

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la capacidad antibiótica y antifúngica de extractos orgánicos y peptídicos  
de hongos endófitos provenientes de la Colección de Endófitos Quito-Católica  
(CEQCA)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

ELIANA ESTEFANÍA VELOZ VILLAVICENCIO

Quito, 2014

## CERTIFICACIÓN

Yo, MSc. Alexandra Narváez, certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Eliana Estefanía Veloz Villavicencio, “Evaluación de la capacidad antibiótica y antifúngica de extractos orgánicos y peptídicos de hongos endófitos provenientes de la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA)”, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

MSc. Alexandra Narváez

Directora de la Disertación

Quito, diciembre de 2014

*“A los que buscan aunque no encuentren.*

*A los que avanzan aunque se pierdan.*

*A los que viven aunque se mueran.”*

-Mario Benedetti

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo se hizo realidad gracias al apoyo incondicional de muchas personas. A ellas, mis más sinceros agradecimientos.

A mi familia, empezando por mi madre, Luz Eliana, por ser un ejemplo de lucha y sacar adelante a nuestra familia en todo momento. A mis abuelitos, María y Leonardo, por ser un gran apoyo y como unos segundos padres para mí. A Erika, mi hermana y mi mejor amiga, por brindarme su apoyo y por estar conmigo a cada paso del camino.

A Alexandra Narváez, directora de mi proyecto de disertación, por la confianza depositada en mí al abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme no solo trabajar con ella sino también llevar a cabo el presente trabajo. Gracias por sus consejos oportunos, su guía y su paciencia.

A Caro Portero, por haberme brindado su confianza y por enseñarme a amar el difícil pero fascinante mundo de la investigación. Por separarme un poco de su limitado tiempo para revisar mi trabajo e iluminar el escabroso camino. Le agradezco sobre todo por su amistad sincera y por buscar mi bienestar en todo momento.

A Stephy, por sus palabras de ánimo, por escuchar mis largas pláticas del día de clases y de trabajo y reírse conmigo (y de los demás). Y en especial, por dar el primer paso en el inexplorado mundo de los péptidos de endófitos.

A Fer, por ser un gran amigo y hacer que los malos momentos se desvanezcan con el ruido de nuestras risas. A Caro Castro, por su apoyo incondicional, no importa qué tan descabellado fuera el plan, y por darme ánimo siempre para seguir adelante. A Sofi López,

por unirse a nuestro simpático grupo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y aportar más risas y ánimo a nuestro día a día.

A todos mis compañeros de carrera, por hacer de las clases momentos mucho más entretenidos y de las salidas de campo unas verdaderas aventuras. A todos, les agradezco su amistad y compañerismo, y les deseo todo el éxito del mundo en sus proyectos y planes futuros.

A los profesores Scott Strobel, Carol Bascom-Slack y Kaury Kucera, de la clase Rainforest Expedition and Laboratory 2013 de la Universidad de Yale, por permitirme continuar con mi trabajo en sus instalaciones y guiarme de una forma única. A mis compañeros de Yale, por compartir conmigo un verano inolvidable y mostrarme la investigación desde un punto de vista único y fascinante, y enseñarme a trabajar con más dedicación, ganas y entrega.

Al personal de la Sala de Preparaciones de la Escuela de Ciencias Biológicas, por el préstamo de equipos y reactivos para mi trabajo, así como también a los investigadores del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas por ayudarme amablemente con la lectura de mis placas de microdilución.

Quiero expresar también un especial agradecimiento para la Dra. Iliana Alcocer y la Mtr. Myrian Rivera, quienes revisaron el trabajo escrito y aportaron con sugerencias y comentarios valiosos para su presentación final.

Finalmente, a todos mis amigos y amigas, quienes siempre me dieron ánimos y me acompañaron en este largo camino.

¡Gracias a todos!

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. BIODIVERSIDAD Y BIOPRODUCTOS.....	5
3.2. HISTORIA NATURAL DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	6
3.3. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS DE VALOR TERAPÉUTICO .....	7
3.4. LOS HONGOS ENDÓFITOS COMO FUENTE DE METABOLITOS .....	11
3.5. BIOPROSPECCIÓN Y HONGOS ENDÓFITOS.....	12
3.6. LA BIOPROSPECCIÓN EN EL ECUADOR.....	14
3.7. LA COLECCIÓN DE ENDÓFITOS QUITO-CATÓLICA (CEQCA) .....	15
3.8. JUSTIFICACIÓN .....	16
3.9. OBJETIVOS .....	17
3.9.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
3.9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. SELECCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS .....	19
4.2. CULTIVO DE HONGOS.....	19
4.3. OBTENCIÓN DE METABOLITOS.....	20
4.3.1. EXTRACTOS ORGÁNICOS .....	20
4.3.2. EXTRACTOS PEPTÍDICOS .....	22
4.3.2.1. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) .....	24

4.4. BIOENSAYOS .....	25
4.4.1. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS: EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS .....	25
4.4.1.1. BACTERIAS UTILIZADAS.....	25
4.4.1.2. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN DIRECTA EN EL AGAR .....	27
4.4.1.3. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN CON DISCOS.....	29
4.4.1.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	30
4.4.2. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS CON BIOACTIVIDAD SIGNIFICATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	32
4.4.2.1. VERIFICACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DE HPLC MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN .....	33
4.4.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	34
4.3. ENSAYO ANTIFÚNGICO CONTRA <i>Pythium ultimum</i> .....	34
5. RESULTADOS .....	37
5.1. CULTIVO DE HONGOS .....	37
5.2. OBTENCIÓN DE METABOLITOS.....	37
5.2.1. EXTRACTOS ORGÁNICOS .....	37
5.2.2. EXTRACTOS PEPTÍDICOS .....	38
5.2.2.1. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS .....	39

5.3. BIOENSAYOS .....	39
5.3.1. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS: EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS .....	39
5.3.1.1. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN DIRECTA EN EL AGAR .....	39
5.3.1.2. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN CON DISCO .....	40
5.3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN .....	41
5.3.2. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS CON BIOACTIVIDAD SIGNIFICATIVA .....	42
5.3.2.1. VERIFICACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DE HPLC MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN .....	43
5.3.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	44
5.3.3. ENSAYO ANTIFÚNGICO CONTRA <i>Pythium ultimum</i> .....	44
6. DISCUSIÓN .....	46
6.1. PARÁMETROS DE CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS .....	46
6.2. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA HACIA LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS .....	50
6.3. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS .....	54
6.4. BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS CON <i>Pythium ultimum</i> .....	55
7. CONCLUSIONES .....	58
8. LITERATURA CITADA .....	60

9. FIGURAS .....	73
10. TABLAS .....	85
11. ANEXOS .....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivo líquido de 1L tras retirarlo de agitación.....	73
<b>Figura 2.</b> Embudo de separación conteniendo la fase correspondiente al solvente orgánico (superior) y la fase correspondiente al caldo (inferior).....	73
<b>Figura 3.</b> Viales de vidrio con los extractos resuspendidos en metanol.....	73
<b>Figura 4.</b> Caldo en agitación junto con la resina Amberlite® incorporada.....	74
<b>Figura 5.</b> Elementos utilizados para los lavados de la resina .....	74
<b>Figura 6.</b> Resina después de los lavados con agua, lista para el proceso de secado.....	75
<b>Figura 7.</b> Ejemplo de placa de agar Mueller-Hinton rotulada para los ensayos de inhibición.....	75
<b>Figura 8.</b> Criterios para la interpretación de resultados con el método por difusión directa en el agar .....	76
<b>Figura 9.</b> Placa de TLC con muestras de los extractos peptídicos O1394, O1400, O1399 y O1393 después de rociarlos con ninhidrina .....	76
<b>Figura 10.</b> Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método por difusión directa en el agar. Para todas las placas, la bacteria ensayada fue <i>S. aureus</i> .....	77
<b>Figura 11.</b> Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método por difusión directa en el agar. En las placas A y B, la bacteria ensayada fue <i>S. marcescens</i> , en las placas C, D y E se ensayó con <i>E. coli</i> y en la placa F, con <i>S. enterica</i> .....	78
<b>Figura 12.</b> Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método por difusión directa en el agar. En las placas A y B, la bacteria ensayada fue <i>S. aureus</i> . En la placa C, se ensayó con <i>P. aeruginosa</i> .....	79
<b>Figura 13.</b> Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método de inhibición por difusión con discos. Para todos los casos, la bacteria ensayada fue <i>S. aureus</i> , excepto para la placa E, cuya bacteria ensayada fue <i>E. coli</i> .....	80

- Figura 14.** Gráficas de Absorbancia vs Concentración construidas con los datos del ensayo de microdilución para determinar la CMI, la cual se muestra con una flecha para cada caso ..... 81
- Figura 15.** Cromatograma resultante de la corrida de HPLC del extracto O1113 DCM.1. Se presume bioactividad de las fracciones 43 a la 49 por tener los picos más altos a las longitudes de onda analizadas (azul: 215 nm; verde: 254 nm)..... 82
- Figura 16.** Curvas de crecimiento de Absorbancia vs Tiempo construidas a partir de los datos del ensayo de microdilución. .... 83
- Figura 17.** Ensayo de inhibición mediante aplicación directa en el agar para las fracciones 45 y 46 del extracto O1113 DCM.1..... 83
- Figura 18.** Resultados de los ensayos de inhibición contra *Pythium ultimum*..... 84

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Hongos endófitos elegidos para el estudio .....	85
<b>Tabla 2.</b> Información de los organismos elegidos en base a los criterios de selección .....	86
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para el cultivo de hongos .....	87
<b>Tabla 4.</b> Peso seco de los extractos y concentraciones aproximadas .....	89
<b>Tabla 5.</b> Pesos y concentraciones aproximadas de todos los extractos peptídicos.....	90
<b>Tabla 6.</b> Resultados de los bioensayos con el método por difusión directa en el agar contra las bacterias ATCC® ensayadas .....	91
<b>Tabla 7.</b> Resultados de los ensayos con el método de difusión con discos para los que presentaron inhibición total con el método por difusión directa en el agar .....	94
<b>Tabla 8.</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los extractos que presentaron inhibición total.....	95
<b>Tabla 9.</b> Fracciones resultantes de las corridas de HPLC.....	96
<b>Tabla 10.</b> Posibles compuestos presentes en la fracción 45 del extracto O1113 DCM.1 identificados por su masa (Da) y su fórmula molecular según la base de datos del diccionario de productos naturales (BioChem Database).....	97
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje diario de crecimiento de <i>Pythium ultimum</i> con cada extracto en relación al control .....	99

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Moléculas con potencial terapéutico aisladas de hongos endófitos.....	101
<b>Anexo 2.</b> Esquema para el montaje de los ensayos de microdilución.....	102
<b>Anexo 3.</b> Parámetros para la corrida de HPLC .....	102
<b>Anexo 4.</b> Análisis estadísticos en DCA para los diámetros (mm) medidos en los ensayos con discos de inhibición.....	103
<b>Anexo 5.</b> Análisis estadísticos (ANOVA encajado y prueba de Tukey 0,05) para los ensayos con de inhibición de <i>Pythium ultimum</i> .....	105

## 1. RESUMEN

Se evaluó la capacidad inhibitoria de extractos orgánicos y peptídicos de doce hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA) contra las bacterias *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>, *P. aeruginosa* ATCC® 27853<sup>TM</sup>, *S. marcescens* ATCC® 13880<sup>TM</sup>, *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup> y *S. enterica* ATCC® 13076<sup>TM</sup>, y contra el hongo *Pythium ultimum*. Los hongos endófitos fueron elegidos de acuerdo a la información registrada en la base de datos de la CEQCA sobre su bioactividad y al considerarse algunos de ellos como especies nuevas. Se trabajó con 34 extractos orgánicos, de los cuales 16 fueron obtenidos por primera vez, y 18 se encontraban en existencia en la Colección CEQCA. Adicionalmente se estandarizó la metodología para obtener extractos peptídicos, de estos se obtuvieron y evaluaron 14 extractos. Los extractos se ensayaron con el método por difusión directa en el agar como primer paso para evaluar su bioactividad; de ellos, seis inhibieron totalmente el crecimiento de *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup> (O1113 DCM.1, O1113 EA.1, O1399 EA.2, O1393 EA.2, O1394 EA.2 y O1400 P.2), mientras que el extracto O1113 EA.2 presentó inhibición total contra *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>. Estos extractos también se evaluaron por el método de inhibición por difusión con discos, obteniéndose el halo de inhibición de mayor diámetro con el extracto O1113 DCM.1. Adicionalmente, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de estos extractos utilizando el método de microdilución. Se purificó el extracto orgánico O1113 DCM.1 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), recuperándose la bioactividad contra *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup> en dos fracciones. En el análisis por espectrometría de masas de una de ellas se identificaron, según su fórmula molecular, 11 posibles compuestos. En cuanto a los ensayos antifúngicos contra *P. ultimum*, los extractos O1113 DCM.1 y O1399 P.1 inhibieron totalmente al hongo (crecimiento del 0% al tercer

día de ensayo), encontrándose un efecto fungicida del primer extracto y uno fungistático del segundo extracto, dejando abierta la posibilidad de continuar con ensayos con líneas celulares de cáncer debido a su acción citotóxica hacia el hongo.

Palabras clave: bioensayos, CEQCA, compuestos bioactivos, hongos endófitos

## 2. ABSTRACT

Bioactivity of organic and peptidic extracts of twelve endophytic fungi from the Endophyte Collection Quito-Católica (CEQCA) was evaluated against *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>, *P. aeruginosa* ATCC® 27853<sup>TM</sup>, *S. marcescens* ATCC® 13880<sup>TM</sup>, *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>, *S. enterica* ATCC® 13076<sup>TM</sup> and the fungal phytopathogen *Pythium ultimum*. The endophytes were selected according the information of their inhibitory activity and the fact of being a possible new species, data registered in the CEQCA database. Thirty four extracts were used in this study, sixteen of them were first time extracted and eighteen were in stock at the CEQCA. Additionally, fourteen peptide extracts were obtained and evaluated. All extracts were assayed using agar diffusion method as a first step to evaluate their bioactivity. Six extracts strongly inhibited *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup> (O1113 DCM.1, O1113 EA.1, O1399 EA.2, O1393 EA.2, O1394 EA.2 y O1400 P.2). Organic extract O1113 EA.2 showed strong inhibition against *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>. Extracts with strong bioactivity in agar diffusion method were also assayed using disk diffusion method. Extract O1113 DCM.1 showed the highest inhibition diameter. Moreover, minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by a microdilution assay. A purification step was performed for organic extract O1113 DCM.1 by means of high performance liquid chromatography (HPLC); two fractions of the extract conserved their bioactivity against *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>. Further mass spectrometry analysis showed eleven possible compounds, identified by their molecular formula, present in one of the fractions. Antifungal assays against *P. ultimum* showed that extracts O1113 DCM.1 and O1399 P.1 totally inhibited the fungus (0% of growing at the third day of the experiment). Extract O1113 DCM.1 showed a fungicidal effect and extract O1399 P.1, a fungistatic effect. The cytotoxic effect showed by these extracts encourages working on future assays with cancer cell lines.

Keywords: bioactive compounds, bioassays, CEQCA, endophytic fungi

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. BIODIVERSIDAD Y BIOPRODUCTOS

La obtención de productos útiles para el ser humano a partir de la biodiversidad (bioproductos) ha sido una práctica que viene desde hace mucho tiempo atrás, prestando especial atención al aislamiento de moléculas bioactivas con potencial terapéutico y para aplicaciones agrícolas e industriales (Pieters y Vlietinck, 2005).

A pesar de ser una de las principales fuentes de moléculas nuevas, la investigación relacionada a los productos naturales disminuyó sustancialmente en la década de 1980 a 1990 salvo contadas excepciones (como las equinocandinas en 1980, una clase de agentes antifúngicos provenientes de la fermentación de caldos de diversos hongos) debido a algunos factores como la introducción de nuevas tecnologías de química combinatoria, con lo que se facilitó la síntesis de compuestos artificiales y quedó de lado la búsqueda de compuestos naturales, así como también la ausencia de una “necesidad médica real” de encontrar nuevos compuestos, ya que bastaban los existentes para combatir las enfermedades (Butler y Buss, 2006; Peláez, 2006).

Actualmente, ante la creciente incidencia de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos existentes, se ha vuelto a centrar la atención en los productos naturales como una fuente persistente de agentes terapéuticos innovadores y muy promisorios para tratar enfermedades infecciosas, cáncer y otras afecciones (Peláez, 2006).

