



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

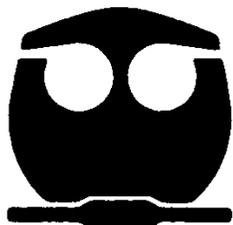
FACULTAD DE QUÍMICA

**POTENCIAL ALELOQUÍMICO DEL ENDÓFITO *EDENIA  
GOMEZPOMPAE* SOBRE DIFERENTES COMUNIDADES DE  
HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS TROPICALES.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

**P R E S E N T A  
CLAUDIO MELÉNDEZ GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents

**VOCAL:** Dr. José Fausto Rivero Cruz

**SECRETARIO:** Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

**1er. SUPLENTE:** M. en C. Isabel Del Carmen Rivero Cruz

**2° SUPLENTE:** Dra. Ana Luisa Anaya Lang

LABORATORIO DE ALELOPATÍA,  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA.  
UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

DRA. ANA LUISA ANAYA LANG

**SUSTENTANTE:**

---

CLAUDIO MELÉNDEZ GONZÁLEZ

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se realizó con el apoyo económico otorgado por el proyecto *Papel de los hongos endófitos en la defensa de las plantas*, PAPIIT IN230107, cuya responsable es la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, a quien agradezco la beca que me proporcionó.

A mi asesora la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava por su enorme apoyo y motivación, y por el cariño y calidez que siempre me brindó.

A la Q.A. Blanca Hernández Bautista por su ayuda y apoyo desinteresados, y por su cariño y por su preocupación por mi.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang por su asesoría para culminar con mi trabajo de tesis, y por su amistad y motivación.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por su colaboración y buenos consejos.

A la Biol. Carmen Loyola Blanco por su apoyo para obtener el material fotográfico.

A mis compañeros del Laboratorio de Alelopatía con quienes he pasado momentos muy gratos, en especial a Jordi Murià y Rosa Sánchez por su sincera amistad, su comprensión y apoyo.

A Paty por su cariño y amistad, y a toda su familia por la hospitalidad y apoyo que me brindaron.

A mis amigos del árbol, por estos años maravillosos, los viajes, los viernes: Carlos, Manuel, Esaú, Erick, Gaby, Arturo, Norma y Daniela, Enrique y Victor, Karla T., Ulises, Javis, Alondra, Jonathan, Alejandro, Miguel, Jeza, Karla V., Raquel, Jesús.

A mi queridísimo amigo Alfredo Cruz, que me enseñó que no hay que buscar maravillas en el mundo si no ver al mundo con maravilla.

A mí querida amiga Flor Sierra G., por su amistad, cariño y confianza.

Agradezco haberlos conocido y que hayan compartido su vida junto con la mía. Le agradezco no solo a aquellos que han estado conmigo largos años, sino también a aquellos que pudieron ofrecerme, una palabra, una sonrisa, una mirada tan solo; y aunque con el tiempo se borre su recuerdo, forman parte de mi historia, y en menor o mayor grado son el origen de todo lo que soy, y la razón misma de mi justa existencia. Y resulta absurdo pensar, si quiera suponer, que pude haber sido más feliz al lado de otras personas. Son ustedes para mí, por siempre, el principio y fin de la vida y la felicidad sobre esta tierra.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo esta dedicado a mi familia: mi madre María Luisa González, mi padre José Gilberto Meléndez y mis hermanos Antonieta, Antolín, Pablo e Isabel, que siempre me apoyaron y confiaron en mí. Gracias a ellos es posible dar feliz término a esta parte de mi vida.

---



---

**ÍNDICE**

	Página
<b>LISTA DE CUADROS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	9
<b>2.1. RELACIONES ENDÓFITO-PLANTA</b>	9
<b>2.1.1. La ecología y la química</b>	9
<b>2.1.2. Los hongos</b>	10
<b>2.1.2.1. Los hongos endófitos</b>	10
<b>2.2. EL RETO DEL NUEVO MILENIO</b>	14
<b>2.2.1. Los plaguicidas</b>	15
<b>2.3. LOS HONGOS ENDÓFITOS COMO FUENTE POTENCIAL DE PRODUCTOS NATURALES</b>	17
<b>2.3.1. Los productos naturales</b>	17
<b>2.3.1.1. Los productos naturales derivados de hongos endófitos</b>	19
<b>2.3.2. El hongo endófito <i>Edenia gomezpompae</i></b>	20
<b>2.3.2.1. Preusomerinas y palmarumicinas</b>	21
<b>3. HIPÓTESIS</b>	30
<b>4. OBJETIVOS</b>	31
<b>4.1. OBJETIVO GENERAL</b>	31
<b>4.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	31
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b>	33
<b>5.1. MATERIAL FÚNGICO</b>	33
<b>5.2. MICROORGANISMOS DE PRUEBA</b>	33
<b>5.2.1. Microorganismos fitopatógenos</b>	33
<b>5.2.2. Hongos endófitos</b>	33
<b>5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA</b>	34

	Página
<b>5.4. CULTIVO EN MEDIANA ESCALA DEL HONGO <i>E. GOMEZPOMPAE</i></b>	35
<b>5.5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS</b>	36
<b>5.6. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO</b>	36
<b>5.6.1. Métodos cromatográficos generales</b>	36
<b>5.6.2. Fraccionamiento biodirigido</b>	37
<b>5.6.2.1. Separación y purificación de los metabolitos secundarios</b>	38
<b>5.6.2.1.1. Obtención de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)</b>	38
<b>5.6.2.1.2. Obtención de la preusomerina EG<sub>1</sub> (36)</b>	38
<b>5.6.2.1.3. Obtención de la preusomerina EG<sub>4</sub> (86)</b>	38
<b>5.6.2.1.4. Obtención de la preusomerina EG<sub>3</sub> (37), de las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (87), EG<sub>2</sub> (88) y ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (89)</b>	38
<b>5.6.2.1.5. Obtención de la preusomerina EG<sub>2</sub> (38)</b>	40
<b>5.6.2.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los metabolitos secundarios</b>	41
<b>5.6.2.3. Obtención de los derivados acetilados de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (36) y EG<sub>4</sub> (86) y de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)</b>	41
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	43
<b>6.1. CULTIVO EN MEDIANA ESCALA</b>	43
<b>6.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL MICELIO DE <i>E. GOMEZPOMPAE</i></b>	44
<b>6.3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL ENDÓFITO <i>E. GOMEZPOMPAE</i> SOBRE DIFERENTES HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE PLANTAS TROPICALES</b>	45

	Página
<b>6.4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO ACTIVO DEL MICELIO DE <i>E. GOMEZPOMPAE</i></b>	47
<b>6.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES ACTIVAS</b>	48
<b>6.5.1. Caracterización de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (36) y EG<sub>4</sub> (86)</b>	50
<b>6.5.2. Caracterización de las preusomerinas EG<sub>2</sub> (38) y EG<sub>3</sub> (37)</b>	52
<b>6.5.3. Caracterización de las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (87) y EG<sub>2</sub> (88)</b>	61
<b>6.5.4. Caracterización de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)</b>	69
<b>6.5.5. Caracterización del ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (89)</b>	71
<b>6.6. BIOSÍNTESIS DE LAS PALMARUMICINAS Y PREUSOMERINAS</b>	78
<b>6.7. EFECTO DE LOS METABOLITOS PUROS Y LOS DERIVADOS ACETILADOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS</b>	79
<b>6.8. METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>CALLICARPA ACUMINATA</i></b>	83
<b>7. CONCLUSIONES</b>	85
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	87
<b>9. REFERENCIAS</b>	88
<b>10. ANEXO I</b>	97
<b>Espectro 1. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>1</sub> (36)</b>	98
<b>Espectro 2. RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>1</sub> (36)</b>	99
<b>Espectro 3. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>2</sub> (38)</b>	100
<b>Espectro 4. RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>2</sub> (38)</b>	101
<b>Espectro 5. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>3</sub> (37)</b>	102
<b>Espectro 6. RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>3</sub> (37)</b>	103
<b>Espectro 7. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>4</sub> (86)</b>	104
<b>Espectro 8. RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>4</sub> (86)</b>	105
<b>Espectro 9. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina CP<sub>2</sub> (51)</b>	106
<b>Espectro 10. RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina CP<sub>2</sub> (51)</b>	107
<b>Espectro 11. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina CP<sub>17</sub> (64)</b>	108

---

	Página
<b>Espectro 12.</b> RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la palmarumicina CP <sub>17</sub> ( <b>64</b> )	109
<b>Espectro 13.</b> RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la palmarumicina EG <sub>1</sub> ( <b>87</b> )	110
<b>Espectro 14.</b> RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la palmarumicina EG <sub>1</sub> ( <b>87</b> )	111
<b>Espectro 15.</b> RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la palmarumicina EG <sub>2</sub> ( <b>88</b> )	112
<b>Espectro 16.</b> RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la palmarumicina EG <sub>2</sub> ( <b>88</b> )	113

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos	3
<b>Cuadro 2.</b> Principales enfermedades que afectan a los cultivos de trigo, maíz, papa y arroz	16
<b>Cuadro 3.</b> Metabolitos de la clase preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados	23
<b>Cuadro 4.</b> Hongos endófitos aislados de nueve plantas tropicales de la Reserva Ecológica ‘El Edén’, en Quintana Roo	34
<b>Cuadro 5.</b> Fraccionamiento primario del extracto activo del micelio de <i>E. gomezpompae</i>	37
<b>Cuadro 6.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa X	39
<b>Cuadro 7.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa XI	40
<b>Cuadro 8.</b> Rendimientos obtenidos para cada cultivo de 10 L	44
<b>Cuadro 9.</b> Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito <i>Edenia gomezpompae</i>	49
<b>Cuadro 10.</b> Constantes físicas de las preusomerinas <b>36, 38, 37 y 86</b>	55
<b>Cuadro 11.</b> Constantes espectroscópicas de UV, IR, DC y espectrométricas (EM-IE $m/z$ ) de las preusomerinas <b>36, 38, 37 y 86</b>	56
<b>Cuadro 12.</b> Datos espectroscópicos de RMN- $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de las preusomerinas <b>36, 38, 37 y 86</b>	57
<b>Cuadro 13.</b> Datos espectroscópicos de RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de las preusomerinas <b>36, 38, 37 y 86</b>	58
<b>Cuadro 14.</b> Correlaciones observadas en los espectros NOESY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de las preusomerinas <b>36, 38, 37 y 86</b>	59
<b>Cuadro 15.</b> Correlaciones observadas en los espectros HMBC (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de las preusomerinas <b>36, 38, 37 y 86</b>	60
<b>Cuadro 16.</b> Constantes físicas de las palmarumicinas <b>51, 64, 87 y 88</b>	72
<b>Cuadro 17.</b> Constantes espectroscópicas de UV, IR, DC y espectrométricas (EM-IE $m/z$ ) de las palmarumicinas <b>51, 64, 87 y 88</b>	73

	Página
<b>Cuadro 18.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las palmarumicinas <b>51, 64, 87 y 88</b>	74
<b>Cuadro 19.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las palmarumicinas <b>51, 64, 87 y 88</b>	75
<b>Cuadro 20.</b> Correlaciones observadas en los espectros NOESY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las palmarumicinas <b>51, 64, 87 y 88</b>	76
<b>Cuadro 21.</b> Correlaciones observadas en los espectros HMBC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las palmarumicinas <b>51, 64, 87 y 88</b>	77

## LISTA DE GRÁFICOS

	Página
<b>Gráfico 1.</b> Efecto de los extractos de medio de cultivo y micelio (250 µg/mL) sobre el crecimiento radial de <i>A. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia</i> sp. y <i>P. capsici</i>	45
<b>Gráfico 2.</b> Efecto de los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo (250 µg/mL) del hongo endófito <i>E. gomezpompae</i> sobre el crecimiento de catorce de los hongos endófitos aislados de diferentes especies tropicales	46
<b>Gráfico 3.</b> Efecto de la fracciones primarias del extracto orgánico del micelio (250 µg/mL) del hongo endófito <i>E. gomezpompae</i> sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Alternaria solani</i>	48
<b>Gráfico 4.</b> Efecto de las preusomerinas EG <sub>1</sub> ( <b>36</b> ), EG <sub>2</sub> ( <b>38</b> ), EG <sub>3</sub> ( <b>37</b> ) y EG <sub>4</sub> ( <b>86</b> ) y de los derivados acetilados EG <sub>1</sub> ( <b>36a</b> ), EG <sub>1</sub> ( <b>36b</b> ) y EG <sub>4</sub> ( <b>86a</b> ) [100 µg/mL] del hongo <i>E. gomezpompae</i> sobre el crecimiento radial de diferentes microorganismos fitopatógenos	79
<b>Gráfico 5.</b> Efecto de las palmarumicinas CP <sub>2</sub> ( <b>51</b> ) y CP <sub>17</sub> ( <b>64</b> ) y de los derivados acetilados CP <sub>2</sub> ( <b>51a</b> ), CP <sub>17</sub> ( <b>64a</b> ) y CP <sub>17</sub> ( <b>64b</b> ) [100 µg/mL] del hongo <i>E. gomezpompae</i> sobre el crecimiento radial de diferentes microorganismos fitopatógenos	82

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura química de fungicidas naturales y sintéticos del grupo estrobilurina	18
<b>Figura 2.</b> <i>Edenia gomezpompae</i> aislado de las hojas de <i>Callicarpa acuminata</i> .	21
<b>Figura 3.</b> Estructuras de las preusomerinas EG <sub>1</sub> ( <b>36</b> ), EG <sub>2</sub> ( <b>38</b> ), EG <sub>3</sub> ( <b>37</b> ) y EG <sub>4</sub> ( <b>86</b> )	52
<b>Figura 4.</b> Estructuras de las palmarumicinas EG <sub>1</sub> ( <b>87</b> ), EG <sub>2</sub> ( <b>88</b> ), CP <sub>2</sub> ( <b>51</b> ) y CP <sub>17</sub> ( <b>64</b> )	68
<b>Figura 5.</b> Vista estereoscópica de la palmarumicina EG <sub>2</sub> ( <b>88</b> )	68
<b>Figura 6.</b> Vista estereoscópica de la palmarumicina CP <sub>2</sub> ( <b>51</b> )	70
<b>Figura 7.</b> Vista estereoscópica de la palmarumicina CP <sub>17</sub> ( <b>64</b> )	71
<b>Figura 8.</b> Estructura del ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona ( <b>89</b> )	71
<b>Figura 9.</b> Biosíntesis propuesta para las palmarumicinas y preusomerinas	78
<b>Figura 10.</b> Derivados acetilados de las preusomerinas EG <sub>1</sub> ( <b>36</b> ) y EG <sub>4</sub> ( <b>86</b> )	81
<b>Figura 11.</b> Derivados acetilados de las palmarumicinas CP <sub>2</sub> ( <b>51</b> ) y CP <sub>17</sub> ( <b>64</b> )	83
<b>Figura 12.</b> Metabolitos secundarios de <i>Callicarpa acuminata</i>	84

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm	Centímetros
COSY	Correlation spectroscopy (espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo-papa-dextrosa
DC	Dicroísmo circular
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DEPT	Decouplete enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
DF	Distrito Federal
EU	Estados Unidos
EM	Espectroscopía de masas
eV	Electrón-volts
Ras- FPTasa	Farnesil fosfotransferasa de Ras
g	Gramos
Kg	Kilogramos
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L	Litros
M <sup>+</sup>	Ion molecular
m/z	Unidades de masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MHz	Mega hercios
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Mult.	Multiplicidad

---

---

nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy (espectro del efecto nuclear de Overhauser)
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
Oxid.	Oxidación
p.f.	Punto de fusión
PDA	Papa-dextrosa-agar
Red.	Reducción
Ref.	Referencia
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
t	Triple
TMS	Tetrametilsilano
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
$\epsilon$	Constante de absorptividad molar
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda_{\max}$	Longitud de onda de máxima absorción
$\nu_{\max}$	Frecuencia máxima
$[\alpha]_D$	Rotación óptica

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos están representados por una amplia variedad de especies de micromicetos que colonizan los tejidos de su planta hospedera sin causar síntomas aparentes de enfermedad, desarrollando con ésta una relación de antagonismo, comensalismo o mutualismo que está equilibrada por la virulencia del hongo y las defensas de la hospedera. En esta relación, los hongos endófitos encuentran un hábitat y alimento dentro de su hospedera, y a cambio, algunos de ellos, disminuyen la probabilidad de enfermedad de la planta por patógenos, gracias a los metabolitos secundarios que producen, a la vez que incrementan las defensas químicas de su hospedera contra patógenos, competidores y factores adversos del ambiente (Arnold *et al.*, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Gunatilaka, 2006).

Investigaciones recientes indican que los hongos endófitos son ubicuos dentro del reino vegetal, y dado que existen más de 300 mil especies de plantas y que sólo una pequeña proporción de hospederos ha sido examinada, sobre todo en nuestro país, los hongos endófitos representan un vasto campo de estudio tanto de las relaciones endófito-planta como de su potencial como fuente de nuevas moléculas (Faeth, 2002; Strobel *et al.*, 2004; Gunatilaka, 2006; Ganguli y Deshmukh, 2007; Webster y Weber, 2007).

Debido a su elevada diversidad biológica y metabólica, los hongos endófitos han sido denominados por Strobel y Daysi (2004) como una mina de oro de metabolitos secundarios. En el cuadro 1 se muestra una parte de la gran diversidad de especies de hongos endófitos aislados, así como de sus metabolitos secundarios y la actividad biológica de éstos.

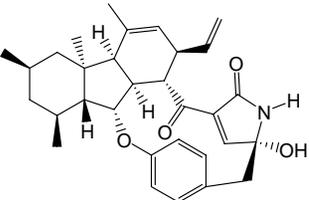
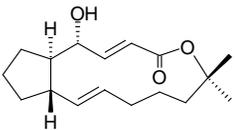
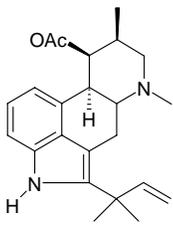
El presente trabajo de tesis se desarrolló como parte de un proyecto a largo plazo que pretende estudiar la biodiversidad de hongos endófitos de especies de plantas de la selva semi-decidua y la vegetación secundaria de la Reserva Ecológica 'El Edén', Quintana Roo. El proyecto comprende aspectos de la ecología química de los hongos endófitos y su potencial antagónico (Saucedo, 2004; Saucedo, 2006; Murià, 2007; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008). El estudio de este tipo de organismos permite el descubrimiento de especies desconocidas hasta el momento y contribuye al conocimiento de la diversidad fúngica de México. Además, permite entender la función ecológica de los hongos endófitos en la

naturaleza, así como profundizar en la comprensión de las relaciones hospedero-endófito y el papel que desempeñan los productos de su metabolismo secundario en dicha relación.

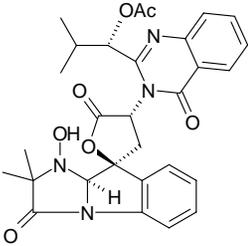
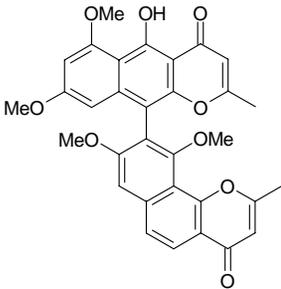
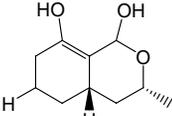
Por otra parte, este conocimiento abre posibilidades promisorias de aplicación racional de la diversidad fúngica en materia agrícola, ya que existe la oportunidad de utilizar a los hongos como agentes de biocontrol y como fuente de novedosas sustancias químicas con actividad biológica y uso potencial como reguladores de crecimiento y plaguicidas naturales biodegradables y, en lo posible, con menor impacto ambiental. Además de su posible uso en medicina y en la industria, como productos naturales o prototipos para síntesis de nuevas moléculas.

En este contexto, el presente proyecto de tesis se desarrolló con la finalidad de: 1) estudiar el potencial aleloquímico de un hongo endófito nuevo para la ciencia: *Edenia gomezpompae*, sobre diferentes hongos endófitos aislados de nueve plantas tropicales; 2) aislar los aleloquímicos responsables de la actividad biológica demostrada por *E. gomezpompae* que pueden ser parte de sus mecanismos químicos de defensa.

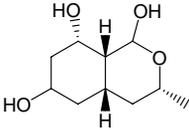
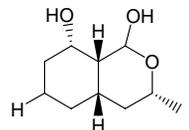
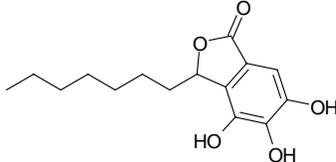
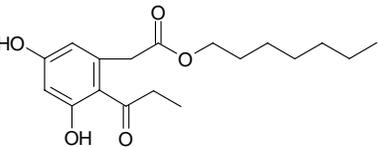
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Acremonium zeae</i> (NRRL 13540) (Hypocreales mitospórico)</p>	<p><i>Zea mays</i> L. (Poaceae)</p>	 <p>(1) Pirrocidina A</p>	<p>Antifúngico, antibacteriano</p>	<p>Wicklow, 2005 He, 2002</p>
<p><i>Aspergillus clavatus</i> cepa H-037 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Taxus mairei</i> y <i>Torreya grandis</i> (Taxaceae)</p>	 <p>(2) Brefeldina A</p>	<p>Antifúngico, antiviral, anticancerígeno, manejo de malezas</p>	<p>Betina, 1992 Vurro, 1998 Zhu, 2000</p>
<p><i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>(3) Fumigaclavina C</p>	<p>Antifúngico, micotoxina</p>	<p>Liu, 2004 Cole, 1997</p>

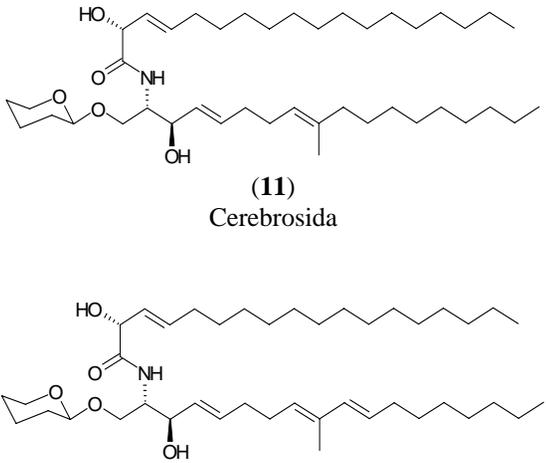
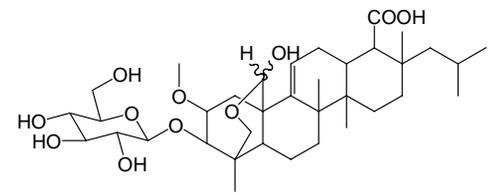
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios de hongos endófitos con actividad biológica (continuación)

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)	 <p>(4) Fumitremorgina C</p>	Antifúngico, micotoxina	Liu, 2004 Cole, 1997
<i>Aspergillus niger</i> IFB-E003 (Trichocomaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)	 <p>(5) Fonsecinona A</p>	Antifúngico, inhibidor de xantina oxidasa	Song, 2004
<i>Botrytis sp.</i> (Sclerotiniaceae)	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)	 <p>(6) Ramulosina</p>	Antibiótico	Stierle, 1998

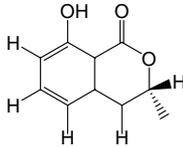
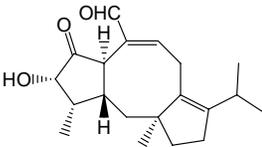
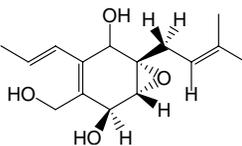
Cuadro 1. Metabolitos secundarios de hongos endófitos con actividad biológica (continuación)

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Botrytis sp.</i> (Sclerotiniaceae)	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)	 <p>(7) 6-hidroxiiramulosina</p>  <p>19 (8) 8-dihidroramulosina</p>	Antibiótico	Stierle, 1998
<i>Cytospora sp.</i> CR 200 (Valsaceae)	<i>Conocarpus erecta</i> (Combretaceae)	 <p>(9) Citosporona E</p>  <p>(10) Citosporona B</p>	Antibacteriano  Antifúngico citotóxico	Brady, 2000  Brady, 2000 Xu, 2004

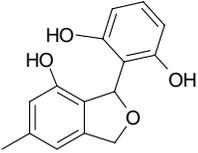
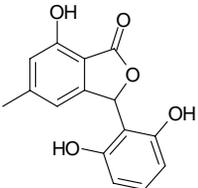
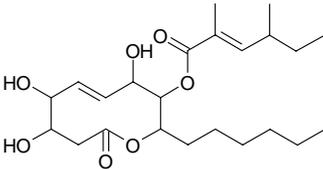
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios de hongos endófitos con actividad biológica (continuación)

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Fusarium sp.</i> IFB-121 (Hypocreales mitosporico)</p>	<p><i>Quercus variabilis</i> (Fagaceae)</p>	 <p>(11) Cerebrosida</p> <p>(12) Fusarusida</p>	<p>Antibacteriano, inhibidor de xantina oxidasa</p>	<p>Shu, 2004</p>
<p><i>Hormonema sp.</i> ATCC 74360 (Dothioraceae)</p>	<p><i>Juniperus communis</i> (Cupressaceae)</p>	 <p>(13) Enfumafungina</p>	<p>Antifúngico</p>	<p>Pelaez, 2000</p>

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios de hongos endófitos con actividad biológica (continuación)

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Penicillium janczewskii</i> (Trichocomaceae)	<i>Prumnopitys andina</i> (Podocarpaceae)	 <p>(14) Meleina</p>	Antibacteriano, antiviral, fitotóxico	Schmeda-Hirschmann, 2005 Dai, 2001 Krohn, 1997 Parisi, 1993 Kusano, 2000 He, 2000
<i>Periconia sp.</i> OBW-15 (Halosphaeriaceae)	<i>Taxus cuspidata</i> (Taxaceae)	 <p>(15) Periconicina A</p>	Antimicótico, inhibidor del crecimiento radicular y de la elongación del hipocótilo (a bajas conc. estimulante del crecimiento radicular)	Kim, 2004
<i>Pestalotiopsis jesteri</i> (Amphisphaeriaceae)	<i>Fragraea bodenii</i> (Gentianaceae)	 <p>(16) Jesterona</p>	Antifúngico	Li, 2001

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios de hongos endófitos con actividad biológica (continuación)

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Amphisphaeriaceae)	<i>Terminalia morobensis</i> (Combretaceae)	 <p>(17) Pestacina</p>  <p>(18) Isopestacina</p>	Antimicótico, antioxidante	Harper, 2003 Li, 2001
<i>Phomopsis</i> sp. (Valsaceae)	<i>Erythrina crista-galli</i> (Fabaceae)	 <p>(19) Fomol</p>	Antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, ligeramente citotóxico	Weber, 2004

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. RELACIONES ENDÓFITO-PLANTA**

#### **2.1.1. La ecología y la química**

La ecología, como ciencia que estudia la estructura y función de la naturaleza, analiza la influencia que tienen los factores del ambiente (humedad, temperatura, luz, salinidad, nivel de nutrimentos, factores bióticos, entre otros) sobre el desarrollo de una especie o población (autoecología), y describe los fenómenos de interacción dentro de una comunidad de especies, como un proceso dinámico regulado (sinecología) [Anaya, 2003]. Aunque se ha acostumbrado a tratar ambas vertientes por separado, la finalidad de la ecología es estudiar a la naturaleza como un ente multiorgánico donde convergen estímulos bióticos y abióticos que representan la fuerza que lo mantiene vivo y lo impulsa al cambio.

Expuesto de esta forma, el propósito de la ecología no es una tarea fácil, por lo que requiere de la integración de muchas ciencias, tales como la biología animal y vegetal, la taxonomía, la fisiología, la genética, la meteorología, la conducta, la edafología, la geología, la sociología, la antropología, la física, la química, las matemáticas y la electrónica, entre otras (Anaya, 2003). Sin embargo, el avance de la ecología está circunscrito a la velocidad del desarrollo de algunas de estas disciplinas.

Indiscutiblemente, un parte aguas de la ciencias biológicas fue el descubrimiento del mundo microscópico en el siglo XVII, que favoreció el salto hacia el espacio celular en el cual, más tarde, la bioquímica y la química darían cuenta de la importancia que tienen las moléculas como portadoras de información en la comunicación entre células y entre organismos. De esta forma, las interacciones entre los organismos toman un nivel de significancia mayor, explicando los cambios fisiológicos en un organismo a razón del ambiente químico que le circunda.

En este contexto, la ecología se conjuga con la química como una herramienta con la capacidad para elucidar la naturaleza de los compuestos responsables de la interacción entre organismos de distinta especie, también llamados aleloquímicos. Estas moléculas provenientes del metabolismo secundario de los organismos surgieron presumiblemente como productos de desecho derivados del metabolismo primario, los cuales, a través de la

evolución, fueron adoptando un papel primordial en el lenguaje, complejo y especializado, entre los organismos. De esta manera, la ecología química investiga la organización y regulación de la naturaleza, desde el punto de vista de las relaciones químico-biológicas que ocurren entre los organismos.

### **2.1.2. Los hongos**

Los hongos son organismos cosmopolitas que han colonizado una gran variedad de nichos ecológicos; se les encuentra en zonas con climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados, semidesérticos, desérticos y aún en los fríos, desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 4000 metros; son organismos de vida libre y asociados con una amplia variedad de otros seres vivos (Herrera y Ulloa, 1990). Algunas de las formas en que se desarrollan son como saprófitos, endófitos, epífitos, micorrizógenos, patógenos y de vida libre. Junto con las bacterias, los hongos forman una parte importante de los ecosistemas. Por ejemplo, los que habitan en el suelo intervienen en la desintegración de un gran número de desechos (excrementos, excreciones, cadáveres animales y restos vegetales) los cuales aprovechan ellos mismos, dejando el resto para ser aprovechado por plantas y otros organismos. Por otra parte, los hongos simbiotes son indispensables para el óptimo desarrollo de otras especies, como es el caso de los hongos micorrizógenos que participan en la nutrición de las plantas aportando nutrimentos y factores de crecimiento (Herrera y Ulloa, 1990).

#### **2.1.2.1. Los hongos endófitos**

A nivel mundial, se considera que existen, según cálculos conservadores, más de 1.5 millones de especies de hongos, de los cuales se conocen apenas cerca del 5% (Guzmán, 1998; Hawksworth, 2001). De éstos, los hongos endófitos, que colonizan asintóticamente los órganos de las plantas, representan una porción prácticamente inexplorada. Se calcula que tan sólo los hongos endófitos podrían alcanzar 1.62 millones de especies, considerando la diversidad de plantas y el número de especies de hongos asociados a ellas. Esta clase de hongos, como todas las demás, constituyen una fuente importante de nuevas moléculas bioactivas, no sólo de interés agrícola, sino también médica e industrial (Gunatilaka, 2006; Webster y Weber, 2007).

Las especies de plantas de las que se han logrado aislar hongos endófitos incluyen aquellas que crecen en bosques tropicales, templados y boreales, plantas herbáceas de diversos hábitats, musgos y helechos, angiospermas y gimnospermas, lo cual evidencia su ubicuidad en el reino vegetal (Faeth, 2002; Strobel *et al.*, 2004). Cabe destacar que existen aproximadamente 300 mil especies de plantas, cuya diversidad de microbiota interna es relativamente alta y, dado que una proporción comparativamente pequeña de potenciales hospederos ha sido examinada, los endófitos representan un número substancial de especies de hongos aún por descubrir (Tan y Zou, 2001; Mueller, 2004; Ganguli y Deshmukh, 2007).

Los hongos endófitos se pueden clasificar basándose en el tipo de colonización que realizan en: *micorrizas*, que colonizan la raíz; *balansiaseos* (endófitos de los pastos), que colonizan sistémicamente a sus hospederos; y *no balansiaseos* (endófitos de las plantas leñosas), que se limitan a colonizar órganos o células específicas (Shulz y Boyle, 2005).

Comúnmente, se considera a las micorrizas como hongos endófitos; sin embargo, es un tema que se encuentra en discusión, por que si bien las micorrizas colonizan asintóticamente los tejidos de la raíz de su hospedera, también poseen una parte que está en contacto con el suelo e incluso con la raíz de otra planta (Herre *et al.*, 2007). En años recientes, se ha hecho énfasis en el estudio de la relación entre los hongos micorrizógenos y las plantas, el cual ha revelado la importancia que tienen sobre la nutrición y el desarrollo de la hospedera. Gasoni y Stegman (1997) analizaron la influencia del hongo *Cladorrhinum foecundissimum* que coloniza las raíces de la planta de algodón (*Gossypium hirsutum*), y encontraron que este endófito aumenta el crecimiento de la planta, presumiblemente por incremento en el transporte de nutrimentos como el fósforo. El hongo *Piriformospora indica* promueve el crecimiento de *Adhatoda vasica*, una planta de interés medicinal (Rai y Varma, 2005). Inclusive se ha explorado la posible aplicación de los hongos endófitos en la agricultura como promotores de crecimiento. Por ejemplo, el hongo *Glomus intraradices*, al colonizar las raíces de la planta de maíz, incrementa la producción del ácido indol-3-butírico, una fitohormona del crecimiento (Kaldorf y Ludwig, 1999).

La relación entre los hongos endófitos y las gramíneas es la más estudiada y mejor comprendida debido a la importancia económica de muchos pastos. Se considera que algunos de estos hongos viven en simbiosis con su hospedera, al grado de funcionar como

un sólo organismo. Dentro de la planta encuentran su hábitat y alimento, y en retribución, algunos de ellos, a través de sus metabolitos secundarios, incrementan las cualidades de competitividad y la resistencia de la planta a factores ambientales bióticos y abióticos (Schulz y Boyle, 2005; Gunatilaka, 2006). Se sabe que algunos endófitos proveen de protección a su hospedero contra la herbivoría, gracias a los alcaloides que producen, los cuales son responsables, por ejemplo, del envenenamiento del ganado. Diversos pastos, entre ellos *Festuca arundinacea*, se desarrollan mejor y aumentan su dominancia dentro de las comunidades en que viven, cuando se encuentran infectados con el endófito *Neotyphodium coenophialum* (Clay y Holand, 1999). Algunos hongos, como *Chaetomium* spp. y *Phoma* sp., que colonizan endofíticamente las plantas de trigo (*Triticum* sp.), reducen la cantidad de pústulas ocasionadas por el hongo patógeno *Puccinia recondita* (Dincgle y McGee, 2003). Redman (2002) encontró que el hongo endófito *Curvularia* sp. incrementa la tolerancia de su hospedera a temperaturas superiores a 65 °C.

Los géneros de endófitos de gramíneas son restringidos, principalmente *Neotyphodium* y *Ephelis* y anamorfos de los ascomicetes *Epichloë* y *Balansia* (Shulz y Boyle, 2005). Dentro de la hospedera, los hongos detienen su reproducción por esporas, así que la propagación la realizan de forma vertical al alojarse dentro de las semillas, aunque la infección es factible por penetración del hongo a través de los estomas y heridas en otros órganos de los pastos (Faeth, 2002).

El papel ecológico de los hongos endófitos de plantas leñosas es poco conocido y existen pocos estudios al respecto (Arnold *et al.*, 2003). Además, su papel no es tan claro como el de los endófitos de pastos, debido principalmente a dos factores: 1) existe una amplia variedad de especies de hongos que colonizan simultáneamente a una planta, y 2) como esta colonización es limitada y no sistémica como en las gramíneas, es difícil asegurar que los metabolitos secundarios producidos por los cultivos de los hongos *in vitro* formen parte de las defensas químicas de la hospedera. Sin embargo, es factible considerar que el total de los hongos endófitos contenido en los órganos de la planta hospedera pudiera dar protección a ésta contra patógenos, por efecto de la competencia y por el fortalecimiento de las defensas químicas de la hospedera (Arnold *et al.*, 2003). Evans y colaboradores (2003) observaron que la pérdida de biodiversidad fúngica interna incrementa la susceptibilidad a plagas y patógenos en individuos de *Theobroma cacao*

extraídos de su ambiente de origen, aludiendo a la importancia de los endófitos de plantas nativas del bosque como promotores de la resistencia natural contra patógenos.