Los productos naturales fueron vistos en un principio como compuestos con estructuras químicas demasiado complejas para ser estudiados; en la actualidad, esto es valorado desde el punto de vista del potencial bioactivo que pueden tener, con lo cual la promesa de encontrar moléculas estructuralmente novedosas que se pueden obtener de la explotación de metabolitos secundarios derivados de fuentes naturales justifican la inversión de tiempo y recursos en su investigación (Butler y Buss, 2006; Pieters y Vlietinck, 2005).

### **3.2. HISTORIA NATURAL DE LOS HONGOS ENDÓFITOS**

Los hongos son microorganismos filamentosos, heterótrofos, que se alimentan por absorción y se caracterizan por poseer paredes celulares de quitina. Habitan en ambientes tanto terrestres como acuáticos y se estima que existen alrededor de 100 000 especies conocidas, cifra que corresponde a cerca del 6% del estimado total de especies existentes (Sridhar, 2009). Evidencia estructural, bioquímica y molecular sugiere la división del reino Fungi en cuatro phyla: Chytridiomycota, Zigomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Onofri y Belisario, 2002).

Dentro del reino de los hongos, los hongos endófitos constituyen un grupo que pasa desapercibido e “invisible” ya que por definición, son aquellos que viven en el espacio intercelular de los tejidos de las plantas sin causar un daño aparente y ocupando un nicho biológico único (Esser, 2007; Strobel, 2006).

Son un grupo polifilético y taxonómicamente diverso cuyos individuos pertenecen en su mayoría a la división Ascomycota. Se calcula una diversidad de endófitos que supera al doble de la diversidad mundial de plantas, albergando cada una de ellas al menos un hongo

endófito. Se cree que de toda la flora mundial, las plantas tropicales son las que presentan una mayor diversidad de endófitos, en gran parte porque muchas de ellas aún no se encuentran descritas (Esser, 2007). Considerando este dato, se estima que existe al menos un millón de hongos endófitos en la Tierra, de los cuales solo una pequeña parte han sido identificados hasta el día de hoy (Kaul *et al.*, 2012).

Algunos hongos endófitos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios para sus plantas hospederas, siendo altamente importantes para el desarrollo de ellas, a tal punto que han evolucionado formas de transferencia horizontal y vertical de una planta a otra: la primera por transferencia de esporas entre plantas y la segunda es una transmisión hacia la descendencia vía semilla (Kusari *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2006).

Esta asociación entre endófitos y plantas puede haber evolucionado desde el momento mismo en que las plantas colonizaron la tierra, de modo que los hongos pudieron haber incorporado información genética de sus plantas hospederas, permitiéndoles adaptarse mejor a ellas y proporcionándoles beneficios tales como la resistencia al estrés tanto abiótico como biótico. No obstante, entender su ecología, evolución y su importancia dentro de las plantas es una tarea ardua debido a su gran diversidad (Aly *et al.*, 2010; Kusari y Spiteller, 2011; Pimentel *et al.*, 2011).

### **3.3. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS DE VALOR TERAPÉUTICO**

Existe evidencia de que los hongos han sido usados en medicina tradicional desde tiempos antiguos, lo cual da una idea de la efectividad y utilidad de los metabolitos producidos por

ellos (Aly *et al.*, 2010). El potencial de los hongos como productores de metabolitos útiles empezó a cobrar importancia desde 1928 con Alexander Fleming y el descubrimiento de la penicilina. Investigaciones posteriores llevaron a la identificación y aislamiento de muchos otros compuestos bioactivos como la griseofulvina, aislada de *Penicillium griseofulvum* en 1939; la cefalosporina, descubierta en 1948 y aislada de *Cephalosporium acremonium*; la ciclosporina, aislada del hongo *Tolypocladium inflatum* en 1970, por citar algunos ejemplos (Aly *et al.*, 2010; Aly *et al.*, 2011a; Stadler y Keller, 2008).

Actualmente, los hongos continúan considerándose como un grupo de organismos eucariotas de alta importancia en cuanto a la producción de metabolitos secundarios de diferente naturaleza química, los cuales han sido motivo de estudio tanto para fines terapéuticos como agronómicos e incluso para la industria cosmética (Aly *et al.*, 2011a). La literatura científica reporta cerca de mil quinientos metabolitos de hongos con probada actividad antitumoral y antibiótica, muchos de los cuales han sido aprobados como medicamentos. Entre ellos se incluyen la micafungina, un metabolito antifúngico proveniente de *Colleophoma empetri* (2004); micofenolato, proveniente de *Penicillium brevicompactum* (2005), usado para tratar las condiciones de colesterol alto y triglicéridos en la sangre (dislipidemias); cefditoren pivoxil, un antibiótico de amplio espectro derivado de *Cephalosporium* sp. (2002), ejemplos citados en Selim *et al.*, 2012.

En cuanto a los endófitos, a pesar de todo su potencial de síntesis de compuestos bioactivos no fue sino hasta finales del siglo XX que estos hongos empezaron a ganar mayor atención por parte de los investigadores, principalmente con el descubrimiento de *Taxomyces andreanae* y su capacidad de producir paclitaxel (de nombre comercial Taxol®), una millonaria droga anti cáncer (Kusari y Spiteller, 2011).

Mediante la obtención y evaluación de la actividad de extractos crudos obtenidos de hongos endófitos, se ha llegado a determinar actividad biológica contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Ka *et al.*, 2012; Tejesvi *et al.*, 2013). La variedad de moléculas que se pueden extraer a partir de cultivos de estos hongos abarca un amplio rango entre las que se encuentran alcaloides, esteroides, terpenos, flavonoides, entre otras, de distinta naturaleza y complejidad química que pueden actuar solos o en conjunto como agentes antimicrobianos (Kaul *et al.*, 2012).

Dentro del grupo tan diverso de moléculas, aquellas de origen peptídico han jugado un importante papel dentro de la industria farmacéutica como compuestos líderes para el desarrollo de medicamentos debido a su gran diversidad (Huang *et al.*, 2007). Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas de 6 a 100 aminoácidos con variaciones en su masa, composición, carga y estructura, con actividad biológica frente un amplio espectro de bacterias y hongos. Se trata de un grupo de moléculas producido por especies dentro de todos los reinos, en muchas de las cuales funcionan como la primera defensa del organismo ante un ataque microbiano (Brogden y Brogden, 2011; Tejesvi *et al.*, 2013).

Los PAMs se aprecian debido a su baja toxicidad y gran actividad, así como también a que no se requiere administrar dosis altas para que sean efectivos y tienen baja propensión al desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos a los que atacan. Son fácilmente difundibles debido a que poseen una cadena corta de aminoácidos. Su efectividad se hace evidente en su persistencia en los organismos a lo largo de la evolución (Giralt *et al.*, 2004; Peravali *et al.*, 2013).

Muchos PAMs son moléculas anfipáticas y catiónicas. Sus cargas positivas netas les permiten anclarse a la membrana de los microorganismos, los cuales normalmente tienen carga negativa. Su mecanismo de acción va desde la perforación de las membranas,

inhibición de la síntesis proteica, inhibición de la síntesis de pared celular hasta daños directos al DNA (Ajesh y Sreejith, 2009; Mygind *et al.*, 2005).

El interés de los PAMs como agentes farmacéuticos es alto. Se han ido desarrollando dos líneas de investigación dentro del campo de los PAMs: la primera es para identificar los PAMs existentes en la naturaleza, determinar su bioactividad contra bacterias, hongos y otros patógenos, determinar su forma de acción y verificar si son citotóxicos. La otra línea se encarga de estudiar la forma de acción de los PAMs dentro del sistema inmune en la respuesta innata. Otra última línea de investigación estudia el desarrollo de péptidos modificados (Brogden y Brogden, 2011).

Algunos de los PAMs aislados de hongos endófitos son la leucinostatina A, aislada de *Acremonium* sp., y éste a su vez de la conífera *Taxus baccata*. El compuesto ha demostrado poseer actividad anticancerígena y también fungicida contra el fitopatógeno *Pythium ultimum*, exhibiendo una posible relación entre la capacidad citotóxica del compuesto contra el hongo y contra las células cancerígenas; la equinocandina A, un lipopéptido purificado de los hongos *Criptosporiopsis* sp. y *Pezicula* sp., aislados de *Pinus silvestris* y *Fagus sylvatica*, respectivamente, el cual tiene actividad contra *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Otro ejemplo es la criptocandina, lipopéptido aislado del hongo *Criptosporiopsis quercina* proveniente de la planta *Tripterigeum wildfordii*, el cual ha mostrado actividad antifúngica contra diversos patógenos humanos como *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, causantes de enfermedades de la piel y uñas. También es activo contra el fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea* (Mousa y Raizada, 2013). Como se puede apreciar, los péptidos no solo tienen potencial como antibióticos sino también como antifúngicos, antivirales, inmunosupresores, entre otros (Giralt *et al.*, 2004).

La diversidad química y de aplicaciones terapéuticas de las moléculas sintetizadas por los hongos endófitos va, como se ha indicado anteriormente, más allá de la aplicación como antibióticos. En el Anexo 1 se resumen algunas de las aplicaciones más importantes de algunas de ellas.

### **3.4. LOS HONGOS ENDÓFITOS COMO FUENTE DE METABOLITOS**

Se cree que las diferentes condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos los hongos como la temperatura, luz, humedad, pH, disponibilidad de minerales como carbono, nitrógeno, entre otros, así como las condiciones biológicas (competencia, interacciones con la planta hospedera, etc.) son altamente influyentes en la producción de metabolitos. Siendo así, gran parte de los hongos que permanecen poco estudiados, entre ellos los endófitos, tendrían un gran potencial para la producción de biomoléculas novedosas al encontrarse relacionados a plantas de hábitats extremos o poco explorados (Selim *et al.*, 2012). Ejemplo de estos hábitats son ambientes hipersalinos como los manglares, aquellos expuestos a temperaturas muy altas o bajas, ambientes acuáticos, pantanosos o expuestos a una alta radiación ultravioleta; estas condiciones han hecho que se incremente el potencial de síntesis de metabolitos en los hongos endófitos, siendo capaces de proteger a las plantas de la herbivoría y del ataque de plagas y ayudarlas a sobrevivir en ambientes extremos gracias al gran arsenal de metabolitos secundarios que producen y que actúan en conjunto con el arsenal químico de las plantas (Cheng *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006).

Los hongos endófitos son un grupo químicamente muy diverso; sin embargo, la producción de ciertos metabolitos ocurre únicamente cuando los hongos se encuentran en cierta etapa de su desarrollo. Por ejemplo, moléculas que actúan como hormonas para promover la producción de esporas dentro de individuos del género *Aspergillus*, también se verían involucradas en la regulación del metabolismo secundario (Aly *et al.*, 2011b). De este modo, los metabolitos con significativa actividad biológica están posiblemente relacionados a funciones de supervivencia del organismo como competencia, simbiosis, estados de diferenciación morfológica y a su fase de crecimiento activo (Vinale *et al.*, 2014).

Aly *et al.* (2010) reporta un incremento en artículos científicos con respecto a metabolitos secundarios de hongos endófitos desde el año 2000. Señala que en el período 2000-2001 se publicaron 18 artículos, en el período 2002-2003, 14 artículos, de 2004 a 2005, 36 artículos, 69 artículos de 2006 a 2007 y de 2008 a 2009, 113 artículos. A ellos habría que añadir los publicados desde 2010 a 2014, pero estos números dan una idea de la importancia que han ido tomando los endófitos y sus metabolitos con el pasar del tiempo, lo que se debe en gran parte a la hipótesis de que estos hongos son metabólicamente más diversos e innovadores que aquellos hongos del suelo o que viven asociados a las algas (Aly *et al.*, 2010; Suryanarayanan *et al.*, 2009).

### **3.5. BIOPROSPECCIÓN Y HONGOS ENDOFITOS**

Bravo (1997) define a la bioprospección como el “estudio de la diversidad biológica con el fin de descubrir organismos con aplicabilidad comercial”. En otras palabras, se trata de la

investigación de la biodiversidad como fuente de productos que pueden ser de utilidad para el ser humano en diferentes áreas: farmacéutica, agrícola, alimentaria, biotecnológica, entre otras.

La bioprospección es un área que busca encontrar moléculas de interés para el ser humano, ya sea industrial, terapéutico o agrícola, provenientes de cualquier fuente natural. Esta área se ve fuertemente respaldada por los hongos endófitos ya que son una fuente rica en metabolitos bioactivos, convirtiéndolos en un grupo de estudio sumamente interesante debido a sus potenciales usos dentro de la industria, la agricultura y la biotecnología. Uno de los mejores ejemplos para ilustrar este potencial y el más conocido es quizá el del anti cancerígeno paclitaxel (Esser, 2007).

Según Newman y Cragg (2007), cerca del 68% de los productos antibacteriales y el 34% de los productos usados en terapias oncológicas provienen de fuentes naturales. Siendo sintetizadores químicos dentro de las plantas, los hongos endófitos se convierten en una valiosa fuente de nuevas biomoléculas con un alto potencial para ser utilizados como antibióticos, antitumorales, inmunosupresivos, antiparasíticos, entre otros (Esser, 2007; Kaul *et al.*, 2012).

A pesar de todo el potencial y lo promisorio de este grupo en particular, el aislamiento de cepas bioactivas a partir de su hospedero y la producción *in vitro* de los metabolitos deseados es un paso crítico a mejorar en lo referente a la bioprospección con endófitos, ya que involucra ciertas desventajas como la dependencia climática, estacional e incluso política en algunos países. No obstante, las técnicas biotecnológicas se perfilan como alternativas prometedoras para una producción sostenible y renovable de compuestos sintetizados a partir de productos naturales provenientes de estos hongos (Pimentel *et al.*, 2011).

Ante lo expuesto anteriormente, lo que más se destaca es la necesidad de comprender de mejor manera los principios bioquímicos, moleculares y evolutivos de la biosíntesis de metabolitos secundarios por parte de endófitos para llevarlos a una producción a escala industrial (Kusari y Spiteller, 2011).

### **3.6. LA BIOPROSPECCIÓN EN EL ECUADOR**

En el Ecuador, la bioprospección se ha hecho presente desde la época de la conquista española y la colonia. Uno de los ejemplos destacados que ilustran este hecho es el de la quinina, compuesto extraído de la planta conocida como cascarilla (*Cinchona pubescens*), y que fuera el antimalárico más importante en el siglo XIX (Bravo, 1997).

Actualmente, debido al gran interés de los investigadores por la biodiversidad del país y la cantidad de productos útiles que se pueden obtener de ella, se está llevando a cabo un proceso de regulación de acceso a los denominados recursos genéticos, definidos por el Convenio de Diversidad Biológica (1993) como todo material de naturaleza biológica con información genética de uso o valor potencial para el ser humano, un concepto clave para tomar en cuenta al momento de hacer investigación en el área de la bioprospección (Estrella *et al.*, 2005).

El Estado ecuatoriano, mediante el Decreto Ejecutivo N° 205, busca “asegurar el acceso y transferencia de tecnologías apropiadas para la conservación y utilización sostenible de los recursos genéticos en el marco del Convenio de Diversidad Biológica y Legislación Nacional” (MAE, 2013), de un modo que se facilite el acceso a los recursos con fines de investigación, aplicación industrial o aprovechamiento comercial, lo cual favorecería al

área de la bioprospección cuyo primordial objetivo es obtener y desarrollar productos a través de la biodiversidad pero con principios bioéticos y sobre todo de respeto a los saberes ancestrales (E-ciencia, 2012).

Tanto la bioprospección como el bioconocimiento se impulsan y se encuentran contemplados dentro del Plan Nacional para el Buen Vivir (2013-2017), en donde se habla de su potenciamiento aplicado a la matriz productiva del país mediante biotecnologías sustentables (Senplades, 2013). De este modo, la bioprospección se perfila como un área de investigación promisoría e importante para el Ecuador.

### **3.7. LA COLECCIÓN DE ENDÓFITOS QUITO-CATÓLICA (CEQCA)**

El Ecuador es poseedor de una gran diversidad de plantas que se calcula cerca de 15 306 especies nativas, de las cuales 4500 son plantas endémicas (Jørgensen y León Yáñez, 1999; León Yáñez *et al.*, 2011). Adicionalmente, se estima que tres de cada 10 plantas tiene algún tipo de uso ya sea medicinal, ornamental, comestible o agrícola (Vega-Villa, 2014).

Estas cifras sirven como referencia para pensar en la gran cantidad y diversidad de endófitos que habitan en las plantas ecuatorianas, las cuales se han ido explorando y seleccionando para el estudio de estos interesantes microorganismos. La Colección de Endófitos Quito-Católica, constituida en el año 2010 por investigadores del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, está orientada hacia la documentación de la diversidad de estos hongos, así como también al estudio de sus usos potenciales (Portero *et al.*, 2011). Hasta el momento, la colección alberga cerca de

3780 endófitos aislados de plantas colectadas en distintos ecosistemas como bosques tropicales, bosques secos y ecosistemas altoandinos (S. Villota, comunicación personal, agosto de 2014).