La biodiversidad de los hongos endófitos de las plantas leñosas es versátil y se incrementa proporcionalmente a la edad de las hojas y a la biodiversidad del lugar. Las especies de hongos involucradas, en su mayoría ascomicetes y deuteromicetes, son muy variables al igual que la especificidad con su hospedero; algunas especies se comportan como hospedero-específicos e incluso como órgano-específicos, mientras que otras se comportan como generalistas (*Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Xylaria* spp., *Phomopsis* spp.) [Carrol, 1988; Strobel y Daysi, 2004].

Shulz y Boyle (2005) sugieren que la relación entre los endófitos y su hospedera no es una relación neutra, sino que se establece un equilibrio antagónico entre las defensas de la hospedera y los factores de virulencia del hongo. De manera que la hospedera limita el desarrollo del hongo, el cual se comporta como un patógeno latente u oportunista y cuando se reducen las defensas de la planta por estrés o senescencia, la virulencia del hongo aumenta y sobreviene la enfermedad.

El origen de los hongos endófitos parece ser diverso, ya que existen especies que se han adaptado específicamente al microambiente de la hospedera en un proceso de coevolución, al grado de perder su capacidad de formar estructuras de reproducción e incluso compartir genes que les permiten producir alguno de los tipos de metabolitos secundarios que su hospedero produce; éste es el caso del hongo *Taxomyces andreanae*, endófito del árbol *Taxus brevifolia*, que es capaz de sintetizar taxol al igual que su hospedero (Tan y Zou, 2003; Strobel y Daysi, 2004). Incluso hay especies de endófitos que no es posible aislar con los medios de cultivo convencionales por tener una fuerte dependencia a su planta hospedera. Sin embargo, también se han considerado como endófitos las especies de hongos fitopatógenos que han perdido sus factores de virulencia (Redman *et al.*, 1999), y los saprófitos y fitopatógenos, que pasan parte de su ciclo de vida como endófitos (Mueller y Bills, 2004; Herre *et al.*, 2007; Ganguli y Deshmukh, 2007).

México se encuentra entre los cinco países con mayor biodiversidad, con hábitats desde clima desértico hasta selva tropical y con una gran cantidad de especies endémicas (cactáceas y reptiles principalmente). Posee unas 200 000 especies de plantas vasculares y tan sólo se ha explorado la microbiota interna de unas cuantas, lo cual sitúa a nuestro país

como un vasto campo de estudio, en nuestro caso particular, el de las relaciones entre los hongos asociados a plantas y el del descubrimiento de novedosas especies fúngicas.

## **2.2. EL RETO DEL NUEVO MILENIO**

En el siglo pasado, de 1950 a 2000 la población mundial aumentó su número, de 2 mil 500 millones a 6 mil millones de habitantes, y se estima que la población crecerá ligeramente menos en los próximos 50 años, de 2000 a 2050. Es así que se requiere de un incremento en la demanda de cosechas del 50% para el año 2020, para la alimentación tanto de humanos como de animales (Plantegenest *et al.*, 2007; Gilligan, 2008). Evidentemente, el incremento en la demanda de alimentos determina la necesidad de optimizar las áreas de cultivo, la creación de nuevas áreas agrícolas, y el uso racional de abonos y plaguicidas para protección e incremento del rendimiento en las cosechas. (Montesinos, 2003; Carvalho, 2006; Knowles, 2008).

Las pérdidas en las cosechas durante el cultivo o durante el almacenamiento de productos agrícolas, alcanzan de 38% a 48% de la producción mundial y están ocasionadas por factores bióticos como las plagas, las enfermedades y las malezas (Plantegenest *et al.*, 2007; Gilligan 2008). En Estados Unidos, las pérdidas debidas a plagas (insectos, patógenos de plantas y malezas) corresponden aproximadamente a un 37%. Los insectos destruyen un 13%, los patógenos de plantas un 12% y las malezas un 12% de las cosechas (Pimentel, 2005; Fletcher, 2006).

A nivel mundial, los cultivos de trigo, maíz, arroz y papa corresponden al 50% del abasto de alimentos. Estos cultivos, al tener mayores extensiones de siembra, tienen mayor probabilidad de ser atacados por distintas plagas y enfermedades (Waage, 2008). En el cuadro 2 se muestran las principales enfermedades ocasionadas por microorganismos que afectan a estos cultivos e ilustra el amplio margen de posibilidades que tiene estos cuatro importantes cultivos de atacados por plagas.

Actualmente, el hongo *Pyricularia oryzae* (Ascomycete) es el responsable de pérdidas anuales que van del 10% al 30% en los cultivos de arroz, mientras que *Phytophthora infestans* (Oomycete), produce pérdidas superiores a los 5 billones de dólares en los cultivos de papa. Otras especies que causan serios problemas son *Pythium*

*aphanidermatum* y *Pythium myriotylum*, los cuales son responsables del 42% al 62% de la mortalidad del pimiento verde, al ocasionar la putrefacción de las raíces de esta planta (Strange y Scott, 2005).

### **2.2.1. Los plaguicidas**

Los plaguicidas (herbicidas, rodenticidas, fungicidas, alguicidas, insecticidas, molusquicidas, nematocidas y antivirales) son sustancias químicas con la capacidad de erradicar, controlar, repeler o mitigar a los agentes biológicos causantes de pérdidas, ya sea porque causan enfermedad o por herbivoría (plagas) [Margni *et al.*, 2002].

En el siglo veinte, hubo un incremento en el conocimiento de las enfermedades de las plantas y en sus causas. Sin embargo, debido a la ausencia de reglamentación respecto al uso de plaguicidas, las industrias comenzaron a generar una gran cantidad de productos para el control de plagas. En la segunda mitad del siglo, y como consecuencia de la maquinaria industrial desarrollada en la etapa de la posguerra, se introdujeron gran cantidad de fungicidas sintéticos al mercado, compuestos con marcada toxicidad para muchos organismos y con prolongados tiempos de permanencia. Desde finales del siglo XIX hasta nuestros días se han introducido gran variedad de compuestos químicos para el control de hongos fitopatógenos, que al paso del tiempo han mejorado en selectividad y por lo tanto se ha reducido la cantidad necesaria a aplicar por hectárea de cultivo. Un par de décadas después de la integración masiva de plaguicidas sintéticos al mercado agrícola se hizo evidente su daño al ambiente, por lo que se generaron nuevos criterios para seleccionar biorracionalmente los agentes químicos utilizados para el control de plagas. Sin embargo, en países en vías de desarrollo, con deficiente legislación en materia agrícola, aún siguen empleándose plaguicidas que en países desarrollados fueron prohibidos debido a su toxicidad e impacto negativo hacia el medio ambiente (Russell, 2005).

Se conoce una gran cantidad de fungicidas, los cuales suelen ser clasificados como *fumigantes*, *protectores* y *erradicantes* (terapéuticos), de acuerdo a su modo de aplicación; *protectores* y *sistémicos*, según su modo de acción; como *específicos* e *inespecíficos*, con base en su sitio diana de acción; y como *naturales* o *sintéticos*, dependiendo de su fuente de origen.

**Cuadro 2.** Principales enfermedades que afectan a los cultivos de trigo, maíz, papa y arroz (Strange y Scott, 2005)

Cultivo	Enfermedad			
	Hongo	Virus	Bacteria	Oomicete
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> , Trigo de pan; <i>Triticum turgidum</i> , Trigo duro)	Roya del tallo: <i>Puccinia graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> Roya de la hoja: <i>Puccinia recondita</i> f.sp. <i>tritici</i> Roya amarilla: <i>Puccinia striiformis</i> Tizón: <i>Cochliobolus sativus</i> Fusariosis: <i>Fusarium</i> spp. Putrefacción del tallo : <i>Corticium rolfsii</i> Mancha amarilla: <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Oidio: <i>Erysiphe graminis</i> ( <i>Blumeria graminis</i> ) Mancha de la hoja: <i>Mycosphaerella graminicola</i> Quemadura de la hoja: <i>Alternaria</i> spp. Carbón: <i>Ustilago nuda</i> f.sp. <i>tritici</i> Podredumbre de la raíz: <i>Rhizoctonia</i> spp.	Enanismo amarillo: Luteovirus del enanismo amarillo de la cebada	Rayado bacteriano o espiga negra: <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Añublo : <i>Magnaporthe grisea</i> Ojo de pájaro o mancha marrón : <i>Cochliobolus miyabeanus</i> Plaga de la vaina: <i>Rhizoctonia solani</i>	Enfermedad del arroz tungro: Machlovirus esférico tungro del arroz, Badnavirus baciliforme tungro del arroz. Enanismo amarillo. Luteovirus del enanismo amarillo de la cebada.	Plaga bacteriana de la hoja: <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	
Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Quemadura temprana: <i>Alternaria solani</i> Viruela de la papa: <i>Rhizoctonia solani</i>	Enrollamiento de la hoja: virus del enrollamiento de hoja de la papa (Luteovirus) Mosaico severo, rugoso: Virus X de la papa (Potexvirus), Virus Y de la papa (Potyvirus)	Marchitez bacteriana: <i>Ralstonia solanacearum</i> Pie negro: <i>Erwinia carotovora</i> Sarna común <i>Streptomyces scabies</i> Pudrición anular: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Tizón tardío: <i>Phytophthora infestans</i> Pudrición rosada: <i>Phytophthora erythroseptica</i>
Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Tizón norteño: <i>Helminthosporium turcicum</i> ( <i>Setosphaeria turcica</i> ) Tizón del sur: <i>H. maydis</i> ( <i>Cochliobolus heterostrophus</i> ) Roya: <i>Puccinia</i> spp. Tizón: <i>Ustilago zeae</i> Pudrición del tallo: <i>Gibberella zeae</i> , <i>Diplodia</i> spp.	Enanismo clorótico: Machlovirus del enanismo clorótico Enanismo clorótico: Machlovirus del enanismo clorótico Enanismo amarillo: Luteovirus del enanismo amarillo de la cebada	Marchitamiento de Stewart: <i>Erwinia stewartii</i> Achaparramiento del maíz: <i>Spiroplasma kunkelii</i>	Moho lanoso: <i>Sclerospora</i> spp.

El uso indiscriminado de pesticidas a lo largo del siglo pasado y hasta nuestros días acarrea consecuencias graves al medio ambiente, contaminando mantos acuíferos, suelo y aire y afectando con ello la vida de los organismos que allí se desarrollan (Gavrilescu, 2005; Arias, 2008; Chowdhury, 2008). Se estima que 4 millones de toneladas de plaguicidas son aplicadas a cultivos anualmente en el mundo, pero menos del 1% alcanza el organismo diana, por lo que una gran cantidad queda disponible para distribuirse en el ambiente y dañar severamente las cadenas tróficas (Gavrilescu, 2005).

### **2.3. LOS HONGOS ENDÓFITOS COMO FUENTE POTENCIAL DE AGENTES ANTIFÚNGICOS**

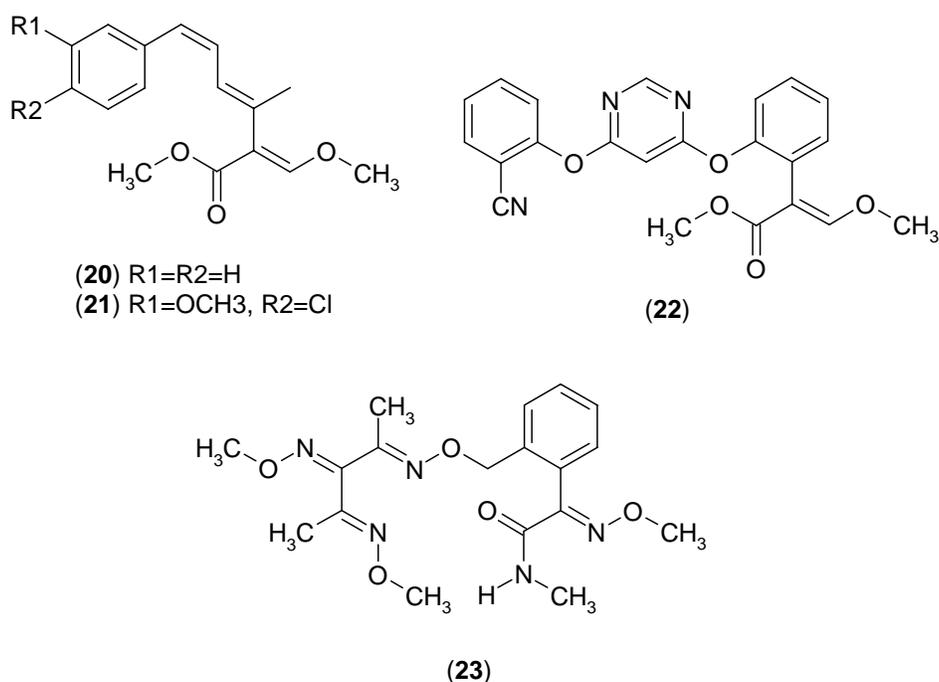
#### **2.3.1. Los productos naturales**

Debido a las implicaciones de los fungicidas sintéticos como contaminantes ambientales y como tóxicos para mamíferos y humanos, se han desarrollado nuevas estrategias para combatir el problema de las plagas en los cultivos agrícolas con la intención de retirar del mercado a muchos de los fungicidas sintéticos más perjudiciales. Estas estrategias incluyen la rotación de los cultivos, la aplicación de agentes de biocontrol y el uso de agroquímicos de origen natural (Montesinos, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Fravel, 2005; Rimando, 2006).

La ventaja que ofrecen los productos naturales como fuente o modelo para plaguicidas, en comparación con los fungicidas sintéticos, es que tienen un menor tiempo de vida en el ambiente, son más específicos, las estructuras generadas por la naturaleza son mucho más variadas y complejas que aquellas generadas incluso por la química combinatoria. Sin embargo, la complejidad de algunas sustancias activas es muy alta, lo cual dificulta o imposibilita su síntesis (Rimando, 2006). Por otra parte, la naturaleza representa una fuente casi inagotable de moléculas nuevas, con actividades biológicas diversas y, actualmente, con el aumento en la sensibilidad de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas, se ha facilitado el proceso de purificación y caracterización de los productos naturales; y con los recientes avances en biotecnología, es posible mejorar las características del organismo productor para incrementar el rendimiento. Por lo anterior y, debido al fracaso de la química combinatoria, los productos naturales están tomando un nuevo auge y se están explorando organismos de nichos

ecológicos altamente competitivos, con la finalidad de obtener moléculas bioactivas. Tal es el caso de la investigación de los microorganismos asociados a plantas (microorganismos de la rizósfera y endófitos), de los hongos coprófilos y de los actinomicetos del lecho marino, por mencionar algunos (Rimando, 2006).

Los fungicidas de la familia de la estrobilurina son un buen ejemplo de productos naturales con mecanismos de acción novedosos y exitosos en el combate contra las plagas de hongos. Las estrobilurinas A (**20**) y B (**21**) fueron aisladas del hongo de la madera podrida *Strobilurus tenacellus* (Basidiomycetae). Pertenecen al grupo de los inhibidores de quinonas externas, fungicidas de amplio espectro que bloquean el flujo de electrones de un segmento del citocromo bc1 en el complejo III de la cadena respiratoria en la mitocondria fúngica. Posteriormente, se prepararon los derivados sintéticos azoxistrobina (**22**) y orisastrobina (**23**) (Figura 1), siendo el primero de ellos, el fungicida más vendido en el mundo debido, en gran parte, a que en estudios de toxicidad agudos y subagudos ha demostrado ser seguro para los humanos. Sin embargo, como es de esperarse, ya se han reportado cepas resistentes a estos compuestos (Yamaguchi, 2005; Rimando, 2006; Ravenzwaay, 2007).



**Figura 1.** Estructura química de fungicidas naturales y sintéticos del grupo de la estrobilurina

### 2.3.1.1. Los productos naturales derivados de hongos endófitos

Históricamente, los mayores productores de metabolitos secundarios son los hongos y los actinomicetos. Se han descrito cerca de 8600 compuestos bioactivos de hongos, de los cuales 4900 son antibióticos y 3700 presentan otras actividades (Ganguli y Deshmukh, 2007). En particular, los metabolitos aislados de hongos endófitos poseen una gran diversidad química, incluyendo esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados del perileno, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipéptidos y citocalacinas (Schulz y Boyle, 2005). Asociada a la diversidad estructural de estos productos naturales, sobreviene su pluralidad funcional y por lo tanto su potencial como posibles agentes plaguicidas y reguladores del crecimiento en agricultura (Strobel *et al.*, 2004). En el cuadro 1 (Introducción) se ilustran algunos metabolitos secundarios con actividad antifúngica producidos por hongos endófitos.

La diversidad metabólica de los hongos endófitos se sustenta en que éstos se han desarrollado en un proceso coevolutivo con las plantas. Son organismos que se han especializado en un nicho biológico (los tejidos de las plantas), que si bien los protegen del ambiente externo, los sitúan en un ambiente extremadamente competitivo, en el cual deben luchar por alimento y espacio con otros organismos endófitos y, además, contender contra las defensas químicas de la planta hospedera. Este estrés biótico dentro de la hospedera es el motor que impulsa la constante y exhaustiva innovación química que han desarrollado los hongos endófitos a lo largo de la evolución y, al mismo tiempo, cada planta hospedera representa un microhábitat único en el que se desarrolla un número limitado de organismos endófitos, lo cual implica que la diversidad metabólica de los hongos endófitos es tan amplia como la de las especies de plantas hospederas (Strobel *et al.*, 2004; Heinz *et al.*, 2006; Ganguli y Deshmukh, 2007).

La propiedad de los microorganismos endófitos de mejorar los mecanismos de resistencia de la planta hospedera y defenderla de posibles enemigos, permite plantear estrategias de selección de los posibles hospederos para incrementar la posibilidad de aislar hongos endófitos con amplia actividad biológica. Strobel y Daysi (2004) describen algunas de estas estrategias para seleccionar los especímenes vegetales:

1. Plantas que viven en situaciones ambientales únicas, especialmente aquellas con una biología inusual y que poseen novedosas estrategias de supervivencia.

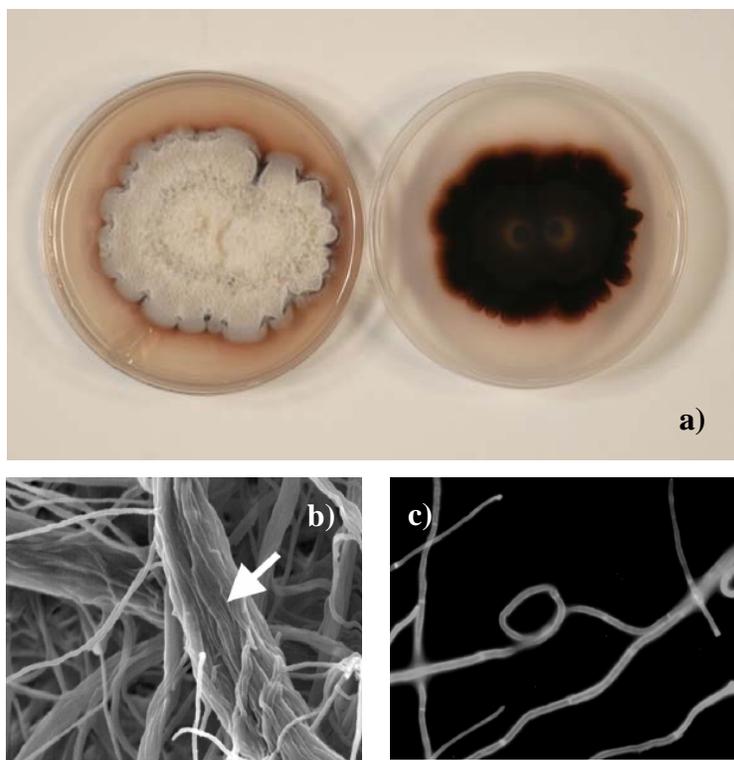
2. Plantas que tienen un antecedente etnobotánico (con un uso utilitario).
3. Plantas que son endémicas, que tienen una inusual longevidad o que han ocupado cierta extensión de tierra desde la antigüedad.
4. Plantas que crecen en áreas con gran biodiversidad que, probablemente, alojan endófitos también con gran biodiversidad.

### **2.3.2. El hongo endófito *Edenia gomezpompae***

El hongo endófito *Edenia gomezpompae* es un ascomiceto cuyo género y especie son de reciente descubrimiento. Hasta el momento el único nicho descrito de este microorganismo son las hojas de *Callicarpa acuminata*. Dado a que este hongo no forma cuerpos fructíferos, su identificación se basó únicamente en su secuencia de ADN ribosomal que permitió clasificarlo dentro de la familia *Pleosporaceae* (Pleosporales) [González *et al.*, 2007].

La morfología del hongo se observó mediante microscopia de luz, microscopia de fluorescencia y microscopia electrónica de barrido. Las colonias sobre papa-dextrosa-agar (PDA) crecen rápidamente, inicialmente blancas y posteriormente de color rosado. El reverso exhibe un color de rojizo-café a café (Figura 2a). Las estructuras de reproducción sexual y asexual son desconocidas. Forma hifas hialinas de pared delgada, rugosas, septadas que frecuentemente presentan ramificaciones en ángulos de 90°, se entrelazan y forman rollos como cuerdas (Figura 2b y 2c) [González *et al.*, 2007].

Durante la realización de un proyecto cuyo objetivo es estudiar la biodiversidad de hongos endófitos asociados a árboles de la reserva ecológica ‘El Edén’ en el Estado de Quintana Roo, investigando también el posible papel ecológico de los metabolitos secundarios bioactivos, *E. gomezpompae* fue aislado de hojas sanas de *C. acuminata*. La selección de la hospedera se efectuó basada en un estudio previo sobre esta especie en el cual se aislaron algunos metabolitos secundarios con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de plantas y microorganismos fitopatógenos (Anaya *et al.*, 2003).



**Figura 2.** *Edenia gomezpompae* aislado de las hojas de *Callicarpa acuminata*

### 2.3.2.1. Preusomerinas y palmarumicinas

En un estudio químico inicial sobre el extracto orgánico del micelio de *E. gomezpompae* realizado por Macías y colaboradores (2008), se identificaron cuatro metabolitos secundarios mayoritarios con actividad antifúngica sobre especies fitopatógenas y endófitas: las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**) y EG<sub>3</sub> (**37**) [dímeros de hidroxi-naftoquinona enlazados por un puente *bis*-espiroacetal], y la palmarumicina CP<sub>2</sub> (**51**) (hetero-dímero de naftalendiol e hidroxinaftoquinona enlazado por un puente espiroacetal).

Cabe mencionar que Martínez y colaboradores (2008) aislaron de las hojas maduras de *Petrea volubilis* L. (Verbenaceae), colectadas en el Parque Nacional de Coiba en Panamá, un hongo endófito caracterizado como *Edenia* sp. El estudio químico permitió el aislamiento y caracterización de cinco metabolitos secundarios con actividad antileishmania: la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**), la palmarumicina CP<sub>2</sub> (**51**), la palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64**), la palmarumicina CP<sub>18</sub> (**85**), y la palmarumicina CJ-12,371 (**57**).

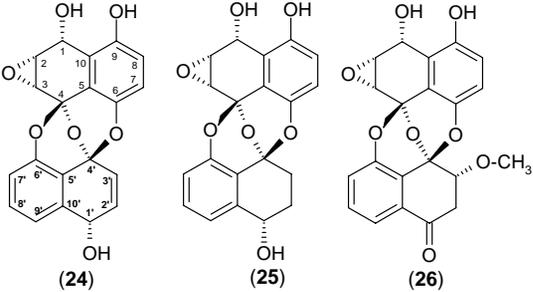
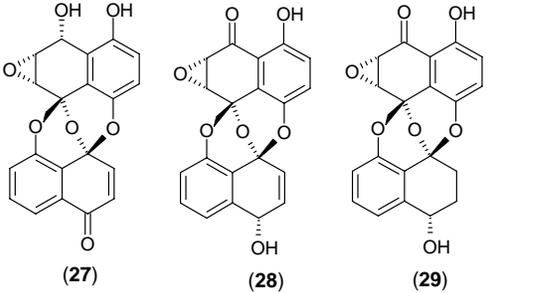
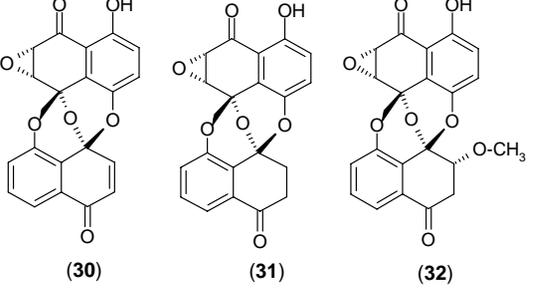
Las preusomerinas y palmarumicinas han sido aisladas de una gran variedad de hongos: coprófilos, acuáticos, saprófitos, asociados a líquenes, a corales y a plantas. Adicionalmente, existen dos reportes de aislamiento de estos compuestos en especies de vegetales, sin embargo, es discutible la posibilidad de que sean producto del metabolismo de hongos asociados a éstas (Ravindranath *et al.*, 2004; Prajoubklang *et al.*, 2005).

Las preusomerinas presentan reducción del grupo cetona de los carbonos 1 y 1' a alcohol, así como grupos hidroxilo, metoxilo o epóxido sobre los carbonos 2, 3 y 2', 3'. En contraste, las palmarumicinas presentan una diversidad estructural mayor al de las preusomerinas, en general, conservan el grupo naftalendiol intacto y presentan diversas oxidaciones y reducciones en la unidad de naftoquinona siendo los grupos funcionales principales epóxido e hidroxilo.

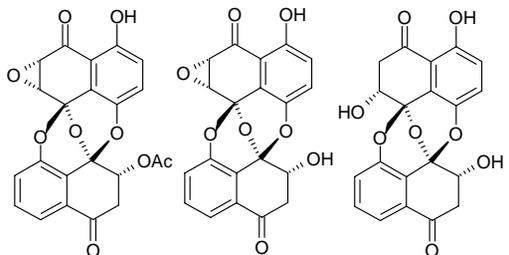
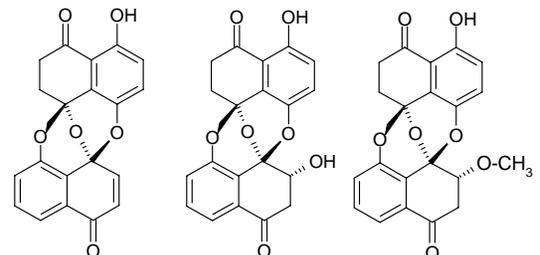
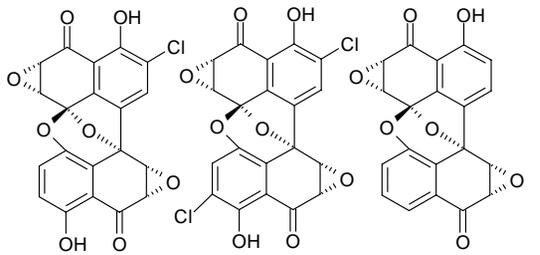
En la literatura, los compuestos del tipo preusomerina se encuentran citados como agentes microbicidas; fungicidas, antibacterianos (Gloer y Weber, 1991; McDonald, 1991; Krohn *et al.*, 2001; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008), antileishmania (Martínez *et al.*, 2008) y nematocidas (Dong *et al.*, 2008). También es sobresaliente su posible aplicación como agentes anticancerígenos, al ser de los pocos compuestos inhibidores de la enzima farnesil fosfotransferasa de Ras (FPTasa de RAS) que se conocen; esta enzima está implicada en el proceso de desarrollo del cáncer (Singh *et al.*, 1994; Vilella *et al.*, 2000).

Por otra parte, las palmarumicinas se han reportado como antibacterianos y fungicidas (Krohn, 1994; Hu, *et al.*, 2006; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008), antimaláricos, alguicidas, antileishmania y citotóxicos (Bode *et al.*, 2000; Seephonkai *et al.*, 2002; Prajoubklang, *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2006). Adicionalmente, se han reportado como inhibidores del sistema tioredoxin-tioredoxin reductasa, que está implicado en procesos malignos como cáncer, VIH-SIDA y artritis reumatoide (Wipf *et al.*, 2001; Wipf, *et al.*, 2005); inhibidores de la fosfolipasa C (Chu *et al.*, 1996) y de la DNA girasa (Sakemi *et al.*, 1995). En el cuadro 3 se presentan algunos compuestos de la familia de las preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados, así como su fuente de origen y la actividad biológica que ha sido evaluada.

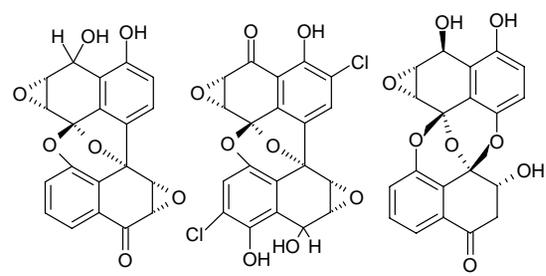
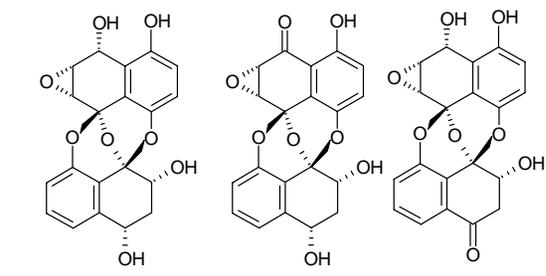
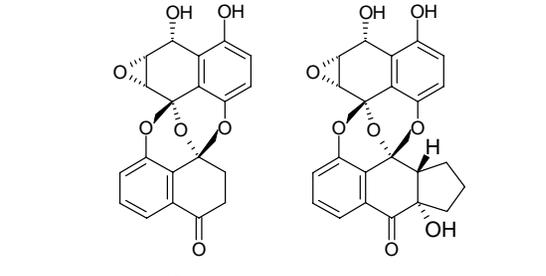
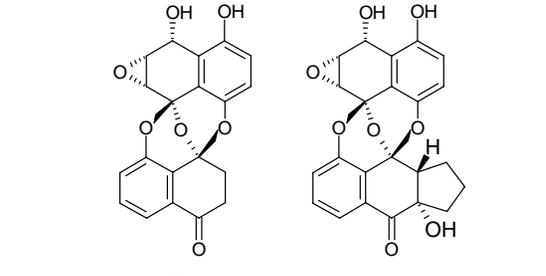
Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(24) (25) (26)</p>	<i>Preussia isomera</i> Cain hongo coprófilo	Preusomerinas A-F (24-29)	Antibacteriano, antifúngico (24,27-29) <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , (24-29) <i>S. fimicola</i> , <i>A. furfuraceus</i>	Gloer, 1991
 <p>(27) (28) (29)</p>	<i>Harmonema dematioides</i> .	Preusomerina D (27)	Antibacteriano, antifúngico <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Ustilago zea</i>	Polishook, 1993
 <p>(30) (31) (32)</p>	Hongo filamentoso Cepa MF5916	Preusomerinas D (27), G, H, I (30-32)	Inhibidor de FPTasa	Singh, 1994
	Hongo filamentoso Cepa LL-37H248 asociado a coral naranja	Spiroxinas A-E (39-43)	Antitumoral (39) carcinoma de ovario de ratón	McDonald, 1999

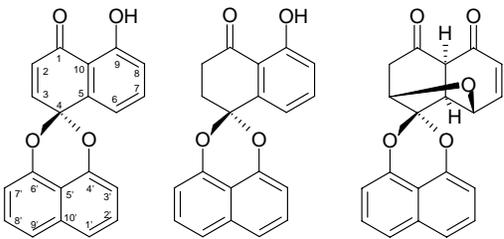
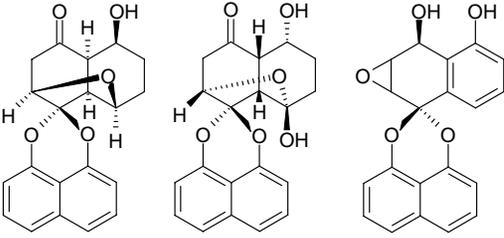
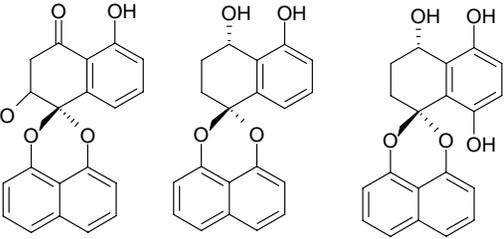
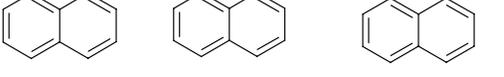
Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados (continuación)

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(33)      (34)      (35)</p>	<i>Sporormiella vexans</i> Hongo coprófilo	<i>O</i> -desmetil-1-epipreusomerina C (44)	Antifúngico <i>A. furfuraceus</i>	Soman, 1999
 <p>(36)      (37)      (38)</p>	Hongo filamentoso Coelomycete tipo- <i>Phoma</i> Coprófilo	Preusomerinas G-I (30-32)	(30) Inhibidor de FPTasa	Vilella, 2000
 <p>(39)      (40)      (41)</p>	<i>Mycelia sterilia</i> Endófito de <i>Atropa belladonna</i>	Preusomerinas J-L (33-35)	Antibacteriano <i>B. megaterium</i> , <i>M. violaceum</i>	Krohn, 2001

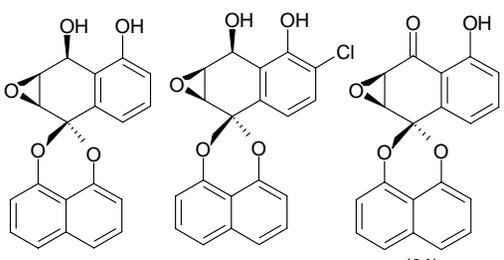
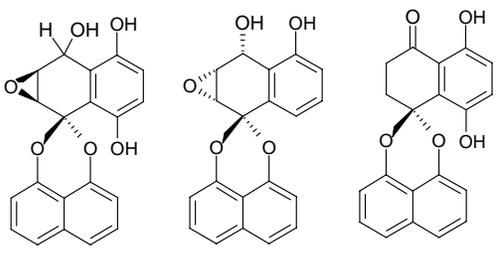
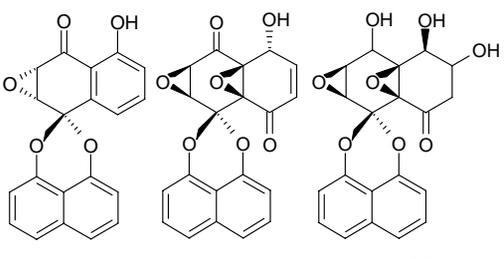
Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados (continuación)

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(42)      (43)      (44)</p>	<i>Microsphaeropsis</i> sp Liquen <i>Dirinaria</i> <i>applanata</i>	Preusomerinas E-I (28-32)	Antibacteriano, Antimalárico <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. falciparum</i>	Seephonkai, 2002
 <p>(45)      (46)      (47)</p>	<i>Edenia gomezpompae</i> Endófito de <i>C. acuminata</i>	Preusomerinas EG <sub>1</sub> - EG <sub>3</sub> (36-38)	Antifúngico <i>A. solani</i> , <i>P. parasitica</i> , <i>P.</i> <i>capsici</i> , <i>F. oxysporum</i>	Macías, 2008
 <p>(48)      (49)</p>	<i>Edenia</i> sp. Endófito de <i>Petrea</i> <i>volubilis</i>	Preusomerina EG <sub>1</sub> (36)	Antileishmania <i>L. donovani</i>	Martínez, 2008
 <p>(48)      (49)</p>	Hongo acuático no identificado YMF1.01029	YMF 1029 A-E (45-49)	Nematicida <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Dong, 2008

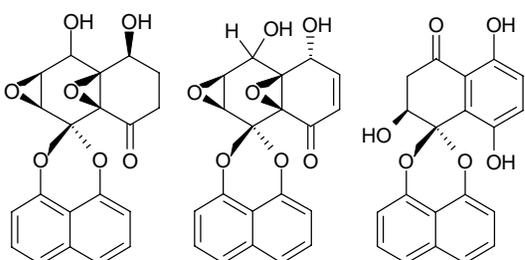
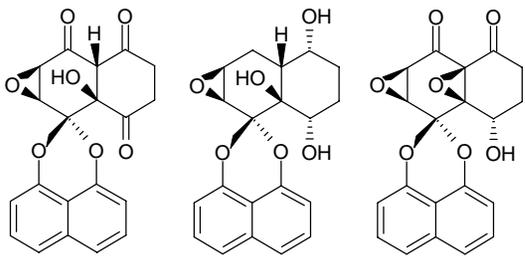
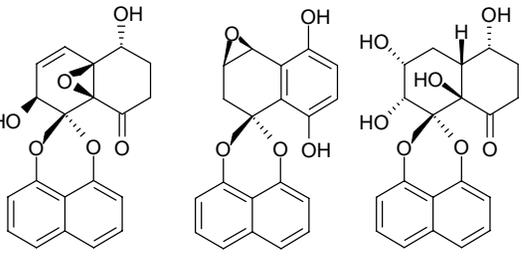
Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados (continuación)

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(50) (51) (52)</p>	<i>Coniothyrium palmarum.</i>	Palmarumicinas CP <sub>1</sub> , CP <sub>2</sub> , CP <sub>3</sub> , CP <sub>4</sub> (50-52)	Antifúngico, Antibacteriano, Alguicida (50,52) <i>B. megaterium</i> , <i>E. coli</i> , (50-52) <i>U. violacea</i> , (52) <i>M. microspora</i> , (52) <i>F. oxysporum</i> , (50-52) <i>E. repens</i> , (51,52) <i>C. fusca</i>	Krohn, 1994
 <p>(53) (54) (55)</p>	Cepa MF5916.	Deoxipreusomerinas A y B (65, 51)	Inhibidor de Ras FPTasa	Singh, 1994
 <p>(56) (57) (58)</p>	Hongo filamentoso (Cepa N983-46)	Palmarumicinas CJ 12 371, CJ 12 372 (57-58)	Inhibidor de DNA girasa	Sakemi, 1995
 <p>(56) (57) (58)</p>	Hongo filamentoso Desconocido Saprófito	Palmarumicinas Sch 53823, Sch 53825 (59-60)	Inhibidores de fosfolipasa C	Chu, 1996

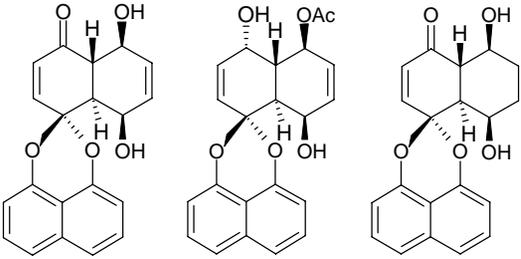
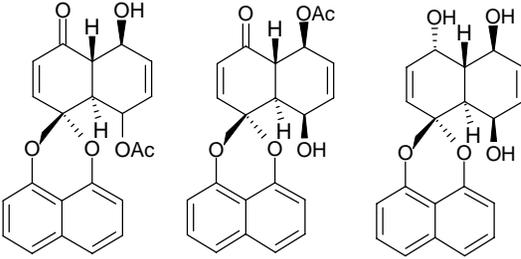
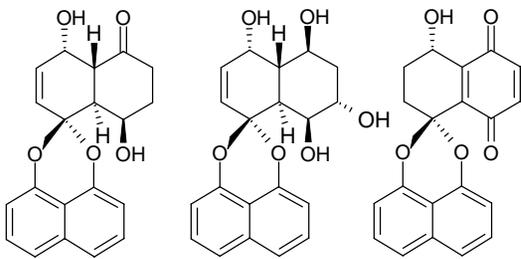
Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados (continuación)

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(59) (60) (61)</p>	<i>Coniothyrium palmarum</i> . Endófito de <i>Lamium purpureum</i>	Palmarumicinas CP <sub>4a</sub> , CP <sub>5</sub> (53-54)	Antifúngico Antibiótico <i>U. violacea</i> , <i>B. megaterium</i>	Krohn, 1997
 <p>(62) (63) (64)</p>	Hongo filamentoso Coelomycete tipo- <i>Phoma</i>	Deoxipreusomerinas A y B (65, 51)	Inhibidores de Ras FPTasa	Vilella, 2000
 <p>(65) (66) (67)</p>	Hongo filamentoso <i>Sphaeropsidales</i> sp. (Cepa F-249707)	Palmarumicina C <sub>12</sub> (62) Cladospironas (B-H) (70-76) Bisepoxicladospirona (69) Diepoxinas $\sigma$ , $\delta$ , $\eta$ (66-68)	Antibacteriano Alguicida (71, 72) <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> , (72) <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i>	Bode, 2000
 <p>(65) (66) (67)</p>	<i>Microsphaeropsis</i> sp. Liquen <i>Dirinaria aplanata</i>	Deoxipreusomerina A y Palmarumicina C <sub>11</sub> (65), (63)	Antituberculosos y antimaláricos moderados <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. falciparum</i>	Seephonkai, 2002

Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados (continuación)

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(68)      (69)      (70)</p>	<i>Jatropha curcas</i> Linn (Euphorbiaceous)	Palmarumicinas CP <sub>1</sub> , JC1, JC2 (50, 55, 56)	Antibacteriano <i>S. aureus</i>	Ravindranath, 2004
 <p>(71)      (72)      (73)</p>	Frutos de <i>Diospyros ehretioides</i>	Palmarumicinas JC1, JC2 (55, 56)	Antimalárico, antifúngico, antimicobacteriano, citotóxico  (55) L cel. Vero, KB, NCI-H187 (56) <i>P. falciparum</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. tuberculosis</i> L. Cel; Vero, KB, NCI-H187, BC	Prajoubklang, 2005
 <p>(74)      (75)      (76)</p>	<i>Decaisnella thyridioides</i> Hongo acuático	Decaspiroas A-E (77-81), palmarumicina CP <sub>1</sub> (50)	Antibacteriano, antifúngico (77-91) <i>B. subtilis</i> (77, 79 y 80) <i>S. aureus</i> (77, 80, 81) <i>C. albicans</i> (77, 80) <i>F. verticilloides</i> y <i>A. flavus</i>	Jiao, 2006

Cuadro 3. Metabolitos de la clase preusomerina, palmarumicina y compuestos relacionados (continuación)

Metabolitos (estructura)	Organismo/Origen	Metabolitos (nombre)	Actividad Biológica	Ref.
 <p>(77)      (78)      (79)</p>	<i>Helicoma viridis</i> Hongo saprofita	Decaspiroonas F-H (82-84)	Antibacteriano (82-84) <i>P. aeruginosa</i> , (83) <i>L. lactis</i>	Hu, 2006
 <p>(80)      (81)      (82)</p>	<i>Edenia gomezpomapea</i> Endófito de <i>C. acuminata</i>	Palmarumicina CP <sub>2</sub> (51)	Antifúngico <i>A. solani</i> , <i>P. parasitica</i> , <i>P. capsici</i> , <i>F. oxysporum</i>	Macias, 2008
 <p>(83)      (84)      (85)</p>	<i>Edenia</i> sp. Endófito de <i>Petrea volubilis</i>	Palmarumicinas CP <sub>2</sub> (51), CP <sub>17</sub> (64) CP <sub>18</sub> (85) CJ 12,371 (57)	Antileishmania <i>L. donovani</i>	Martínez, 2008

### **3. HIPÓTESIS**

La hipótesis del presente proyecto considera que debido a que los hongos endófitos son una fuente prometedora y poco explorada de producción de aleloquímicos, se encontrarán, en el hongo *Edenia gomezpompae*, diversos metabolitos secundarios con actividad biológica, que pueden ser indicadores adecuados para el estudio de los mecanismos químicos de defensa de este hongo y, a la vez, guías para investigar el papel ecológico que desempeñan en el equilibrio hongo endófito-planta hospedera.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el potencial aleloquímico del hongo endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes hongos endófitos aislados de diversas plantas tropicales y, mediante un fraccionamiento químico biodirigido, poner en evidencia a los metabolitos secundarios responsables de la bio-actividad demostrada por *E. gomezpompae*. Asimismo, determinar el potencial antifúngico de estos metabolitos, mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de cuatro especies de microorganismos fitopatógenos con importancia económica, y de esta manera, contribuir al conocimiento del posible papel ecológico de estos compuestos en las complejas relaciones que *E. gomezpompae* establece con su planta hospedera y con otros microorganismos asociados, y coadyuvar al posible desarrollo de nuevos agentes de control de plagas y enfermedades de origen natural.

### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Realizar el cultivo en mediana escala (30 L) del hongo endófito *Edenia gomezpompae* y preparar los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo.
2. Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico de los extractos orgánicos, evaluando su efecto sobre el crecimiento radial de diferentes hongos endófitos aislados de nueve plantas tropicales, de dos hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*, y de dos fungoides fitopatógenos: *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*, mediante el método de dilución en agar.
3. Aislar y purificar los metabolitos secundarios con actividad antifúngica, de los extractos crudos derivados del cultivo a mediana escala, por medio de un estudio químico biodirigido y utilizando el método de dilución en agar para monitorear la actividad biológica de las fracciones.

4. Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.
  
5. Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico de los metabolitos aislados de las fracciones activas sobre el crecimiento radial de cinco microorganismos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia* sp. *Phytophthora capsici* y *Alternaria solani*.

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1. MATERIAL FÚNGICO**

El hongo endófito *Edenia gomezpompae* fue aislado de hojas sanas del árbol *Callicarpa acuminata* Humb et al. (Verbenaceae) colectadas en la reserva ecológica ‘El Edén’ en Quintana Roo. La identidad de este microorganismo fue establecida por métodos moleculares ya que no forma estructuras reproductoras (González *et al.*, 2007). *E. gomezpompae* fue liofilizado y conservado en nitrógeno líquido. Muestras de referencia fueron depositadas en el Herbario Nacional [(MEXU) (clave 25346)] del Instituto de Biología, UNAM y en el Herbario de Micología J.H. Millar [(GAM), (clave 16175)] de la Universidad de Georgia, EU.

### **5.2. MICROORGANISMOS DE PRUEBA**

#### **5.2.1. Microorganismos fitopatógenos**

Como organismos de prueba se utilizaron tres hongos fitopatógenos con importancia económica: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *Alternaria solani* (Eumycota) y dos fungoides (Oomycota) fitopatógenos: *Phytophthora capsici* y *P. parasitica*. Todas las cepas fueron donadas por la Dra. Olga Gómez, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo. de México.

#### **5.2.2. Hongos endófitos**

Se emplearon catorce hongos endófitos aislados de nueve especies de plantas de las comunidades vegetales de la Reserva Ecológica ‘El Edén’. En el cuadro 4 se muestran las claves de los endófitos y las plantas de las que fueron aislados. Como podrá observarse, no todos los hongos endófitos fueron identificados, ya que varios de ellos no formaron estructuras reproductoras por lo que se utilizan las claves que se les asignaron como morfotipos para referirse a ellos. La identificación de los endófitos se está estableciendo por medio de métodos moleculares (González *et al.*, 2007).

**Cuadro 4.** Hongos endófitos aislados de nueve especies de plantas de la Reserva Ecológica ‘El Edén’, Quintana Roo

<b>Plantas hospederas</b>	<b>Hongo endófito y/o clave</b>
<i>Acacia sedillense</i> (Fabaceae)	AHC* (aislado de las hojas) AEC* (aislado de las espinas)
<i>Chrysophyllum mexicana</i> (Sapotaceae)	CHB* <i>Guignardia mangiferae</i>
<i>Bursera simaruba</i> (Burseraceae)	<i>Muscodor</i> sp. <i>G. mangiferae</i> <i>Colletotrichum</i> sp. 101*
<i>Callicarpa acuminata</i> (Verbenaceae)	<i>Muscodor</i> sp. <i>G. mangiferae</i> <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp.
<i>Lonchocarpus castilloi</i> (Fabaceae)	<i>G. mangiferae</i> LH* LD1*
<i>Metopium brownei</i> (Anacardiaceae)	<i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>G. mangiferae</i> <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. 55*
<i>Pteridium aquilinum</i> (Dennstaedtiaceae)	<i>Xylaria</i> sp.
<i>Sebastiania adenophora</i> (Euphorbiaceae)	<i>Colletotrichum</i> sp. 131*
<i>Zuelania guidonia</i> (Flacourtiaceae)	<i>G. mangiferae</i>

\* Claves asignadas como morfotipos a los hongos endófitos no identificados que no forman estructuras reproductoras

### 5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos, fracciones primarias, compuestos puros y derivados acetilados, se realizó mediante la

evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos y de los hongos endófitos de prueba utilizando el método de dilución en agar.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en acetona o en metanol (~100-500  $\mu$ L) y se prepararon disoluciones en PDA (1%) a 250  $\mu$ g/mL para los extractos y fracciones, y a 100  $\mu$ g/mL para los compuestos puros y derivados acetilados. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas se incubaron de 3 a 10 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 h) con luz fluorescente. Como controles negativos se utilizaron PDA (1%) y PDA 1(%) / acetona o metanol (~100-500  $\mu$ L). Como control positivo se utilizó el fungicida comercial Prozycar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato) [50  $\mu$ g/mL]. Al final del bioensayo se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición y de cada especie de hongo de prueba. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa STATISTICA versión 6.0) [Mead et al., 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008].

#### **5.4. CULTIVO A MEDIANA ESCALA DEL HONGO *E. GOMEZPOMPAE***

Para la obtención del cultivo a mediana escala (30L) con agitación, se utilizaron las condiciones óptimas de crecimiento establecidas previamente. La fermentación se realizó en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para ello se utilizaron 3 fermentadores de 15 L de capacidad. A cada uno de los fermentadores se les adicionaron 10 L de caldo-papa-dextrosa (CPD) preparado con papas frescas y como inóculo, el hongo endófito cultivado en pequeña escala (1L) por un periodo de quince días en CPD. Cada uno de los fermentadores se incubó durante 15 días a 28 °C con una agitación de 200 rpm (mediante propelas), un flujo de aire de 8 a 10 L/ min. y un fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 h) con luz fluorescente (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

Una vez concluido el proceso de fermentación, el micelio se separó del medio de cultivo mediante centrifugación. Posteriormente, se procedió a preparar los extractos orgánicos del cultivo.

## **5.5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS**

El micelio húmedo obtenido durante la incubación se sometió a un proceso de maceración con diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), realizándose cinco extracciones con un volumen de 2.0 L de disolvente, dejando entre cada extracción un periodo de tres días. Inmediatamente después y con el mismo procedimiento, se realizaron cinco extracciones más con acetato de etilo (AcOEt). Al término de la maceración, los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCF), observándose que eran cromatográficamente similares, por lo que se decidió combinarlos.

Por otra parte, los extractos del medio de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones empleando también  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt como disolventes de extracción. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El análisis por CCF de los extractos orgánicos, indicó que son cromatográficamente similares, por lo que se combinaron.

## **5.6. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO**

### **5.6.1. Métodos cromatográficos generales**

El extracto orgánico del micelio del cultivo en mediana escala del hongo endófito *E. gomezpompae* se fraccionó mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> Merck de 0.25 mm de espesor), varios sistemas de eluyentes (Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Hex- $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  en diversas proporciones) y como agente cromogénico se empleó una disolución de sulfato cérico (12 g sulfato cérico + 22.2 mL

ácido sulfúrico concentrado + 350 g hielo); para obtener el desarrollo del color fue necesario calentar cada cromatoplaque por dos minutos aproximadamente a 110 °C (Ghisalberti, 1993; Stahl, 1969). La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 mm de espesor aplicando en cada cromatoplaque aproximadamente 10 mg de muestra.

### 5.6.2. Fraccionamiento biodirigido

El extracto activo del medio de cultivo (~10 g de un sólido de color café rojizo) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, utilizando 630 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 241 fracciones de 200 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 15 fracciones primarias (I-XV). En el cuadro 5 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas. El efecto antifúngico de las fracciones primarias se evaluó por el método de dilución en agar (inciso 5.3). La actividad biológica estuvo concentrada en el grupo de fracciones VIII.

**Cuadro 5.** Fraccionamiento primario del extracto activo del micelio de *E. gomezpompae*

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Clave
Hexano	100	1-26	I
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	27-36	II
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	37-44	III
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	45-46	IV
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	47-64	V
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	65-70	VI
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	71-82	VII
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	83-89	VIII*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	90-102	IX*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	103-146	X*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	147-151	XI*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	152-204	XII*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4	205-207	XIII*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	208-210	XIV*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	211-217	XV
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	60:40	218-241	

\* Fracciones antifúngicas

### 5.6.2.1. Separación y purificación de los metabolitos secundarios

#### 5.6.2.1.1. Obtención de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)

Las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64), precipitaron de manera espontánea como sólidos cristalinos de color amarillo claro a partir de las fracciones primarias inactivas V y VII, respectivamente. Los sólidos se sometieron a sucesivas recristalizaciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Como resultado de este proceso se obtuvieron 488 mg del compuesto 51 (Krohn *et al.*, 1994; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008) con un p.f. de 169-170 °C y 61 mg de la palmarumicinas CP<sub>17</sub> (64) [Martínez *et al.*, 2008] con un p.f. de 200-201 °C.

#### 5.6.2.1.2. Obtención de la preusomerina EG<sub>1</sub> (36)

De la fracción primaria activa VIII (262.5 mg) precipitó un sólido cristalino de color amarillo claro, el cual tras sucesivos lavados con una mezcla de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) y de una recristalización de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1) generó 155 mg de palmarumicina EG<sub>1</sub> (36) [Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008], con un p.f. de 215.7 °C.

#### 5.6.2.1.3. Obtención de la preusomerina EG<sub>4</sub> (86)

De la fracción activa IX (111.7 mg) precipitó un sólido amorfo de color amarillo. El análisis mediante cromatografía en capa fina de este sólido demostró que se trataba de una mezcla de dos constituyentes mayoritarios. La separación de los productos naturales se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El proceso de elución se realizó dos veces. Como resultado del procedimiento anterior, se obtuvieron 36 mg del compuesto 86 en forma de un sólido cristalino de color amarillo claro, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un p.f. de 242.1-243.0 °C. Por otra parte, se obtuvieron 56 mg adicionales del compuesto 36.

#### 5.6.2.1.4. Obtención de la preusomerina EG<sub>3</sub> (37), de las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (87) y EG<sub>2</sub> (88) y de la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (89)

La fracción primaria activa X (767 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 135 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y MeOH en diferentes proporciones. Se

obtuvieron 289 fracciones de 50 mL cada una, reuniéndose las que resultaron cromatográficamente similares, para generar trece grupos de fracciones secundarias. El monitoreo de la actividad antifúngica, mediante el método de dilución en agar, permitió observar que la actividad antifúngica se encontraba en la fracción X-9. En el cuadro 6 se presentan los sistemas de elución utilizados y las fracciones combinadas.

El análisis por cromatografía en capa fina de la fracción activa X-9 (240 mg) mostró que estaba constituida por cuatro compuestos mayoritarios. Esta fracción fue sometida a sucesivas purificaciones por cromatografía preparativa en capa fina, utilizando Hex-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (80:20) como eluyente. Después de procesar las cromatoplasmas de manera habitual se obtuvieron 11.8 mg de ergosta-4,6,8[14],22-tetraen-3-ona (**89**) con un p.f. de 197-198 °C (Tanaka *et al.*, 1996; Fujimoto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), 50 mg de la preusomerina EG<sub>3</sub> (**37**) con un p.f. de 183.6-185.6 °C (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008), 8 mg de la palmarumicina EG<sub>1</sub> (**87**) y 12.6 mg de la palmarumicina EG<sub>2</sub> (**88**) con un p.f. de 164.5-166.2 °C.

**Cuadro 6.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa X

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Clave
Hexano	100	1-38	X-1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	39-45	X-2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	46-51	X-3
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	52-57	X-4
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	58-76	X-5
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	77-88	X-6
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	89-94	X-7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	95-118	X-8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	119-150	X-9*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	151-238	X-10
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	239-245	X-11
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	246-272	X-12
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	272-289	X-13

\*Fracciones antifúngicas

### 5.6.2.1.5. Obtención de la preusomerina EG<sub>2</sub> (38)

La fracción primaria XI (1.654 g) se recromatografió en una columna abierta empacada con 149 g de gel de sílice y mezclas de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH en diferentes proporciones. Este proceso permitió la obtención de 214 fracciones de 50 mL cada una, mismas que fueron analizadas por cromatografía en capa delgada con la finalidad de reunir las que presentaban homogeneidad cromatográfica. El procedimiento anterior permitió obtener 12 grupos de fracciones. La actividad antifúngica se concentró en la fracción secundaria XI-5. El cuadro 7 resume este proceso cromatográfico.

De la fracción secundaria activa XI-5 (392 mg) precipitó de manera espontánea un sólido cristalino de color amarillo, el cual se sometió a sucesivas recristalizaciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1). Como resultado de este proceso se obtuvieron 18.5 mg de la preusomerina EG<sub>2</sub> (38) con un p. f. de 224 °C (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

Por otra parte, la fracción secundaria XI-2 (18 mg) se sometió a un proceso de purificación por cromatografía preparativa en capa delgada, empleando Hex-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (80:20) como eluyente. Después de dos eluciones y de procesar las cromatoplasas de manera habitual se obtuvieron 5.0 mg adicionales de la palmarumicina EG<sub>2</sub> (88).

**Cuadro 7.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa XI

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Clave
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-15	XI-1
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	16-30	
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	31-44	XI-2
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	45-62	XI-3
Hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	63-82	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	83-108	XI-4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	109-132	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	133-158	XI-5*
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	159-172	XI-6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4	173-185	XI-7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	186-193	XI-8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	194-198	XI-9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	199-206	XI-10
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	207-212	XI-11
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50	213-214	XI-12

\*Fracciones antifúngicas.

### **5.6.2.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los metabolitos secundarios**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. La rotación óptica se registró en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros de dicroísmo circular (DC) se determinaron en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25 °C en metanol. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) se generaron en un aparato Varian UNITY PLUS 500, el cual se operó a una frecuencia de 500 MHz y de 125 MHz, respectivamente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de los nuevos productos naturales se obtuvieron en un aparato Bruker DM X500. Todos los espectros se registraron en CDCl<sub>3</sub> y los desplazamientos químicos (δ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, en pastilla de KBr y en película. Los espectros en el ultravioleta (UV) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 202. Los espectros de masas se registraron en un aparato JEOL JMS-AX505 HA mediante introducción directa a 70 eV. El análisis de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química, en un difractómetro Nicolet R3m.

### **5.6.2.3. Obtención de los derivados acetilados de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (36) y EG<sub>4</sub> (86) y de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)**

Para obtener los derivados acetilados de los productos naturales **36**, **51**, **64** y **86**, se utilizaron 0.5 mL de piridina anhidra y 0.5 mL de anhídrido acético por cada 10 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, a la mezcla de reacción se le adicionó agua destilada y 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se procedió a extraer con HCl 1N (3 x 10 mL); la fase orgánica remanente se lavó con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> 10% (3 x 10 mL) y con agua desionizada (3 x 10 mL). Por último, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío.

En el caso de los productos naturales **51** y **86** el residuo resultante correspondió al producto acetilado en forma pura, compuestos **51a** y **86a**, respectivamente.

El análisis por cromatografía en capa fina de la mezcla de reacción de los metabolitos **36** y **64**, mostró que ambos estaban constituidos por dos compuestos

mayoritarios. Estos sólidos fueron sometidos a purificación por medio de CCFP, eluyendo dos veces las placas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (99:1). Después de procesar las cromatoplasas de manera habitual, se obtuvieron los derivados monoacetilados de la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36a**) y de la palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64a**) y los diacetil derivados de la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36b**) y de la palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64b**).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de investigar el potencial aleloquímico del hongo endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes hongos endófitos aislados de diversas especies de plantas tropicales y, mediante un fraccionamiento químico biodirigido, poner en evidencia a los metabolitos secundarios responsables de la bioactividad demostrada por *E. gomezpompae*. Los resultados obtenidos se dividen en cuatro partes. La primera corresponde a la obtención del cultivo en mediana escala de *E. gomezpompae*. La segunda comprende la evaluación del potencial antagónico de los extractos del micelio y del medio de cultivo sobre catorce microorganismos endófitos y cuatro fitopatógenos con importancia económica. La tercera parte se refiere al aislamiento y la caracterización de los principales metabolitos secundarios. Por último, la cuarta parte se enfoca a la evaluación biológica de estos compuestos y de algunos de sus diferentes derivados acetilados, mediante la determinación de su efecto sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos.

### 6.1. CULTIVO EN MEDIANA ESCALA (30 L)

El cultivo en mediana escala se realizó utilizando las condiciones óptimas de crecimiento previamente establecidas: como medio de cultivo se utilizó CPD (fabricado con papas naturales); una agitación a 200 rpm mediante propelas, un período de incubación de quince días, un flujo de aire de 8 a 10 L/ min y una temperatura de incubación de 28 °C (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

En el cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos, observándose diferencias considerables, tanto en la biomasa generada como en los rendimientos de extractos. En todos los casos el extracto del micelio resultó más abundante. Sin embargo, la cantidad de extracto obtenida de cada cultivo de 10 L resultó muy variable, lo cual indica que el éxito de la fermentación depende, además de las condiciones de cultivo, de la calidad del inóculo, es decir, del estado metabólico o de la recombinación de genes del fragmento de micelio seleccionado.

Cada uno de los extractos obtenidos a partir de las tres fermentaciones de 10 L, se analizaron por cromatografía en capa delgada, observándose por una parte, similitud en la

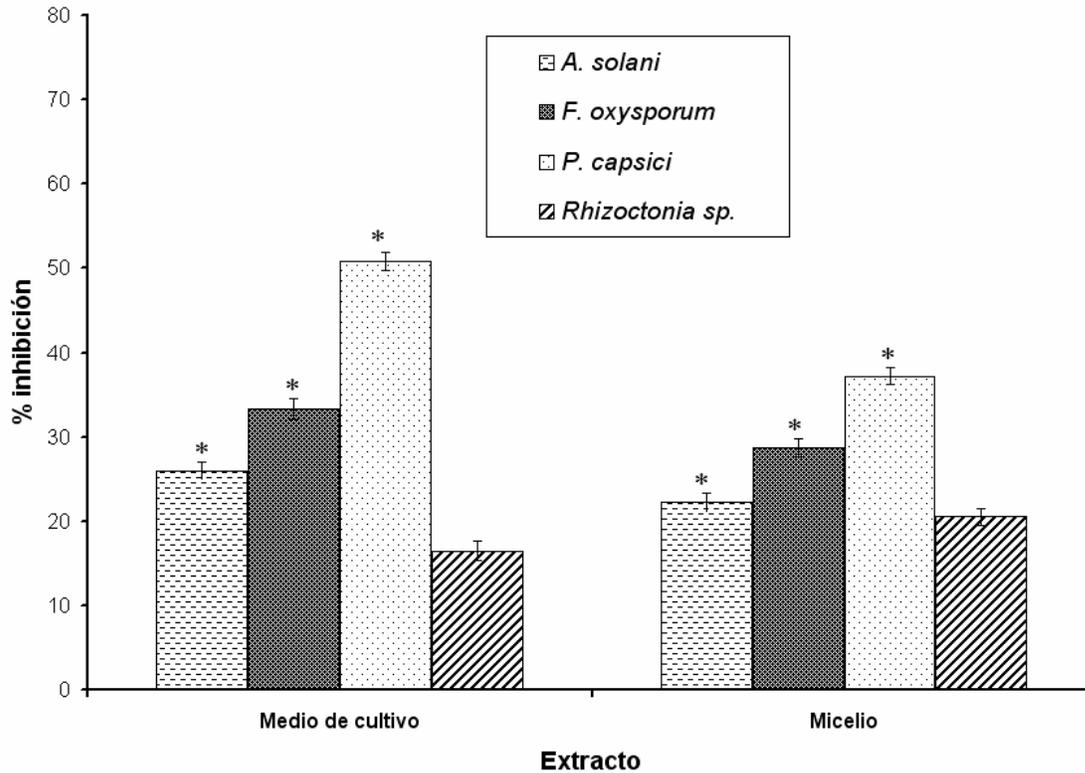
composición entre los tres extractos del medio de cultivo y, por otra, también una similitud entre los tres extractos del micelio, por lo que se decidió combinarlos, obteniéndose dos extractos: uno del medio de cultivo y uno del micelio. Se obtuvieron 10.23 g de extracto del micelio, que tenía un color café rojizo y 2.57g de extracto del medio de cultivo, con un color café oscuro (cuadro 8). Con base en estos resultados, el extracto del micelio se seleccionó para realizar el fraccionamiento biodirigido.

**Cuadro 8.** Rendimientos obtenidos para cada cultivo de 10 L

Extracto	Rendimiento (g)			
	Cultivo 1 (10 L)	Cultivo 2 (10 L)	Cultivo 3 (10 L)	Total (30 L)
Biomasa	17.37	24.26	21.63	63.26
Micelio	1.73	5.02	3.48	10.23
Medio	0.34	1.05	1.18	2.57

## 6.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL MICELIO DE *E. GOMEZPOMPAE*

Se corroboró cuantitativamente el efecto antifúngico de los extractos orgánicos (250 µg/mL) de *E. gomezpompaе* sobre el crecimiento de tres hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *Alternaria solani* y de un fungoide fitopatógeno *Phytophthora capsici*. En el gráfico 1 se presenta el efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio sobre estos cuatro microorganismos. Aunque el extracto del medio de cultivo presentó mayor actividad inhibitoria sobre los microorganismos de prueba, todos éstos, excepto *Rhizoctonia* fueron inhibidos significativamente por ambos extractos. *P. capsici* fue la especie mas afectada, alcanzando una inhibición del 50% en presencia del extracto del medio de cultivo, y de 38% con el extracto del micelio. La actividad biológica demostrada por los extractos orgánicos derivados de la fermentación en mediana escala es similar a la reportada en un estudio previo realizado con este endófito (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).



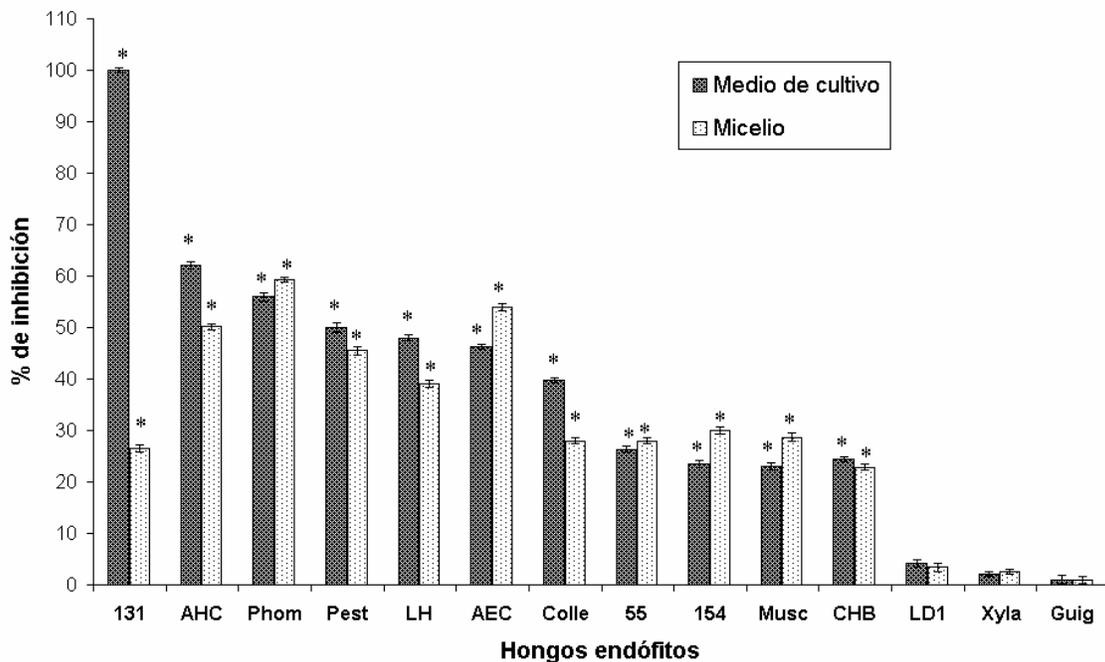
**Gráfico 1.** Efecto de los extractos de medio de cultivo y micelio (250  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre el crecimiento radial de *A. solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia sp.* y *P. capsici*. \*  $n=4$ ,  $p < 0.05$

### 6.3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL ENDÓFITO *E. GOMEZPOMPAE* SOBRE DIFERENTES HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE PLANTAS TROPICALES.

Con la finalidad de conocer el posible papel ecológico que *E. gomezpompae* desempeña dentro de su planta hospedera, de determinar el tipo de relación que establece con otros endófitos que conviven con él dentro de la misma hospedera, con algunos hongos endófitos aislados de otras especies de plantas tropicales, y de establecer el papel que desempeñan los metabolitos secundarios bioactivos que *E. gomezpompae* produce, evaluamos el grado de inhibición del crecimiento que ejercen los extractos del medio de cultivo y del micelio sobre catorce hongos endófitos aislados de nueve plantas tropicales. Los hongos endófitos de prueba se aislaron principalmente de las hojas de *A. sedillense*, *B. simaruba*, *C. acuminata*, *C. mexicana*, *L. castilloi*, *M. brownei*, *P. aquilinum*, *S.*

*adenophora* y *Z. guidonia*, colectadas en la Reserva Ecológica ‘El Edén’, Quintana Roo (cuadro 4 sección experimental).

En el gráfico 2 se muestra el efecto de los extractos del medio de cultivo y del micelio de *E. gomezpompae* a una concentración de 250 µg/mL, sobre el crecimiento de los catorce hongos endófitos, incluyendo cuatro que fueron aislados de su misma planta hospedera (*Callicarpa acuminata*). En este gráfico se puede observar que las respuestas de crecimiento de los hongos endófitos a los extractos son muy diversas; la mayor parte de ellos son inhibidos significativamente por los dos extractos orgánicos, con excepción de los endófitos LD1, *Xylaria* sp. y *G. mangiferae*. El morfotipo 131 mostró la respuesta de crecimiento diferencial más acentuada; es 100% inhibido por el extracto orgánico del medio de cultivo pero el del micelio lo inhibe aproximadamente, cuatro veces menos.