Entre ellos, se han aislado algunos que según la literatura científica tienen un alto potencial biotecnológico, como por ejemplo aquellos del género *Pestalotiopsis* y su capacidad de degradar el plástico; o individuos del género *Muscodor*, que producen compuestos volátiles con propiedades interesantes tales como antibacteriales o antifúngicas (Strobel y Daisy, 2003).

### **3.8. JUSTIFICACIÓN**

La búsqueda de nuevas fuentes de biomoléculas es muy importante tanto para identificar nuevos agentes terapéuticos para enfermedades tradicionales, emergentes y olvidadas, como de compuestos útiles para la industria (Aly *et al.*, 2011a; Kaul *et al.*, 2012).

Dentro de los bosques tropicales, la alta diversidad se ve representada no solo por los macroorganismos sino también por microorganismos (Li *et al.*, 2008). Al ser un componente de la biodiversidad ecuatoriana, los endófitos podrían constituir una fuente altamente promisorio para el descubrimiento de compuestos bioactivos de naturaleza química diversa y potencial terapéutico extenso. No obstante, aún es poco lo que se conoce sobre los endófitos dentro de nuestro país, por lo que el presente trabajo constituye una base importante para la investigación del potencial de los hongos endófitos y sus metabolitos, especialmente aquellos de uso terapéutico como los péptidos, moléculas consideradas de gran valor para el desarrollo de medicamentos.

De manera similar, el presente estudio sirve como base de investigación en el área de la bioprospección con hongos endófitos, con un enfoque dirigido hacia los organismos y las moléculas más interesantes, promoviendo la conservación de la biodiversidad de las plantas como hospederas de estos magníficos sintetizadores de biomoléculas, ya que incluso muchas de las especies de endófitos aún no descubiertas podrían producir compuestos de importancia para el ser humano (Smith *et al.*, 2008).

### **3.9. OBJETIVOS**

#### **3.9.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad antibiótica y antifúngica de extractos orgánicos y peptídicos de hongos endófitos provenientes de la CEQCA.

#### **3.9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Definir una metodología para la extracción de péptidos mediante una revisión bibliográfica y experimentación en laboratorio.
2. Obtener extractos tanto orgánicos como peptídicos a partir de cultivos líquidos de hongos endófitos mediante extracción con solventes orgánicos.
3. Evaluar la bioactividad de los extractos orgánicos y peptídicos mediante la ejecución de bioensayos en medio sólido y líquido.

4. Purificar los extractos orgánicos que presenten actividad fuerte y/o moderada mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
5. Identificar las fracciones que conserven actividad después de la purificación mediante nuevos bioensayos.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. SELECCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS**

Se seleccionaron doce hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA) para el presente estudio (Tabla 1). Esta selección se realizó con base en la información de la base de datos de la CEQCA y considerando lo siguiente:

- 1) Posible especie nueva, de acuerdo al porcentaje de cobertura y la máxima identidad de la secuencia dada por la herramienta BLAST.
- 2) Extractos existentes en la Colección con evidencia de bioactividad contra algún microorganismo en ensayos estándar realizados con anterioridad.

Siguiendo estos criterios, se seleccionaron cuatro hongos bajo el criterio de posibles especies nuevas y los ocho restantes bajo el segundo criterio, por calificar como promisorios al dar positivo en alguna prueba básica de bioactividad (Tabla 2).

### **4.2. CULTIVO DE HONGOS**

Los hongos de la CEQCA se crioconservan a -80 °C. Para el cultivo, los endófitos seleccionados fueron recuperados de la crioconservación y se los sembró en placas de agar papa dextrosa (PDA) para su crecimiento y posterior preparación tanto de extractos peptídicos como extractos orgánicos.

De los hongos seleccionados, seis ya contaban con extractos obtenidos usando la metodología estándar de extracción orgánica (Bascom-Slack *et al.* (2012) Ver sección 4.3.1 de Materiales y Métodos), que se usa en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la PUCE.

Para aquellos que no tenían extractos preparados, una vez que los hongos crecieron en el medio PDA, se verificó la pureza de los cultivos y se colocaron en el medio líquido caldo de dextrosa y papa (PDB), transfiriendo varios trozos del micelio en agar a este medio, primero en cultivos de 250 mL y luego de 1 L por al menos dos semanas en agitación o un mes sin agitación, con el objetivo de obtener abundante micelio y producción de metabolitos en el medio para la posterior extracción (Figura 1). Las condiciones de cultivo de cada hongo se detallan en la Tabla 3.

### **4.3. OBTENCIÓN DE METABOLITOS**

#### **4.3.1. EXTRACTOS ORGÁNICOS**

Tanto para los hongos que ya poseían los extractos en la Colección como para aquellos que fueron extraídos por primera vez, el proceso para la obtención de metabolitos secundarios en las fracciones orgánicas fue la siguiente, basado en el protocolo de Bascom-Slack *et al.* (2012) con ligeras modificaciones:

Cuando el cultivo alcanzó una cantidad abundante de micelio, se procedió a filtrarlo con ayuda de varias capas de gasa colocadas sobre vasos de precipitación de 2 L. Se desechó el micelio retenido en la gasa, mientras que la fase líquida se reservó para procedimientos

posteriores. Antes de continuar con la extracción, se aseguró que la fase líquida no contenga ninguna partícula de micelio. Ante alguna duda, se filtró nuevamente todo el caldo utilizando filtros de papel y un embudo.

Una vez libre de micelio, se colocaron cerca de 400 mL del caldo en un embudo de separación de 1 L de capacidad. Seguidamente, se añadieron 300 mL de diclorometano (DCM) y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se dejó reposar la emulsión hasta que sean bien visibles dos fases: la correspondiente al solvente y la correspondiente al caldo (Figura 2); se separaron las fases, dejando la fase del caldo en el embudo para un segundo lavado. Concluido éste, se separó la fase orgánica de DCM (inferior), la cual contenía los metabolitos extraídos, y se reservó para posterior rotoevaporación. Se procedió de igual forma con el resto del caldo de cultivo hasta extraer su totalidad (1 L), con un volumen final de solvente de 600 mL.

Concluida la extracción con DCM, el caldo se volvió a colocar en un embudo de separación limpio para proceder con los lavados con etil acetato (EA). Se siguió un proceso similar al de la extracción con DCM, con un volumen de 600 mL de EA para los lavados del caldo. Se colectó la fase orgánica (superior) y se reservó. El caldo fue descartado en un contenedor de desechos.

Finalmente, tanto la fracción que se extrajo con DCM como la de EA fueron rotoevaporadas en viales de vidrio previamente pesados hasta obtener un concentrado sólido. El peso final de los viales también fue registrado para obtener un peso aproximado del extracto obtenido.

Una vez registrados estos valores, se resuspendieron los extractos en volúmenes de entre 500  $\mu$ L y 1 mL de metanol (Figura 3), dependiendo de la cantidad de concentrado

obtenido, para poder evaluar su bioactividad en los ensayos bacterianos. Finalmente, se almacenaron a 4 °C hasta posterior utilización.

Se planificó realizar una segunda extracción para todos los extractos que se agoten mientras se estén llevando a cabo los bioensayos. Adicionalmente, para los hongos O1393, O1394, O1399 y O1113, se volvió a realizar una extracción con el propósito adicional de comprobar si se recuperaba la bioactividad reportada en ensayos previos.

#### 4.3.2. EXTRACTOS PEPTÍDICOS

Para la obtención de extractos peptídicos, se tomó como referencia la metodología utilizada por Panizel *et al.* (2013) hasta ajustarla a un protocolo exitoso, como se detalla a continuación:

Los medios líquidos con abundante micelio fueron filtrados con ayuda de varias capas de gasa. Si después de este proceso el caldo aún presentaba micelio, se procedió a filtrar de nuevo el caldo con ayuda de papel filtro. El micelio fue desechado mientras que el caldo fue colocado en un matraz de 1 L limpio junto con 50 g del reactivo reactivo Amberlite® XAD7HP, una resina adsorbente a la cual las moléculas blanco (péptidos) se adhieren para posteriormente ser liberadas a base de lavados y filtraciones sucesivas (Rohm y Haas Company, 2003).

Una vez incorporada la resina al medio, se colocó un agitador magnético en él y se selló la boca del matraz con Parafilm®, para posteriormente dejar en agitación toda la noche

(Figura 4). Esto con el fin de asegurar el contacto de todas las esferas adsorbentes de resina con el caldo.

Al día siguiente, se sacó el matraz de agitación y se procedió a separar el caldo de la resina. Para esto, se colocó la suspensión en un matraz kitasato y se filtró con ayuda de un embudo de cerámica, papel filtro y una bomba de vacío para asegurar que el líquido y la resina queden bien separados el uno del otro. La fase acuosa fue desechada mientras que la resina colocó en una bandeja limpia.

Seguidamente, se realizaron lavados sucesivos de la resina con agua MiliQ, en un volumen aproximado a tres veces el peso de la resina. Se realizaron tres lavados y de este modo se aseguró que la resina quede libre de cualquier residuo de caldo. Para un último lavado, se colocó la resina en una bandeja de aluminio hasta cubrirla totalmente con agua MiliQ; se lavó bien, moviendo la bandeja por cerca de un minuto y luego se filtró. Finalmente, se extendió la resina húmeda sobre una cama de papel filtro y se dejó secar por cerca de tres horas, hasta que las esferas de resina quedaron bien secas y no se adhirieron unas con otras (Figura 5 y 6).

Una vez seca, la totalidad de la resina usada se colocó en un vaso de precipitación y se añadió metanol hasta cubrir la resina en su totalidad. El volumen aproximado de metanol usado para este fin fue de 300 mL. Se dejó reposar la resina en el metanol por cinco minutos y luego se mantuvo en agitación por 10 minutos con ayuda de un agitador magnético. En este paso se liberan en el metanol las moléculas adheridas a la resina.

Después de esto, el metanol fue colectado mediante filtración. Se añadió otra vez 300 mL de metanol para un segundo lavado de la resina siguiendo los pasos anteriores. Se continuó lavando hasta que el metanol colectado se mostró incoloro (en los primeros lavados es amarillento). El volumen final de metanol colectado fue de 700 a 800 mL, dependiendo de

cada extracción en particular. La resina empleada es reusable, por lo que después de lavarla con metanol, se dejó secar en su totalidad y se almacenó.

El metanol colectado de los lavados fue rotoevaporado en un vial de vidrio, del mismo modo como se realizó con los extractos orgánicos. El concentrado final fue resuspendido en agua MiliQ autoclavada en un volumen de 500  $\mu$ L a 1 mL dependiendo de la cantidad de concentrado obtenido, para finalmente almacenar a 4 °C.

#### 4.3.2.1. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Antes de proceder con los bioensayos, se verificó la presencia de péptidos en los extractos utilizando la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). Para esto se procedió de la siguiente manera:

Se utilizaron placas de sílica gel para TLC de 10x10 cm, las mismas que se recortaron para obtener un tamaño más manejable al momento de cargar y correr las muestras.

Se trazó una línea a lápiz a 1 cm del borde inferior de la placa, como referencia para cargar las muestras. Seguidamente, la placa fue calentada por tres minutos en una plancha de calor o con aire caliente. Una vez calentada, se procedió a cargar las muestras con ayuda de capilares. Se realizaron dos cargas de 5  $\mu$ L, las cuales se colocaron a 1cm sobre la línea de referencia y dejando secar entre aplicación y aplicación. Para acelerar el proceso de secado, se calentó la placa ligeramente.

La cámara de TLC fue preparada con la fase móvil a utilizar, que en este caso fueron 200 mL de etil acetato:metanol:agua en proporción 120:60:20. La mezcla permaneció en la cámara 30 minutos antes de iniciar la corrida de las muestras.

Una vez secas las muestras, la placa fue colocada en la cámara para empezar la corrida, la cual duró hasta que el solvente alcanzara dos tercios de la placa (~40 minutos). Una vez alcanzado este nivel, se sacó de la cámara y se dejó secar la placa. Cuando estuvo seca, se aplicó el revelador monohidrato de ninhidrina, preparado según la relación de 1 g de ninhidrina para disolverse en 30 mL de metanol.

El revelador fue aplicado con ayuda de un atomizador en spray sobre el área de la corrida. Se realizaron dos aplicaciones uniformes, dejando secar entre aplicación y aplicación. Tras 15 minutos de reposo y si se observan manchas de color púrpura, la prueba es positiva para la presencia de péptidos (Friedman, 2004).

#### **4.4. BIOENSAYOS**

##### **4.4.1. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS: EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS**

###### **4.4.1.1. BACTERIAS UTILIZADAS**

Para los ensayos antibacterianos, se utilizaron bacterias certificadas (ATCC®), las cuales garantizan la pureza de los cultivos. Las bacterias se eligieron teniendo en cuenta las

patógenas humanas y para las cuales se ha reportado diferentes niveles de resistencia (Høiby *et al.*, 2010). Las bacterias utilizadas fueron las siguientes:

*Escherichia coli* (ATCC® 25922<sup>TM</sup>): Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y móvil por flagelos peritricos. En cultivo, las colonias son enteras, brillantes, lisas, translúcidas y poco convexas. Esta bacteria suele estar presente en el intestino de animales de sangre caliente, incluido el ser humano. Algunas cepas pueden causar enfermedades gastrointestinales graves de transmisión alimentaria (ATCC, 2014).

*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923<sup>TM</sup>): Bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa e inmóvil. En cultivo forma colonias convexas, lisas, enteras, brillantes y de color blanco-beige. Muchas colonizan a sus hospederos sin infectarlos; sin embargo, pueden ser causantes de un amplio rango de enfermedades, especialmente cutáneas y de las mucosas (ATCC, 2014).

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853<sup>TM</sup>): Bacteria Gram negativa, móvil con un solo flagelo, aerobia, que puede llegar a ser patógena afectando las vías respiratorias e infecciones generalizadas en todo el organismo. En cultivo, las colonias pueden ser rugosas, algo convexas o también enteras, pequeñas, brillantes y lisas (ATCC, 2014).

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC® 13076<sup>TM</sup>): Bacilo Gram negativo, anaerobia facultativa, móvil gracias a sus flagelos peritricos. Suelen ser causantes de enfermedades gastrointestinales. En cultivo, las colonias son circulares, enteras, brillantes, translúcidas y poco convexas (ATCC, 2014).

*Serratia marcescens* subsp. *marcescens* (ATCC® 13880<sup>TM</sup>): Es un bacilo Gram negativo, móvil, que puede ser causante de algunas enfermedades que afectan las mucosas. Las colonias en cultivo forman pequeños puntos translúcidos, circulares, enteros y poco

convexos. Se observan colonias blancas pero también puede haber rosadas. La pigmentación de la colonia se acentúa con el tiempo (ATCC, 2014).

#### 4.4.1.2. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN DIRECTA EN EL AGAR

La actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos y peptídicos fue analizada, en primera instancia, con el método de inhibición por difusión directa en el agar, siguiendo la metodología estándar que se usa en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la PUCE y sugerida en Bascom-Slack *et al.* (2012).

Este método es considerado cualitativo ya que los niveles de inhibición se calificaron bajo criterios dados por simple inspección de las placas Petri. Las bacterias a ensayar fueron recuperadas de crioconservación y puestas a crecer en el medio Luria-Bertani (LB) para cultivos bacterianos, por un periodo de 24 horas a 37 °C. Una vez obtenido el cultivo, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina al 0,8% para sembrar en las placas de LB, ajustando el inóculo según el estándar 0,5 de turbidez MacFarland, esto es, una absorbancia de 0,08 a 0,10 a una longitud de onda de 625 nm. El valor que se observa corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de *E. coli* de  $1,5 \times 10^8$  células por mL (Arivudainambi *et al.*, 2011).

Para llevar a cabo el ensayo, se utilizaron placas Petri con el medio LB, las cuales fueron rotuladas con el código del extracto a ensayar y divididas en cuadrantes para facilitar el ensayo. En cada cuadrante de la caja Petri, se colocó una marca en el lugar donde se inocularía posteriormente el extracto (Figura 7).

La siembra de bacterias se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad tipo IIA. Con ayuda de una pipeta, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto a ensayar en dos aplicaciones de 5  $\mu\text{L}$ , permitiendo que el extracto se seque antes de la segunda aplicación y así evitar que la gota de extracto se desparrame. Tras la última aplicación, se dejó secar por 15 minutos con las tapas de las placas levantadas. Luego, se procedió a la siembra de bacterias en cada uno de los cuadrantes con ayuda de hisopos estériles, empapando al hisopo con la suspensión bacteriana y frotándolo suavemente por todo el cuadrante con la placa levemente inclinada. Una vez concluida la siembra, se sellaron las placas con Parafilm®.

Se procedió de esta manera hasta inocular todas las placas, incluidos el control de crecimiento de bacterias (solo solución bacteriana) y control negativo (solución bacteriana y metanol).

Las placas permanecieron en incubación a 37°C por cerca de 18 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de las placas. La actividad antimicrobiana se detectó debido a la formación de halos de inhibición e interpretada bajo los criterios de inhibición total, parcial o ninguna de acuerdo a la densidad de bacterias observadas a simple vista en el agar (Figura 8). Para aquellos extractos que mostraron inhibición parcial de bacterias, se repitió la prueba con el doble de extracto utilizado (20  $\mu\text{L}$ ) para verificar si la inhibición continúa siendo parcial o se logra obtener inhibición total.

Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado.

#### 4.4.1.3. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN CON DISCOS

En este ensayo, la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos y peptídicos fue analizada de forma cuantitativa. Se seleccionaron únicamente los extractos que presentaron inhibición total en el método por difusión directa en el agar para ser analizados mediante este método.

Para llevar a cabo este ensayo, se siguieron las recomendaciones del Protocolo de Estándares para Pruebas de Susceptibilidad con Discos Antimicrobianos (CLSI, 2012). Se usaron cultivos de 18 horas de las bacterias a ensayar, poniéndolas a crecer en el medio agar Müeller-Hinton (MHA), idóneo para pruebas de susceptibilidad, y dejándolas incubar a 37 °C. Al día siguiente, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina al 0,8% y ajustó el inóculo a un estándar de 0,5 de la escala de McFarland.

Mientras tanto, placas de MHA fueron debidamente rotuladas y divididas en cuadrantes para proceder con la inoculación, la misma que se realizó en una cabina de bioseguridad tipo IIA. Para los ensayos, los discos de difusión (Whatman, 6 mm de diámetro) fueron cargados con 10 µL del extracto correspondiente en dos aplicaciones de 5 µl, dejando permitiendo que el disco se seque entre carga y carga. Para aquellos extractos que mostraron inhibición total en la prueba cualitativa por difusión directa se aplicó la cantidad usada en dicha prueba, esto es 10 µL con dos aplicaciones de 5 µL o 20 µL con dos aplicaciones de 10 µL.

Para cargar los extractos de péptidos se requirió mayor tiempo de secado debido a su viscosidad. Para los extractos orgánicos, fueron cerca de 10 minutos de reposo hasta garantizar que el disco absorbió todo el extracto.

Antes de colocar los discos en sus cuadrantes respectivos, se sembraron las bacterias en las placas Petri con ayuda de hisopos estériles. La siembra se realizó en toda el área de la placa con movimientos continuos de lado a lado y girando la placa 90° por tres veces, empapando el hisopo con suspensión cada vez antes de estriar. Al final, se empapó el hisopo una cuarta vez para sembrar en el contorno de la circunferencia de la placa y asegurar una cobertura total de las bacterias en el medio.

Una vez realizada la siembra de bacterias, los discos de inhibición fueron colocados en sus cuadrantes respectivos con ayuda de una pinza estéril, dando unos golpecitos sobre el disco para asegurar que permanezcan fijos sobre el agar. Una vez concluido esto, se sellaron las placas con Parafilm® y se las puso a incubar a 37 °C por alrededor de 18 horas.

Transcurrido ese tiempo, se registraron los resultados mediante la medición del diámetro del halo de inhibición en milímetros. Los datos obtenidos fueron comparados con criterios dados por la literatura en cuanto a la relación del diámetro del halo de inhibición y la resistencia o no de las bacterias al extracto ensayado.

El experimento fue llevado a cabo en triplicado con un modelo completamente al azar para el posterior análisis de variancia de los datos. Se incluyeron controles con discos cargados solo con metanol y un control de esterilidad con discos sin cargar.

#### 4.4.1.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

Se define como concentración mínima inhibitoria a la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un organismo tras el período de

incubación (Andrews, 2001). En este estudio, la CMI fue determinada únicamente para los extractos que presentaron inhibición total, tanto en el ensayo por difusión directa en el agar como en el ensayo de difusión con discos.

Para realizar este ensayo, se siguió el protocolo establecido por Arivudainambi *et al.* (2011), como se detalla a continuación:

Se realizaron diluciones seriadas en metanol de cada extracto a probar, diluyéndolos a la mitad de su concentración anterior. En total se obtuvo ocho diluciones.

Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Corning®). Las bacterias a ensayar fueron puestas a crecer durante 18 horas en caldo Müeller-Hinton (MHB) a 37 °C. Al día siguiente, se sacaron de incubación y se ajustó el inóculo siguiendo la escala de McFarland.

Una vez listo el inóculo, se preparó la placa con 90 µL de MHB en cada pocillo, a los cuales se añadieron 10 µL de inóculo y 10 µL de cada dilución o extracto crudo según sea el caso. En total, se probaron ocho diluciones y el extracto crudo sin dilución de cada muestra. Adicionalmente, se prepararon tres controles: uno de MHB con metanol, MHB más inóculo bacteriano y el último de MHB con inóculo y el antibiótico penicilina/estreptomicina (control positivo). El experimento fue llevado a cabo en triplicado.

Una vez preparadas las placas, se taparon y dejaron incubar a 37 °C durante 18 horas; después de transcurrido este tiempo, se procedió a su lectura: primero a simple vista y después en un lector óptico de placas a 630 nm para obtener datos de absorbancia y verificar el crecimiento bacteriano o inhibición del mismo; según esto, se identificaron los valores de la CMI y construyeron curvas de crecimiento “Absorbancia vs. Concentración”

mediante regresiones con ayuda del programa GraphPad Prism. El modelo que se siguió para montar el ensayo se detalla en el Anexo 1.

#### 4.4.2. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS CON BIOACTIVIDAD SIGNIFICATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

A partir de selecciones sucesivas, se llegó a determinar cuáles son los extractos con bioactividad significativa, los mismos que fueron purificados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las corridas se llevaron a cabo en el equipo Gilson® HPLC y el cromatograma fue obtenido mediante el programa Trilution® LC. Los parámetros para la corrida se especifican en el Anexo 2.

El protocolo para la corrida de la muestra se usó tal como lo indica Kucera (2013) para el curso Rainforest Expedition and Laboratory de la Universidad de Yale.

Brevemente, los extractos con bioactividad significativa fueron inyectados en filtros Millipore® Ultrafree® (2 mL) para centrifugarlos a 3000 rpm por un minuto, con lo cual se retuvo cualquier partícula que pudiese interferir al momento de la corrida. Se realizó una segunda centrifugación con los mismos parámetros que la primera vez pero añadiendo cerca de 500 µL de metanol para enjuagar el filtro completamente y recuperar la mayor cantidad de extracto posible.

Seguidamente, se transfirió el extracto filtrado (~1 mL) a un vial estéril y se lo colocó en la gradilla del equipo de HPLC. La corrida se realizó con los solventes acetonitrilo (100%) y

agua grado HPLC. Se inyectó la muestra y se colectaron fracciones por un lapso de 40 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se reservaron las fracciones correspondientes a picos de absorbancia altos observados en el cromatograma para posteriores ensayos y fueron liofilizadas a 35 °C por 12 horas utilizando el concentrador GeneVac®. El resto de fracciones fueron descartadas.

#### 4.4.2.1. VERIFICACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DE HPLC MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

Se realizaron bioensayos comprobatorios para verificar si las fracciones de los extractos con inhibición total conservaron su bioactividad después de la purificación con HPLC. Dada la gran cantidad de fracciones que se obtienen tras una corrida de HPLC, se optó por utilizar el método de microdilución en placas de poliestireno de 96 pocillos ya que es posible probar varias fracciones por placa y se optimiza el tiempo y material empleados en el ensayo.

De este modo, se siguió el protocolo indicado por Redick y Kucera (2013):

En primer lugar, se colocaron en cultivo líquido las bacterias a ensayar, en agitación constante y a 30 °C por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la densidad óptica (OD) del cultivo a 600 nm y se la ajustó a 0,03125 para obtener un cultivo homogéneo.

Posteriormente, se preparó la placa con 200 µL de caldo bacteriano y 5 µL de fracción de HPLC a probar en cada pocillo. Como control positivo se utilizó el antibiótico

Ciprofloxacina (0,1 mg/mL) y metanol como control negativo. Una vez lista la placa, se la colocó en un lector automático para medir la OD a 600 nm cada diez minutos por doce horas, a temperatura constante de 35 °C y en agitación continua.

Los resultados se observaron a manera de curvas de crecimiento bacteriano generadas automáticamente con los promedios de las mediciones de absorbancia obtenidas por el lector.

#### 4.4.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las fracciones de HPLC que conservaron su bioactividad fueron enviadas al Centro de Innovaciones Moleculares (MIC) en el Campus Oeste de la Universidad de Yale para su análisis por espectrometría de masas. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa MassHunter Workstation (Agilent Technologies®) junto con la base de datos online del diccionario de productos naturales CHEMnetBASE.

#### 4.4.3. ENSAYO ANTIFÚNGICO CONTRA *Pythium ultimum*

El ensayo antifúngico se llevó a cabo de acuerdo al protocolo para probar extractos orgánicos en la inhibición de organismos fúngicos según Bascom-Slack *et al.* (2012).

Para esto, se pusieron a crecer cultivos de *Pythium ultimum* en placas de agar papa y dextrosa (PDA) por tres días a temperatura ambiente. Dado que el hongo es de crecimiento rápido, ese tiempo fue suficiente para que el micelio cubra la totalidad de la placa.

Para realizar las pruebas, se dividieron placas de PDA en cuadrantes y se rotularon con el ID de los extractos a probar. Del mismo modo, se señaló con una marca el lugar donde se colocarían los extractos. Después, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de los extractos a probar mediante dos aplicaciones de 5  $\mu\text{L}$ , dejando secar bien tras la última aplicación, esto por 15 minutos o hasta que esté totalmente seco el extracto.

Una vez obtenidos los cultivos de tres días, se procedió a cortar cubos de agar de aproximadamente 3x3 mm y se los colocó en las placas de PDA con el lado del micelio en contacto con la superficie del agar, justo sobre los sitios donde se colocaron anteriormente los extractos. Se hizo presión ligeramente sobre el cubo de agar con ayuda del bisturí para asegurar que queden fijos en las placas, las cuales se sellaron con Parafilm® una vez concluida la siembra.

Las placas sembradas se mantuvieron a temperatura ambiente y se observaron por tres días consecutivos para verificar la existencia o no crecimiento del hongo. Adicionalmente, se midieron los diámetros de crecimiento del hongo. Transcurridos los tres días, aquellos cubos de agar colocados sobre los extractos que inhibieron totalmente al hongo fueron transferidos a una placa nueva de PDA para observar si el efecto del extracto sobre el hongo fue fungicida o fungistático.

Este ensayo se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar. Se realizaron tres repeticiones para cada extracto, y se incluyeron controles de crecimiento del hongo (un cubo de micelio sobre PDA) y controles de metanol (cubo de micelio sobre metanol). Los datos fueron analizados mediante análisis de variancia y el promedio de las

tres mediciones fueron expresadas en porcentaje de crecimiento en relación al control de metanol.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. CULTIVO DE HONGOS**

Todos los hongos elegidos crecieron exitosamente en el medio PDA, excepto O1113, cuyo crecimiento fue muy lento tanto en placas de agar como en el medio líquido PDB, a pesar de que estuvo durante un largo tiempo en cultivo y en agitación continua.

El parámetro de agitación fue muy importante para los cultivos ya que hizo posible obtener gran cantidad de micelio en menor tiempo, a comparación de dejar los cultivos sin agitar. La morfología de los hongos que crecieron con agitación fue básicamente esférica y no algodonosa tal como ocurría cuando el cultivo se encontraba en reposo.

### **5.2. OBTENCIÓN DE METABOLITOS**

#### **5.2.1. EXTRACTOS ORGÁNICOS**

Se obtuvo 16 extractos orgánicos (ocho fracciones en DCM y ocho fracciones en EA), a los cuales se suman 18 extractos ya existentes en la Colección CEQCA (nueve fracciones en DCM y nueve fracciones en EA). Para el presente trabajo se ensayaron un total de 34 extractos orgánicos (17 fracciones en DCM y 17 en EA) (Tabla 4).

De los extractos existentes en la CEQCA, el O1113 DCM.1 fue del que se tiene registro de mayor peso seco (52,7 mg), al contrario del O1055 DCM.1 que fue del que se obtuvo menor cantidad de producto (1,5 mg).

De los extractos obtenidos en este estudio, el O1393 EA.2 fue del que se obtuvo mayor cantidad de producto (191,6 mg), mientras que de los extractos O1400 DCM.1 y O1399 DCM.1 se obtuvo la menor cantidad (1,6 mg). Con base en la cantidad de producto obtenido, se determinó el volumen de metanol para resuspender los extractos. Siendo así, la concentración aproximada más alta de los extractos obtenidos de los extractos obtenidos en este estudio corresponde al extracto O1393 EA.2 (383,2 mg/mL), mientras que de los existentes en la CEQCA fue el O1090 DCM.1 (108,33 mg/mL). Los que tuvieron concentraciones más bajas son el O1399 DCM.1 y O1400 DCM.1 (3,2 mg/mL) para los extractos obtenidos en este estudio y M1193 EA.1 (2,14 mg/mL) para los extractos existentes en la CEQCA (Tabla 4).

### 5.2.2. EXTRACTOS PEPTÍDICOS

En la Tabla 5 se compila el valor del peso seco de los extractos peptídicos obtenidos y de sus concentraciones aproximadas. El péptido del que se obtuvo mayor peso seco corresponde a O1055.1P (302,9 mg), mientras del que se obtuvo menor cantidad fue el O1400.1P (32,9 mg). Sin embargo, mayor concentración de producto se obtuvo del O1400.2P (949 mg/mL) y el de menor concentración O1400.1P (32,9 mg/mL).

Después de resuspender el producto obtenido, mediante rotoevaporación se obtuvo cerca de 1mL de extracto por cada hongo extraído. En una primera instancia, se resuspendió el

extracto seco en metanol pero no se disolvió todo el producto, por lo que se probó con agua MilliQ como solvente y se obtuvo un mejor resultado.

#### 5.2.2.1. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE PÉPTIDOS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

La verificación de la presencia de péptidos en las muestras obtenidas mediante la prueba de la ninhidrina resultó exitosa; los doce extractos peptídicos dieron positivo para esta prueba (Figura 9).

### 5.3. BIOENSAYOS

#### 5.3.1. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS: EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS

##### 5.3.1.1. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN DIRECTA EN EL AGAR

Los resultados de este método son cualitativos ya que los criterios de interpretación mostrados en la Figura 8 se basan únicamente en la inspección visual; no obstante, el empleo de esta técnica permitió tener una visión general de la bioactividad de los extractos obtenidos.

Del total de extractos, 13 de ellos presentaron inhibición parcial contra *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>, seis de ellos fueron extractos peptídicos, cinco corresponden a extractos en DCM y dos a extractos orgánicos en EA. Cinco mostraron inhibición parcial de *P. aeruginosa* ATCC® 27853<sup>TM</sup> (todas fracciones en EA); cuatro inhibieron parcialmente a *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>, uno en DCM y tres en EA; siete exhibieron inhibición parcial de *S. marcescens* ATCC® 13880<sup>TM</sup>, seis en EA y uno en DCM y por último, seis tuvieron inhibición parcial de *S. enterica* ATCC® 13076<sup>TM</sup>, cuatro en EA, uno en DCM y uno de naturaleza peptídica (Tabla 6).

En cuanto a inhibiciones totales, seis extractos inhibieron totalmente a *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>, uno en DCM, cuatro en EA y un peptídico. Un extracto orgánico procedente de EA presentó inhibición total contra *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>. Finalmente, no se observaron inhibiciones totales contra *P. aeruginosa* ATCC® 27853<sup>TM</sup>, *S. marcescens* ATCC® ni *S. enterica* ATCC® 13076<sup>TM</sup> (Tabla 6). Las Figuras 10, 11 y 12 muestran los resultados para las inhibiciones totales y parciales mencionadas.

Los hongos para los cuales se obtuvo un segundo extracto mantuvieron su bioactividad inicial y en algunos casos mostraron bioactividad más fuerte (por ejemplo, de parcial a total) o actividad frente a otras bacterias además de las inhibidas por el primer extracto (resaltados en azul en la Tabla 6).