**Gráfico 2.** Efecto de los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo (250 µg/mL) del hongo endófito *E. gomezpompae* sobre el crecimiento de catorce hongos endófitos aislados de diferentes especies de plantas tropicales. *Phomopsis* sp. (Phom), *Pestalotiopsis* sp. (Pest), *Colletotrichum* sp. (Colle), *Muscodor* sp. (Musc), *Xylaria* sp. (Xyla), *Guignardia mangiferae* (Guig) \*  $n=4$ ,  $p<0.05$

#### 6.4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO ACTIVO DEL MICELIO DE *E. GOMEZPOMPAE*

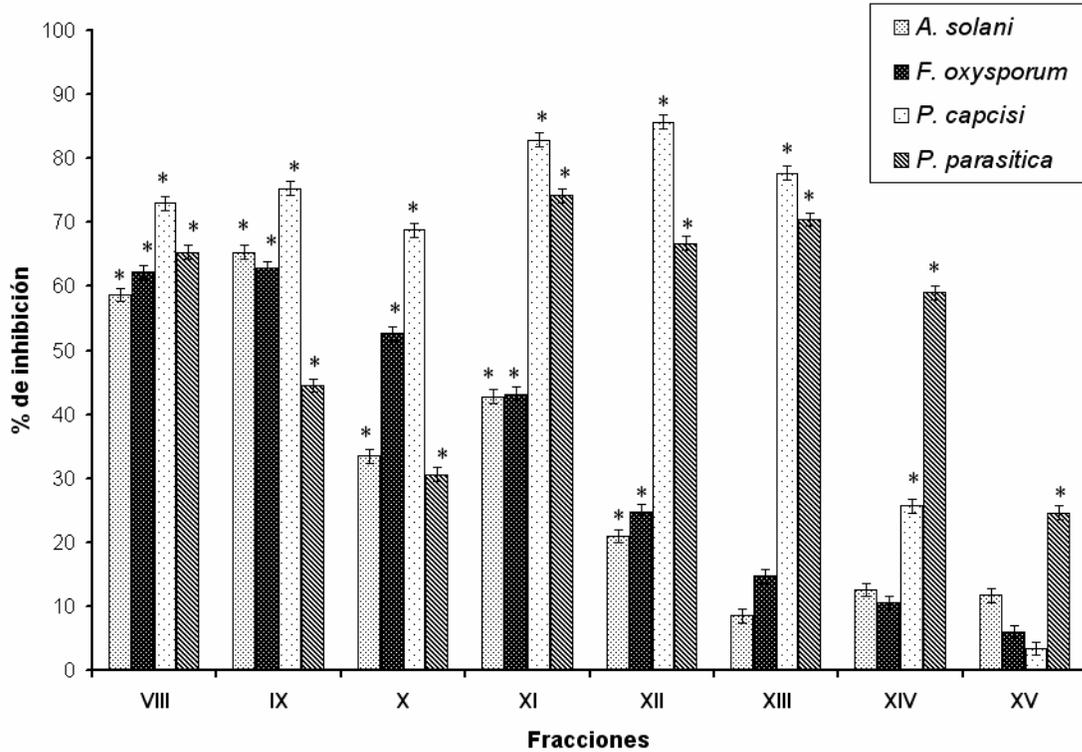
Una vez que se demostró el potencial aleloquímico de los extractos orgánicos, se procedió al aislamiento de los principales metabolitos secundarios bioactivos a partir del extracto del micelio, obtenido de los cultivos a mediana escala (30 L) utilizando un procedimiento biodirigido. Como ensayo de monitoreo de la actividad biológica se utilizó el método de dilución en agar empleando como microorganismos de prueba cuatro fitopatógenos con importancia económica *A. solani*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *P. parasitica* (Anaya *et al.*, 2003; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

El fraccionamiento biodirigido de 10 g del extracto activo del micelio, utilizando una cromatografía en columna abierta, permitió obtener 16 fracciones primarias (Cuadro 5 sección experimental). En el gráfico 3 se muestra el perfil de la actividad antifúngica de las fracciones primarias de mayor polaridad (VIII a XV). En general, las fracciones evaluadas inhiben significativamente el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. Las fracciones VIII y IX mostraron menos selectividad en su actividad inhibitoria. Las fracciones XIII y XIV solo inhiben significativamente el crecimiento de los fungoides *P. capsici* y *P. parasitica*, los cuales fueron los más afectados por las fracciones cromatográficas, en general, la inhibición de su crecimiento es superior al 50%. La fracción XV únicamente inhibe de manera significativa el crecimiento de *P. parasitica*. Las fracciones VIII a XII resultaron ser las más activas ya que inhiben significativamente el crecimiento radial de todos los microorganismos de prueba.

Debido a que las fracciones menos polares (I a VII) no son solubles en un disolvente adecuado (metanol, agua o acetona) para realizar los bioensayos con microorganismos, no se pudo determinar su efecto antifúngico.

Como producto del fraccionamiento biodirigido del extracto activo del micelio, utilizando diversos procedimientos cromatográficos, se aislaron y purificaron nueve metabolitos secundarios, incluyendo un derivado novedoso de preusomerina: la preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**) y dos derivados novedosos de deoxipreusomerina: la palmarumicina EG<sub>1</sub> (**87**) y la EG<sub>2</sub> (**88**) y seis compuestos conocidos: la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**), la EG<sub>2</sub> (**38**), la EG<sub>3</sub> (**37**), la palmarumicina CP<sub>2</sub> (**51**), la CP<sub>17</sub> (**64**) y el ergosta-

4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**89**). En el cuadro 9 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento y las fracciones cromatográficas de donde se aislaron.

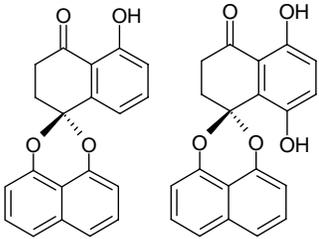
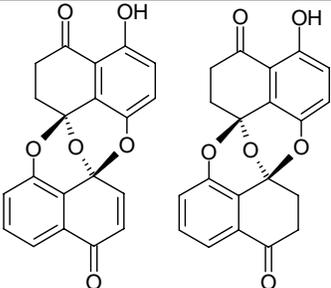
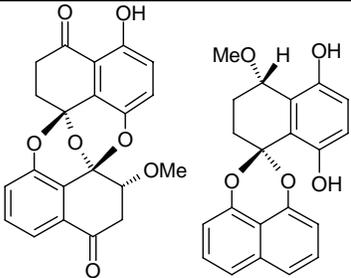
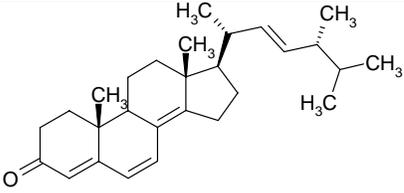
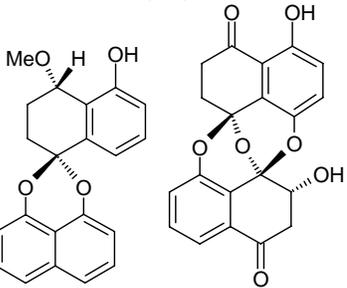


**Gráfico 3.** Efecto de las fracciones primarias del extracto orgánico del micelio (250 µg/mL) del hongo endófito *E. gomezpompae* sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici* y *Alternaria solani*. \*  $n=4$ ,  $p<0.05$

### 6.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES ACTIVAS

La caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quiroópticos convencionales.

**Cuadro 9.** Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito *Edenia gomezpompae*

Metabolito (Estructura)	Número	Peso (mg)	Rendimiento (mg/L)	Fracciones (Clave)
 <b>(51)</b> <b>(64)</b>	<b>51</b>	488	16.3	V
	<b>64</b>	61	2.0	VII
 <b>(36)</b> <b>(86)</b>	<b>36</b>	211	7.0	VIII IX
	<b>86</b>	36	1.20	IX
 <b>(37)</b> <b>(87)</b>	<b>37</b>	50	1.67	X X-9
	<b>87</b>	8	0.27	X X-9
 <b>(89)</b>	<b>89</b>	11.8	0.40	X X-9
 <b>(88)</b> <b>(38)</b>	<b>88</b>	17.6	0.58	X X-9 XI XI-2
	<b>38</b>	18.5	0.62	XI XI-5

### 6.5.1. Caracterización de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (36) y EG<sub>4</sub> (86)

Las preusomerinas **36** y **86** se obtuvieron como sólidos cristalinos de color amarillo solubles en diclorometano. En los cuadros 10-11 se indican sus constantes físicas y espectroscópicas.

Los espectros en el infrarrojo (IR) de estos compuestos presentan bandas de absorción asociadas con su carácter aromático ( $\nu_{\max.} \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) y con la presencia de grupos hidroxilo ( $\nu_{\max.} \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo conjugado ( $\nu_{\max.} \sim 1642 \text{ cm}^{-1}$ ) y un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado ( $\nu_{\max.} 1690 \text{ cm}^{-1}$ ) en la preusomerina EG<sub>1</sub> (cuadro 11).

La fórmula molecular de los productos naturales **36** y **86** se estableció como C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> y C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, respectivamente mediante espectrometría de masas de alta resolución. Estas fórmulas permiten calcular un índice de insaturación de quince y catorce, respectivamente.

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) y bidimensionales (HMQC, HMBC, COSY y NOESY) permitieron establecer que los dos productos naturales contienen un núcleo de preusomerina (Weber *et al.*, 1990; Weber y Gloer, 1991; Soman *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 1999; Bode *et al.*, 2000; Krohn, 2001; Seephonkai *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008). A continuación se discute en detalle las características principales de los espectros:

a) Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C (espectros 2 y 8; anexo I) presentan señales para 20 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas (cuadro 12).

b) En la región aromática de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (cuadro 13; espectros 1 y 7 anexo I) se observan señales que indican la presencia de anillos aromáticos 1,2,3-trisustituídos y 1,2,3,4-tetrasustituídos. Estas resonancias corresponden a un sistema de protones aromáticos *orto* acoplado en el caso de la preusomerina EG<sub>4</sub> en  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-8) y 7.03 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-7), el cual correlaciona con los metinos de carácter aromático en  $\delta_{\text{C}}$  120.6 y 126.0 en el espectro de correlación heteronuclear HSQC y a dos sistemas de protones aromáticos *orto* acoplados en la preusomerina EG<sub>1</sub> en  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-8) y 7.01 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-7) y en  $\delta_{\text{H}}$  6.56 (*d*, *J* = 9.5 Hz, H-2') y 7.17 (*d*, *J* = 9.5 Hz, H-3'). Estas cuatro señales presentan correlación en el espectro HSQC con los metinos en  $\delta_{\text{C}}$  120.7, 126.2, 133.3 y 141.2, respectivamente. De acuerdo con los desplazamientos

químicos observados, el carbono en  $\delta_C$  141.2 (C-3') es asignable a un carbono  $\beta$  a un grupo carbonilo. Asimismo, las señales para H-2' y H-3' son características de un fragmento Z-olefínico de un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado.

c) En la región aromática de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (espectros 1 y 7 anexo I) se observa para ambos compuestos, tres hidrógenos aromáticos conformando un sistema ABC como señales doble de dobles alrededor de  $\delta_H$  7.60 ( $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz, H-7'), 7.38 ( $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 7.5$  Hz, H-8') y 7.5 ( $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz, H-9').

d) Ambos compuestos presentan una señal simple en  $\delta_H$  11.71 (**36**) y 11.69 (**86**) debido a la presencia de un grupo hidroxilo quelatado. Esta observación permitió proponer *a priori* que este grupo debía encontrarse en C-9 (figura 3).

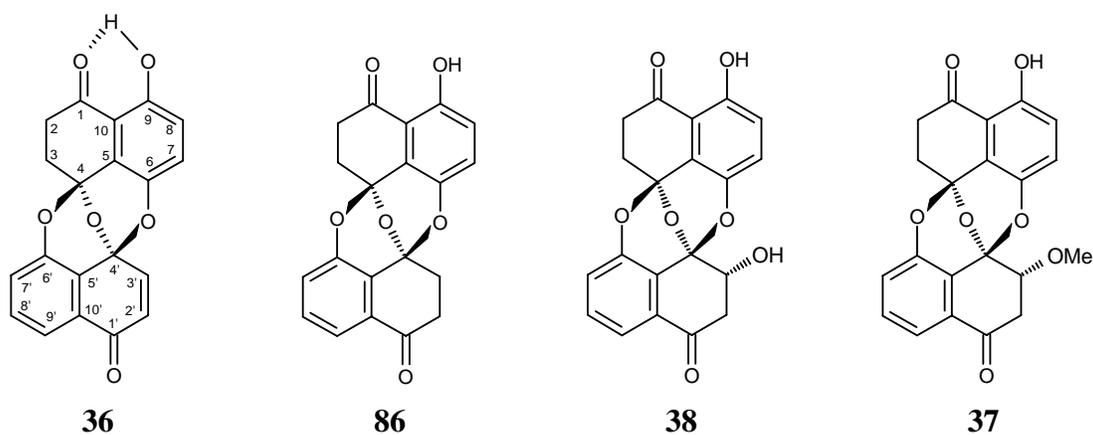
e) A campo alto, los espectros de RMN- $^1\text{H}$  presentan dos pares de señales doble de doble de doble con desplazamientos químicos alrededor de  $\delta_H$  2.90 ( $J_1 = 19.0$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz,  $J_3 = 2.0$  Hz; H-2a,) y 3.35 ( $J_1 = 19.0$  Hz,  $J_2 = 13.5$  Hz,  $J_3 = 5.5$  Hz; H-2b ) y en 2.53 ( $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 13.5$  Hz,  $J_3 = 5.5$  Hz; H-3a) y 2.74 ( $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz,  $J_3 = 2.0$  Hz; H-3b ) asignables a los metilenos C-2 y C-3 del núcleo base los cuales correlacionan con las señales en  $\delta_C$  33.7 y 32.6 (**36**) y en 33.7 y 32.7 (**86**) en el espectro de correlación heteronuclear HSQC. Adicionalmente, la preusomerina EG<sub>4</sub> presenta dos pares mas de señales *ddd* centradas en  $\delta_H$  2.86 ( $J_1 = 19.0$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz,  $J_3 = 2.0$  Hz; H-2a'), y 3.28 ( $J_1 = 19.0$  Hz,  $J_2 = 13.5$  Hz,  $J_3 = 5.5$  Hz; H-2b') y en 2.46 ( $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 13.5$  Hz,  $J_3 = 5.5$  Hz; H-3a') y 2.74 ( $J_1 = 13.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz,  $J_3 = 2.0$  Hz; H-3b'), asignables a los grupos metileno C-2' y C-3' los cuales correlacionan con las señales en  $\delta_C$  33.8 y 32.8 en los espectros HSQC. Las señales en RMN- $^1\text{H}$  de los compuestos **36** y **86** se muestran en el cuadro 13.

f) Finalmente, el experimento DEPT de RMN- $^{13}\text{C}$  permitió asignar el resto de los carbonos observados, a dos grupos carbonilo conjugados alrededor de  $\delta_C$  202 (C-1) y 190 (C-1') y nueve carbonos cuaternarios  $\delta_C$  93 (C-4), 121 (C-5), 141 (C-6), 157 (C-9), 113 (C-10), 92 (C-4'), 120 (C-5'), 150 (C-6') y 130 (C-10') [cuadro 12, figura3]. De acuerdo con los desplazamientos químicos observados los carbonos alrededor de  $\delta_C$  141 (C-6), 149 (C-6') y 157 (C-9) se encuentran unidos a funciones oxigenadas y las señales aproximadamente en  $\delta_C$  92 (C-4') y 94 (C-4) son características para los carbonos

espirocetales de las preusomerinas (Weber *et al.*, 1990; Weber y Gloer, 1991; Singh *et al.*, 1994; Krohn *et al.*, 2001; Quesada *et al.*, 2004; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008).

El análisis detallado de los espectros de correlación homonuclear (COSY y NOESY) y heteronuclear (HMBC) permitió determinar la ubicación del grupo hidroxilo en el núcleo preusomerina. Las conclusiones más importantes se resumen en los cuadros 14 y 15.

Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del nuevo producto natural (**86**) se estableció como la indicada en la figura 3 y se le asignó el nombre trivial de preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**). Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos del producto natural **36** se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Estructura de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**), EG<sub>3</sub> (**37**) y EG<sub>4</sub> (**86**)

### 6.5.2. Caracterización de las preusomerinas EG<sub>2</sub> (**38**) y EG<sub>3</sub> (**37**)

Las preusomerinas **38** y **37** se obtuvieron como sólidos cristalinos de color amarillo claro y anaranjado, respectivamente, solubles en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. En los cuadros 15-20 se indican sus constantes físicas y espectroscópicas. El análisis detallado de sus constantes espectrométricas y espectroscópicas permiten establecer que los productos naturales **38** y **37** son muy similares a las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**) y EG<sub>4</sub> (**86**).

La comparación de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **38** con los de la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**) mostraron como únicas diferencias la ausencia del doble enlace en

C-2', C-3' y la presencia de un grupo hidroxilo en OH-3'/C-3' ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2.38/70.3) y de una señal triple en  $\delta_{\text{H}}$  4.71 (pseudo-*t dd*,  $J_1 = 3.0$  Hz,  $J_2 = 3.0$  Hz; H-3') que integra para un hidrógeno, asignable al metino C-3' del núcleo base y que se encuentra geminal al grupo hidroxilo evidenciado anteriormente. También se observan las señales características para dos protones alifáticos en  $\delta_{\text{H}}$  3.02 (1H, *dd*,  $J_1 = 3.0$  Hz,  $J_2 = 18.3$  Hz; H-2a') y 3.38 (1H, *dd*,  $J_1 = 3.0$ ,  $J_2 = 18.3$  Hz; H-2b').

La configuración absoluta del centro quiral en C-3' se estableció como 3*R*, con base en el efecto Cotton negativo en 334 y 218 nm observado en el espectro de dicroísmo circular del compuesto **38** (Krohn *et al.*, 2001). La propuesta estructural se comprobó mediante el análisis de las correlaciones observadas en los espectros HMBC y NOESY, mismas que se resumen en los cuadros 14 y 15.

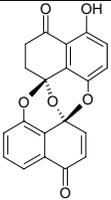
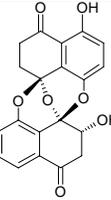
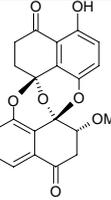
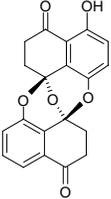
Cabe destacar que las correlaciones H-2a' ( $\delta_{\text{H}}$  3.02), H-2b' ( $\delta_{\text{H}}$  3.39) y H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  4.27)/OH-3 ( $\delta_{\text{H}}$  2.38, *s*) observadas en los espectros NOESY (cuadro 14), así como las interacciones entre los carbonos asignados a las posiciones C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  94.0), C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  119.3) y C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  193.6), con el hidrógeno del OH en la posición C-3' en el espectros HMBC, permiten confirmar la ubicación del grupo hidroxilo en el compuesto **38** (cuadro 15).

Por otra parte, en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectros 3 y 5; anexo I) del compuesto **37** se observa como única diferencia con respecto a la preusomerina EG<sub>2</sub> (**38**) la desaparición de la señal simple ancha debida a la presencia en la molécula de un grupo hidroxilo en  $\delta_{\text{H}}$  2.38 (OH-3') en el compuesto **38**. En su lugar se observa la presencia de una señal simple en  $\delta_{\text{H}}$  3.51, asignable a un grupo metoxi en C-3'. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (espectro 4 y 6; anexo I) presenta por consiguiente un átomo de carbono adicional en  $\delta_{\text{C}}$  59.2 asignado al grupo metoxi, evidenciado en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H. Es importante mencionar que, al igual que en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H no se observan otros cambios importantes en las señales restantes. Esta propuesta estructural se comprobó mediante el análisis de las correlaciones observadas en los espectros HMBC y NOESY, y que se indican en los cuadros 14 y 15. De la misma forma las correlaciones entre H-2a' ( $\delta_{\text{H}}$  3.08 *dd*,  $J_1 = 18.0$  Hz,  $J_2 = 3.0$  Hz), H-2b' ( $\delta_{\text{H}}$  3.39 *dd*,  $J_1 = 3.0$  Hz,  $J_2 = 18.0$  Hz) y H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  4.27 pseudo *tdd*,  $J_1 = 3.0$  Hz,  $J_2 = 3.0$  Hz)/CH<sub>3</sub>O-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3.51, *s*) observadas en los espectros NOESY (cuadro 14), así como la interacción entre el carbono asignado a la posición C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  79.3) con los hidrógenos H-2a', H-2b' y los hidrógenos del CH<sub>3</sub>O/C-3' en el espectro

HMBC, permiten confirmar la ubicación del grupo metoxilo en el compuesto **37**. De nueva cuenta, la configuración absoluta del centro estereogénico en C-3 se estableció como *3R*, con base en el efecto Cotton negativo (314 nm) observado en el espectro de dicroísmo circular del compuesto **37** (Krohn *et al.*, 2001).

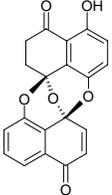
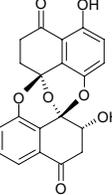
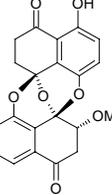
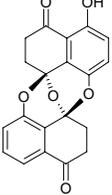
Con base en la información anterior, la estructura de los productos naturales **38** y **37** se estableció como la indicada en la figura 3 y se les asignaron los nombres triviales de preusomerina EG<sub>2</sub> (**38**) y EG<sub>3</sub> (**37**), respectivamente. Cabe señalar que todos los datos espectroscópicos de estos productos naturales, se encuentran de acuerdo con los descritos previamente en la literatura (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

**Cuadro 10.** Constantes físicas de las preusomerinas **36**, **38**, **37** y **86**

METABOLITO	p.f	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> (c 1 mg/mL);	P.M.	F.M.
 <p>(36)</p>	215.7 °C	-114°*	m/z 348	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
 <p>(38)</p>	224 °C	-143°*	m/z 366	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
 <p>(37)</p>	183.6–185.6 °C	-178°§	m/z 380	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>
 <p>(86)</p>	242.1-246.0 °C	-----	m/z 350	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>

\*CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, †CHCl<sub>3</sub>, §CH<sub>3</sub>OH

**Cuadro 11.** Constantes espectroscópicas de UV, IR, DC y espectrométricas (EM-IE *m/z*) de las preusomerinas **36**, **38**, **37** y **86**

METABOLITO	UV ( $\lambda_{\max}$ , log $\epsilon$ )	DC ( $\Delta\epsilon$ )	IR $\nu_{\max}$ (KBr)	EM-IE ( <i>m/z</i> )
 <b>(36)</b>	348 (3.10), 307 (2.72), 264 (3.29), 252 (3.24), 232 (3.66) nm.*	-----	3078, 1679, 1642, 1592, 1472, 1359, 1330, 1297, 1274, 1231 cm <sup>-1</sup>	348 [M <sup>+</sup> (81)], 303 (4), 191 (4), 175 (31), 174 (100), 173 (4), 147 (8), 146 (11), 118 (6) 75 (7); HRMS <i>m/z</i> 348.0631 (cal. C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> , 348.0633).
 <b>(38)</b>	359 (3.10), 333 (2.94), 318 (3.04), 283 (2.63), 258 (3.66), 243 (3.49), 221 (3.95) nm.*	-1.0 x 10 <sup>6</sup> (219) nm -4.8 x 10 <sup>4</sup> (334) nm <sup>§</sup>	3452, 1692, 1648, 1596, 1471, 1329, 1291, 1226 cm <sup>-1</sup>	366 [M <sup>+</sup> (100)], 348 (7), 337 (18), 323 (6), 295 (6), 282 (12), 277 (6), 266 (6), 238 (13), 192 (23), 176 (20), 175 (10), 174 (11), 163 (9), 147 (6), 91 (8), 55 (8), 18 (26); HRMS <i>m/z</i> 366.0737 (cal. C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> , 366.0739).
 <b>(37)</b>	362 (3.71), 335 (3.17), 316 (3.31), 283 (3.04), 261 (3.89), 209 (2.53) nm. <sup>§</sup>	-7.3 x 10 <sup>4</sup> (334) nm <sup>¥</sup>	3375, 2929, 2856, 1739, 1696, 1651, 1598, 1471, 1412, 1361, 1332, 1289, 1262, 1228 cm <sup>-1</sup>	380 [M <sup>+</sup> (100)], 365 (10), 347 (7), 321 (7), 294 (8), 293 (10), 277 (7), 266 (8), 265 (8), 238 (23), 210 (5), 192 (6), 189 (6), 175 (14), 174 (10), 147 (4), 119 (4), 91 (6), 75 (5), 55 (6); HRMS <i>m/z</i> 380.0892 (cal. C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> , 380.0896).
 <b>(86)</b>	360 (3.65), 332 (3.47), 315 (3.56), 281 (3.12), 258 (4.17), 243.5 (4.01), 220 (4.48) nm. <sup>§</sup>	-----	3434, 3085, 1690, 1642, 1593, 1473, 1365, 1331, 1291, 1230, cm <sup>-1</sup>	350 [M <sup>+</sup> (100)], 332 (7), 305 (4), 192 (9), 176 (82), 174(34), 175 (19), 147 (8), 120 (4), 91 (4), 77 (4), 55 (5), (cal. C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> , 350.0790)

\*CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, <sup>¥</sup>CHCl<sub>3</sub>, <sup>§</sup>CH<sub>3</sub>OH

**Cuadro 12.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las preusomerinas **36**, **38**, **37** y **86**

POSICIÓN	<sup>13</sup> C			
	Preusomerina EG <sub>1</sub> (36)	Preusomerina EG <sub>2</sub> (38)	Preusomerina EG <sub>3</sub> (37)	Preusomerina EG <sub>4</sub> (86)
<b>1</b>	201.9	202.0	202.2	202.2
<b>2</b>	33.7	33.7	33.8	33.7
<b>3</b>	32.6	32.7	32.8	32.7
<b>4</b>	93.7	93.4	93.2	93.3
<b>5</b>	119.5	120.1	120.3	120.0
<b>6</b>	141.4	140.9	140.9	141.4
<b>7</b>	126.2	126.0	126.0	126.0
<b>8</b>	120.7	120.9	120.7	120.6
<b>9</b>	157.3	157.5	157.3	157.2
<b>10</b>	112.6	113.0	113.0	113.0
<b>1'</b>	184.1	193.6	193.7	195.8
<b>2'</b>	133.3	41.3	40.4	33.8
<b>3'</b>	141.2	70.3	79.3	32.8
<b>4'</b>	89.6	94.0	94.4	93.3
<b>5'</b>	120.6	119.3	119.9	122.5
<b>6'</b>	149.5	150.8	150.6	149.4
<b>7'</b>	120.4	121.5	121.6	120.5
<b>8'</b>	130.8	131.1	130.9	130.8
<b>9'</b>	120.6	120.4	120.3	121.4
<b>10'</b>	130.4	130.8	130.9	130.9
<b>OH-3'</b>	----	----	---	---
<b>OH-9</b>	----	----	---	---
<b>CH<sub>3</sub>O-3'</b>	----	----	59.2	---

**Cuadro 13.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las preusomerinas **36**, **38**, **37** y **86**

POSICIÓN	<sup>1</sup> H (δ, mult., J en Hz)			
	Preusomerina EG <sub>1</sub> (36)	Preusomerina EG <sub>2</sub> (38)	Preusomerina EG <sub>3</sub> (37)	Preusomerina EG <sub>4</sub> (86)
<b>1</b>	---	---	---	---
<b>2a</b>	2.90 (1H, <i>ddd</i> , 19.0, 5.5, 2.0)	2.91 (1H, <i>ddd</i> , 18.8, 13.5, 5.5)	2.90 (1H, <i>ddd</i> , 18.6, 5.5, 2.0)	2.90 (1H, <i>ddd</i> , 19.5, 5.5, 2.0)
<b>2b</b>	3.35 (1H, <i>ddd</i> , 19.0, 13.5, 5.5)	3.37 (1H, <i>ddd</i> , 18.8, 5.5, 2.0)	3.37 (1H, <i>ddd</i> , 18.6, 13.5, 5.5)	3.36 (1H, <i>ddd</i> , 19.5, 13.5, 5.5)
<b>3a</b>	2.53 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 13.5, 5.5)	2.50 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 13.5, 5.5)	2.50 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 13.5, 5.5)	2.50 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 13.5, 5.5)
<b>3b</b>	2.74 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 5.5, 2.0)	2.77 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 5.5, 2.0)	2.80 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 5.5, 2.0)	2.71 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 5.5, 2.0)
<b>4</b>	---	---	---	---
<b>5</b>	---	---	---	---
<b>6</b>	---	---	---0.	---
<b>7</b>	7.01 (1H, <i>d</i> , 9.0)	7.04 (1H, <i>d</i> , 9.0)	7.02 (1H, <i>d</i> , 9.0)	7.03 (1H, <i>d</i> , 9.5)
<b>8</b>	6.91 (1H, <i>d</i> , 9.0)	6.94 (1H, <i>d</i> , 9.0)	6.92 (1H, <i>d</i> , 9.0)	6.91 (1H, <i>d</i> , 9.5)
<b>9</b>	---	---	---	---
<b>10</b>	---	---	---	---
<b>1'</b>	---	---	---	---
<b>2a'</b>	6.56 (1H, <i>d</i> , 9.5)	3.02 (1H, <i>dd</i> , 3.0, 18.3)	3.08 (1H, <i>dd</i> , 3.0, 18.0)	2.86 (1H, <i>ddd</i> , 19.0, 5.5, 2.0)
<b>2b'</b>		3.38 (1H, <i>dd</i> , 3.0, 18.3)	3.39 (1H, <i>dd</i> , 3.0, 18.0)	3.28 (1H, <i>ddd</i> , 19.0, 13.5, 5.5)
<b>3a'</b>	7.17 (1H, <i>d</i> , 9.5)	4.71 (1H, pseudo <i>t dd</i> , 3.0, 3.0)	4.27 (1H, pseudo <i>t dd</i> , 3.0, 3.0)	2.46 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 13.5, 5.5)
<b>3b'</b>				2.74 (1H, <i>ddd</i> , 13.5, 5.5, 2.0)
<b>4'</b>	---	---	---	---
<b>5'</b>	---	---	---	---
<b>6'</b>	---	---	---	---
<b>7'</b>	7.59 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 1.0)	7.09 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	7.08 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	7.62 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)
<b>8'</b>	7.38 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 7.5)	7.41 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 8.0)	7.38 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 8.0)	7.39 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 8.0)
<b>9'</b>	7.03 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	7.66 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	7.63 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	7.07 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)
<b>10'</b>	---	---	---	---
<b>OH-3'</b>	---	2.38 (1H, <i>s</i> )	---	---
<b>OH-9</b>	11.71 (1H, <i>s</i> )	11.71 (1H, <i>s</i> )	11.71 (1H, <i>s</i> )	11.69 (1H, <i>s</i> )
<b>CH<sub>3</sub>O-3'</b>	---	---	3.51 (3H, <i>s</i> )	---

**Cuadro 14.** Correlaciones observadas en los espectros NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las preusomerinas **36**, **38**, **37** y **86**

POSICIÓN	NOESY			
	Preusomerina EG <sub>1</sub> (36)	Preusomerina EG <sub>2</sub> (38)	Preusomerina EG <sub>3</sub> (37)	Preusomerina EG <sub>4</sub> (86)
<b>1</b>	---	---	---	---
<b>2a</b>	2b, 3a, 3b	2b, 3a, 3b	2b, 3a, 3b	2b, 3a, 3b
<b>2b</b>	2a, 3a, 3b	2a, 3a, 3b	2a, 3a, 3b	2a, 3a, 3b
<b>3a</b>	2a, 2b, 3b,	2a, 2b, 3b	2a, 2b, 3b	2a, 2b, 3b,
<b>3b</b>	2a, 2b, 3a	2a, 2b, 3a	2a, 2b, 3a	2a, 2b, 3a
<b>4</b>	---	---	---	---
<b>5</b>	---	---	---	---
<b>6</b>	---	---	---	---
<b>7</b>	8, OH-9	8	8	8
<b>8</b>	7, OH-9	7, OH-9	7, OH-9	7, OH-9
<b>9</b>	---	---	---	---
<b>10</b>	---	---	---	---
<b>1'</b>	---	---	---	---
<b>2a'</b>	3'	2b', 3'	2b', 3'	2b', 3a', 3b'
<b>2b'</b>		2a', 3'	2a', 3'	2a', 3a', 3b'
<b>3a'</b>	2'	2a', 2b', OH-3	2a', 2b', CH <sub>3</sub> O-3'	2a', 2b', 3b'
<b>3b'</b>				2a', 2b', 3a'
<b>4'</b>	---	---	---	---
<b>5'</b>	---	---	---	---
<b>6'</b>	---	---	---	---
<b>7'</b>	8', 9'	8'	8'	8', 9
<b>8'</b>	7', 9'	7', 9'	7', 9'	7', 9'
<b>9'</b>	8', 7'	8', 7'	8', 7'	8', 7'
<b>10'</b>	---	---	---	---
<b>OH-3'</b>	---	2a', 2b', 3'	---	---
<b>OH-9</b>	8	8	8	8
<b>CH<sub>3</sub>O-3'</b>	---	---	---	---

**Cuadro 15.** Correlaciones observadas en los espectros HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las preusomerinas **36**, **38**, **37** y **86**

POSICIÓN	HMBC (C → H)			
	Preusomerina EG <sub>1</sub> (36)	Preusomerina EG <sub>2</sub> (38)	Preusomerina EG <sub>3</sub> (37)	Preusomerina EG <sub>4</sub> (86)
<b>1</b>	2a, 2b, 3a, 3b, 8	2a, 2b, 3a, 3b, 8	2a, 2b, 3a, 3b, 8	2a, 2b, 3a, 3b, OH-9
<b>2a</b> <b>2b</b>	3a, 3b	3a, 3b	3a, 3b	3a, 3b
<b>3a</b> <b>3b</b>	2a, 2b	2a, 2b	2a, 2b	2a, 2b
<b>4</b>	2a, 2b, 3a, 3b, 7			
<b>5</b>	3a, 3b, 7, 8	3a, 3b, 7, 8	3b, 7, 8	3a, 3b, 7, 8
<b>6</b>	3b, 7, 8	3b, 7, 8	3b, 7, 8	3a, 3a', 3b, 3b', 7, 8
<b>7</b>	OH-9	8, OH-9	8, OH-9	8, OH-9
<b>8</b>	7, OH-9	7, OH-9	7, OH-9	OH-9
<b>9</b>	7, 8, OH-9	7, 8, OH-9	7, 8	7, 8, OH-9
<b>10</b>	2a, 7, 8, O H-9	2a, 7, 8, OH-9	2a, 7, 8, O H-9	2a, 7, 8, O H-9
<b>1'</b>	2', 3', 7', 8'	2a', 2b', 3', 8', 9'	2a', 2b', 3', 8', 9'	2a', 2b', 3a', 3b'
<b>2a'</b> <b>2b'</b>	---	---	---	3a', 3b'
<b>3'</b>	---	2a', 2b',	2a', 2b', CH <sub>3</sub> O-3'	2a', 2b',
<b>4'</b>	2', 3', 7', 9'	2a', 3', 7', 9'	2a', 3', 7', 9'	2a', 2b', 3a', 3b', 7', 9'
<b>5'</b>	3', 7', 8', 9'	3', 7', 8', 9'	3', 7', 8', 9'	3a', 3b', 7', 8', 9'
<b>6'</b>	3a, 3', 7', 8', 9'	3a, 7', 8', 9'	3a, 7', 8', 9'	3a, 3a', 3b, 3b', 7', 8', 9'
<b>7'</b>	8', 9'	8', 9'	8', 9'	8', 9'
<b>8'</b>	7' 9'	7' 9'	7', 9'	7', 9'
<b>9'</b>	2', 7', 8'	7' 8'	7', 8', OH-9	7', 8'
<b>10'</b>	2', 8' 9'	2a', 7', 8' 9'	2a', 7', 8' 9'	2a', 7', 8' 9'
<b>OH-3'</b>	---	---	---	---
<b>OH-9</b>	---	---	---	---
<b>CH<sub>3</sub>O-3'</b>	---	---	2b', CH <sub>3</sub> O-3'	---

### 6.5.3. Caracterización de las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (87) y EG<sub>2</sub> (88)

Las palmarumicinas novedosas **87** y **88** se aislaron como sólidos cristalinos de color amarillo claro, solubles en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los espectros en el UV presentan absorciones intensas en  $\lambda_{\text{max}}$  226 y 296 nm, sugiriendo la presencia de una porción naftalénica. Por otra parte, los espectros en el IR presentan como características relevantes la absorción para grupos hidroxilo en  $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$  y para bandas asociadas con su carácter aromático en  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ . Su fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas de alta resolución. Los espectros de masas presentan un ión molecular en una relación de masa carga ( $m/z$ ) de 350 y 334, y permiten establecer las fórmulas moleculares de C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> y C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, respectivamente (cuadro 17).