#### 5.3.1.2. MÉTODO DE INHIBICIÓN POR DIFUSIÓN CON DISCO

Los extractos que presentaron inhibición total en el método por difusión directa en el agar fueron elegidos para la prueba de inhibición por difusión con disco. De ellos, se observó

que el extracto con mayor tamaño de halo de inhibición fue el O1113 DCM.1, con 17,67 mm de diámetro promedio y el de menor diámetro de halo de inhibición corresponde al extracto O1399 EA.2 (Tabla 7), ambos observados en el ensayo contra *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>. Según los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2012), la capacidad de inhibición del extracto O1113 DCM.1 frente a la bacteria *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup> es intermedia. En cuanto al resto de extractos ensayados, su capacidad de inhibición fue baja y las bacterias fueron resistentes a los extractos probados al presentar diámetros de halos de inhibición menores a 14 mm (Figura 13).

Los resultados del análisis de variancia (Anexo 4) muestran diferencias significativas entre los halos de inhibición; la prueba de significación de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) agrupa a los diámetros de los halos de inhibición (<14 mm) resultantes de los extractos O1399 EA.2, O1394 EA.2, O1393 EA.2 y O1400 P.2 como causantes de un efecto similar; O1113 EA.1 en otro grupo y finalmente a O1113 DCM.1 en un grupo aparte, ya que tuvo el mejor resultado y ningún otro extracto mostró acción similar mediante este método. O1113 EA.2 se observa incluido dentro dos subconjuntos, entendiéndose que debido a su efecto sobre las bacterias se puede considerar dentro de cualquiera de ellos.

#### 5.3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

La CMI se determinó mediante la lectura de las absorbancias obtenidas para cada dilución ensayada; la menor concentración a la cual se registre la menor absorbancia corresponde a la CMI.

Al realizar la comparación entre el CMI y la concentración total aproximada (CTA), se determinó que en el caso del extracto O1113 EA.1 su CMI es igual a su CTA (15,85 mg/mL) ya que no existió inhibición de bacterias con ninguna de las diluciones realizadas. Para el extracto O1113 EA.2 su CMI (45,6 mg/mL) es casi la mitad de su CTA (91,2 mg/mL) y para los extractos O1399 EA.2, O1393 EA.2 y O1394 EA.2 sus CMIs son mucho menores que la mitad de sus CTAs (Tabla 8). No fue posible determinar la CMI para el extracto O1113 DCM.1 ya que se evaporó el medio de cultivo en varios de los pocillos y ya no se tenía más extracto en existencia para repetir el ensayo.

Según los criterios del CLSI (2012), ninguna de las CMIs obtenidas son significativas; es decir, las bacterias no son sensibles a ninguno de los extractos probados.

En los gráficos de absorbancia vs concentración se indican las CMIs de todos los extractos ensayados. La CMI se identifica cerca del punto de inflexión de las curvas, antes de que aumente el crecimiento bacteriano (Figura 14).

### 5.3.2. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS CON BIOACTIVIDAD SIGNIFICATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

De los extractos peptídicos O1111 P.1 y O1055 P.1 con inhibición parcial de *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>, se obtuvo 39 y 48 fracciones, respectivamente; del extracto orgánico O1113 DCM.1, que presentó inhibición total hacia esta bacteria, se obtuvo 41 fracciones; por último, de los extractos peptídicos O1394, O1393, O1399 y O1400, con evidencia de bioactividad (inhibición total) contra *S. aureus* ATCC® 25923<sup>TM</sup>, se obtuvieron 29, 34, 34

y 18 fracciones, respectivamente (Tabla 9). Las otras bacterias no se tomaron en cuenta para estos ensayos ya que los extractos no presentaron inhibición total hacia ellas.

Las fracciones fueron selectivamente escogidas de acuerdo a los picos de absorbancia mostrados en los cromatogramas. Con los picos más altos se obtuvo además una idea de aquellas fracciones que podrían guardar bioactividad para ensayarlas después.

#### 5.3.2.1. VERIFICACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DE HPLC MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

Del total de fracciones colectadas que fueron evaluadas mediante la técnica de microdilución, únicamente las fracciones 45 y 46 del extracto O1113 DCM.1 conservaron su bioactividad. En el cromatograma resultante del fraccionamiento de dicho extracto, dichas fracciones corresponden a los picos más altos de absorbancia (Figura 15).

Las lecturas dadas por el lector óptico para ambas fracciones permitieron la construcción de curvas de crecimiento de acuerdo a la absorbancia versus el tiempo transcurrido. Para la fracción 45 que presentó inhibición total se observa una disminución en el crecimiento de la curva bacteriana conforme avanza el tiempo, comparado con el control (Figura 16a). La fracción 46 no mostró la misma potencia, sin embargo, su curva de crecimiento muestra que también existió inhibición del crecimiento bacteriano, aunque en menor proporción (Figura 16b).

Para tener un respaldo adicional de estos resultados, se llevó a cabo un ensayo de inhibición con aplicación directa en el agar (Figura 17) cuyos resultados apoyan los resultados obtenidos mediante microdilución.

Ninguna de las fracciones resultantes de los extractos peptídicos (tanto los de inhibición total como parcial) recuperaron su bioactividad, a pesar de que se obtuvo evidencia de que el péptido seguía presente en casi todas las fracciones obtenidas (prueba de ninhidrina en placas de TLC).

#### 5.3.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El cromatograma de la fracción 45 del extracto O1113 DCM.1 fue analizado con el programa MassHunter Workstation (Agilent Technologies®), según el cual existen 11 posibles compuestos dentro de la muestra, identificados por su fórmula molecular. Para cada fórmula se encontraron varias coincidencias de posibles compuestos que pueden estar presentes en la muestra. Algunos de los más relevantes se muestran en la Tabla 10.

#### 5.3.3. ENSAYO ANTIFÚNGICO CONTRA *Pythium ultimum*

El análisis encajado de variancia (Anexo 5) sugiere que hay diferencias entre extractos orgánicos y peptídicos en cuanto al retraso del crecimiento de este hongo ( $p \leq 0.05$ ). Aquellos extractos que provocaron un menor crecimiento de *Pythium ultimum* al tercer día

de ensayo fueron: O1111 DCM.1 con un 81,67%, M1214 DCM.1, con un 64,17% de crecimiento, O1113 DCM.2 con un 57,50%, O1113 EA.1 con un 15% y O1113 EA.2 con un 14,17%. Los más exitosos dentro del ensayo fueron O1113 DCM.1 y O1399 P.1, ya que registraron un crecimiento del 0% de *P. ultimum* al tercer día del ensayo (Tabla 11).

Por otro lado, no se distinguieron diferencias ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la bioactividad de los extractos por fracción de DCM, EA o P. Es decir, no se observó ningún patrón que sugiera que alguna de las fracciones fuera más efectiva que otra.

Conforme avanzó el ensayo diariamente, sí se observaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ), ya que algunos extractos retardaron el crecimiento del hongo hasta el tercer día de ensayo, como por ejemplo los más efectivos O1113 DCM.1 y O1399 P.1 (0% de crecimiento de *P. ultimum* al tercer día del ensayo, Figura 18). De ellos, al sembrar el cubo de agar con micelio de *P. ultimum* luego de tratarse con el extracto O1399 P.1 en una placa nueva, volvió a crecer; mientras que aquel que estuvo en contacto con el extracto O1113 DCM.1 no volvió a crecer, dándose a entender un efecto fungistático del primer extracto y uno fungicida del segundo extracto.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. PARÁMETROS DE CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS

Uno de los factores más importantes a tomar en cuenta al momento de cultivar hongos para la producción de metabolitos secundarios es la composición del medio (Bode *et al.*, 2002), al igual que los factores ambientales a los que se encuentran expuestos los hongos como la temperatura, pH, luz, entre otros.

En este estudio, el uso del medio de cultivo PDA para el crecimiento de los hongos así como del caldo PDB para la fermentación de los cultivos líquidos fue exitoso para la mayoría de los hongos empleados, aunque en menor grado para los hongos M1214 y M1179, que no mostraron bioactividad frente a ninguna bacteria (aunque en el ensayo antifúngico, el extracto M1214 DCM.1 exhibió un 64,17% de inhibición de *Pythium ultimum*). La ausencia de bioactividad podría deberse a que no fueron cultivados en un medio óptimo y bajo las condiciones requeridas para que cada hongo produzca metabolitos activos, o tal vez son bioactivos contra otros microorganismos que en este estudio no fueron ensayados, o simplemente no se encontraban en la etapa de desarrollo adecuada para la producción de metabolitos (Calvo *et al.*, 2010).

Por otra parte, es importante mencionar el caso del hongo O1113, que mostró un crecimiento muy lento al cultivarse en los medios elegidos (PDA y PDB). Esto pudo deberse a varios factores, entre ellos el más evidente sería que los medios a base de papa y dextrosa no son sus medios óptimos de cultivo. Existen otras condiciones como la

temperatura y la luz, que también pudieron afectar su crecimiento ya que fueron variables al momento de realizar la presente investigación, no solo para el caso del hongo O1113 sino también para el resto de hongos cultivados, pero puede ser que O1113 haya sido más sensible a los cambios ambientales y por ello su crecimiento se vio afectado.

A pesar de no ser su medio óptimo de crecimiento, los extractos provenientes del hongo mencionado exhibieron bioactividad fuerte contra *S. aureus* ATCC®25923™ y *P. ultimum* en el caso de la fracción DCM.1; y contra *E. coli* en el caso de la fracción EA.2.

Es importante identificar el medio de cultivo óptimo para el hongo O1113 ya que esto podría potenciar su producción de metabolitos activos; se podría experimentar cultivando al hongo en PDA pero variando algunas condiciones del cultivo como pH, temperatura, luz, entre otros (Calvo *et al.*, 2010). También sería interesante intentar imitar las condiciones a la que se expone el endófito *in vivo* (en su planta hospedera), como por ejemplo la competencia con otros microorganismos (realizando cultivos mixtos) y añadiendo hormonas de plantas a los medios de cultivo para observar si con ese estrés se incentiva mayor producción de metabolitos bioactivos por el hongo (Pettit, 2009).

Un aspecto relevante es el caso del hongo O1113, para el que las condiciones de cultivo resultaron claves para la producción de metabolitos bioactivos. Esto pudo determinarse después de ensayar el extracto DCM.1 (primer extracto) y al momento de realizar una nueva extracción para obtener el extracto DCM.2 (segundo extracto) del mismo hongo.

En este caso, después de varios intentos por obtener extractos con bioactividad, se observó que solo bajo ciertas condiciones el hongo producía exudados de color café oscuro y al colocar los cubos del micelio que produce estos exudados en el medio líquido, éstos continúan produciéndose. Estos extractos mostraron bioactividad por lo que se puede proponer que las condiciones del medio de cultivo son importantes para la producción de

metabolitos. Esta observación de la producción de exudados al momento de llevar a cabo el cultivo en PDA fue lo que hizo posible la recuperación de la bioactividad –aunque parcial– del extracto O1113 DCM.1.

Si bien es cierto, no se recuperó la potencia de la actividad del extracto inicial, sí se llegó a determinar uno de los factores que propician la bioactividad (los exudados). Se podría tratar de una relación directa: a mayor cantidad de exudado, mayor cantidad de metabolitos bioactivos y por tanto, mayor bioactividad del extracto. Nuevamente, la observación constante del hongo O1113 en cultivo es la que sustenta esta teoría: Se colocaron dos matraces de 250mL con cubos de agar del hongo en cuestión: uno con micelio productor de exudado y el otro únicamente de micelio sin exudado. Del cultivo con producción de exudado se recuperó la actividad parcial contra *S. aureus* ATCC®25923™, mientras que del cultivo sin exudado no se obtuvo ningún tipo de actividad.

La excreción activa de agua y materiales disueltos es un fenómeno común en plantas pero también muy común en el micelio de los hongos. Se ha reportado la formación de gotas en hongos de las clases Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota, y en estudios posteriores se han utilizado incluso para diferenciarlos taxonómicamente. Se conoce poco sobre la composición de los exudados, pero dado que de exudados del hongo *Penicillium* se derivó la penicilina, se ha sugerido que estos exudados tienen la función de reservorios de metabolitos secundarios (Hutwimmer *et al.*, 2010).

Un aporte relevante de este trabajo es haber evidenciado que los extractos previamente extraídos y que forman parte de la colección de extractos de la CEQCA, mantienen su bioactividad a través del tiempo y en condiciones de almacenamiento. Un ejemplo es el extracto O1113 DCM.1, obtenido en el año 2012, cuya bioactividad se volvió a ensayar en las pruebas de inhibición por difusión con disco y aún se mantenía. Esto es un indicativo

de que el protocolo de almacenamiento de los extractos es adecuado y se puede tener una librería de extractos en la CEQCA que por lo determinado en este estudio, mantendrán su bioactividad a través del tiempo. Aún así, se recomienda (Cos *et al.*, 2006), que si no se va a utilizar los extractos a corto plazo, es mejor liofilizarlos para que éstos se conserven en condiciones óptimas y mantenerlos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que perdurarán por mucho tiempo.

Con relación a la cantidad de extracto obtenido con cada solvente orgánico, no se observó algún patrón que indique que con DCM o EA se obtiene más cantidad de extracto, aunque en lo referente a los péptidos, sí se obtuvo mayor cantidad de extracto en comparación con la extracción con solventes orgánicos, lo cual pudo deberse a que es una extracción específica de un solo tipo de metabolitos, al contrario de la extracción orgánica, que es más general para un amplio rango de metabolitos (Bascom-Slack *et al.*, 2012).

Un factor que influyó para obtener mayor o menor cantidad de producto tanto en extracción orgánica como en extracción peptídica fue el volumen de cultivo líquido empleado para la extracción, puesto que de los cultivos de 1L se obtuvo mayor cantidad de producto que de los de 250mL. Esto debido a que a mayor cantidad de medio de cultivo líquido, el hongo puede desarrollar más su micelio y por tanto también puede existir mayor producción de metabolitos (Calvo *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012).

La cantidad de micelio puede ser un factor que influya directamente en la cantidad de metabolitos producidos, pero no se trata necesariamente de una relación directamente proporcional (a mayor cantidad de micelio en el cultivo, mayor cantidad de metabolitos).

Los hongos son organismos morfológicamente complejos, cuya estructura varía de una especie a otra, difiere en diferentes etapas de sus ciclos de vida, al igual que entre cultivos sólidos y líquidos y las condiciones físicas y químicas de los mismos. En cultivo, el micelio de los hongos adopta distintas morfologías, ya sean macizos de hifas, filamentos

dispersos o esferas. Puede ser que la morfología que los hongos adoptan en cultivo también influya en la producción de metabolitos activos (Yu *et al.*, 2012).

En *Aspergillus*, por ejemplo, la morfología filamentosa se cultiva para mayor producción de enzima pectínica mientras que la forma en esferas se prefiere para mayor producción de ácido cítrico (Papagianni, 2004)

En este estudio, el parámetro de agitación fue un factor muy importante al momento de cultivar los hongos ya que el crecimiento de los hongos fue mucho más rápido que el de los cultivos sin agitación, y se observaron morfologías distintas; en el caso de agitación se observaron esferas y sin agitación crecimiento filamentoso. Puede ser que en agitación crecen más rápido porque debido al movimiento hay una mejor oxigenación del cultivo, o el estrés mecánico ocasiona que el hongo se desarrolle a mayor velocidad (Dobson *et al.*, 2008).

## **6.2. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA HACIA LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS Y PEPTÍDICOS**

Con el método por difusión directa en el agar se realizó un muestreo general de la bioactividad de los extractos para luego centrar la atención en aquellos más promisorios. Comparando con la difusión con disco, el método de aplicación directa fue más eficiente para evidenciar la bioactividad de los extractos, posiblemente debido a que al aplicar directamente el extracto en el agar se obtiene una mejor difusión del mismo en el medio y por tanto se asegura el contacto del mismo con las bacterias al momento de sembrarlas (Valgas *et al.*, 2007). Dado que los metabolitos generalmente son moléculas difundibles

que requieren entrar en contacto con la bacteria u hongo para ejercer su acción (Khasabuli *et al.*, 2014), es necesario ajustar esta metodología para hacerla más precisa y eficiente al momento de realizar los bioensayos.

En cuanto al método por difusión con discos, parece no ser eficiente para trabajar con productos naturales. Esto se puede observar comparando los resultados obtenidos con este método y con el de difusión directa en el agar y analizando los valores del diámetro de los halos de inhibición con los valores dados por el CLSI para la interpretación de los mismos. El ejemplo más relevante es el caso del extracto O1113 DCM.1 que según estos criterios, tiene una actividad moderada frente a *S. aureus* ATCC®25923™, cosa que no se observa con el de difusión directa, donde la inhibición se califica como fuerte.

Para explicar esta discrepancia entre un método y otro, hay que tomar en cuenta varios factores, siendo las características físicas de los extractos uno de las más importantes. Muchos de ellos, al ser resuspendidos ya sea en agua para el caso de los péptidos o en metanol para el caso de los extractos orgánicos, presentaron una viscosidad variable, siendo algunos más oleosos que otros. De este modo, podría ser que debido al estado físico de los extractos, algunos de los discos no queden bien impregnados con el extracto y mucho más importante, que debido al tamaño de poro del disco, los compuestos del extracto crudo no pueden difundirse fácilmente cuando se lo colocó sobre el agar, pudiendo quedar atrapadas algunas moléculas dentro del disco (Valgas *et al.*, 2007). Por lo tanto, no hay una correspondencia entre los resultados de inhibición entre un método y el otro.

Es de notar que la metodología por difusión con disco fue desarrollada para evaluar la sensibilidad de bacterias contra agentes antibacterianos ya purificados y muchas veces, sintetizados (CLSI, 2012). Considerando que los extractos crudos consisten en una mezcla

de moléculas; tal vez después de purificar el extracto para trabajar con moléculas purificadas (principio activo) se pueda utilizar la metodología con los discos de difusión y calificar a los extractos bajo los criterios que recomienda el CLSI (Ncube *et al.*, 2008; Valgas *et al.*, 2007).

En el caso de los extractos peptídicos, es mucho más recomendable el método por difusión directa en el agar ya que a pesar de estar disueltos en agua, se observó la presencia de precipitados insolubles lo cual dificultó la carga del disco con el extracto y por tanto pudo interferir con la difusión de las sustancias antimicrobianas en el agar (Valgas *et al.*, 2007).

Uno de los métodos más recomendados para observar susceptibilidad bacteriana con productos naturales es el de microdilución (Cos *et al.*, 2006; Ncube *et al.*, 2008; Valgas *et al.*, 2007). Con este método, se tiene la ventaja de que no se requiere demasiado material para realizar el ensayo, especialmente de extracto. Esto es una gran ventaja al trabajar con extractos de endófitos ya que no se obtiene una gran cantidad de extracto por cultivo. El método de microdilución es sensible, se puede trabajar varios extractos y bacterias en una misma placa y los resultados se pueden expresar mediante construcción de curvas de crecimiento bacteriano gracias a las lecturas de absorbancia que se obtienen de la placa (Cos *et al.*, 2006). Eso sí, las lecturas deben realizarse a intervalos de tiempo cortos y por un período de al menos 12 horas (como se realizó en el presente estudio para la verificación de bioactividad de las fracciones purificadas mediante HPLC) porque de otro modo no se puede ver con claridad si la inhibición es fuerte, moderada o débil.

En este estudio, también se utilizó el método de microdilución para encontrar las CMI de los extractos con bioactividad significativa. Es importante determinar la CMI ya que se trata de un indicador cuantitativo de la sensibilidad de las bacterias hacia un agente

antimicrobiano, y sirve de referencia no solamente *in vitro* sino también cuando se trabaja en la fase de experimentación *in vivo* (Klančnik *et al.*, 2010).

Con base en los criterios dados por el CLSI, ningún extracto de los ensayados tiene un efecto antimicrobiano fuerte. El que presentó una mejor inhibición hacia *S. aureus* ATCC®25923™ fue el extracto O1113 EA.1, que a pesar de que su CMI fue igual a su CTA, fue mucho menor que la de los otros extractos ensayados. En lo referente al extracto O1113 DCM.1, no fue posible determinar su CMI, pero dado que a comparación del resto de extractos, éste mostró la inhibición más fuerte en los ensayos de susceptibilidad, y que su CTA no es tan alta (35,13 mg/mL), se esperaría que su CMI sea baja.

No obstante, al revisar la literatura se encuentran varios criterios, entendiéndose que aún no existe un acuerdo para determinar qué valores de CMI de extractos provenientes de fuentes naturales son aceptables en comparación a los estándares; algunos autores consideran únicamente actividades que se pueden comparar con las de los antibióticos. Saleem *et al.* (2009), por ejemplo, considera como promisorios aquellos extractos que tengan una CMI menor a 100 µg/mL para extractos crudos, y de 0,02 a 10 µg/mL para extractos purificados; mientras que otros autores aceptan como promisorios valores mucho más altos de CMI, expresados en mg/mL (Lee *et al.*, 2007). En este estudio, las concentraciones determinadas como CMI tienen valores que van desde los 15,85 mg/mL hasta los 237,42 mg/mL, que pueden ser considerados como promisorios bajo el último criterio. Siendo así, los valores de CMI constituyen un punto de partida que resulta útil para futuros ensayos; uno de los más llamativos consiste en probar si existe sinergismo de dos extractos contra una bacteria o incluso entre un extracto y un antibiótico comercial, para el caso de bacterias resistentes. En este tipo de ensayos, se parte de la CMI para realizar diluciones y combinar los extractos; los mismo valores de CMI junto a otros

cálculos adicionales sirven para determinar si los extractos exhiben sinergismo, antagonismo o ninguna interacción (Arivudainambi *et al.*, 2011).

### 6.3. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS

La purificación del extracto O1113 DCM.1 resultó exitosa ya que se recuperaron dos fracciones activas. De ellas, la más fuerte es la fracción 45, de la cual con los resultados de espectrometría de masas se pueden apreciar varios compuestos. Si bien es cierto, aún hacen falta llevar a cabo varios pasos de purificación antes de identificar los compuestos activos, se tiene obtuvo una idea más aproximada de los posibles compuestos presentes dentro de la mezcla que compone la fracción 45. De los 11, tres de ellos no aparecen dentro de la base de datos de productos naturales, por lo cual podría tratarse de compuestos nuevos. Los ocho restantes arrojaron varias coincidencias, algunas de las más relevantes (mostradas en la Tabla 10), corresponden a compuestos presentes en hongos y plantas y algunos de ellos han sido ensayados para determinar su bioactividad, como por ejemplo la Scalusamida A (fórmula molecular  $C_{16}H_{27}NO_3$ ), aislada del hongo *Penicillium citrinum*, para la cual se reporta un efecto antibacterial y antifúngico (Tsuda *et al.*, 2005). De este modo, se puede tener una aproximación al compuesto o compuestos activos producidos por el hongo O1113, pero es necesario llevar a cabo nuevos pasos de purificación para llegar a identificarlos.

Por otro lado, en el proceso de purificación mediante HPLC también existe el riesgo de perder moléculas activas. Para el caso de los péptidos, esta pérdida pudo deberse a varios factores, tal vez los solventes de corrida no fueron los adecuados (acetonitrilo y agua) con

lo cual no tuvieron estabilidad al momento del fraccionamiento y se degradaron; también puede ser que en los pasos de preparación de la muestra como centrifugación y filtración los componentes de la misma hayan cambiado sus conformaciones y por tanto se haya tenido pérdida de bioactividad (Adams *et al.*, 2008). Otro factor a tomar en cuenta es que los extractos peptídicos O1055 P.1 y O1111 P.1 presentaban inhibición parcial, por lo cual al momento de purificación seguramente no había suficiente cantidad del compuesto bioactivo y por tanto se perdió en el proceso de purificación. Para una futura purificación de extractos peptídicos, sería ideal trabajar solo con extractos con inhibición total, realizar la purificación con mayor cantidad de muestra y buscar solventes de corrida que estabilicen de mejor manera a la muestra (Aguilar, 2004).

#### **6.4. BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS CON *Pythium ultimum***

*Pythium ultimum* es un hongo fitopatógeno que ataca diversas especies de plantas, desde ornamentales hasta pastos y cultivos, las cuales son atacadas desde la raíz, ocasionando la pudrición de la misma y la posterior caída de la planta (Hernández y Plasencia, 2013). Al ser un organismo más complejo que las bacterias, puesto que es eucariota y pluricelular, se lo consideró para evaluar la capacidad de los extractos orgánicos y peptídicos para inhibirlo, sobre todo porque su crecimiento es muy rápido, siendo capaz de cubrir la totalidad de la placa de cultivo en menos de tres días. En un estudio realizado por Strobel *et al.* (1997), una de las fracciones del extracto metanólico obtenido a partir del hongo endófito *Acremonium* sp. mostró actividad antifúngica hacia *P. ultimum* y también actividad antiBT-20 (contra células cancerígenas). De este modo, los extractos con

actividad frente a este hongo pueden ser muy promisorios para ensayos posteriores con líneas celulares de cáncer.

Los extractos O1113 DCM.1 y O1399.P1 inhibieron eficazmente al crecimiento acelerado de *P. ultimum*. El extracto O1113 DCM.1 tuvo un efecto fungicida, lo cual indica que este extracto contiene alguna o varias moléculas con un efecto citotóxico del cual las células no pueden recuperarse y por lo tanto el hongo muere.

Los resultados obtenidos con el extracto O1113 DCM.1 son promisorios pues este extracto presenta una actividad citotóxica contra *P. ultimum* y actividad inhibitoria fuerte contra *S. aureus* ATCC®25923™. Esto indica que el extracto debe contener una mezcla de moléculas de acción única o sinérgica que deberán ser purificadas mediante HPLC y análisis adicionales de espectrometría de masas para evaluar su utilidad como antibacterianos en estudios posteriores. Adicionalmente, es de interés evaluar la capacidad de los compuestos purificados como agentes antitumorales, dado que parece existir un nexo entre la sensibilidad de ciertos hongos oomycetes como *P. ultimum* y ciertas líneas celulares de cáncer. La literatura reporta compuestos bien identificados con estas características, entre ellos se encuentran el taxol y la leucinostatina A, ésta última de naturaleza peptídica (Strobel *et al.*, 1997). De esta manera, se puede considerar los ensayos con hongos oomycetes como un ensayo básico al buscar compuestos anticancerígenos.

Por su parte, el péptido O1399.P1 mostró un efecto fungistático sobre el hongo ya que inhibió su crecimiento pero no llegó a matarlo. Es posible que si se aplica una mayor cantidad de extracto peptídico se llegue a matar al hongo. Sin embargo, hay que considerar que para aplicaciones agrícolas, un efecto fungistático fuerte puede ser suficiente para controlar un fitopatógeno, como por ejemplo los productos comerciales Fosfi-Cal® o Ecolife®, que tienen efecto fungistático hacia hongos que atacan la raíz como los

pertenecientes de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* y los controlan de manera efectiva (DEAQ, 2014; Quinabra, 2007). Sería interesante evaluar la capacidad inhibitoria del extracto peptídico O1399 P.1 frente a otros hongos patógenos como por ejemplo *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* o *Botrytis cinerea*, ya que si inhibe a uno de crecimiento muy rápido como *P. ultimum*, bien podría resultar muy efectivo frente a otros hongos con una menor velocidad de crecimiento.

También sería importante profundizar la investigación para conocer cuál es el mecanismo de acción del péptido sobre el hongo, ya que los efectos varían de acuerdo a los mecanismos de defensa del patógeno y a la naturaleza del péptido. Por ejemplo, algunos de ellos son de naturaleza catiónica y se unen a la membrana celular para luego insertarse en ella. Algunos son disruptivos, con lo cual destruyen la membrana, mientras que otros la atraviesan e interactúan con otros blancos como los ácidos nucleicos o proteínas, inhibiendo su síntesis (Montesinos, 2007).

Conociendo su modo de acción, se podría llegar a catalogar al péptido como fungistático fuerte y tal vez llevar al compuesto a un nivel de ensayos *in planta* como parte del camino hacia la aplicación agrícola.

## 7. CONCLUSIONES

- La extracción de péptidos a partir de cultivos líquidos de hongos endófitos, llevada a cabo con la resina Amberlite®, es adecuada para obtener una cantidad significativa del producto buscado por cada ronda de extracción.
- La mayoría de extractos (42 de 48) mostraron actividad hacia al menos uno de los patógenos ensayados, ya sean bacterias o el hongo *P. ultimum*, lo cual da una muestra del potencial de los hongos endófitos como fuentes de moléculas bioactivas.
- Los extractos de los hongos endófitos de la colección CEQCA utilizados en este estudio presentan diferentes niveles de bioactividad, siendo el extracto O1113 DCM.1 el más promisorio dada su fuerte actividad antibiótica contra *S. aureus* ATCC®25923™ y su actividad fungicida contra *P. ultimum*.
- La purificación del extracto O1113 DCM.1 mediante HPLC permitió identificar las fracciones responsables de su bioactividad.
- El espectro de masas obtenido a partir de la fracción 45 del extracto O1113 DCM.1 permite una aproximación al posible compuesto o compuestos responsables de su bioactividad; sin embargo, pasos adicionales de purificación son necesarios para una identificación más precisa.

- Luego de la purificación por HPLC pocas fracciones conservaron su bioactividad, ya sea que presentaban baja bioactividad inicial en los ensayos de inhibición o por pérdida de bioactividad durante la purificación, por lo cual es necesario realizar ajustes para disminuir la pérdida de fracciones bioactivas.
- Al considerarse los extractos orgánicos como mezclas de moléculas secretadas por los hongos endófitos, y por lo tanto difundibles, el mejor método para evaluar su bioactividad es por difusión directa en el agar.
- Los parámetros físico-químicos en el cultivo de los hongos endófitos son importantes no solo para su crecimiento y proliferación en el medio sino también para la producción de metabolitos.

## 8. LITERATURA CITADA

Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N., Manley-Harris, M., y Snow, M. J. 2008. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research*, 343 (4): 651-659.

Aguilar, M. 2004. *Methods in Molecular Biology: HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*. Humana Press. New Jersey, USA.

Ajesh, K., y Sreejith, K. 2009. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides*, 30 (5): 999–1006.

Aly, A. H., Debbab, A., y Proksch, P. 2011a. Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity*, 50 (1): 3–19.

Aly, A. H., Debbab, A., y Proksch, P. 2011b. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (6): 1829–45.

Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., y Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, 41 (1): 1–16.

American Type Culture Collection (ATCC). 2014. Product sheets for bacteria. Sitio web: [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (1): 5-16.

Arivudainambi, U. S., Anand, T. D., Shanmugaiah, V., Karunakaran, C., y Rajendran, A. 2011. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 61 (3): 340-345.

Assante, G., Dallavalle, S., Malpezzi, L., Nasini, G., Burruano, S., y Torta, L. 2005. Acremines A–F, novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic *Acremonium*, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Tetrahedron*, 61 (32): 7686-7692.

Ayer, W. A., y McCaskill, R. H. 1980. The synthesis of trisnorcybrodolide, A metabolite of *Cyathus bulleri* brodie. *Tetrahedron Letters*, 21 (20): 1921-1922.

Ayer, W. A., Craw, P. A., y Neary, J. 1992. Metabolites of the fungus *Arthrospis truncata*. *Canadian Journal of Chemistry*, 70 (5): 1338-1347.

Bascom-Slack, C. A., Arnold, A. E., Strobel, S. A. 2012. Supplementary Materials for Student-Directed Discovery of the Plant Microbiome and Its Products. *Science* 338, 485: 1-67.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., y Zeeck, A. 2002. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem*, 3: 619–627.

Bravo, E. 1997. La Bioprospección en Ecuador. En: Biodiversidad, Bioprospección y Bioseguridad (Varea *et al.*): 131-141. Abya-Yala. Quito, Ecuador.

Brogden, N., Brogden, K. 2011. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents* 38 (3): 217–225.

Butler, M. S., y Buss, A. D. 2006. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical pharmacology*, 71 (7): 919-929.

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., y Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3): 447-459.

Chao, P. D., Schiff Jr, P. L., Slatkin, D. J., y Knapp, J. E. 1974. Metabolites of aspergilli. II. Asparvenone and O-methylasparvenone, naphthalenones from *Aspergillus parvulus*. *Lloydia*, 38 (3): 213-217.

CHEMnetBASE, chemical databases online. 2014. Dictionary of Natural Products. Sitio web: <http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=10928933&ysid=>

Cheng, X. C., Jensen, P. R., y Fenical, W. 1999. Luisols A and B, new aromatic tetraols produced by an estuarine marine bacterium of the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). *Journal of natural products*, 62 (4): 608-610.

Cheng, Z. S., Pan, J. H., Tang, W. C., Chen, Q. J., y Lin, Y. C. 2009. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. *Journal of forestry research*, 20 (1): 63-72.

Chien, M. M., Schiff Jr, P. L., Slatkin, D. J., y Knapp, J. E. 1977. Metabolites of aspergilli. III. The isolation of citrinin, dihydrocitrinone and sclerin from [Fungi]. *Lloydia*.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, y Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *Journal of Ethnopharmacology*, 106 (3): 290–302.