El análisis de los espectros de RMN (cuadros 18-21) permite establecer que los productos naturales presentan el núcleo estructural palmarumicina o deoxipreusomerina (Krohn *et al.*, 1994a; Krohn *et al.*, 1994b; Ragot *et al.*, 1999; Wipf *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2000; Jiao *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006).

Así, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (cuadro 19, espectro 13; anexo I) del compuesto **87** presenta señales para dos grupos hidroxilo en  $\delta_{\text{H}}$  7.03 (OH-6, *s*) y 7.57 (OH-9, *s*), un grupo metoxilo en  $\delta_{\text{H}}$  3.48 (CH<sub>3</sub>O-1, *s*) y ocho hidrógenos aromáticos. Seis de los hidrógenos aromáticos conforman dos sistemas ABC en el núcleo naftalénico 1,8 dioxi sustituido ubicadas alrededor de  $\delta_{\text{H}}$  7.56 (*dd*,  $J_1 = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 1.0 \text{ Hz}$ ; H-1', H-9'), 7.46 (*dd*,  $J_1 = 8.0 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 7.5 \text{ Hz}$ ; H-2', H-8'), 7.01 (*dd*,  $J_1 = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 1.0 \text{ Hz}$ ; H-3', H-7'). Los otros dos corresponden a un sistema de protones aromáticos *orto* acoplados en  $\delta_{\text{H}}$  6.94 (*d*,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ , H-7) y 6.96 (*d*,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ , H-8).

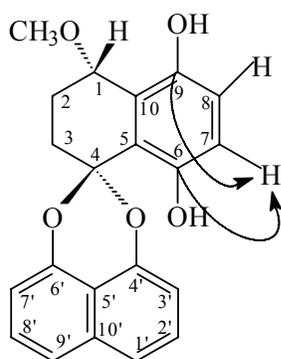
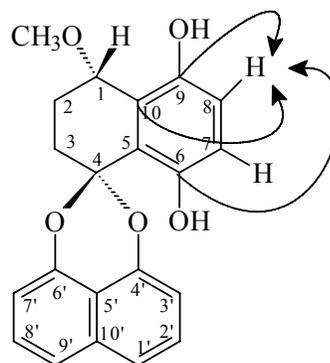
A campo alto, el espectro presenta cuatro señales múltiples centradas en  $\delta_{\text{H}}$  1.90 y 2.50, asignables a dos metilenos de carácter alifático. También se observa una señal pseudo triple centrada en  $\delta_{\text{H}}$  4.85 (*dd*,  $J_1 = 6.25 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 7.75 \text{ Hz}$ , H-1) que integra para un hidrógeno, asignable al metino C-1 del núcleo base y que se encuentra geminal al grupo metoxilo evidenciado anteriormente ( $\delta_{\text{H}}$  3.48).

Los datos generados por el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (espectro 14, anexo I) confirman la presencia de 21 átomos de carbono. De estas señales, ocho corresponden a metinos aromáticos ( $\delta_{\text{C}}$  110.4, 110.5, 119.2, 120.0, 121.2, 121.6, 127.5 y 127.6), cuatro a carbonos cuaternarios aromáticos ( $\delta_{\text{C}}$  113.8, 119.5, 122.1 y 134.2), una a un carbono espirocetal ( $\delta_{\text{C}}$

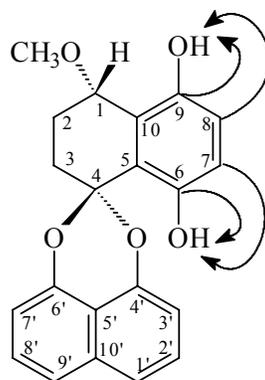
102.5), cuatro a carbonos aromáticos unidos a funciones oxigenadas ( $\delta_C$  146.5, 147.1, 149.4 y 149.5), una a un metino alifático unido a función oxigenada ( $\delta_C$  75.5) y las últimas tres señales corresponden a dos grupos metileno ( $\delta_C$  22.5 y 27.2) y a un grupo metoxilo ( $\delta_C$  54.2). Cabe mencionar que la discriminación entre metilos, metilenos y metinos se realizó mediante el análisis del espectro DEPT (cuadro 18).

Para establecer la disposición de los grupos funcionales y asignar los carbonos cuaternarios, se procedió a realizar el análisis de los espectros de RMN de correlación homonuclear (COSY y NOESY) y heteronuclear (HMBC). Las conclusiones más importantes se resumen a continuación:

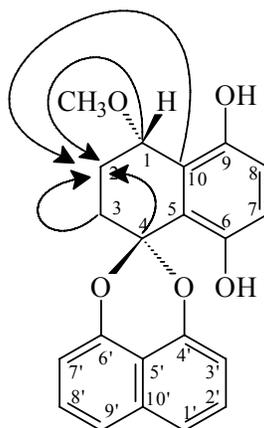
1) El espectro HMBC del compuesto **87** muestra que los carbonos cuaternarios base de oxígeno en  $\delta_C$  149.4 (C-9) y 149.5 (C-6) muestran una correlación con el protón aromático en  $\delta_H$  6.94 (H-7) [estructura **87 A**]. Por otro lado, las señales para estos dos carbonos y el carbono cuaternario en  $\delta_C$  119.5 (C-10) muestran una correlación a larga distancia con el hidrógeno aromático en  $\delta_H$  6.96 (H-8) [estructura **87 B**].

**87 A****87 B**

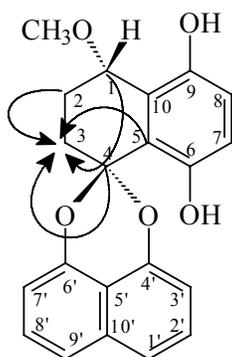
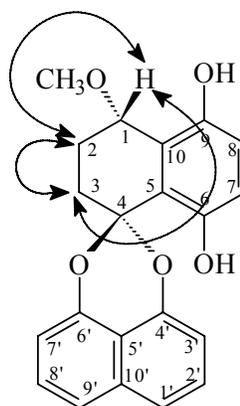
2) Las señales para el carbono cuaternario base de oxígeno en  $\delta_C$  149.5 (C-6) y para el carbono aromático en  $\delta_C$  119.2 (C-7) correlacionan con el hidrógeno en  $\delta_H$  7.03 asignado a un grupo hidroxilo en C-9. Asimismo, el carbono cuaternario en  $\delta_C$  149.4 (C-9) y la señal para el carbono aromático en  $\delta_C$  120.0 (C-8), muestran una correlación a larga distancia con el hidrógeno en  $\delta_H$  7.57 asignado a un grupo hidroxilo en C-9 (estructura **87 C**).

**87 C**

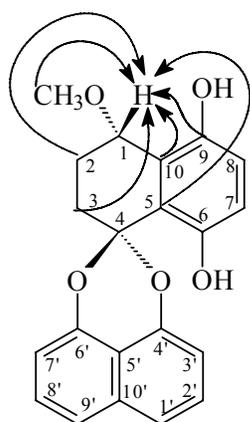
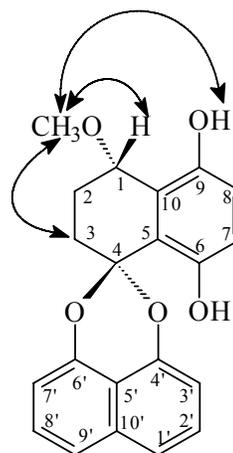
3) La señal para el carbono alifático unido a función oxigenada en  $\delta_C$  75.48 (C-1), el carbono cuaternario en  $\delta_C$  119.5 (C-10), el carbono del metileno en  $\delta_C$  22.5 (C-3) y el carbono espirocetal en  $\delta_C$  102.5 (C-4), muestran una correlación a larga distancia con los hidrógenos en  $\delta_H \sim 1.90$ -2.13 (H-2) [estructura **87 D**].

**87 D**

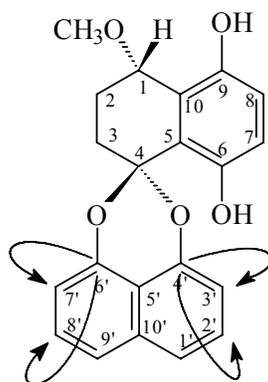
4) El carbono del metileno en  $\delta_C$  27.2 (C-2), el carbono del metino alifático unido a función oxigenada en  $\delta_C$  75.5 (C-1), el carbono cuaternario en  $\delta_C$  122.1 (C-5) y el carbono espirocetal en  $\delta_C$  102.5 (C-4), correlacionan con los hidrógenos en  $\delta_H$  2.13 (H-3) [estructura E]. De manera adicional, en los espectros COSY y NOESY, se observan las correlaciones entre H-2a/H-2b, H-3, entre H-3/ H-2a, H-2b y entre H-1/ H-2, H-3 (estructura **87 F**).

**87 E****87 F**

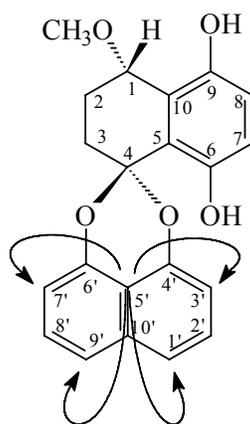
5) El espectro HMBC de la palmarumicina **87** muestra que el carbono cuaternario base de oxígeno en  $\delta_C$  149.4 (C-9), los carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  119.5 (C-10) y 122.1 (C-5) y los metilenos en  $\delta_C$  22.5 (C-3) y 27.2 (C-2), muestran una correlación con el protón en  $\delta_H$  4.85 (H-1') [estructura **87 G**]. El grupo de correlaciones descritas en los incisos 3-5, permiten ubicar al grupo metoxilo en la posición C-1. De manera adicional, en el espectro NOESY se observa una clara interacción entre el metoxilo en  $\delta_H$  3.48 (CH<sub>3</sub>O-1) y el hidrógeno del grupo hidroxilo en  $\delta_H$  7.57 (OH-9) y los hidrógenos en  $\delta_H$  2.13 (H-3) y 4.85 (H-1). Estas correlaciones proporcionan una evidencia adicional para la ubicación del grupo metoxilo en C-1' (estructura **87 H**).

**87 G****87 H**

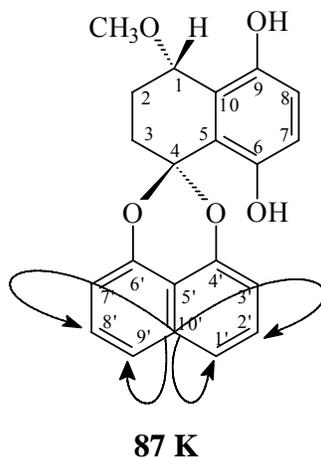
6) La señal para el carbono cuaternario base de oxígeno en  $\delta_C$  146.5 (C-4') correlacionan con los hidrógenos aromáticos en  $\delta_H$  7.00 (H-3') y 7.46 (H-2'). Por otro lado, el carbono cuaternario en  $\delta_C$  147.0 (C-6'), muestra una correlación a larga distancia con los hidrógenos en  $\delta_H$  7.02 (H-7') y 7.47 (H-8') [estructura **87 I**].

**87 I**

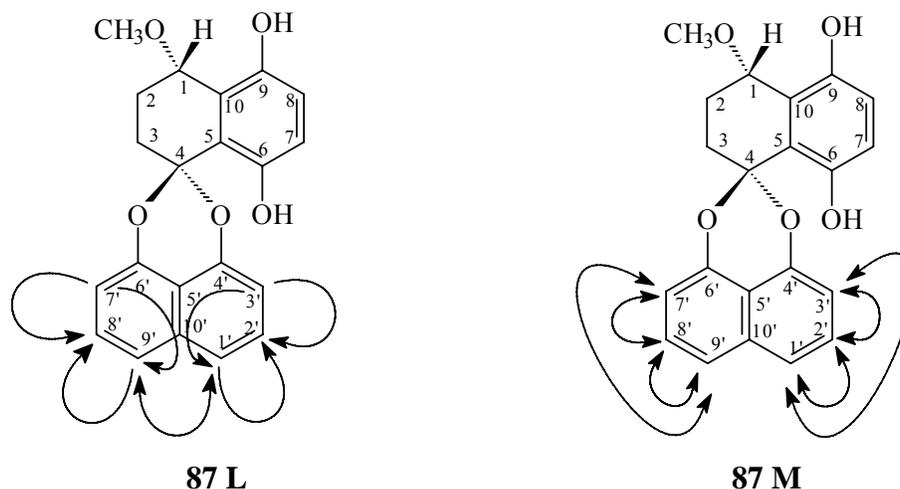
7) El carbono cuaternario en  $\delta_C$  113.8 (C-5'), muestra una correlación con los hidrógenos aromáticos en  $\delta_H$  7.00 (H-3'), 7.02 (H-7'), 7.56 (H-1') y en 7.57 (H-9') [estructura **87 J**].

**87 J**

8) El espectro HMBC del producto natural **87** muestra que el carbono cuaternario en  $\delta_C$  134.2 (C-10) correlaciona con los hidrógenos en  $\delta_H$  7.56 (H-1'), 7.46 (H-2'), 7.47 (H-8'), y en 7.57 (H-9') asignados a metinos aromáticos (estructura **87 K**).



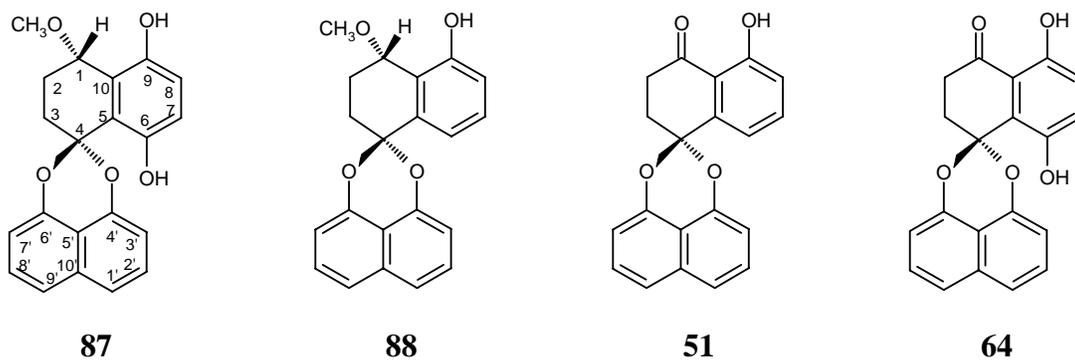
9) Los carbonos de los metinos en  $\delta_C$  110.4 (C-3') y en 121.2 (C-1') correlacionan con el hidrógeno en  $\delta_H$  7.46 (H-2'). El carbono en  $\delta_C$  110.4 (C-3') también muestra una correlación a larga distancia con el hidrógeno aromático en  $\delta_H$  7.56 (H-1'). Por otro lado, los carbonos en  $\delta_C$  110.5 (C-7') y en 121.6 (C-9') correlacionan con el hidrógeno en  $\delta_H$  7.47 (H-8'). El carbono del metino en  $\delta_C$  110.7 (C-7') además, muestra una correlación con el protón aromático en  $\delta_H$  7.57 (H-9'). Por último, los carbonos de los metinos en  $\delta_C$  121.2 (C-1') y 121.6 (C-9') correlacionan con los hidrógenos aromáticos en  $\delta_H$  7.57 (H-9') y 7.56 (H-1'), respectivamente [estructura **87 L**]. De manera adicional en los espectros COSY y NOESY, se observan las correlaciones entre H-1'/H-2', H-3', entre H-2'/H-1', H-3', entre H-3'/H-2', H-1', entre H-7'/H-8', H-9', H-8'/H-7', H-9' y entre H-9'/H-7', H-8' (estructura **87 M**).



En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **88** (espectros 13 y 15; anexo I) se observa como única diferencia la desaparición de la señal simple asignada al hidroxilo en C-9 ( $\delta_{\text{H}}$  7.57; OH-9) en el compuestos **87**. En su lugar se observa la presencia de un hidrógeno aromático, conformando ahora un sistema ABC ( $\delta_{\text{H}}$  7.42 *dd*,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz, H-6; 7.36 *dd*,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, H-7; 7.00 *dd*,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz, H-8) con los hidrógenos aromáticos *orto* acoplados ( $\delta_{\text{H}}$  6.94 (*d*,  $J = 9.0$  Hz, H-7 y 6.96 *d*,  $J = 9.0$  Hz, H-8) en el compuesto **87**.

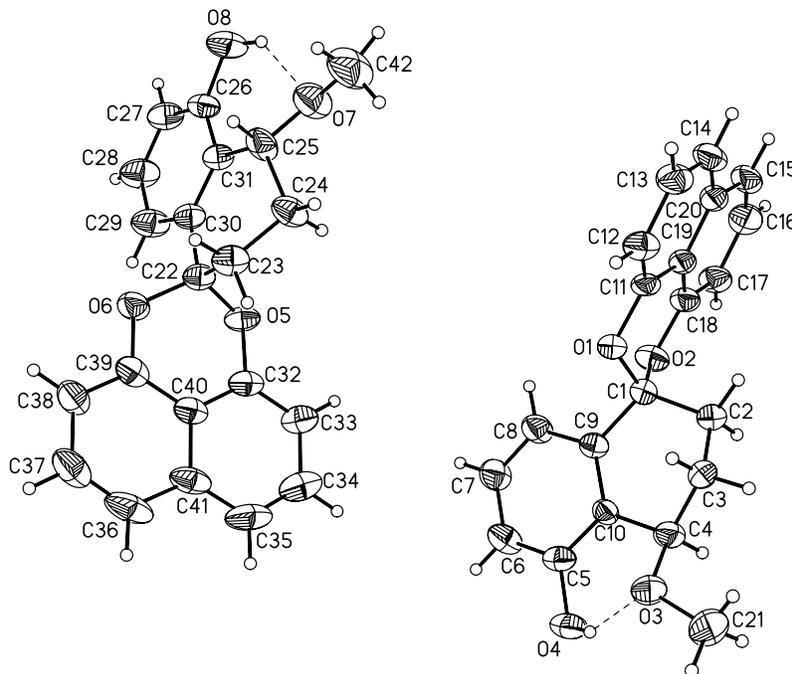
Los compuestos **87** y **88** presentan un efecto Cotton negativo en 307 y un efecto positivo 330 nm, en el espectro de dicroísmo circular. En consecuencia, la configuración absoluta en C-1 se designó como *S* (Sakemi *et al.*, 1995).

Con base en la información anterior, la estructura de los nuevos productos naturales **87** y **88** se estableció como la indicada en la figura 4 y se les asignaron los nombres triviales de palmarumicinas EG<sub>1</sub> (**87**) y EG<sub>2</sub> (**88**), respectivamente.



**Figura 4.** Estructuras de las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (**87**), EG<sub>2</sub> (**88**), CP<sub>2</sub> (**51**) y CP<sub>17</sub> (**64**)

La estructura de la palmarumicina EG<sub>2</sub> (**88**) se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En la figura 5 se muestra una vista estereoscópica de este compuesto.



**Figura 5.** Vista estereoscópica de la palmarumicina EG<sub>2</sub> (**88**)

#### 6.5.4. Caracterización de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)

Los productos naturales **64** y **51** se aislaron como sólidos cristalinos de color amarillo, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un punto de fusión de 200.4-201.5 °C y 169.5-171.2 °C, respectivamente.

Las fórmulas moleculares de estos compuestos se establecieron por espectrometría de masas como C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> y C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, respectivamente (cuadro 16), las cuales permiten un índice de insaturación de catorce.

En el cuadro 16 se presentan las constantes físicas y en el cuadro 17 las constantes espectroscópicas de UV, IR y espectrométricas (EM-IE) de los metabolitos **64** y **51**.

De nueva cuenta, el análisis exhaustivo de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas indicadas en los cuadros 17-21 permitieron establecer que los productos naturales **64** y **51** corresponden a los análogos desmetoxilados en la posición C-1 de las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (**87**) y EG<sub>2</sub> (**88**), respectivamente.

Las evidencias más importantes que apoyan esta propuesta son la ausencia en los espectros de RMN-<sup>13</sup>C (espectros 10 y 12; anexo I) de la señal en δ<sub>c</sub> 54.1 asignada al grupo metoxilo en la posición C-1 y la presencia de una señal alrededor de δ<sub>c</sub> 202.5, en lugar del metino en δ<sub>c</sub> 76.0 observado en los compuesto **87** y **88**.

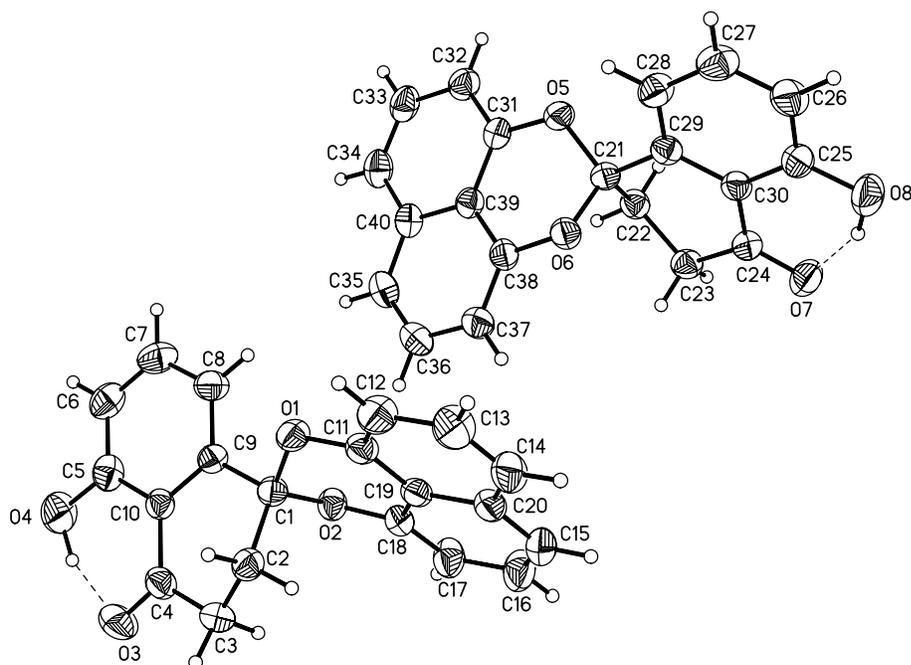
En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (espectros 9 y 11; anexo I) se observan como únicas diferencias la desaparición de las señales simples asignadas al hidrógeno en aproximadamente δ<sub>H</sub> 4.90 y al metoxilo en δ<sub>H</sub> 3.50 asignadas al C-1 en los compuestos **87** y **88**. Por último, cabe resaltar que las señales de los metilenos H-2 y H-3 se encuentran desplazadas paramagnéticamente alrededor de δ<sub>H</sub> 2.80 y 2.50 en armonía con la disposición de estos grupos vecinos a un carbonilo. Es importante mencionar que, al igual que en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C no se observan otros cambios importantes en las señales restantes.

Estas evidencias aunadas a la información proporcionada por los espectros bidimensionales (COSY, NOESY y HMBC) [cuadros 20-21] permiten identificar a los productos naturales **64** y **51** como las palmarumicinas CP<sub>17</sub> (**64**) y CP<sub>2</sub> (**51**).

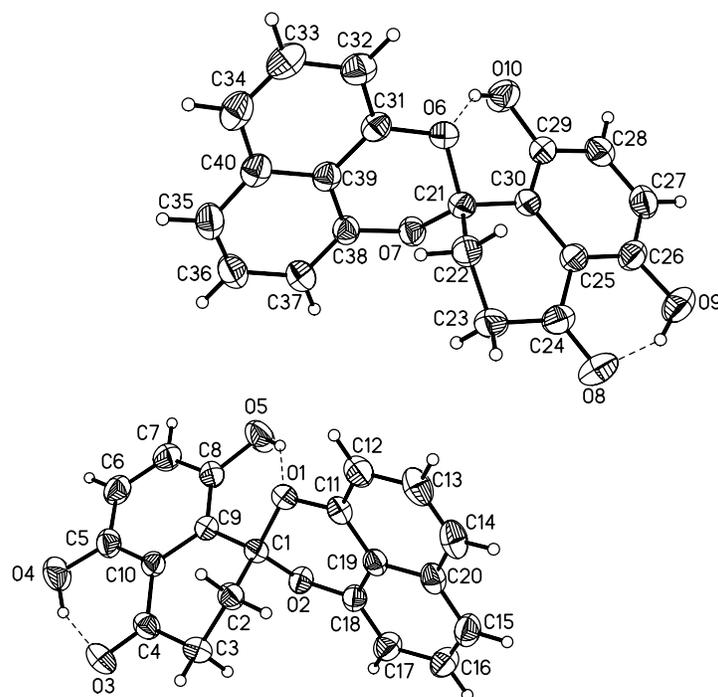
Todos los datos espectroscópicos de estos productos naturales, se encuentran de acuerdo con los descritos previamente en la literatura (Krohn *et al.*, 1994a; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008). La palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64**) se reportó por primera vez como metabolito secundario del hongo endófito *Edenia* sp. (Martínez *et al.*,

2008). Además, junto con las palmarumicinas EG<sub>1</sub> (**87**) y EG<sub>2</sub> (**88**) y las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**), EG<sub>3</sub> (**37**) y EG<sub>4</sub> (**86**), son hasta el momento metabolitos secundarios exclusivos del género *Edenia*.

La estructura de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> (**64**) y CP<sub>2</sub> (**51**) se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En las figuras 6 y 7 se presenta una vista estereoscópica de estos productos naturales.



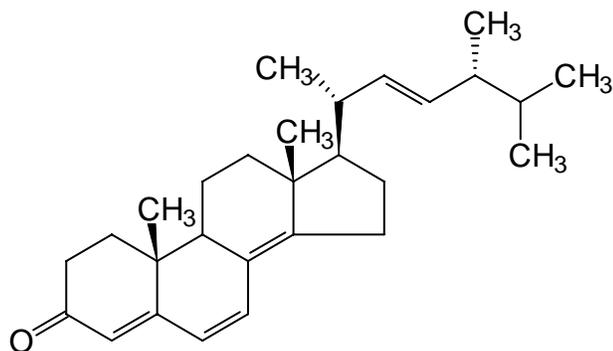
**Figura 6.** Vista estereoscópica de la palmarumicina CP<sub>2</sub> (**51**)



**Figura 7.** Vista estereoscópica de la palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64**)

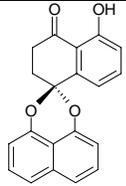
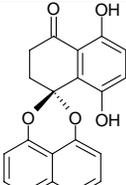
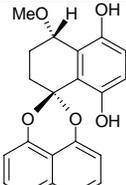
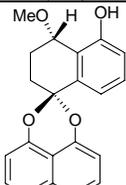
#### 6.5.5. Caracterización del ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**89**)

El producto natural **89** se aisló de la fracción secundaria 119-150 X-9 mediante CCFP, como un sólido amarillo fluorescente, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El compuesto se identificó como el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**89**) [figura 8] mediante la comparación de su comportamiento cromatográfico con el de una muestra auténtica y mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura (Tanaka *et al.*, 1996; Fujimoto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005)

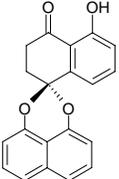
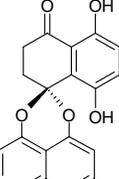
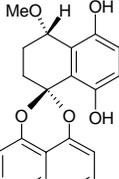
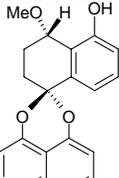


**Figura 8.** Estructura del ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**89**)

**Cuadro 16.** Constantes físicas de las palmarumicinas **51**, **64**, **87** y **88**

METABOLITO	p.f	P.M.	F.M.
 <p><b>(51)</b></p>	169.5-171.2 °C	<i>m/z</i> 318	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
 <p><b>(64)</b></p>	200.4-201.5 °C	<i>m/z</i> 334	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
 <p><b>(87)</b></p>	-----	<i>m/z</i> 350	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>
 <p><b>(88)</b></p>	164.5-166.2 °C	<i>m/z</i> 334	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>

**Cuadro 17.** Constantes espectroscópicas de UV, IR, DC y espectrométricas (EM-IE  $m/z$ ) de las palmarumicinas **51**, **64**, **87** y **88**

METABOLITO	UV ( $\lambda_{\max}$ log $\epsilon$ )	IR $\nu_{\max}$ (KBr)	EM-IE ( $m/z$ )
 <p><b>(51)</b></p>	327.5 (3.97), 323.5 (3.87), 314 (3.94), 309 (3.87), 299.5 (3.95), 270.5 (3.52), 254.5 (3.91), 244 (3.79), 255 (4.81) nm*	3057, 1639, 1456, 1411, 1380, 1333, 1270, 1100 cm <sup>-1</sup>	318 [M <sup>+</sup> (100)], 301 (27), 170 (6), 159 (24), 160 (5), 131 (17), 18, (4) (cal. C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> 318.0892)
 <p><b>(64)</b></p>	366.5 (3.76), 334 (3.48), 327 (3.74), 323 (3.61), 312.5 (3.77), 309 (3.75), 298 (3.89), 272.5 (3.64), 259 (3.78), 251.5 (3.75), 266 (4.81) nm <sup>§</sup>	3420, 3058, 1642, 1611, 1447, 1409, 1378, 1264, 1232, 1173 cm <sup>-1</sup>	334 [M <sup>+</sup> (100), 317 (13), 210 (7), 165 (6), 160 (29), 115 (10), 105 (22), 77 (6), 18 (15), (cal. C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> 334.08412)
 <p><b>(87)</b></p>	-----	3453, 3063, 1608, 1468, 1409, 1376, 1264, 1053 cm <sup>-1</sup>	350 [M <sup>+</sup> (19)], 318 (100), 301 (7), 300 (7), 273 (7), 175 (7) 160 (24), 144 (7), 131 (8), 115 (5), (cal. C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> 350.11542)
 <p><b>(88)</b></p>	328.5 (3.39), 325.5 (3.24), 314.5 (3.53), 311 (3.49), 300.5 (3.66), 296 (3.64), 289 (3.7), 253 (3.11), 266.5 (4.43), 213 (4.25), 207 (4.27) nm <sup>§</sup>	3294, 3057, 2957, 1607, 1641, 1411, 1379, 1273, 1067 cm <sup>-1</sup>	334 [M <sup>+</sup> (19)], 302 (100), 285 (13), 284 (9) 160 (6), 131 (7), 115 (14) (cal. C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> 334.1205)

\*CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, <sup>†</sup>CHCl<sub>3</sub>, <sup>§</sup>CH<sub>3</sub>OH

**Cuadro 18.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las palmarumicinas **51**, **64**, **87** y **88**

POSICIÓN	<sup>13</sup> C			
	Palmarumicina EG <sub>1</sub> (87)	Palmarumicina EG <sub>2</sub> (88)	Palmarumicina CP <sub>2</sub> (51)	Palmarumicina CP <sub>17</sub> (64)
<b>1</b>	75.5	76.2	203.3	202.4
<b>2</b>	27.2	28.0	34.1	33.8
<b>3</b>	22.5	23.1	29.4	29.0
<b>4</b>	102.5	99.5	98.4	102.0
<b>5</b>	122.1	136.5	140.8	119.7
<b>6</b>	149.5	117.9	116.7	147.7
<b>7</b>	119.2	130.0	137.2	128.9
<b>8</b>	120.0	118.8	119.6	121.9
<b>9</b>	149.4	156.2	162.4	157.2
<b>10</b>	119.5	121.8	115.4	114.5
<b>1'</b>	121.2	120.4	120.9	121.9
<b>2'</b>	127.5	127.4	127.5	127.6
<b>3'</b>	110.4	109.4	109.4	110.5
<b>4'</b>	146.5	147.8	147.4	146.3
<b>5'</b>	113.8	113.6	113.3	113.5
<b>6'</b>	147.1	148.0	147.4	146.3
<b>7'</b>	110.5	109.3	109.4	110.5
<b>8'</b>	127.6	127.5	127.5	127.6
<b>9'</b>	121.6	120.5	120.9	121.9
<b>10'</b>	134.2	134.2	134.2	134.2
<b>OH-6</b>	---	---	---	---
<b>OH-9</b>	---	---	---	---
<b>CH<sub>3</sub>O-1</b>	54.2	54.1	---	---

**Cuadro 19.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las palmarumicinas **51**, **64**, **87** y **88**

POSICIÓN	<sup>1</sup> H (δ, mult., J en Hz)			
	Palmarumicina EG <sub>1</sub> (87)	Palmarumicina EG <sub>2</sub> (88)	Palmarumicina CP <sub>2</sub> (51)	Palmarumicina CP <sub>17</sub> (64)
<b>1</b>	4.85 (1H, <i>Pseudo t dd</i> , 6.0, 7.5)	4.93 (1H, <i>Pseudo t dd</i> , 6.0, 8.5)	---	---
<b>2a</b>	1.98 m	1.93 m	2.84 t (6.5)	2.76 t (6.5)
<b>2b</b>	2.42 m	2.43 m		
<b>3</b>	2.13 m	2.20 m	2.49 t (6.5)	2.51 t (6.5)
<b>4</b>	---	---	---	---
<b>5</b>	---	---	---	---
<b>6</b>	---	7.42 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	7.45 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 1.0)	---
<b>7</b>	6.94 (1H, <i>d</i> , 9.0)	7.36 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 8.0)	7.62 (1H, <i>t</i> 8.0)	7.25 (1H, <i>d</i> , 9.0)
<b>8</b>	6.96 (1H, <i>d</i> , 9.0)	7.00 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.0)	6.91 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.0)	7.07 (1H, <i>d</i> , 9.0)
<b>9</b>	---	---	---	---
<b>10</b>	---	---	---	---
<b>1'</b>	7.56 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 7.5)	7.5 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)	7.53 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.0)	7.60 (1H, <i>dd</i> , 9.0, 1.0)
<b>2'</b>	7.46 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 7.5)	7.42 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 8.0)	7.45 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 7.5)	7.48 (1H, <i>dd</i> , 9.0, 7.5)
<b>3'</b>	7.00 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 7.5)	6.92 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)	6.97 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 1.0)	7.05 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 1.0)
<b>4'</b>	---	---	---	---
<b>5'</b>	---	---	---	---
<b>6'</b>	---	---	---	---
<b>7'</b>	7.02 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 7.5)	6.94 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)	6.97 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 1.0)	7.05 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 1.0)
<b>8'</b>	7.47 (1H, <i>dd</i> , 7.5, 8.5)	7.43 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 8.0)	7.45 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 7.5)	7.48 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 7.5)
<b>9'</b>	7.57 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.5)	7.5 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 8.0)	7.53 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.0)	7.60 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.0)
<b>10'</b>	---	---	---	---
<b>OH-6</b>	7.57 (1H, <i>s</i> )	---	---	12.36 (1H, <i>s</i> )
<b>OH-9</b>	7.03 (1H, <i>s</i> )	8.25 (1H, <i>s</i> )	12.44 (1H, <i>s</i> )	7.64 (1H, <i>s</i> )
<b>CH<sub>3</sub>O-1</b>	3.48 (3H, <i>s</i> )	3.51 (3H, <i>s</i> )	---	---

**Cuadro 20.** Correlaciones observadas en los espectros NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las palmarumicinas **51**, **64**, **87** y **88**

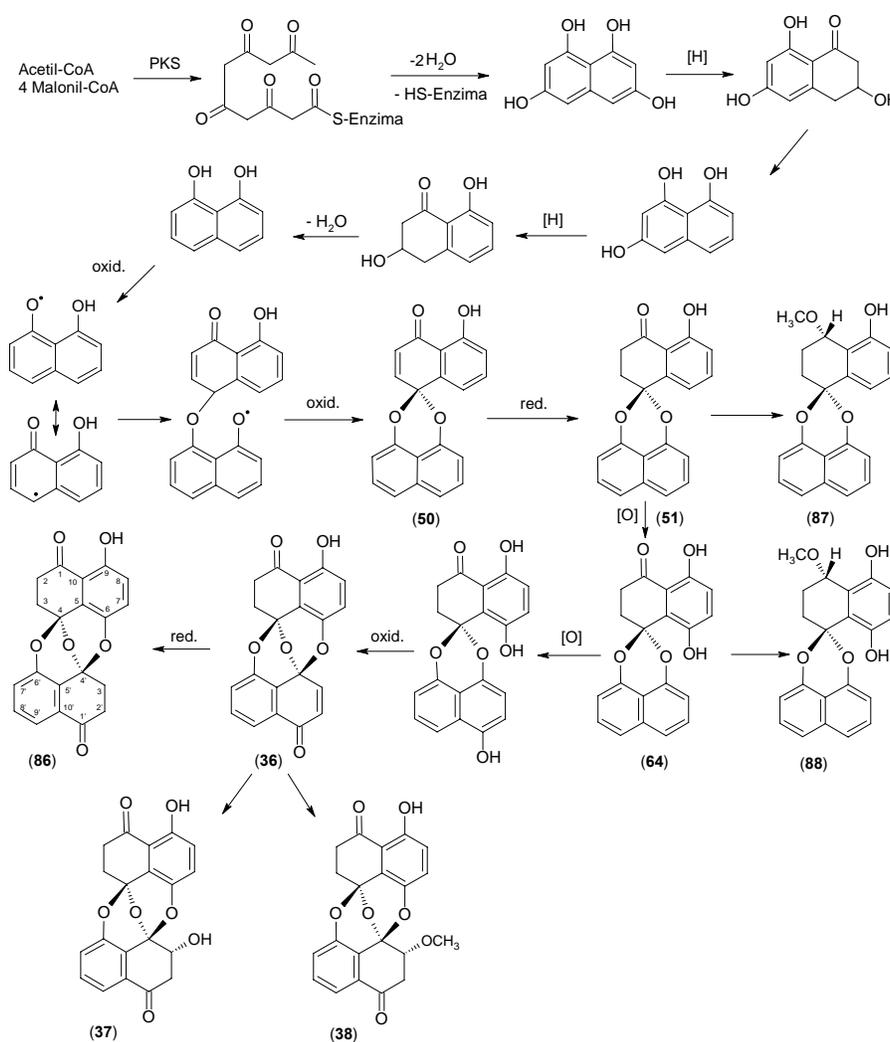
POSICIÓN	NOESY			
	Palmarumicina EG <sub>1</sub> (87)	Palmarumicina EG <sub>2</sub> (88)	Palmarumicina CP <sub>2</sub> (51)	Palmarumicina CP <sub>17</sub> (64)
<b>1</b>	3, 2a, CH <sub>3</sub> O-1, OH-9	3	---	---
<b>2</b>	2b, 3 2a, 3	2b, 3 2a, 3	3, OH-9	3, OH-9
<b>3</b>	1, 2a, 2b, CH <sub>3</sub> O-1	1, 2a, 2b	2, OH-9	2, OH-9
<b>4</b>	---	---	---	---
<b>5</b>	---	---	---	---
<b>6</b>	---	7	---	---
<b>7</b>	---	6	6, 8	8, OH-6
<b>8</b>	---	---	7	7, OH-9
<b>9</b>	---	---	---	---
<b>10</b>	---	---	---	---
<b>1'</b>	2', 3'	2', 3'	2', 3'	2', 3'
<b>2'</b>	1', 3'	1', 3'	1', 3'	1', 3'
<b>3'</b>	2', 1'	2', 1'	1', 2'	1', 2'
<b>4'</b>	---	---	---	---
<b>5'</b>	---	---	---	---
<b>6'</b>	---	---	---	---
<b>7'</b>	8', 9'	8', 9'	8', 9'	8', 9'
<b>8'</b>	7', 9'	7', 9'	7', 9'	7', 9'
<b>9'</b>	8', 7'	8', 7'	7', 8'	7', 8'
<b>10'</b>	---	---	---	---
<b>OH-6</b>	---	---	2, 3	7
<b>OH-9</b>	1, CH <sub>3</sub> O-1	---	---	2, 3, 8
<b>CH<sub>3</sub>O-1</b>	1, 3, OH-9	---	---	---

**Cuadro 21.** Correlaciones observadas en los espectros HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las palmarumicinas **51**, **64**, **87** y **88**

POSICIÓN	HMBC (C→H)			
	Palmarumicina EG <sub>1</sub> (87)	Palmarumicina EG <sub>2</sub> (88)	Palmarumicina CP <sub>2</sub> (51)	Palmarumicina CP <sub>17</sub> (64)
<b>1</b>	CH <sub>3</sub> O-1, 2a, 2b, 3	CH <sub>3</sub> O-1, 2a, 2b, 3	2, 3	2, 3
<b>2</b>	3, 1	3	3	3
<b>3</b>	1, 2a, 2b	2a,	2	2
<b>4</b>	2a, 2b, 3	2a, 2b, 3, 6	2, 3, 6, 7	2, 3, 7
<b>5</b>	1, 3	1, 7	3, 6, 7	3, 7, 8, OH-6
<b>6</b>	7, 8, OH-6	8	7, 8, 10	7, 8, OH-6
<b>7</b>	OH-6	---	6, 8,	8, OH-6
<b>8</b>	OH-9	6, OH-9	6, 7, OH-9	7, OH-9
<b>9</b>	1, 7, 8, OH-9	7, OH-9	7, 8, OH-9	7, 8, OH-9
<b>10</b>	1, 2b, 7, 8	1, 6, 8, OH-9	2, 6, 8, OH-9	2, 7, 8, OH-9
<b>1'</b>	3'	3', 9'	3'	3', 2'
<b>2'</b>	---	---	---	---
<b>3'</b>	1', 2'	1'	1', 2'	1', 2'
<b>4'</b>	1', 2', 3'	2', 3'	1', 2', 3'	1', 2', 3'
<b>5'</b>	1', 3', 7', 9'	1', 3', 7', 9'	1', 3', 7', 9'	1', 2, 3', 7', 8, 9'
<b>6'</b>	7', 8', 9'	7', 8'	7', 8', 9'	7', 8', 9'
<b>7'</b>	8', 9	9'	8', 9	8', 9
<b>8'</b>	---	---	---	---
<b>9'</b>	7'	7'	7'	7', 8'
<b>10'</b>	1', 2', 8', 9'	1', 2', 8', 9'	1', 2', 8', 9'	1', 2', 8', 9'
<b>OH-6</b>	---	---	---	---
<b>OH-9</b>	---	---	---	---
<b>CH<sub>3</sub>O-1</b>	1	1	---	---

## 6.6. BIOSÍNTESIS PROPUESTA PARA LAS PALMARUMICINAS Y PREUSOMERINAS

Se ha propuesto que tanto las palmarumicinas como las preusomerinas, se biosintetizan a partir de la ruta de los policétidos (figura 9), teniendo como precursor un pentacétido que da origen al intermediario 1,8-dihidroxi-naftaleno, que por un proceso de oxidación fenólica y ataque de los grupos hidroxilo sobre los carbonos 1' y 9' al carbono 4, dimeriza para formar el núcleo espiroacetal de las palmarumicinas, y que tras posterior oxidación de los carbonos 6 y 6' y ataque 6-9' da lugar al núcleo *bis*-espiroacetal de las preusomerinas (Bode *et al.*, 2000).

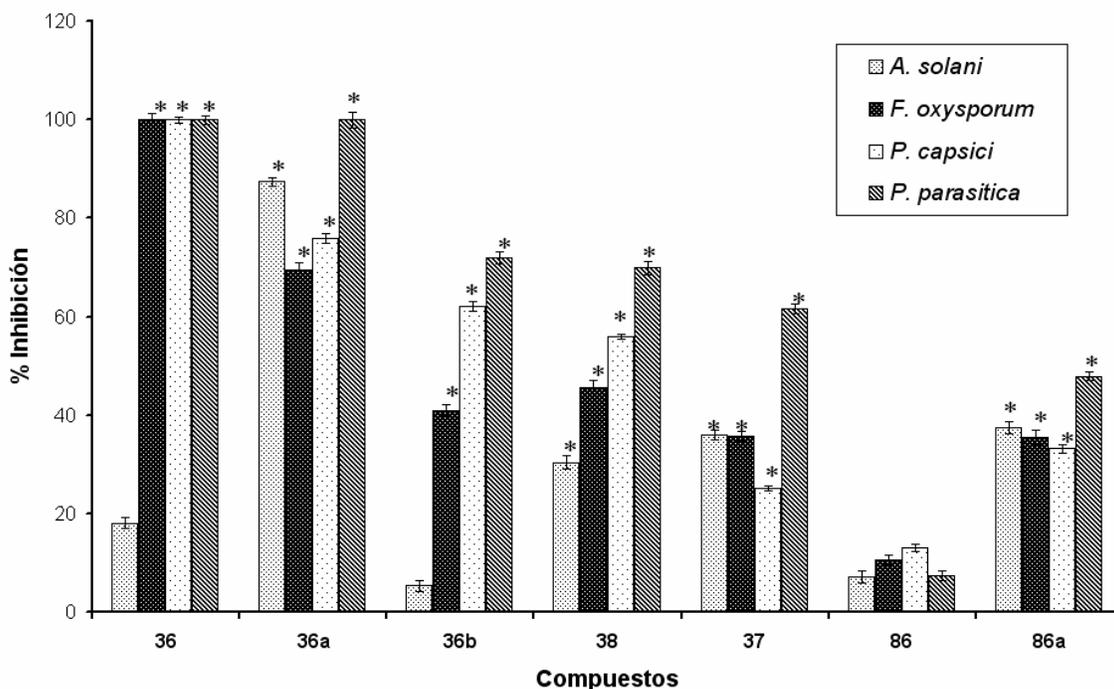


**Figura 9.** Biosíntesis propuesta para las palmarumicinas y preusomerinas

## 6.7. EFECTO DE LOS METABOLITOS PUROS Y DE LOS DERIVADOS ACETILADOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

La evaluación del efecto antifúngico de los compuestos puros y de sus derivados acetilados se realizó sobre cuatro especies de microorganismos fitopatógenos utilizando el método de dilución en agar, y a una concentración de prueba de 100 µg/mL.

En el gráfico 4 se presenta el efecto inhibitorio comparativo de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**), EG<sub>3</sub> (**37**) [Macías-Rubalcava *et al.*, 2008] y EG<sub>4</sub> (**86**), aisladas de *E. gomezpompae* sobre el crecimiento radial de dos hongos fitopatógenos con importancia económica; *F. oxysporum* y *A. solani* y dos fungoides fitopatógenos: *P. parasitica* y *P. capsici*. La preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**), con excepción de *A. solani* inhibe el 100% del crecimiento de los microorganismos de prueba. Las preusomerinas EG<sub>2</sub> (**38**) y EG<sub>3</sub> (**37**) inhiben significativamente el crecimiento radial de los cuatro microorganismos evaluados. Sin embargo, la preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**) no inhibe de manera significativa el crecimiento de ninguno de los fitopatógenos de prueba.



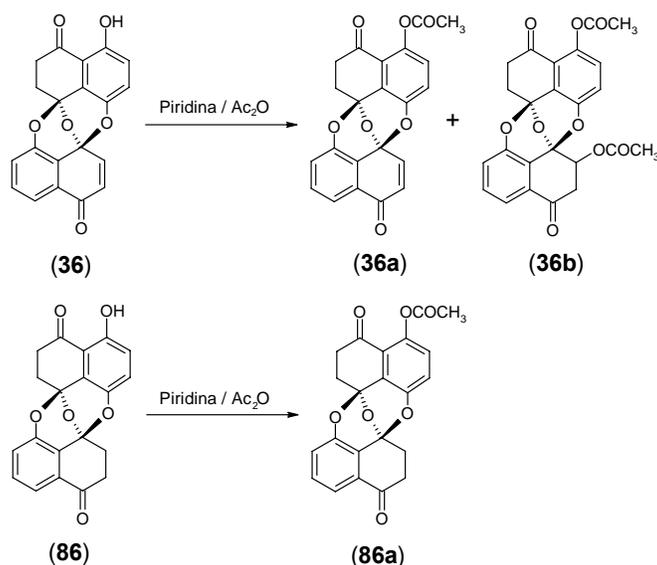
**Gráfico 4.** Efecto de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**), EG<sub>3</sub> (**37**) y EG<sub>4</sub> (**86**) y de los derivados acetilados EG<sub>1</sub> (**36a**), EG<sub>1</sub> (**36b**) y EG<sub>4</sub> (**86a**) [100 µg/mL], del hongo *E. gomezpompae* sobre el crecimiento radial de diferentes microorganismos fitopatógenos. \*  $n=4$ ,  $p<0.05$

Con la finalidad de estudiar la relación estructura actividad de las preusomerinas mayoritarias y/o de las mas activas, se obtuvieron derivados acetilados de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**) [Macías-Rubalcava *et al.*, 2008] y EG<sub>4</sub> (**86**). El tratamiento del metabolito secundario **36** con piridina/Ac<sub>2</sub>O generó la monoacetilpreusomerina **36a** y la diacetilpreusomerina **36b** (figura 10). La preusomerina **36b** fue obtenida por medio de la reacción de adición de Michael (adición de un grupo ‘acetato’ a una cetona- $\alpha,\beta$  insaturada). Por su parte, la preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**) originó el derivado monoacetilado **86a** (figura 10). En el gráfico 4 se observa que, en general, los tres derivados acetilados presentan un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba. A diferencia de la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**), su derivado monoacetilado **36a** inhibe significativamente el crecimiento de *A. solani*. Asimismo, en contraste con el producto natural **86**, su derivado monoacetilado **86a** inhibe significativamente el crecimiento radial de los cuatro fitopatógenos evaluados.

La preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**) y su derivado monoacetilado **36a** poseen la mayor actividad biológica sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba; posiblemente esta actividad se deba a la presencia de la cetona- $\alpha,\beta$  insaturada sobre los carbonos C-2' y C-3'. La actividad biológica relacionada con esta característica estructural es evidente en su análoga la preusomerina inactiva EG<sub>4</sub> (**86**). Sin embargo, la presencia de grupos nucleofílicos en C-3' en las preusomerinas **36b**, **38** y **37** incrementa la actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos. El mecanismo de acción del metabolito secundario **38**, posiblemente se deba a la capacidad de la cetona- $\alpha,\beta$  insaturada de sufrir reacciones de adición con moléculas nucleofílicas, como por ejemplo los grupos tiol y amino presentes en muchas enzimas biológicas, así como con los grupos amino de las bases púricas y pirimidínicas del ADN, interfiriendo de esta manera en los procesos celulares. Asimismo, el núcleo preusomerina presenta cierta actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos, inherente al anillo bis-espiroacetal.

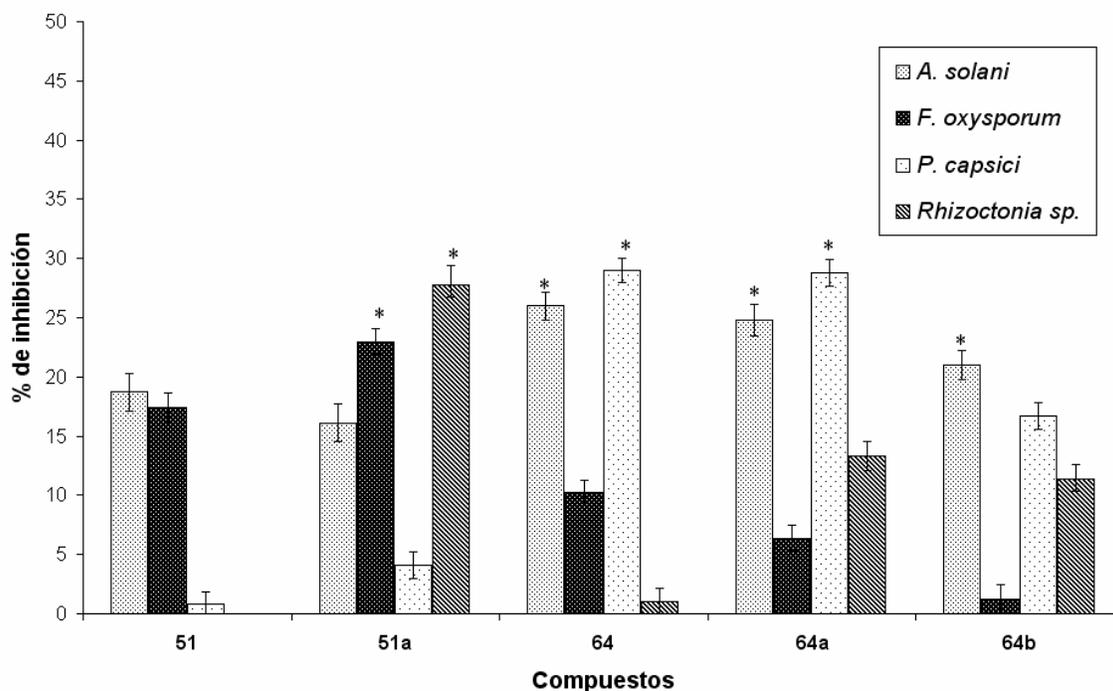
El grupo hidroxilo sobre C-9 no es indispensable para la actividad biológica. Sin embargo, al sustituirlo por un grupo acetilo, como en las preusomerinas **36a** y **86a** se favorece la actividad biológica. La preusomerina monoacetilada **36a** amplía su espectro de acción de tres a cuatro organismos; y el derivado monoacetilado (**86a**) de la preusomerina **118** incrementa en un 50% su actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los

microorganismos fitopatógenos de prueba. Esto quizá se deba a que se aumentó la permeabilidad de las membranas biológicas, al reducir el carácter polar de las moléculas, facilitándose el transporte a través de la membrana fúngica.



**Figura 10.** Derivados acetilados de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**) y EG<sub>4</sub> (**86**)

En el gráfico 5 se presenta el efecto inhibitorio de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (**51**) y CP<sub>17</sub> (**64**) y de sus derivados acetilados CP<sub>2</sub> (**51a**), CP<sub>17</sub> (**64a**) y CP<sub>17</sub> (**64b**) [figura 11] sobre el crecimiento radial de los microorganismos de prueba: *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *A. solani* y *P. capsici*. En contraste, con la actividad biológica demostrada por las preusomerinas aisladas de *E. gomezpompae*, las palmarumicinas y sus derivados acetilados, presentan una limitada actividad antifúngica sobre el crecimiento de los microorganismos evaluados a la concentración de prueba que fue de 100 µg/mL, corroborando así, que el anillo bis-espiroacetal es indispensable para la actividad biológica.

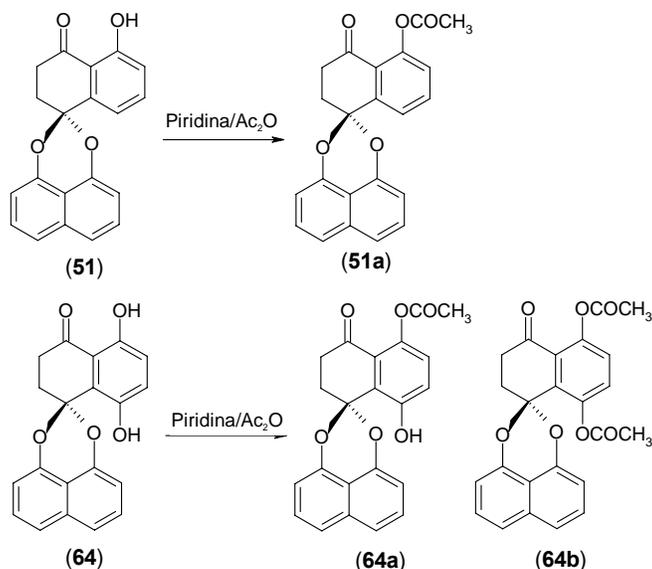


**Gráfico 5.** Efecto de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64) y de los derivados acetilados CP<sub>2</sub> (51a), CP<sub>17</sub> (64a) y CP<sub>17</sub> (64b) [100 µg/mL] del hongo *E. gomezpompae* sobre el crecimiento radial de diferentes microorganismos fitopatógenos. \* n=4, p<0.05

Los resultados de las evaluaciones biológicas de los compuestos puros permiten confirmar que la actividad antifúngica demostrada por las fracciones primarias VIII-XI se debe principalmente a la presencia de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (36), EG<sub>2</sub> (38) y EG<sub>3</sub> (37), siendo la preusomerina EG<sub>1</sub> (36) el metabolito secundario mas activo aislado de *E. gomezpompae*.

Finalmente, el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (89) no presenta actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba, lo cual no es sorprendente ya que el precursor de este compuesto es el ergosterol, un constituyente ubicuo en el reino de los hongos e indispensable para su desarrollo. En general, muchos hongos producen metabolitos secundarios derivados del ergosterol.

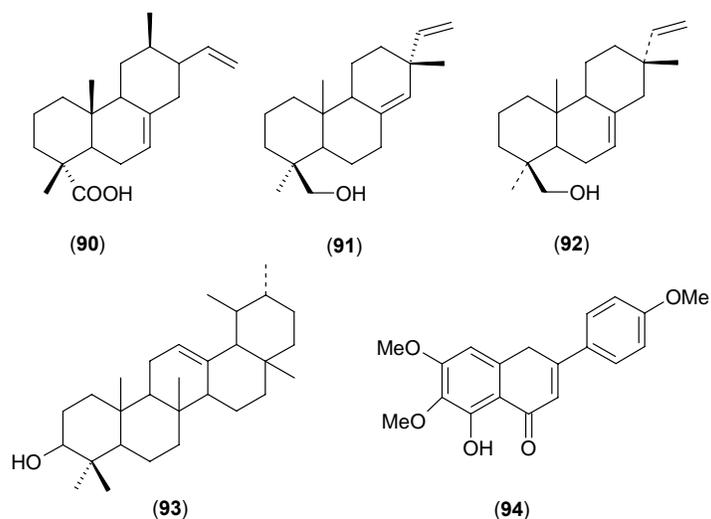
El ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (89) se ha aislado de una amplia variedad de hongos y se han reportado diferentes actividades biológicas: antibacteriana (Lu *et al.*, 2000), antitumoral sobre las líneas celulares Hep3B, HT-29, HeLa229 y AGS (Lee *et al.*, 2005), moderada actividad inmunosupresiva (Fujimoto *et al.*, 2004), diurética (Yuan *et al.*, 2004) y moderado efecto inhibidor de las cicloxigenasas 1 y 2 (Zhang *et al.*, 2002).



**Figura 11.** Derivados acetilados de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (51) y CP<sub>17</sub> (64)

### 6.8. METABOLITOS SECUNDARIOS DE *CALLICARPA ACUMINATA*

Como se mencionó en los antecedentes, la elección de *C. acuminata* como una hospedera importante para el estudio de sus hongos endófitos, se realizó con base en su potencial alelopático previamente demostrado por Anaya y colaboradores (2003). El estudio químico biodirigido sobre el extracto orgánico de hojas de *C. acuminata* condujo al aislamiento de cinco metabolitos secundarios: el ácido isopimárico (90), el sandaracopimaradie-19-nol (91), el akhdarenol (92), la  $\alpha$ -amirina (93) y la salvigenina (94) [figura 11]. De estos componentes, la  $\alpha$ -amirina (93) mostró actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*; el ácido isopimárico (90), demostró actividad antifúngica sobre *Helmintosporium longirostratum* y *A. solani*. Cabe mencionar que ninguno de los metabolitos secundarios aislados del extracto del micelio de *E. gomezpompae* está relacionado químicamente con los aislados de *C. acuminata*. Lo cual no es sorprendente ya que en la literatura se encuentra claramente establecido que las preusomerinas y las palmarumicinas son metabolitos exclusivos de hongos.



**Figura 12.** Metabolitos secundarios aislados de *C. acuminata*: ácido isopimárico (90), sandaracopimaradien-19-nol (91), akhdarenol (92),  $\alpha$ -amirina (93) y salvigenina (94)

El papel que desempeñan los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompae* en la relación planta (*C. acuminata*)-endófito (*E. gomezpompae*), parece ser el de antagonistas de microorganismos fúngicos. La colonización de los tejidos de *C. acuminata* por *E. gomezpompae*, posiblemente promueve la resistencia de ésta al ataque por hongos patógenos, debido quizá a la producción de las preusomerinas y, particularmente, de la preusomerinas EG<sub>1</sub> (36), las que pudieran inhibir la colonización de los microorganismos fitopatógenos (Wilson, 1993; Saikkonen *et al.*, 1998); o bien, por competencia directa por espacio y nutrientes entre ambos organismos (endófito-fitopatógeno). Sin embargo, los mecanismos responsables de estas complejas interacciones requieren de mayores investigaciones.

## 7. CONCLUSIONES

El estudio químico biodirigido del hongo endófito *E. gomezpompae* permitió el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, de los cuales tres presentan estructuras químicas novedosas, corroborando de esta manera que el criterio de selección basado en el potencial antagónico de esta especie de hongo endófito es importante para ampliar la posibilidad de obtener compuestos novedosos bioactivos.

La inhibición causada por los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio de *E. gomezpompae*, sobre el crecimiento de los hongos endófitos de prueba, aislados de plantas tropicales, y la actividad antifúngica demostrada por los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompae* confirman que este novedoso endófito posee un alto potencial alelopático. Esto sugiere que el principal mecanismo mediante el cual este endófito compite por espacio y nutrientes, pudiera ser la fungitoxicidad ejercida por algunos de sus metabolitos secundarios, a diferencia de otros hongos endófitos que incrementan su competitividad por su plasticidad para colonizar diversas especies de hospederas y extenderse a través de la producción de esporas.

El estudio químico biodirigido del extracto activo del micelio del hongo endófito *E. gomezpompae* permitió la obtención de un derivado novedoso de preusomerina: la preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**) y dos derivados novedosos de palmarumicina: la palmarumicina EG<sub>1</sub> (**87**) y la EG<sub>2</sub> (**88**), y cinco compuestos conocidos: la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**) y la EG<sub>3</sub> (**37**); la palmarumicina CP<sub>2</sub> (**51**) y la CP<sub>17</sub> (**64**), y el ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**89**). La elucidación estructural de estos compuestos se realizó por métodos espectroscópicos y espectrométricos. En el caso de las palmarumicinas **64**, **51** y **88**, la estructura se confirmó de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X.

Las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**), EG<sub>3</sub> (**37**) y EG<sub>4</sub> (**86**), así como las palmarumicinas CP<sub>17</sub> (**64**), EG<sub>1</sub> (**87**) y EG<sub>2</sub> (**88**) constituyen metabolitos secundarios a la fecha exclusivos del género *Edenia*.

Las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**36**), EG<sub>2</sub> (**38**) y EG<sub>3</sub> (**37**), aisladas a partir del hongo *E. gomezpompae*, así como sus derivados acetilados presentan en general, una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. parasitica* y *P. capsici*. La preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**) y su derivado monoacetilado **36a** poseen la mayor actividad biológica sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba, posiblemente esta actividad se deba a la presencia de la cetona- $\alpha,\beta$  insaturada sobre los carbonos C-2' y C-3'.

En contraste con el potencial antifúngico demostrado por las preusomerinas aisladas de *E. gomezpompae*, todas las palmarumicinas evaluadas, así como sus derivados acetilados presentan una menor actividad inhibitoria sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba.

El presente estudio constituye una importante contribución al conocimiento del posible tipo de relación ecológica que establece *E. gomezpompae* con otros microorganismos asociados a diferentes plantas hospederas de la selva semi-decidua de la Reserva Ecológica 'El Edén', Quintana Roo, así como al posible papel de sus metabolitos secundarios en estas complejas relaciones. Además, demuestra que los estudios sobre la ecología química de los hongos endófitos son de gran importancia para el conocimiento de los mismos, de las interacciones biológicas que establecen y para la búsqueda de novedosos compuestos con actividad biológica y posible utilidad en el control de algunas plagas y enfermedades.

## 8. PERSPECTIVAS

- Obtener cantidades adicionales de las palmarumicinas novedosas EG<sub>1</sub> y EG<sub>2</sub> aisladas del extracto del micelio de *Edenia gomezpompae*, mediante la preparación de un nuevo cultivo en mediana escala (60 L), lo que nos permitirá evaluar la actividad antifúngica de estos compuestos y explorar los posibles mecanismos de acción de todos los aleloquímicos aislados.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica demostrada por el extracto del medio de cultivo de *Edenia gomezpompae*, a través de un estudio químico biodirigido utilizando el método de dilución en agar para monitorear la actividad biológica de las fracciones.
- Determinar cuantitativamente el efecto antifúngico de los aleloquímicos aislados de las fracciones activas.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.
- Determinar el efecto citotóxico de los extractos orgánicos y de los aleloquímicos aislados sobre diversas líneas celulares con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.
- Profundizar en el estudio de las relaciones hospedero-endófito y en el papel que desempeñan las palmarumicinas y las preusomerinas aisladas en dicha relación.

## 9. REFERENCIAS

- Anaya, A. L. (2003) Ecología química. Plaza y Valdez editores. México. pp 19-33.
- Anaya, A. L., Mata, R., Sims, J. J., González, C. A., Cruz, O. R., Guadaño, A., Hernández, B. B., Midlan, S. L., Rios, G., Gomez, P. A. (2003) Allelochemical potencial of *Callicarpa acuminata*. Journal of Chemical Ecology 29(12): 2761-2776.
- Arias, E. M., López, P. E. (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, Ecosystems and Environment 123: 247–260.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Mynard, Z., Robbins, N., Herre, E. A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. PNAS 100 (26): 15649-15654.
- Betina, Y. (1992) Biological effects of the antibiotics brefeldin A (decumbin, cyanein, ascotoxin, synergisidin): a retrospective. Folia Microbiol. 37: 3-13.
- Bode, H. B., Walker, M., Zeeck, A. (2000) Secondary metabolites by chemical screening, 42. Cladospirones B to I from *Sphaeropsidales* sp. F-24'707 by variation of culture conditions. Eur. J. Org. Chem. 18: 3185-3193.
- Bode, H. B., Wegner, B., Zeeck, A. (2000) Biosíntesis of cladospirone bisepoxide, A member of the spirobisanthralene family. The Journal of Antibiotics 53 (2): 153-157.
- Brady, S. F., Wagenaar, M. M., Singh, M. P., Janso, J. E., Clardy, J. (2000) The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. J. Org. Lett. 2: 4043-4046.
- Carroll, G. (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69(1): 2-9.
- Carvalho, F. P. (2006) Review. Agriculture, pesticides, food security and food safety environmental science & policy 9 685 – 692.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., Sanyal, N. (2008) Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. Indian J. Microbiol. 48:114–127.
- Chu, M., Patel, M. G., Pai, J. K., Das, P. R., Puar, M. S. (1996) SCH 5382 and SCH 53825, novel fungal metabolites with phospholipase d inhibitory activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 6(5): 576-584.

- Clay, K., Holah, J. (1999) Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285: 1742-1744.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. N., Johnson, J. C., Johnson, J. A. N., Bedell, D. M., Springer, J. P., Chexal, K. K. Clardy, J. C., Cox, R. H. (1997) Mycotoxins reduced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agric. Food Chem.* 25: 826-830.
- Dai, J. R., Carte, B., Sidebottom, P., Sek, A. L., Ng, S., Huang, Y., Butler, M. (2001) Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus*. *J. Nat. Prod.* 64: 125-126.
- Dingle, J., McGee, P. (2003) Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *Triticici* in wheat. *Mycol. Res* 107(3): 310-316.
- Dong, J. Y., Song, H. C., Li, J. H., Tang, Y. S., Sun, R., Wang, L., Zhou, Y. P., Wang, L. M., Shen, K. Z., Wang, C. R., Zhang, K. Q. (2008) Ymf 1029A-E, preussomerin analogues from the fresh water derived fungus YMF 1.01029. *J. Nat. Prod.* 71: 952-956.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., Thomas, S. E. (2003) Endophytes and mycoparasites associates with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Micological Progress* 2(2): 149-160.
- Faeth, S. H. (2002) Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *OIKOS* 98: 25–36.
- Fletcher, J., Bender, C., Budowle, B., Cobb, W. T, Gold, S. E, Ishimaru, C. A., Luster, D. (2006). *Plant Pathogen Forensics: Capabilities, Needs, and Recommendations.* *Microbiology and molecular reviews.* 450-471.
- Fravel, D. R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. 43: 337–359.
- Fujimoto, H., Nakamura, E., Okuyama, E., Ishibashi, M. (2004) Six immunosuppressive features from an Ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. *Chem. Pharm. Bull.* 52(8): 1005-1008.
- Ganguli, B. N, Deshmukh, S. K. (2007) *Fungi. Multifaceted Microbes.* Anamaya Publishers. New Deli.
- Gasoni, L. Stegman, G. B. (1997) The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycol. Res.* 101(7): 867-870.
- Gavrilescu, M. (2005) Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Review. Engineeryed life science* 5(6): 497-526.

- Gilligan, C. A. (2008) Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 741–759.
- González, M. C., Anaya, A. L., Glenn, A. E., Saucedo, G. A., Macías, R. M., Hanlin, T. R. (2007) A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, México. *Mycotaxon* 10; 251-260.
- Gunatilaka, L. A. (2006) Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* 69: 509-526.
- Guzman, G. (1998) Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7: 369-384.
- Harper, J. K., Arif, A. M., Ford, E. J., Strobel, G. A., Porco, J. A., Tomer, D. P., O'Neill, K. L., Grant, D. M. (2003) Pestacin: a 1,3 dihydro isobezofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 49: 2471-2476.
- He, H., Yang, H.Y., Bigelis, R., Solum, E. H., Greenstein, M., Carter, G.Y. (2002) Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. *Tetrahedron letters* 42: 1633-1636.
- He, J., Lion, U., Sattler, I., Gollmick, F. A., Grabley, S., Cai, J., Meiners, M., Schunke, H., Shaumann, K., Dechert, U., Krohn, M. (2000) Diastereoisomeric quinolines alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium janczewskii*. *J. Nat. Prod.* 68 1347-1399.
- Heinz, K. K., Franjen, P., Hückelhoven, R. H. (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358–363.
- Herre, E. A., Mejia, C. L., Kylo, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., Van Bael, S. A. (2007) Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* 88(3): 550-558.
- Herrera, T., Ulloa, M. (1990) El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. UNAM. Fondo de cultura económica.
- Hu, H., Guo, H., Li, E., Liu, X., Zhou, Y., Che, Y. (2006) Decaspirones F-I, bioactive secondary metabolites from the saprophytic fungus *Helicoma viridis*. *J. Nat. Prod.* 69(12): 1672-1675.
- Jiao, P., Swenson, D. C., Gloer, J. B., Campbell, J., Shearer, C. A. (2006) Decaspirones A-E, bioactive spirodioxynaphthalenes from the freshwater aquatic fungus. *Journal of Natural Products* 69(12): 1667-1671.

- Kaldor, M. Ludwig, M. J. (2000) AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 109: 58-67.
- Kim, S., Shin, D. S., Lee, T., Oh, K. B. (2004) Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. With antibacterial activity. *J. Nat. Prod.* 67: 448-450.
- Knowles, A. (2008) Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist* 28:35-44.
- Krohn, K., Bahmasari, R., Florke, V., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S. (1997) Dihydroisocumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry* 45: 313-320.
- Krohn, K., Beckman, K., Flörke, U., M., Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B., Busemann, S., Bringmann, G. (1997) Biologically active metabolites from fungi. Part 9: New palmarumycins CP<sub>4a</sub> and CP<sub>5</sub> from *Coniothyrium palmarum*: structure elucidation, cristal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron* 53(9): 3101-3110.
- Krohn, K., Flörke, U., John, M., Root, N., Steirgröver, K., Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M., Zsila, F. (2001) biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, cristal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron* 57: 4343-4348.
- Krohn, K., Michel, A., Flörke, U. Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B. (1994a) Biologically Active Metabolites from Fungi, 4. Palmarumycins CP<sub>1</sub>-CP<sub>4</sub> from *Coniothyrium palmarum*: Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity. *Liebigs Ann. Chem.* 11: 1093-1097.
- Kusano, M., Koshino, H., Uzawa, J., Fujioka, S., Kawano, T., Kimura, Y. (2000) Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium sf. simplicissimum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64: 2559-2568.
- Lee, W. Y., Park, Y., Anh, J. K., Park, S. Y., Lee H. J. (2005) Cytotoxic activity of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bull. Korean. Chem. Soc.* 26(9); 1464-1466.
- Li, J, Y., Strobel, G. A. (2001) Jesterone and hydroxyl-jesterone antioomycete cyclohexenenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 57: 261-265.