Dat, N. T., Van Kiem, P., Cai, X. F., Shen, Q., Bae, K., y Kim, Y. H. 2004. Gymnastone, a new Benzofuran derivative from *Gymnaster koraiensis*. *Archives of pharmacal research*, 27 (11): 1106-1108.

Diccionario de especialidades agroquímicas (DEAQ). 2014. Fosfi-Cal: hoja del producto. Sitio web: [www.agroquimicos-organicosplm.com/fosfi-cal-892-3#inicio](http://www.agroquimicos-organicosplm.com/fosfi-cal-892-3#inicio)

Dobson, L. F., O’Cleirigh, C. C., y O’Shea, D. G. 2008. The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 79 (5): 859-866.

Eciencia. 2012. Universidades crean la Red de Investigación en Bioproductos. Blogsfera de noticias de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sitio web: <http://blogs.espe.edu.ec/>

Esser, K. 2007. The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Bochum, Germany.

Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., Ribadeneira, M. 2005. Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador. Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador.

Friedman, M. 2004. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (3): 385–406.

Fujimoto, H., Satoh, Y., Nakayama, M., Takayama, T., y Yamazaki, M. 1995. Isolation of some immunosuppressive components from an ascomycete, *Gelasinospora multiforis*. *Chemical y pharmaceutical bulletin*, 43 (4): 547-552.

Giralt, E., Palomera, F. A., Jiménez, J. C. 2004. Péptidos y la industria farmacéutica. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (1): 10-16.

Hernández, C. y Plasencia, J. 2013. Biocontrol del mal del semillero, enfermedad causada por los hongos *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp. en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) empleando hongos antagonistas del género *Trichoderma* sp. a nivel de semilleros. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., y Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35 (4): 322-332.

Huang, H., She, Z., Lin, Y., Vrijmoed, L. L. P., y Lin, W. 2007. Cyclic peptides from an endophytic fungus obtained from a mangrove leaf (*Kandelia candel*). *Journal of Natural Products*, 70 (11): 1696–9.

Hutwimmer, S., Wang, H., Strasser, H., y Burgstaller, W. 2009. Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. *Mycologia*, 102 (1): 1–10.

Ka, S., Aa, E., Tm, A., y Ai, E. 2012. Biology of Endophytic Fungi, (Bérdy 2005): 31–82.

Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., y Dhar, M. K. 2012. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 11 (4): 487–505.

Khasabuli, O. Y., y Kibera, A. N. 2014. Isolation, characterization and primary screening of soil actinomycetes from Kenyatta University arboretum grounds for antibacterial activities. *Journal of Applied Biosciences*, 74 (1): 6072-6079.

Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., y Možina, S. S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81 (2): 121-126.

Kondo, H., Oritani, T., y Kiyota, H. 2000. Synthesis and antifungal activity of the four stereoisomers of streptimidone, a glutarimide antibiotic from *Streptomyces rimosus* forma paromomycinus. *European Journal of Organic Chemistry*, 2000 (20): 3459-3462.

Kucera, K. y Redick, M. 2013. Liquid Growth Inhibition Assay. In: Expedition and Laboratory, course manual. Yale University. New Haven, CT.

Kucera, K. 2013. JWG 312 Gilson HPLC Protocol. Rainforest Expedition and Laboratory, course manual. Yale University. New Haven, CT.

Kusari, S., y Spiteller, M. 2011. Metabolomics of Endophytic Fungi Producing Associated Plant Secondary Metabolites: Progress, Challenges and Opportunities. *Nat. Prod. Rep.* 28: 1203–1207.

Kusari, S., Singh, S., y Jayabaskaran, C. 2014. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in Biotechnology*, 32 (6): 297–303.

Lee, S. H., Chang, K. S., Su, M. S., Huang, Y. S., y Jang, H. D. 2007. Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food control*, 18 (12): 1547-1554.

- Li, J., Zhao, G.-Z., Chen, H.-H., Wang, H.-B., Qin, S., Zhu, W.-Y., ... Li, W.-J. 2008. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (6): 574–80.
- Liu, D. Z., Wang, F., Liao, T. G., Tang, J. G., Steglich, W., Zhu, H. J., y Liu, J. K. 2006. Vibralactone: a lipase inhibitor with an unusual fused  $\beta$ -lactone produced by cultures of the basidiomycete *Boreostereum vibrans*. *Organic letters*, 8 (25): 5749-5752.
- Liu, L., Gao, H., Chen, X., Cai, X., Yang, L., Guo, L., ... y Che, Y. 2010. Brasilamides A–D: Sesquiterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010 (17): 3302-3306.
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., y Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18 (5): 5891-5935.
- McLean, S., Brandon, S., Davies, N. W., Foley, W. J., y Muller, H. K. 2004. Jensenone: Biological reactivity of a marsupial antifeedant from *Eucalyptus*. *Journal of chemical ecology*, 30 (1): 19-36.
- Ministerio del Ambiente (MAE). 2013. Taller de reflexiones sobre el Biocomercio y el Acceso a los Recursos Genéticos en el Ecuador. Dirección Nacional de Biodiversidad. Quito, Ecuador.
- Montesinos, E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 270 (1): 1-11.
- Mousa, W. K., y Raizada, M. N. 2013. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4 (65): 1-12.

Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., ... Kristensen, H.-H. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437 (7061): 975–80.

Nakamura, M., Kido, K., Kinjo, J., y Nohara, T. 2000. Two novel actinidine-type monoterpene alkaloids from *Incarvillea delavayi*. *Chemical and pharmaceutical bulletin - Tokyo-*, 48 (11): 1826-1827.

Ncube, N. S., Afolayan, A. J., y Okoh, A. I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).

Newman, D.J., Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461–477.

Onocha, P. A., Okorie, D. A., Connolly, J. D., Krebs, H. C., Meier, B., y Habermehl, G. G. 2003. Cytotoxic activity of the constituents of *Anthocleista djalonensis* and their derivatives. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 7 (1): 58-60.

Onofri, S. y Belisario, A. 2002. Systematics of Fungi. In: Biological Science fundamentals and Systematics, Vol. II. Rome, Italy.

Orjala, J., Wright, A. D., Behrends, H., Folkers, G., Sticher, O., Rügger, H., y Rali, T. 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Journal of natural products*, 57 (1): 18-26.

Pandey, D. P., y Rather, M. A. 2012. Isolation and Identification of Phytochemicals from *Xanthium strumarium*. *International Journal of Chem Tech Research*, 4 (1): 266-271.

- Pandian, M. R., Banu, G. S., y Kumar, G. 2006. A study of the antimicrobial activity of *Alangium salviifolium*. *Indian journal of pharmacology*, 38 (3): 203.
- Panizel, I., Yarden, O., Ilan, M., y Carmeli, S. 2013. Eight new peptaibols from sponge-associated *Trichoderma atroviride*. *Marine drugs*, 11 (12): 4937-4960.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances*, 22 (3): 189-259.
- Patterson, M. F., y Damoglou, A. P. 1987. Conversion of the mycotoxin citrinin into dihydrocitrinone and ochratoxin A by *Penicillium viridicatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26 (6): 574-578.
- Peláez, F. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? *Biochemical pharmacology*, 71 (7): 981-990.
- Peravali, J. B., Kotra, S. R., Sobha, K., Nelson, R., Rajesh, K. V, y Pulicherla, K. K. 2013. Antimicrobial peptides: an effective alternative for antibiotic therapy. *Mintage Journal of Pharmaceutical y Medical Science*: 1-7.
- Pettit, R. K. 2009. Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Applied microbiology and biotechnology*, 83 (1): 19-25.
- Pieters, L., y Vlietinck, A. J. 2005. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1): 57-60.
- Pimentel, M. R., Molina, G., Dionísio, A. P., Maróstica Junior, M. R., y Pastore, G. M. 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International*: 1-11.

Qian-Cutrone, J., Gao, Q., Huang, S., Klohr, S. E., Veitch, J. A., y Shu, Y. Z. 1994. Arthrinone, a novel fungal metabolite from *Arthrinium* sp. FA 1744. *Journal of Natural Products*, 57 (12): 1656-1660.

Química Natural Brasileira (Quinabra). 2007. Ecolife, boletín técnico. Sitio web: <http://polidist.com/web/index.php>

Reed, K. A., Manam, R. R., Mitchell, S. S., Xu, J., Teisan, S., Chao, T. H., ... y Potts, B. C. 2007. Salinosporamides DJ from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, bromosalinosporamide, and thioester derivatives are potent inhibitors of the 20S proteasome. *Journal of natural products*, 70 (2): 269-276.

Rohm and Haas Company. 2003. Amberlite™ XAD7HP Industrial Grade Polymeric Adsorbent, Product Datasheet. Philadelphia, USA.

Rukachaisirikul, V., Rodglin, A., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Buatong, J., y Sakayaroj, J. 2012. Phthalide and isocoumarin derivatives produced by an *Acremonium* sp. isolated from a mangrove *Rhizophora apiculata*. *Journal of natural products*, 75 (5): 853-858.

Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (Senplades). 2013. Plan Nacional para el Buen Vivir (2013-2017). Quito, Ecuador.

Selim K.A., El-Beih A.A., AbdEl-Rahman T.M., El-Diwany A.I. 2012. Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental y Applied Mycology* 2 (1): 31-82.

Smith, S., Tank, D. C., Boulanger, L.-A., Bascom-Slack, C., Eisenman, K., Kingery, D., ... Strobel, S. 2008. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PloS One*, 3 (8): e3052.

- Sridhar, K. R. 2009. *Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites*. I.K. International Publishing House. Nueva Delhi, India.
- Stadler, M., y Keller, N. P. 2008. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological research*, 112 (2): 127-130.
- Strobel, G. 2006. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (3): 240–4.
- Strobel, G. y Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 491-502.
- Strobel, G. A., Torczynski, R., y Bollon, A. 1997. *Acremonium* sp.—a leucinostatin A producing endophyte of European yew *Taxus baccata*. *Plant Science*, 128 (1): 97-108.
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., y Murali, T. S. 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23 (1-2): 9–19.
- Tan, M. A., Kitajima, M., Kogure, N., Nonato, M. G., y Takayama, H. 2010. Isolation of Pandamarilactonine-H from the Roots of *Pandanus amaryllifolius* and Synthesis of epi-Pandamarilactonine-H. *Journal of natural products*, 73 (8): 1453-1455.
- Tejesvi, M. V., Segura, D. R., Schnorr, K. M., Sandvang, D., Mattila, S., Olsen, P. B., ... Pirttilä, A. M. 2013. An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*, 60 (1): 153–159.
- Tsuda, M., Sasaki, M., Mugishima, T., Komatsu, K., Sone, T., Tanaka, M., ... y Kobayashi, J. I. 2005. Scalusamides AC, New Pyrrolidine Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*. *Journal of natural products*, 68 (2): 273-276.

Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., y Smânia Jr, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38 (2): 369-380.

Varga, J., Due, M., Frisvad, J. C., y Samson, R. A. 2007. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*, 59: 89-106.

Vega-Villa, K. 2014. Guía para la bioprospección farmacéutica en Ecuador. Sitio web: [www.imciencia.com](http://www.imciencia.com).

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... y Lorito, M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8, (Suppl-1, M5): 127-139.

Weber, H. A., Swenson, D. C., Gloer, J. B., y Malloch, D. 1992. Similins a and b: New antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella similis*. *Tetrahedron letters*, 33 (9): 1157-1160.

Xu, J., Aly, A. H., Wray, V., y Proksch, P. 2011. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Tetrahedron Letters*, 52 (1): 21-25.

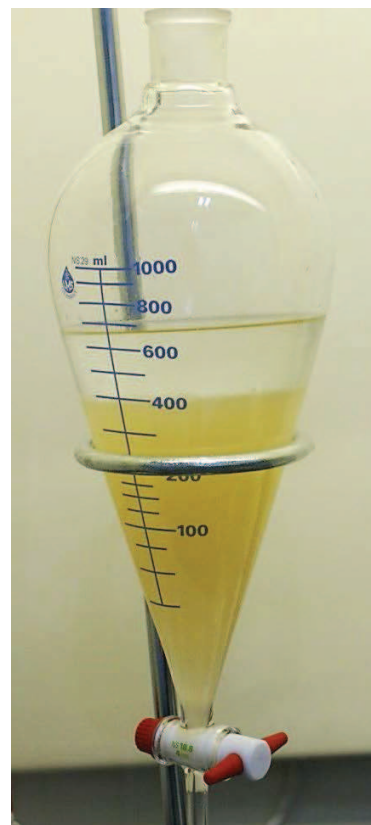
Yu, C., Cai, M., Kang, L., Zhang, Y., y Zhou, X. 2012. Significance of seed culture methods on mycelial morphology and production of a novel anti-cancer anthraquinone by marine mangrove endophytic fungus *Halorosellinia* sp. (No. 1403). *Process Biochemistry*, 47 (3): 422-427.

Zhang, H. W., Song, Y. C., y Tan, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23 (5): 753–71.

## 9. FIGURAS



**Figura 1.** Cultivo líquido de 1L tras retirarlo de agitación.



**Figura 2.** Embudo de separación conteniendo la fase correspondiente al solvente orgánico EA (superior) y la fase correspondiente al caldo (inferior).



**Figura 3.** Viales de vidrio con los extractos resuspendidos en metanol.



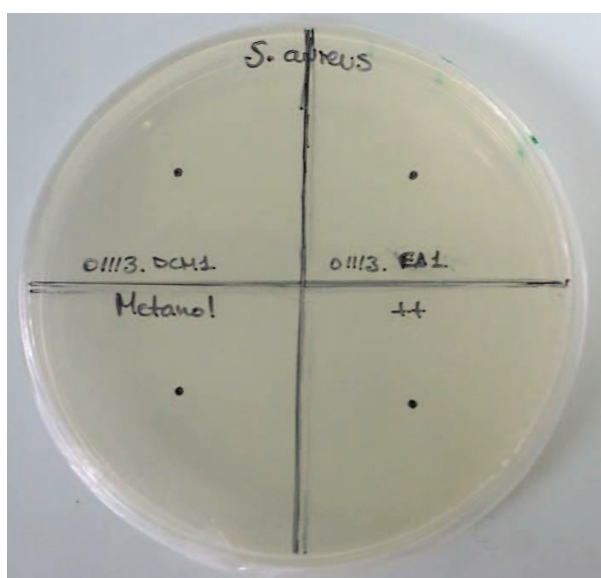
**Figura 4.** Caldo en agitación junto con la resina Amberlite® incorporada.



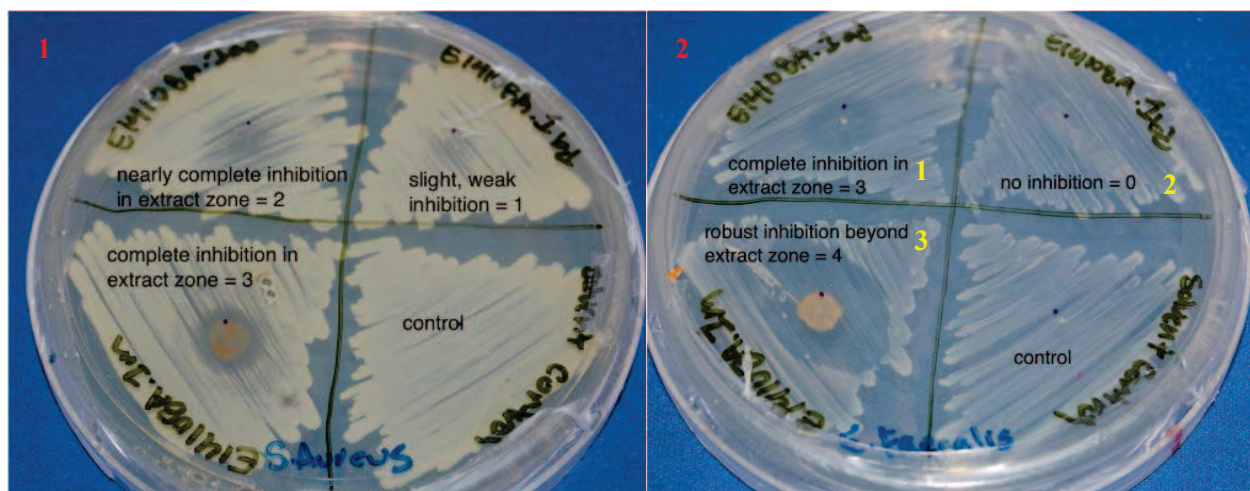
**Figura 5.** Elementos utilizados para los lavados de la resina. 1) Bandeja para el lavado con agua. 2) Filtros de papel. 3) Matraz y embudo de cerámica para la filtración del medio líquido.