- Li, J. Y., Harper, J. K., Grant, D. M., Tombe, B. O., Bashyal, B., Hess, W. M., Strobel, G. A. (2001) Ambuic acid, a high functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. And *Monochaetia* sp. *Phytochemistry* 56: 463-468.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L. Guo, Z. J., Zou, W. X., Tan, R. X. (2004) *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* 114: 279-287
- Macías-Rubalcava, M., Hernández, B. B., Jiménez, E. M., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Hernández, O. S. Saucedo, G. A., Muria, G. J., Anaya, A. L. (2008) Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* 69: 1185-1196.
- Martínez, L. S., Della, T. G., Coley, P. D., Cursar, A. T., Gerwick, W. H., Cubilla, R. L. (2008) Antileishmanial constituents of the panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* 71(12): 2011-2014.
- Mc Donald, R. A., Abbanat, D. R., Berbieri, L. R., Beruan, V. S., Discifani, C. M., Greenstein, M., Janota, K., Korshalla, J. D., Lassota, P., Tischler, M., Carter, G. T. (1999) spiroxins, DNA cleaving antitumor antibiotics from a marine-derived fungus. *Tetrahedron Letters* 40; 2489-2492.
- Mead, R., Curnow, R.N., Hasted, A. M. (2002) *Statistical Methods In Agriculture And Experimental Biology*. 3rd Edn. Chapman And Hall. Crc, Boca Raton, Fl.
- Montesinos, E. (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6: 245–252.
- Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (2004) *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academia Press.
- Muriá-González, M.J. (2007) Búsqueda de actividad antifúngica y fitotóxica en algunos hongos endófitos aislados de hojas de árboles de la selva mediana subperenifolia de Quintana Roo (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- Parisi, A., Piatelli, M., Tringale, C., Magnano, G. (1993) Identification of the phytotoxin mullein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry* 32: 865-867.
- Pelaez, F., Cabello, A., Platas, G., Diez, M. T., González del Val, A., Basilio, A., Martan, I., Vicente, F., Bills, G. F., Giacobbe, R., Schwartz, R. E., Onishi, J. C., Meinz, M. S., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L., Kurtz, M. B. (2000) The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *hormonema* species: biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 333-343.

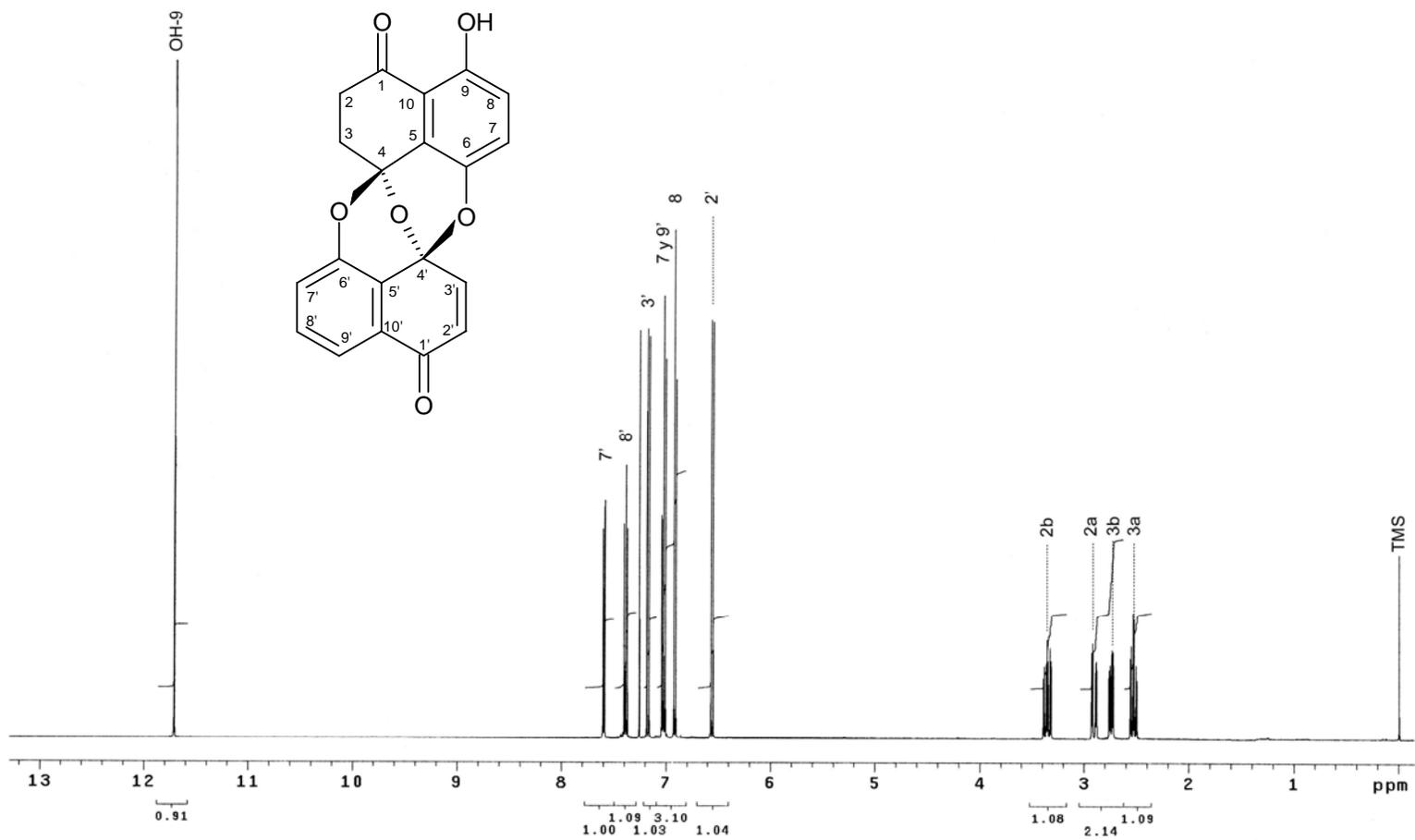
- Pimentel, D. (2005) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability* 7: 229–252.
- Plantegenest, M., Le may C., Fabré F. (2007) Landscape epidemiology of plant disease. Review. *Journal of the Real Society. Interfase* 4, 963-972.
- Polishook, J. D., Dombrowski, A. W., Tsou, N. N., Saliturno, g. M., Curotto, J. E. (1993) Preussomerin D from the endophyte *Hormonema dematioides*. *Mycologia* 85(1): 62-64.
- Prajoubkleng, A., Sirithunyalung, B., Charoenchai, P., Suvannakad, R., Sriubolmas, N., Piyamongkol, S., Kongsaree, P., Kittakoop, P. (2005) Bioactive desoxypreussomerins and dimeric naphthoquinones from *Diospyros ehretioides* fruits: deoxypreussomerins may not be plant metabolites but may be from fungal epiphytes or endophytes. *Chemistry & Biodiversity* 2: 1358-1367.
- Ragot, J. P., Steeneck, C., Alcaraz, M. L., Taylor J. K. (1999) The synthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene-derived natural products: palmarumycin CP<sub>1</sub>, palamrumicyn CP<sub>2</sub> palmarumycin C<sub>11</sub>, CJ-12,371, deoxypreussomerin A and novel analogues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 1073-1082.
- Rai, M., Varma, A. (2005) Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica* Ness. *Electronical Journal of Biotechnology* 8(1): 107-112.
- Ravenzwaay, B. V., Akiyama, M., Landsiedel, R., Kieczka, H., Cunha, G., Schneider, S., Kaspers, U., Kaufmann, W., Osawa, M. (2007) Toxicological overview of a novel strobilurin fungicide, orysastrobin. *J. Pestic. Sci.*, 32(3), 270–277.
- Ravindranath, M., Reddy, R., Mahender, G., Ramu, R., Kumar, K. R., Das, B. (2004) Deoxypreussomerins from *Jatropha carucas*: are they also plant metabolites? *Phytochemistry* 65: 2387-2390.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J. & Henson, J.M. (2002) Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298: 1581.
- Redman, R.S., Ranson, J. C., Rodriguez, R.J. (1999) Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant-microbe Interactions* 12(11): 969-975.
- Rimando, A. M., Duke, S. O. (2006) Natural products for pest management. ACS symposium series. American Chemical society. Washington DC USA.
- Russell, P. E. (2005) A century of fungicide evolution. Centenary review. *Journal of Agricultural Science* 143, 11–25.

- Saikkonen, K.; Faeth, S.H.; Helander, M. y T.J. Sullivan. (1998) Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* 29: 319-343.
- Sakemi, S., Inagaki, T., Kaneda, K., Hiral, H., Iwata, E., Sakakibara, T., Yamagichi, Y., Norcia, M., Wondrack, L. M., Sutcliffe, J., Korma, N. (1995) CJ-12,371 and CJ-12,372, two novel DNA gyrase inhibitors. Fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *The Journal of Antibiotics* 48(2) 134-142.
- Saucedo, G. A. (2002) Relación entre el potencial antagónico y el potencial aleloquímico de algunos hongos asociados a plantas de la Reserva Ecológica, 'El Edén', Quintana Roo. (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias. UNAM.
- Saucedo, G. A. (2006) Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos antagónicos endófitos de plantas con potencial aleloquímico de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Schmeda-Hirschmann, G. Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodríguez, J., Theoduloz, C. (2005) Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotech.* 21: 27-32.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Review. Mycol. Res.* 109(6): 661-686.
- Seephonkai, P., Isaka, M., Kittakoop, P., Palittapongarnpim, P., Kamchonwonpaisan, S., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. (2002) Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BC 3050. *Planta Med.* 68: 45-48.
- Shu, R. G., Wang, F. W., Yang, Y. M., Liu, Y. X., Tan, R. X. (2004) Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebroside from *Fusarium* sp. IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids* 39: 667-673.
- Singh, B. S., Zinck, D. L., Liesch, J. M., Ball, R.G., Goetz, M. A., Bolessa, E. A., Giacobbe, R.A., Silverman, K. C., Bills, G. F., Pelaez, F., Cascales, C., Gibbs, J. B., Lingham, R. B. (1994) Preussomerins and deoxypreussomerins: Novel inhibitors of Ras farnesyl-protein transferase. *J. Org. Chem.* 59: 6296-6302.
- Soman, A. G., Gloer, J. B., Koster, B., Malloch, D. (1999) Sporovexins A-C and new preussomerin analog antibacterial and antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Sporomiella vexans*. *J. Nat. Prod.* 62; 659-661.
- Song, Y. C., Li, H., Ye, Y. H., Shan, C. Y., Yang, Y. M., Tan, R. X. (2004) Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiol. Lett.* 241: 67-73-

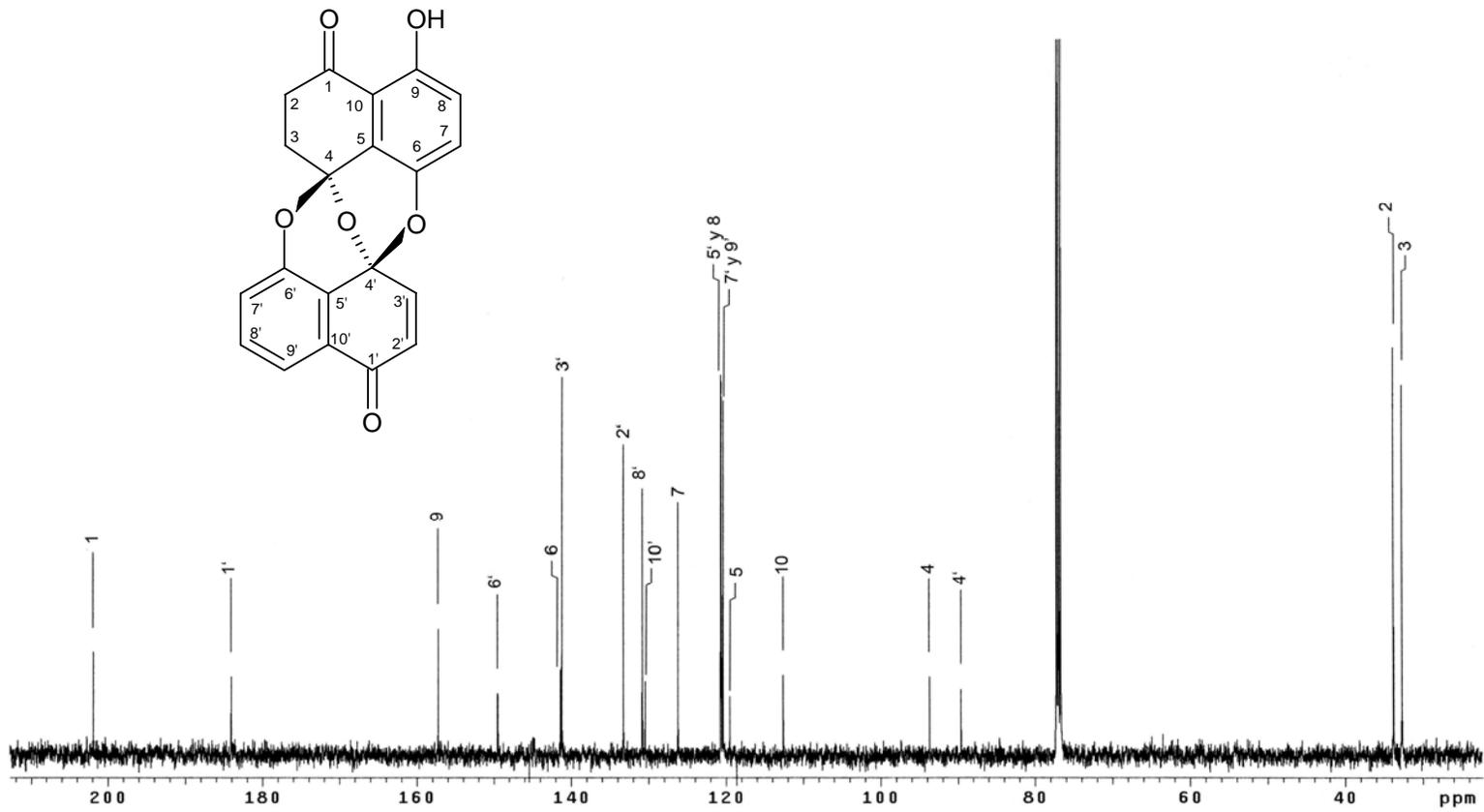
- Stahl, E. (1969) Thin layer chromatography. Academic Press Inc. Nueva York.
- Stierle, D. B., Stierle, A. A., Kunz, A. (1998) Dihydroramulosin from *Botrytis* sp. J. Nat. Prod. 61: 1277-1278.
- Strange, R. N., Scott, P. R. (2005) Plant disease: A Threat to Global Food Security. Annu. Rev. Phytopathol. 43:83–116.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004) Natural Products from Endophytic Microorganisms. J. Nat. Prod. 67: 257-268.
- Tan, R. X., Zou, W. X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep., 18, 448–459.
- Tanaka, N., Hosoi, K. I., Tanaka, D., Takahashi, M. (1996) Photochemical reaction of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. Chem. Pharm. Bull. 44(4): 843-846.
- Tscherter, H., Hofmann, H., Ewald, R., Dreyfuss, M. M. (1988) Antibiotic lactone compound. U.S. Patent No. 4,753,959.
- Vilella, D., Sanchez, M., Platas, G., Salazar, O., Genilloud, O., Royo, I., Cascales, C., Martín I., Díez, T., Silverman, K. C., Lignham, R. B., Singh, S. B., Jayasuriya, H., Peláez, F. (2000) Inhibitors of farnesylation of ras from a microbial natural products screening program. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 25; 315-327.
- Vurro, M., Evidente, A., Andolfi, A., Zonno, M. C., Giordano, F., Motta, A. (1998) Brefeldin A and  $\alpha$ ,  $\beta$ -denhydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. Plant Sci. 138: 67-79.
- Waage, J. K. & Mumford, J. D. (2008) Agricultural biosecurity. Phil. Trans. R. Soc. B 363, 863–876.
- Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczany, S., Martino, V., Acevedo, C. (2004) Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. J. Antibiot. 57: 559-563.
- Weber, H. A., Gloer, J. B. (1991) The preussomerins: Novel antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Preussia isomera* Cain. J. Org. Chem. 56: 4355-4360.
- Webster, J., Weber, R. (2007) Introduction to fungi. Third edition. Cambridge University press. New York USA.
- Wicklowsky, D. T., Roth, R., Deyrup, S. T., Gloer, J.B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. Mycol. Res 109: 610-618.

- Wilson, D. (1993) Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos*. 68: 379-384.
- Wipf, P., Jung, J. K., Rodriguez, S., Lazo, J. S. (2001) Synthesis and biological evaluation of deoxypreussomerin A and palmarumycin CP<sub>1</sub> and related naphthoquinone spiroketals. *Tetrahedron* 57: 283-296.
- Xu, Q., Wang, J., Huang, Y., Zheng, Z., Song, S., Zhang, Y., Su, W. (2004) Metabolites from mangrove endophytic fungus *Dothiorella* sp. *Acta Ocnaol. Sin.* 23: 541-547.
- Yamaguchi, I., Fujimura, M. (2005) Recent Topics on Action Mechanisms of Fungicides. *J. Pestic. Sci.*, 30(2): 67-74.
- Yuan, D., Mori, J., Komatsu, K. I., Makino, T., Kano, Y. (2004) An anti-aldosteronic diuretic component (drain dampness) in *Polyporus sclerotium*. *Biol. Pharm Bull.* 27(6): 867-870.
- Zhang, Y., Mills, G. L., Nair, M. G. (2002) Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 7581-7585.
- Zhu, J. W., Nagasawa, H., Nagura, F., Mohamad, S. B., Uto, Y., Okura, K., Hori, H. (2000) Elucidation of strict structural requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiations and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* 8: 455-463.

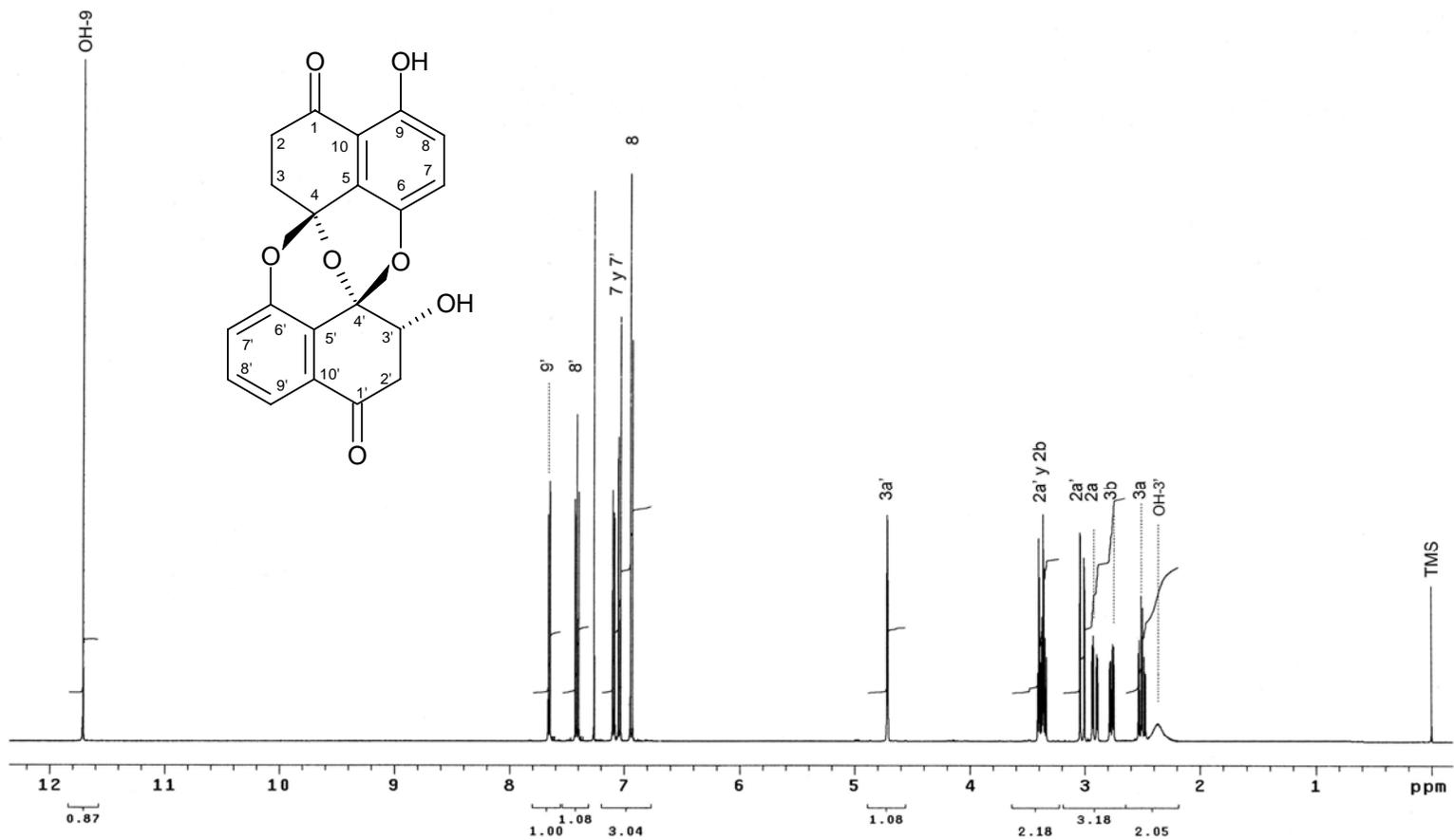
## **10. ANEXO I**



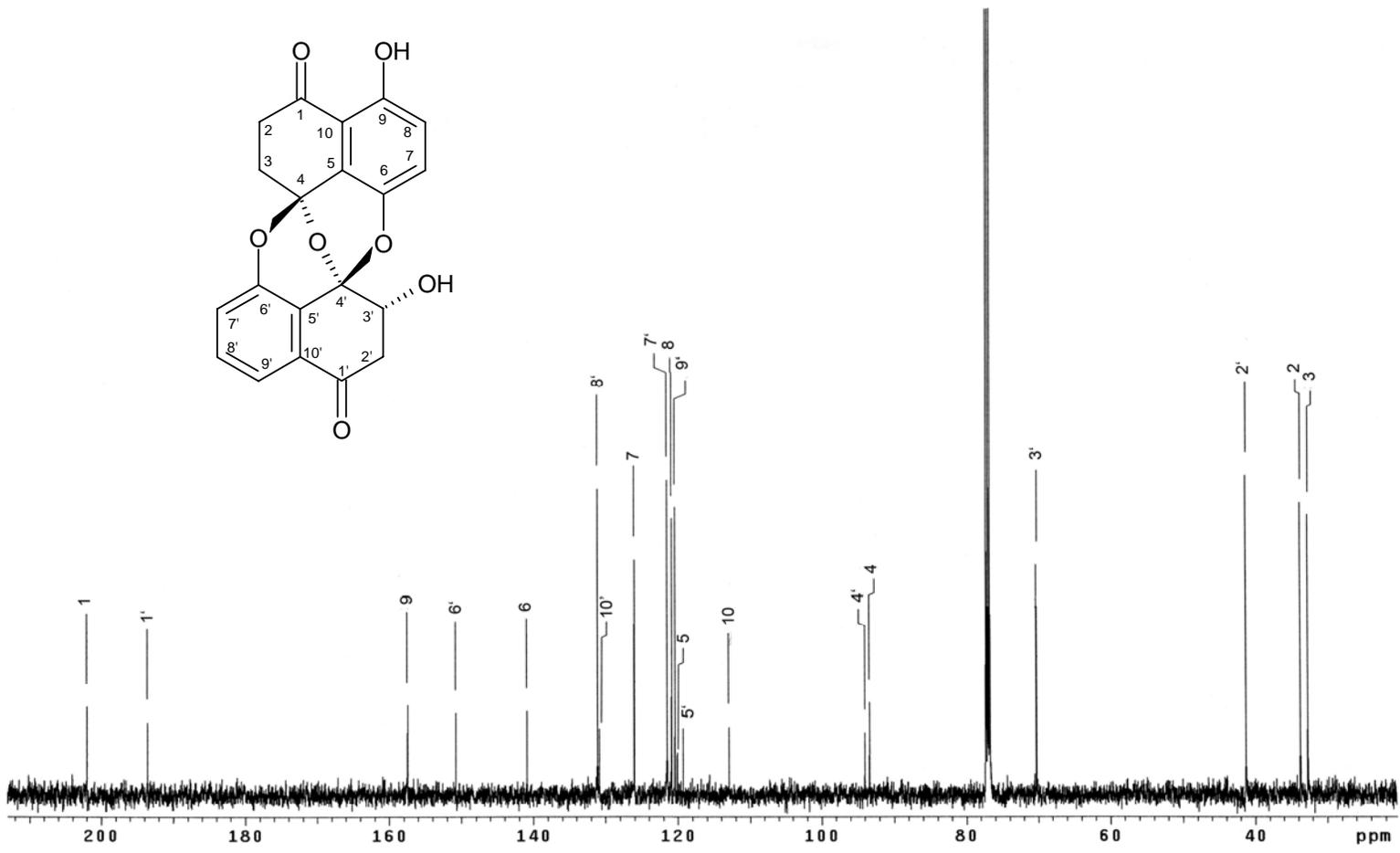
**Espectro 1.** RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**)



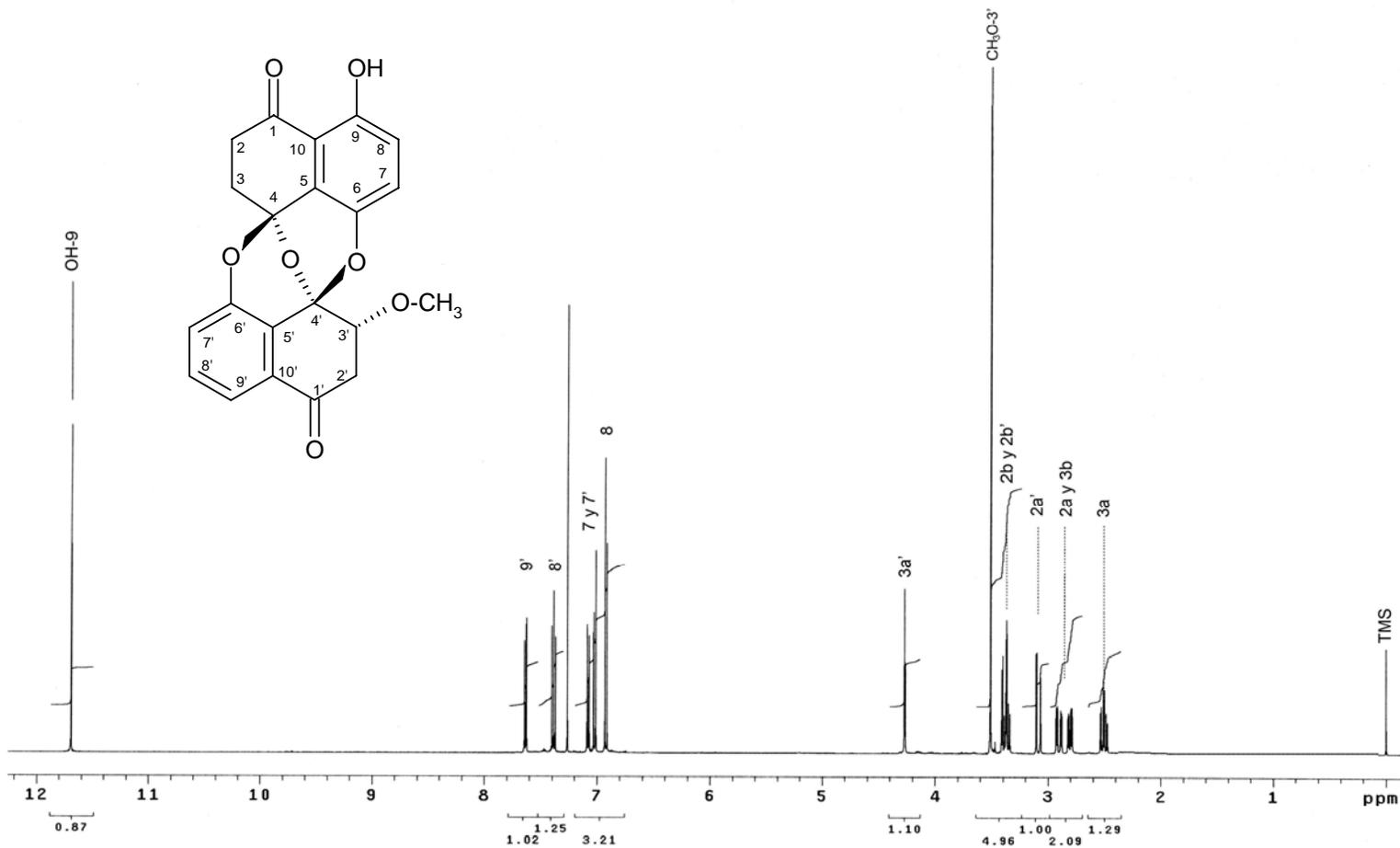
**Espectro 2.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>1</sub> (**36**)



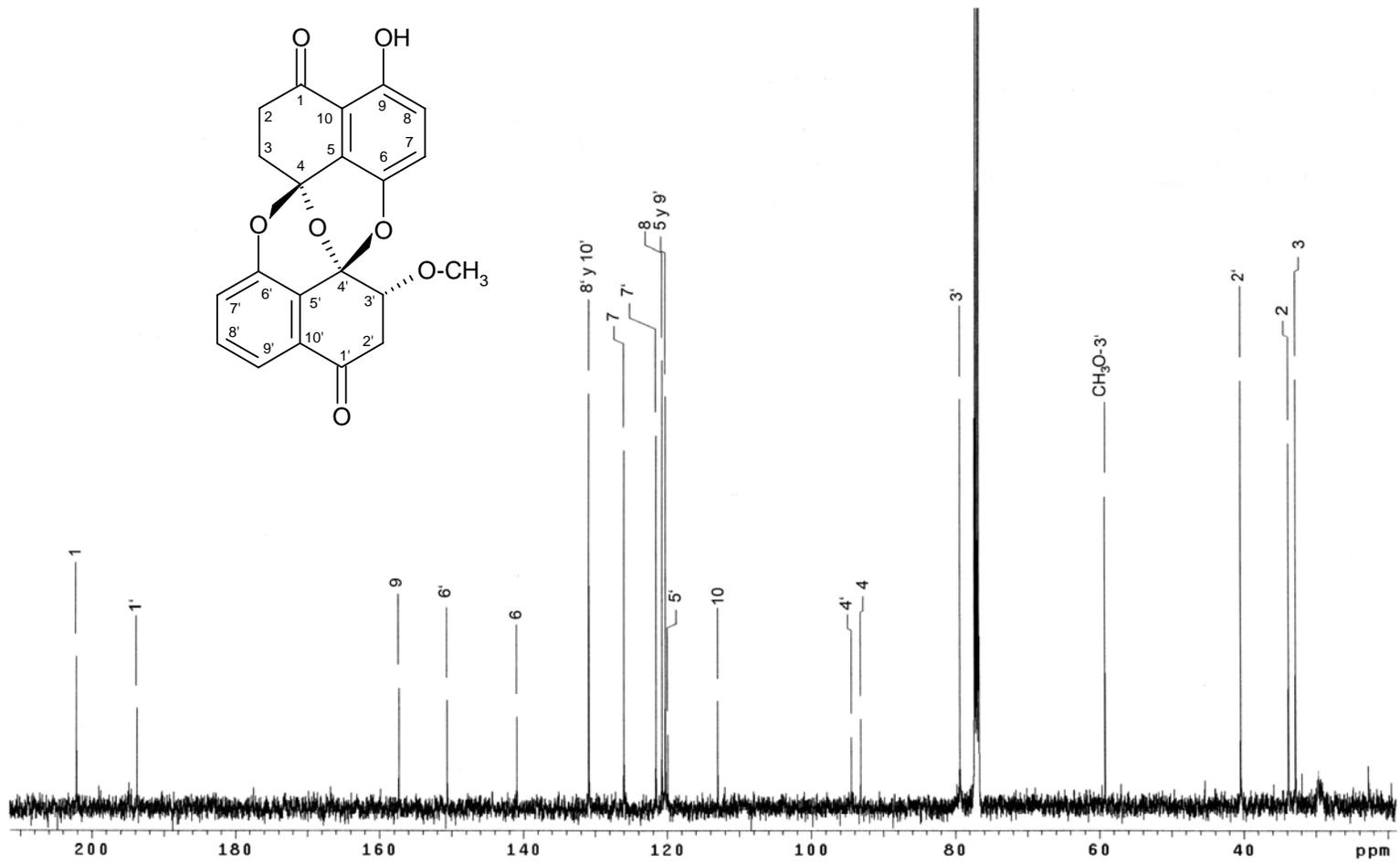
**Espectro 3.** RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>2</sub> (**38**)



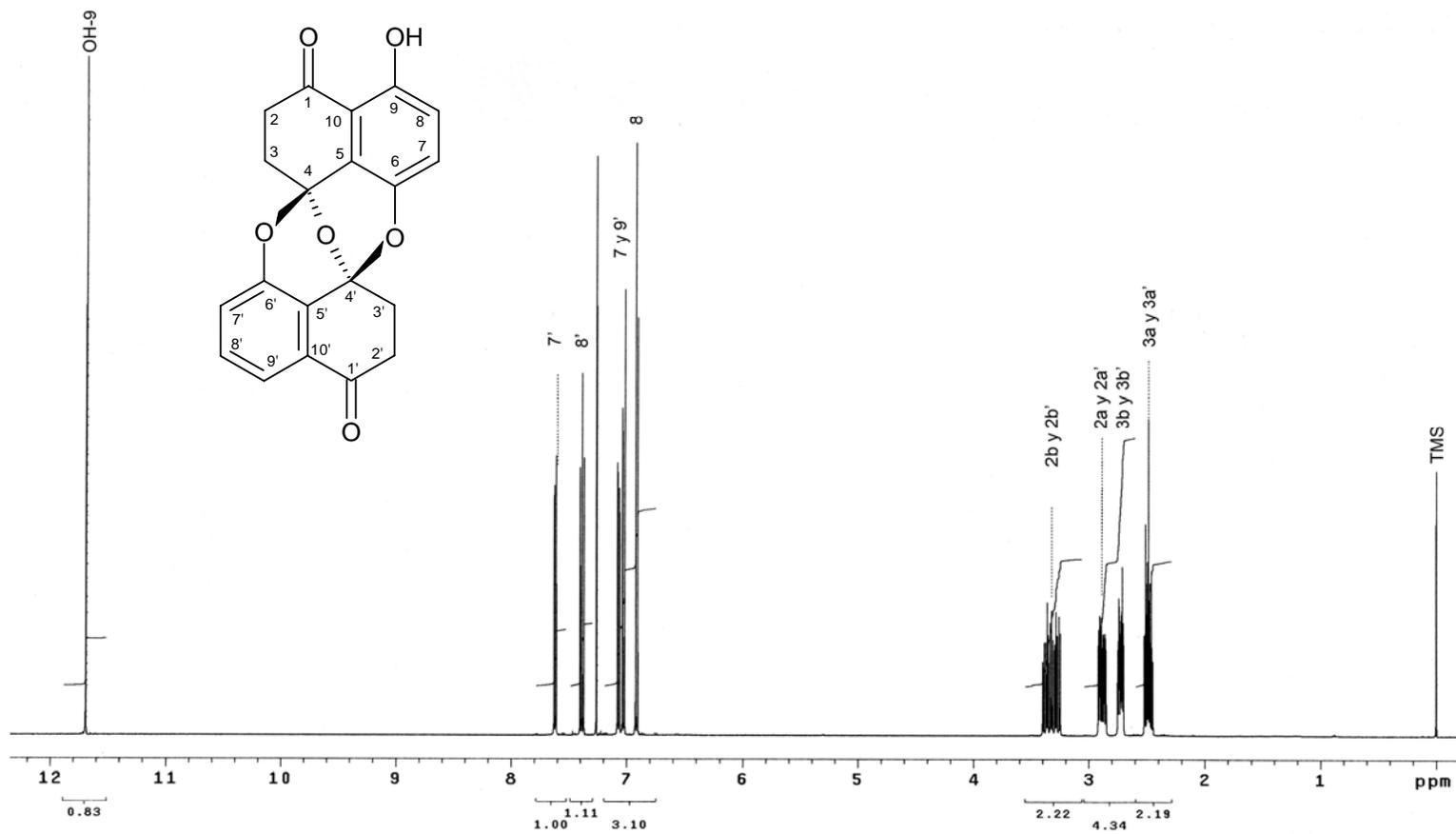
**Espectro 4.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>2</sub> (**38**)



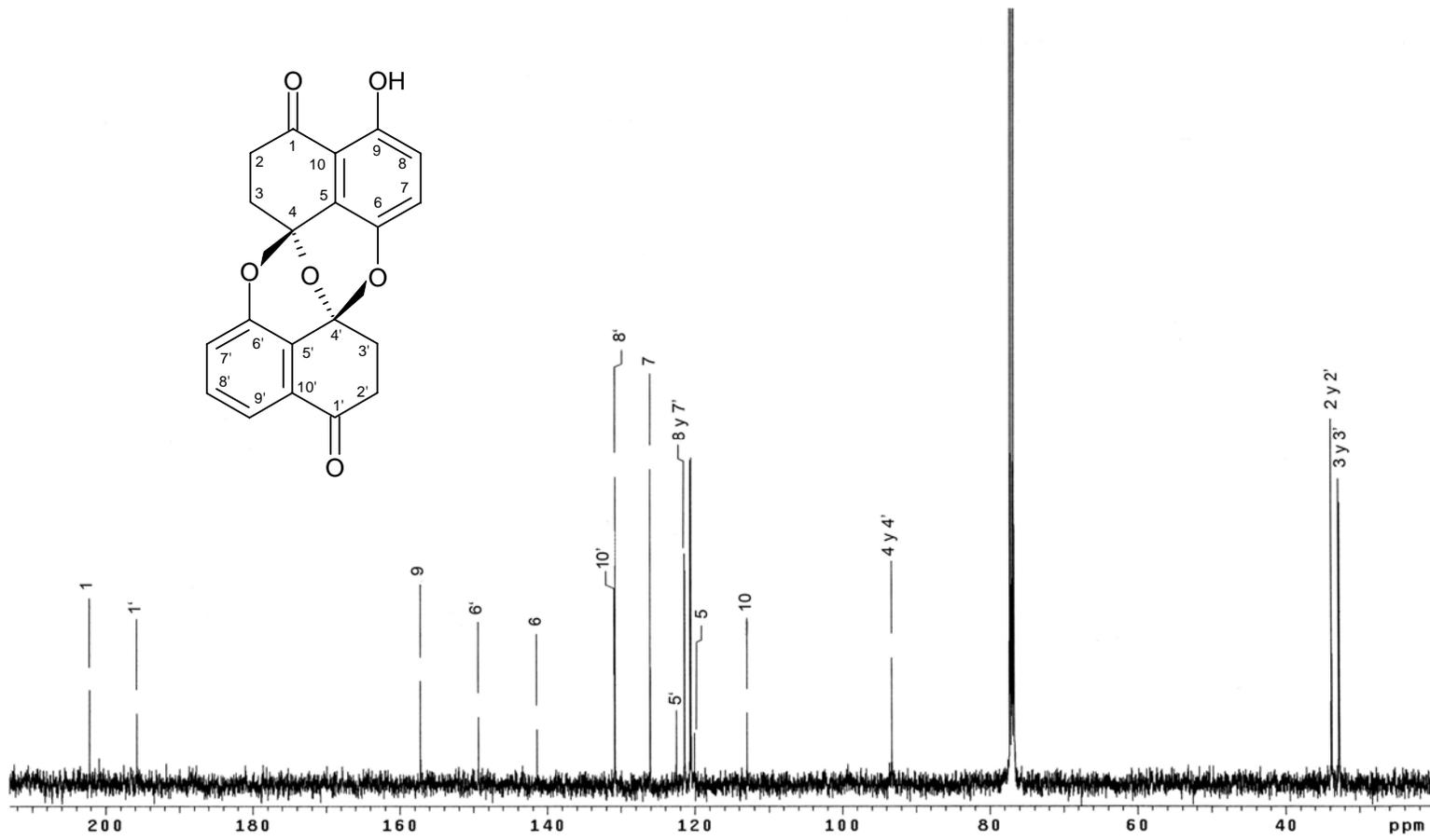
**Espectro 5.** RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>3</sub> (**37**)



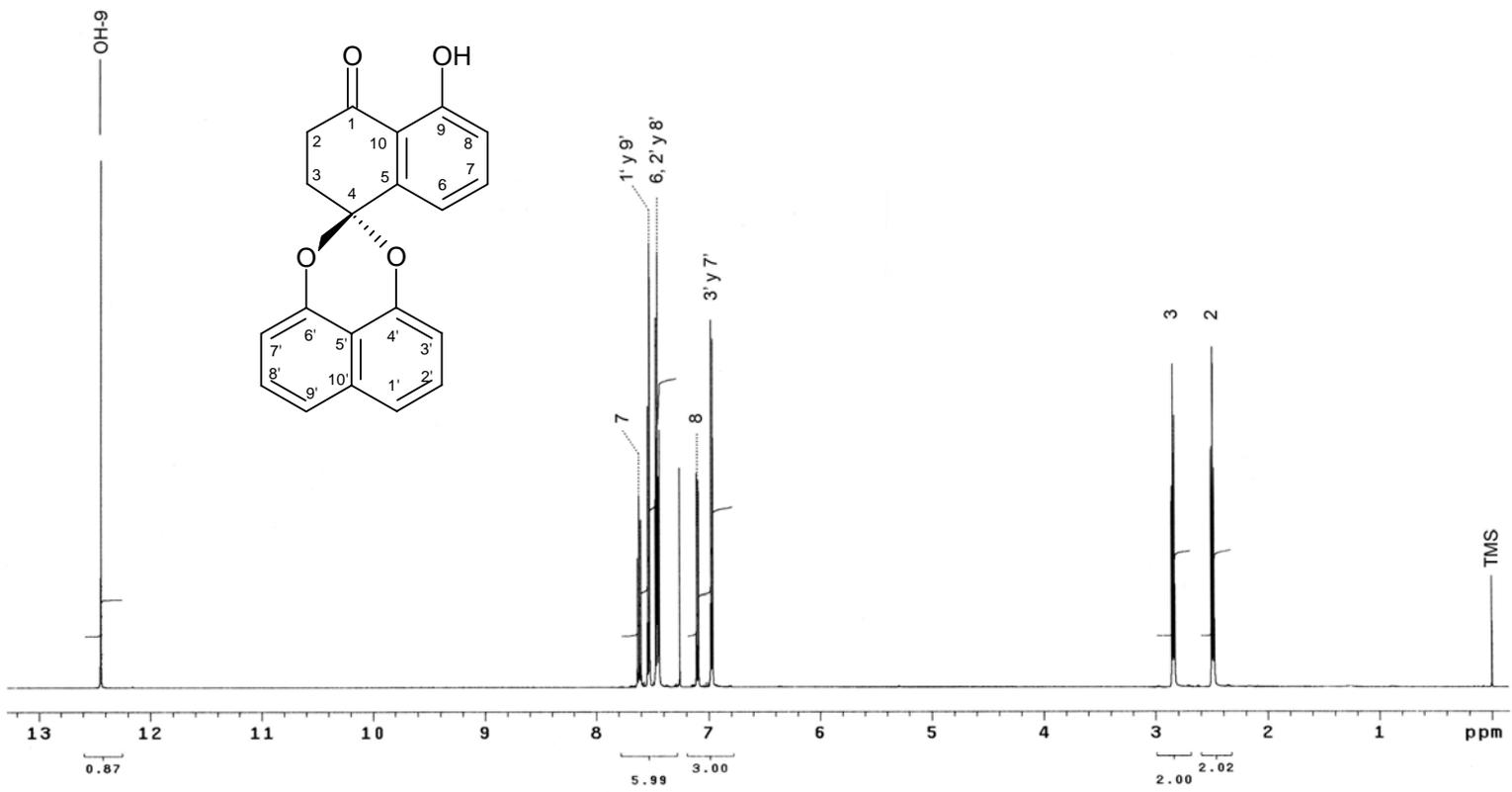
**Espectro 6.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>3</sub> (37)



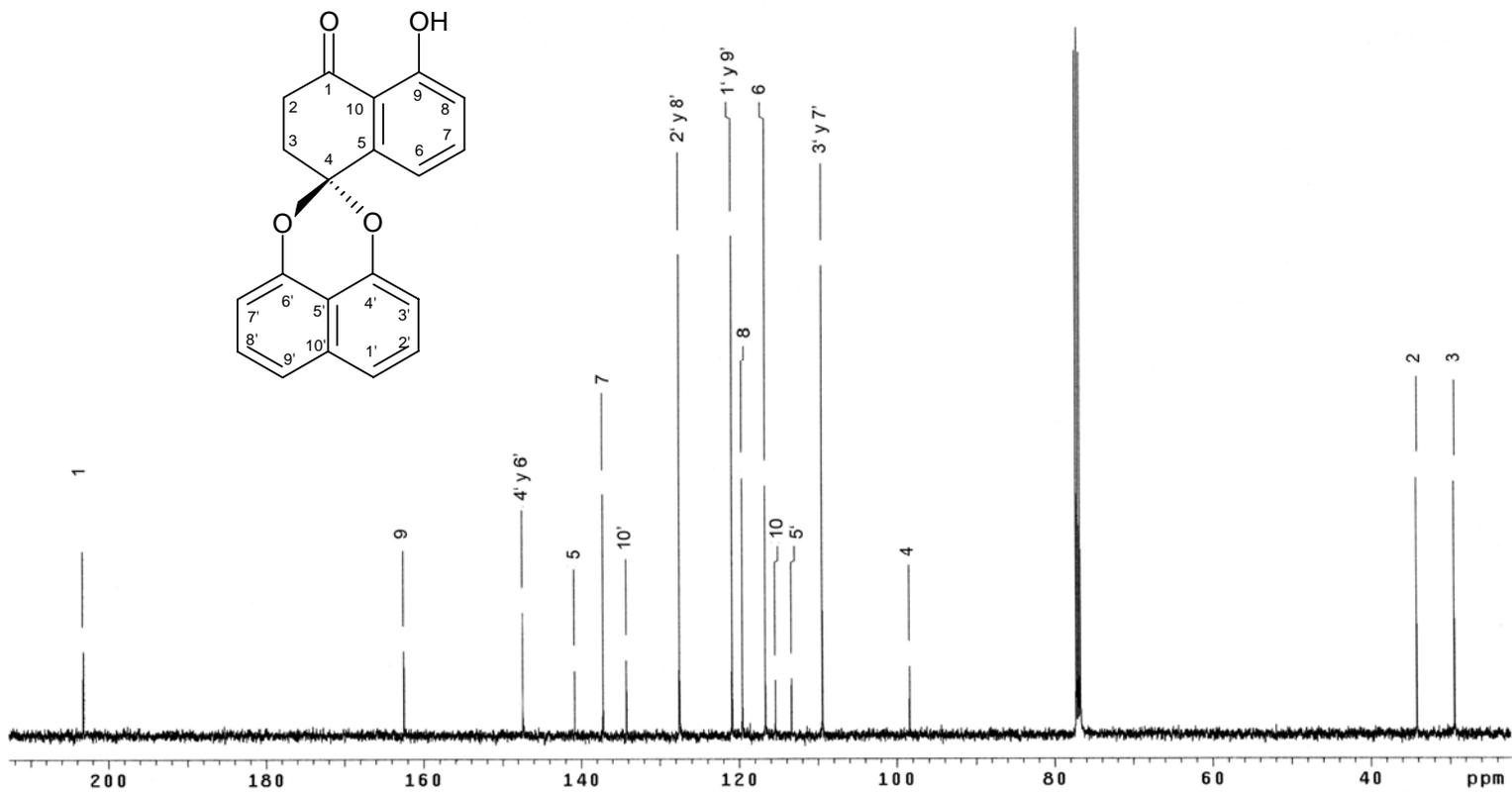
**Espetro 7.** RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**)



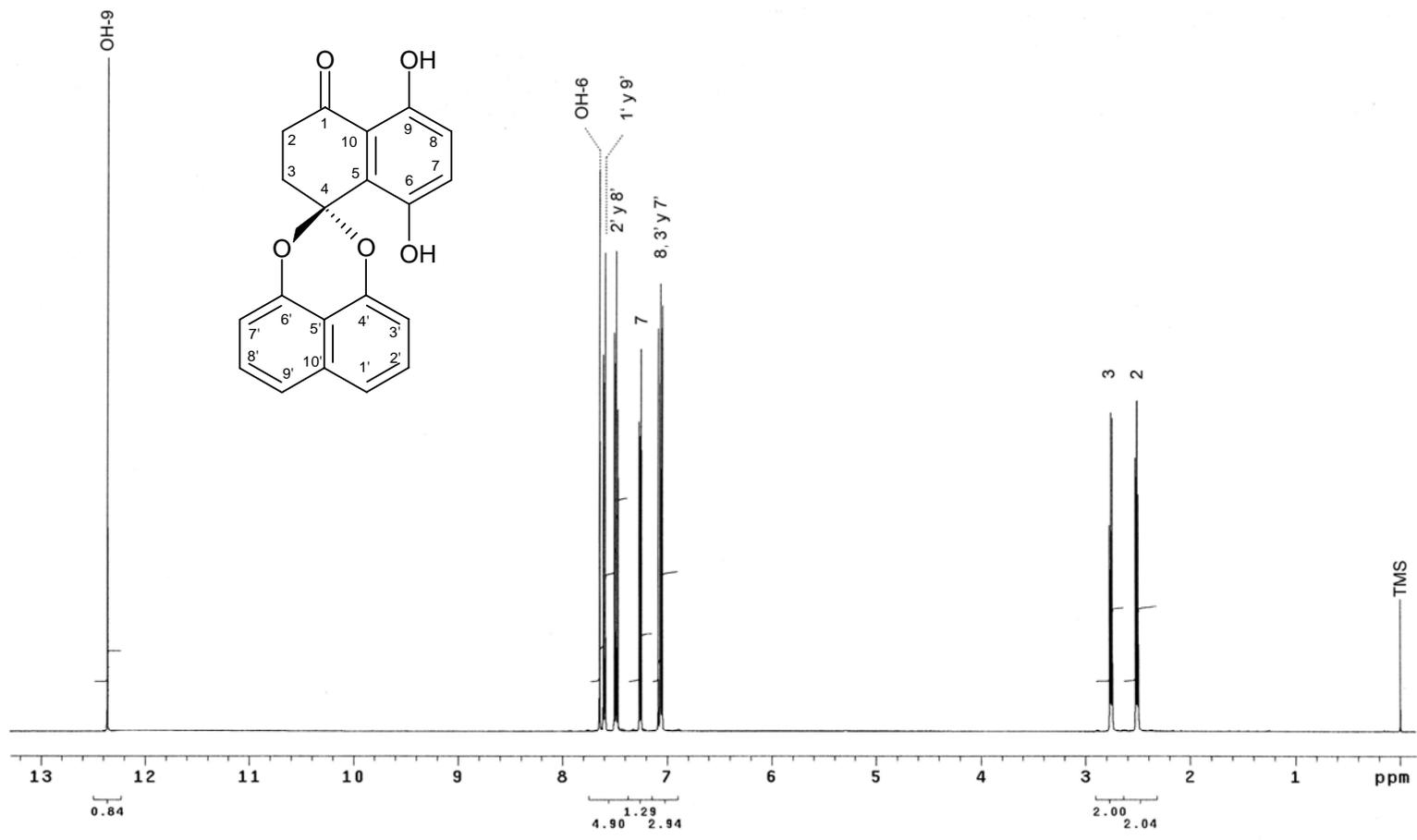
**Espectro 8.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la preusomerina EG<sub>4</sub> (**86**)



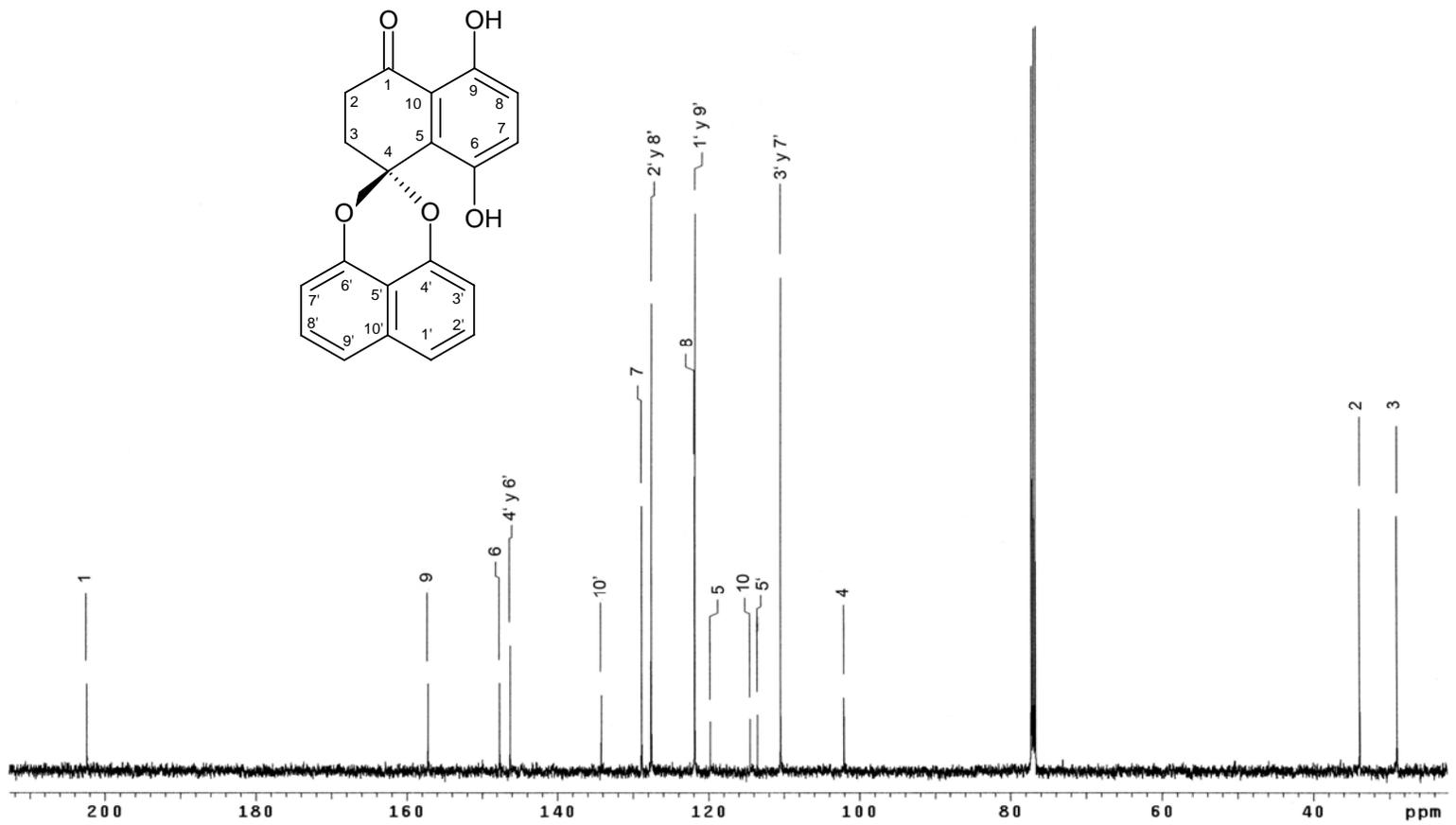
**Espectro 9.** RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la palmarumicina CP<sub>2</sub> (**51**)



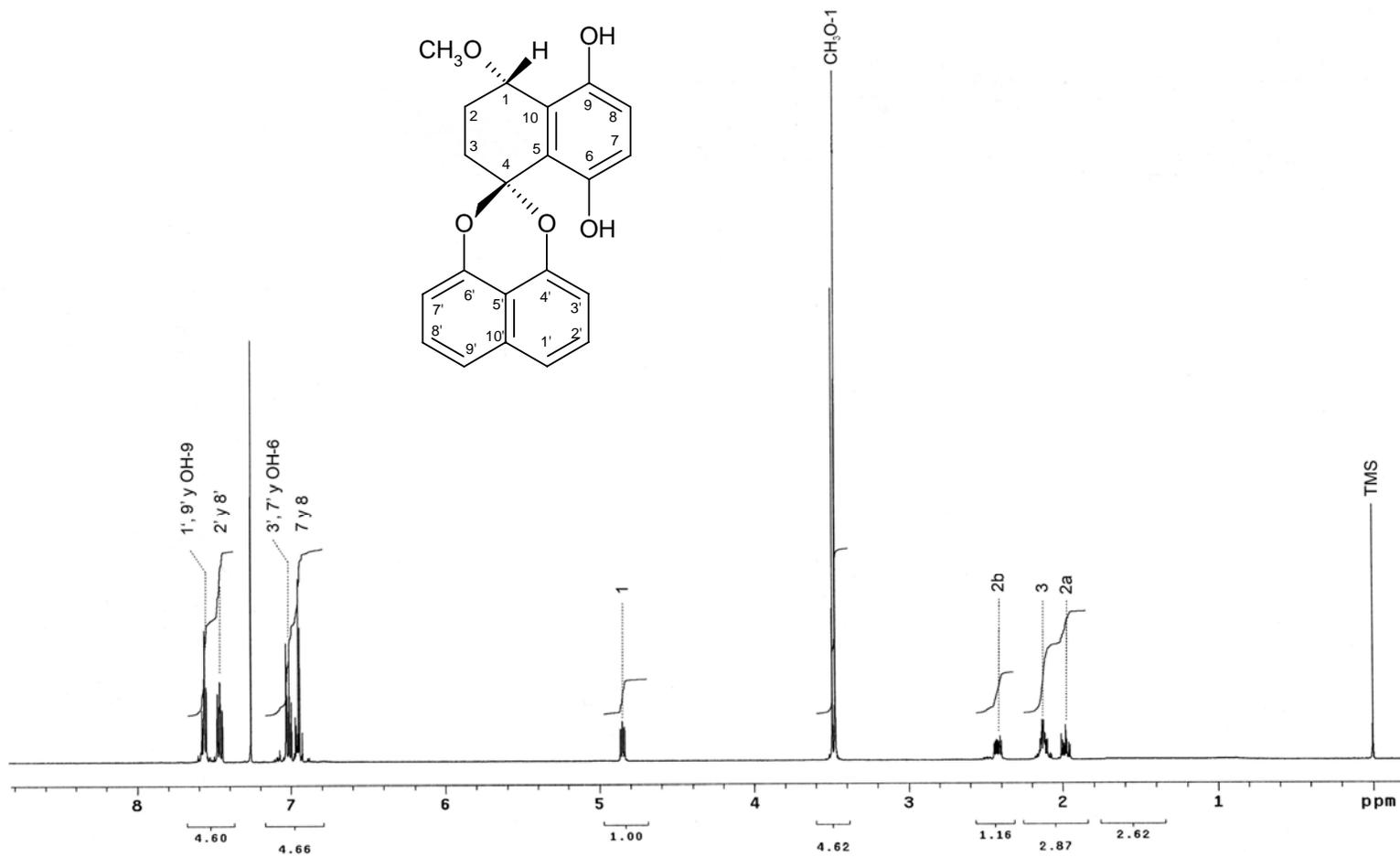
**Espectro 10.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina CP<sub>2</sub> (51)



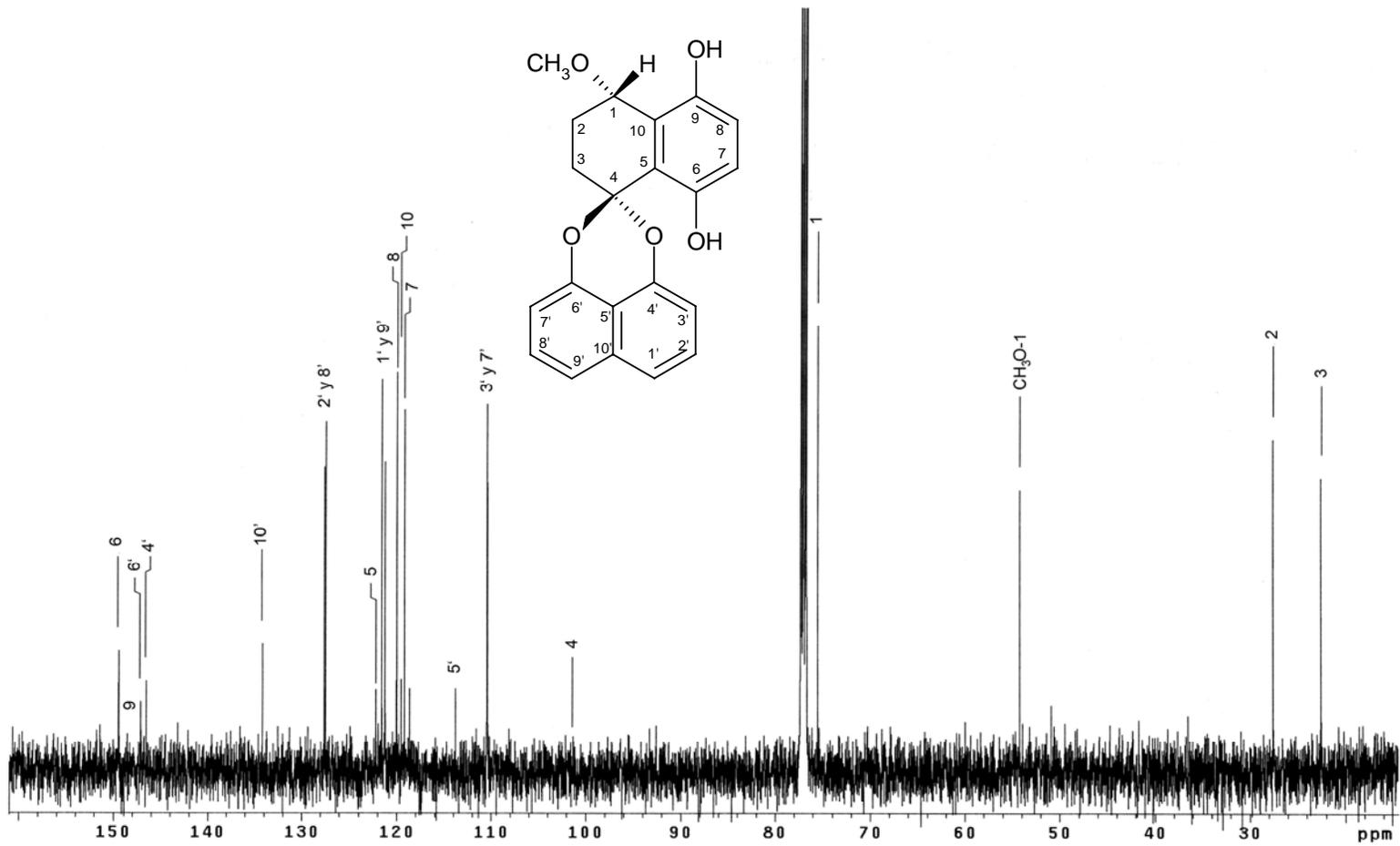
**Espectro 11.** RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64**)



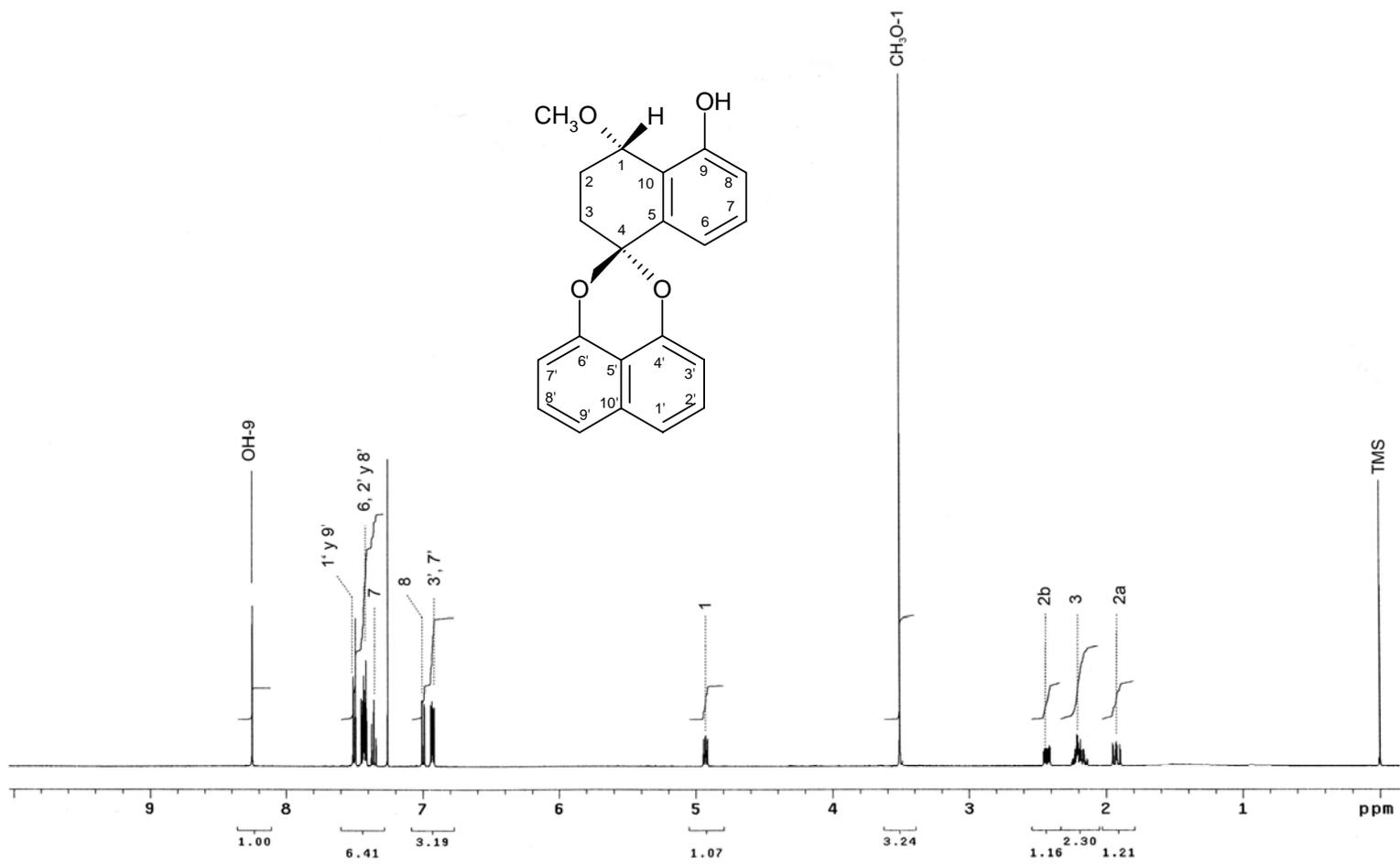
**Espectro 12.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina CP<sub>17</sub> (**64**)



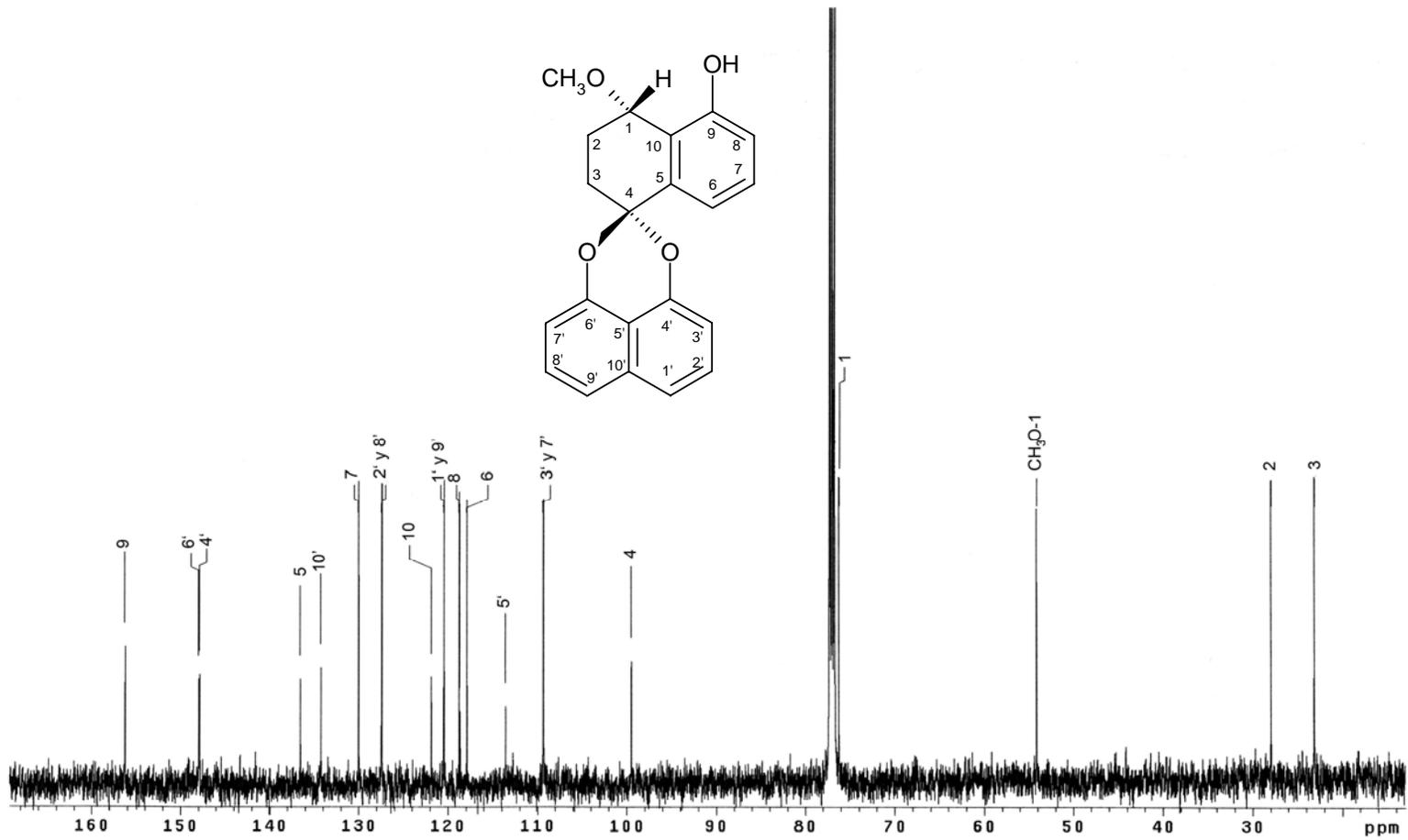
**Espectro 13.** RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina EG<sub>1</sub> (**87**)



**Espectro 14.** RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina EG<sub>1</sub> (**87**)



**Espectro 15.** RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina EG<sub>2</sub> (**88**)



**Espectro 16.** RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la palmarumicina EG<sub>2</sub> (**88**)