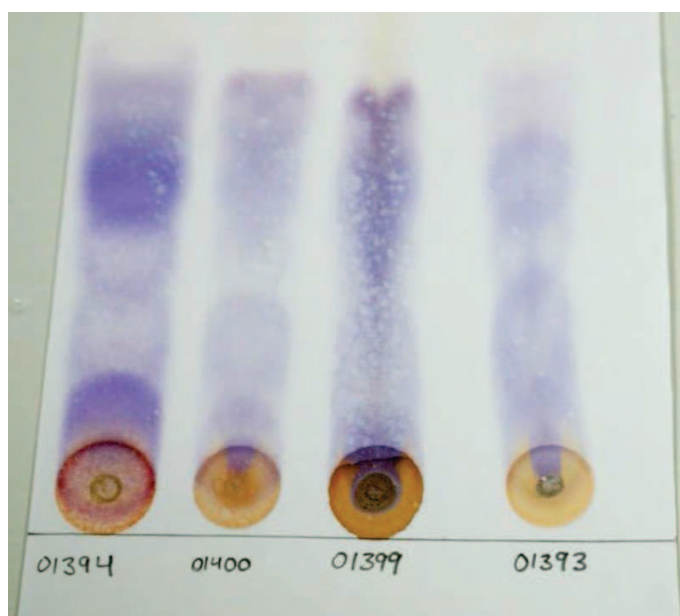
**Figura 6.** Resina después de los lavados con agua, lista para el proceso de secado.



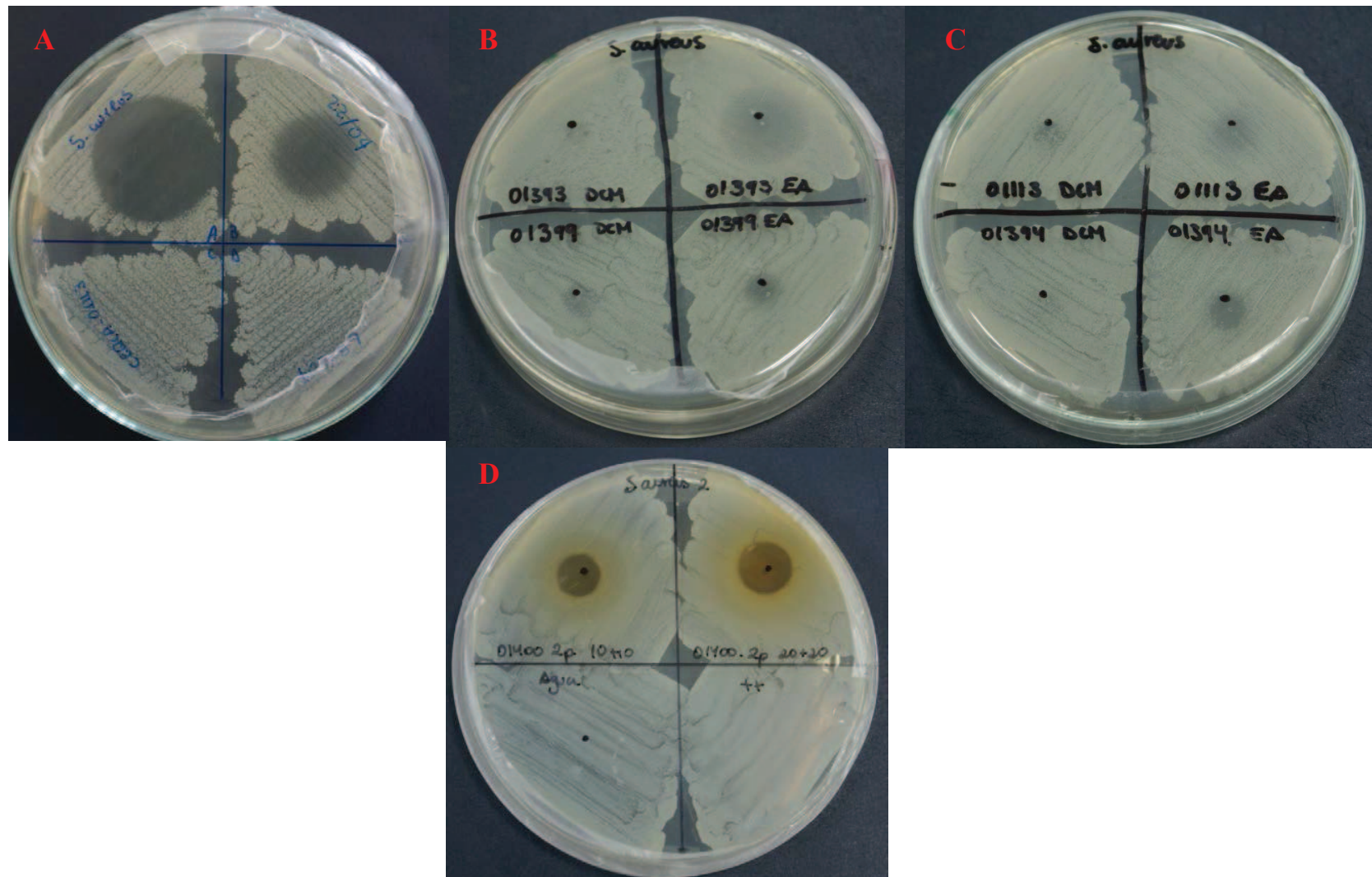
**Figura 7.** Ejemplo de placa de agar Müller-Hinton rotulada para los ensayos de inhibición



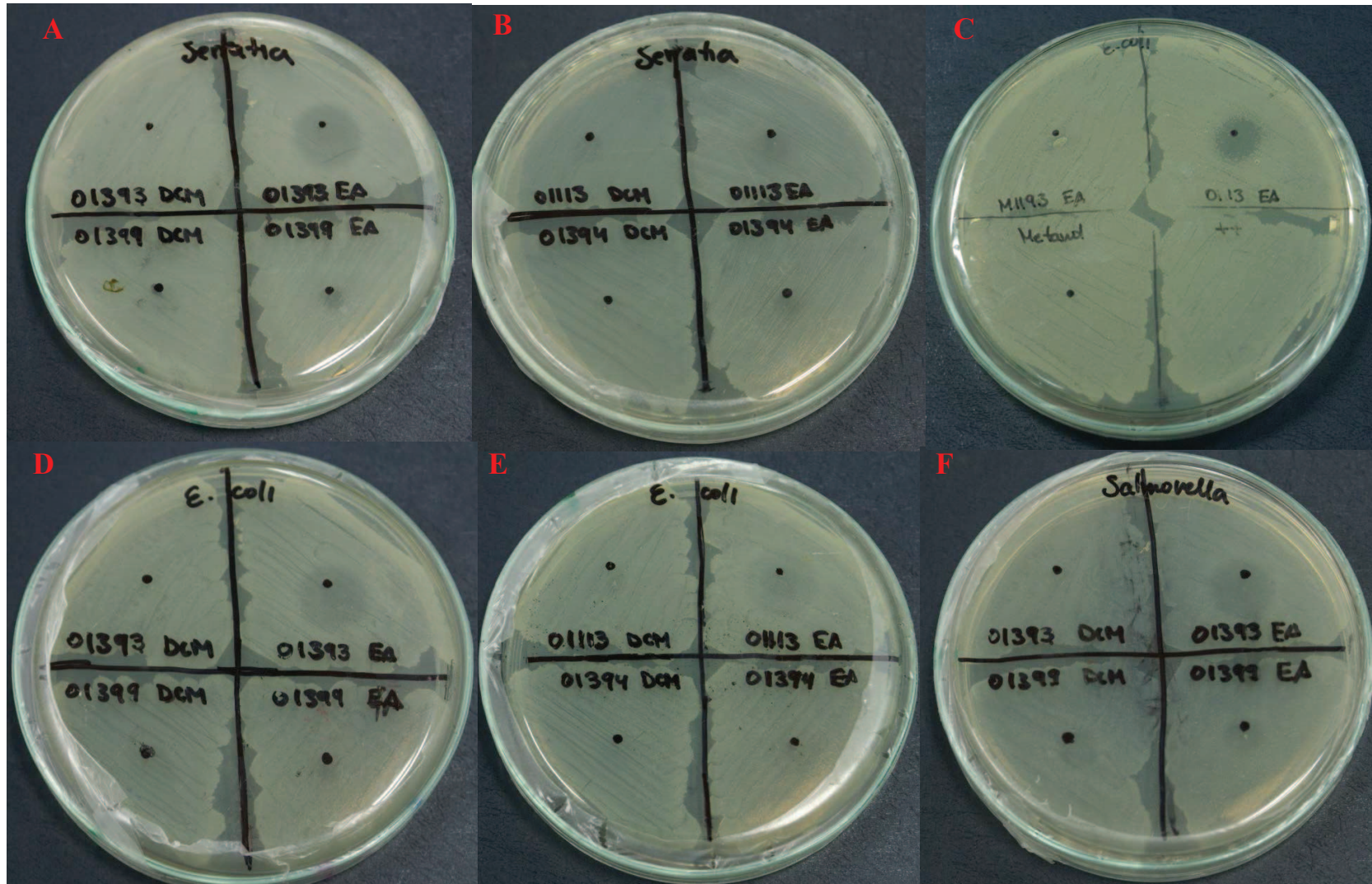
**Figura 8.** Criterios para la interpretación de resultados con el método de difusión directa en el agar según el manual del curso Rainforest Expedition & Laboratory (2013) de la Universidad de Yale. La primera placa muestra ejemplos de inhibición parcial, mientras que la segunda placa muestra en los cuadrantes 1 y 3 ejemplos de inhibición total y en el cuadrante 2, ninguna inhibición.



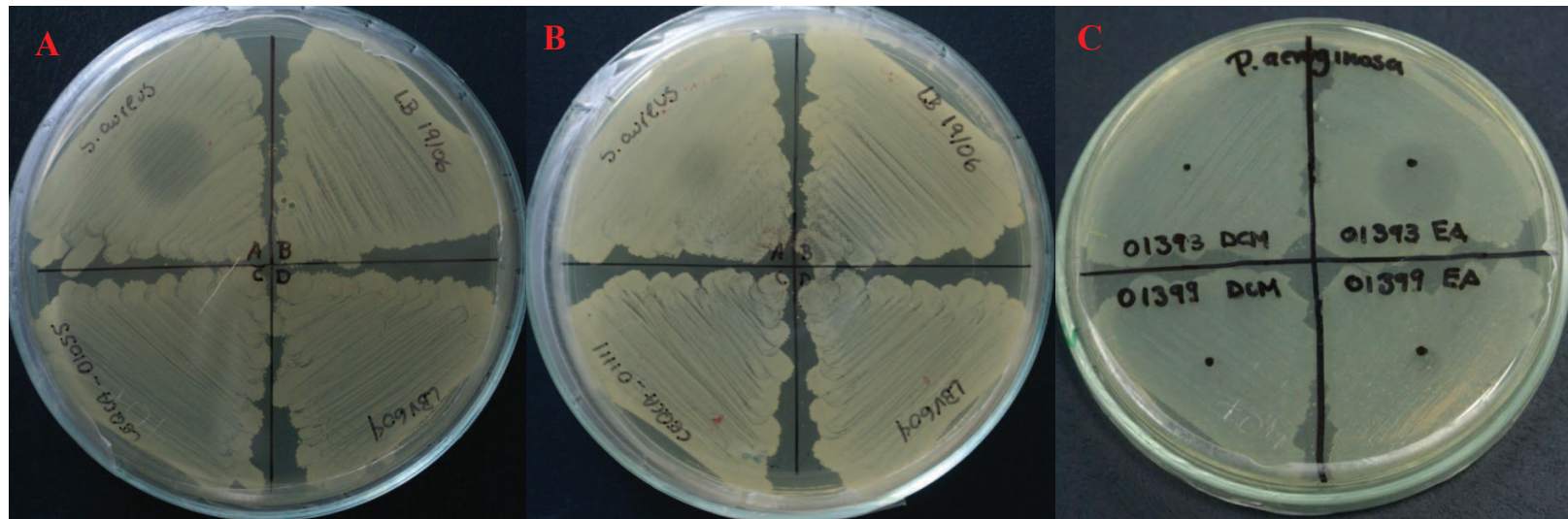
**Figura 9.** Placa de TLC con muestras de los extractos peptídicos O1394, O1400, O1399 y O1393 después de rociarla con ninhidrina. El color violeta revela que las muestras son positivas para esta prueba.



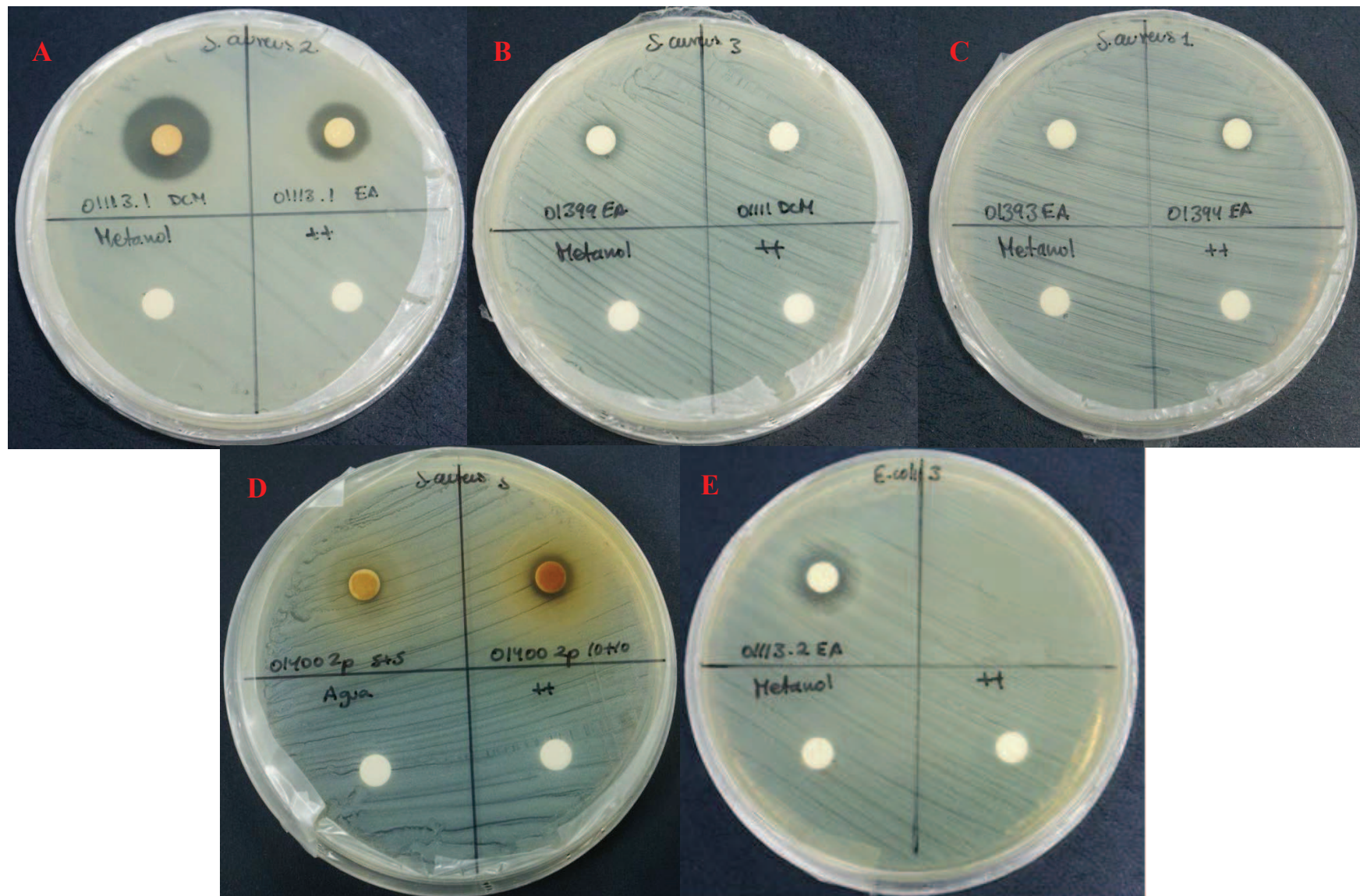
**Figura 10.** Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método por difusión directa en el agar. Para todas las placas, la bacteria ensayada fue *S. aureus*. **A:** Inhibición total de los extractos O1113 DCM.1 y O1113 EA.1. **B:** Inhibición total de los extractos O1393 EA.2 y O1399 EA.2; inhibición parcial con el extracto O1399 DCM.2. **C:** Inhibición parcial con los extractos O1113 DCM.2 y O1113 EA.2; inhibición total con el extracto O1394 EA.2. (Fotografía A tomada de la base de datos de la CEQCA).



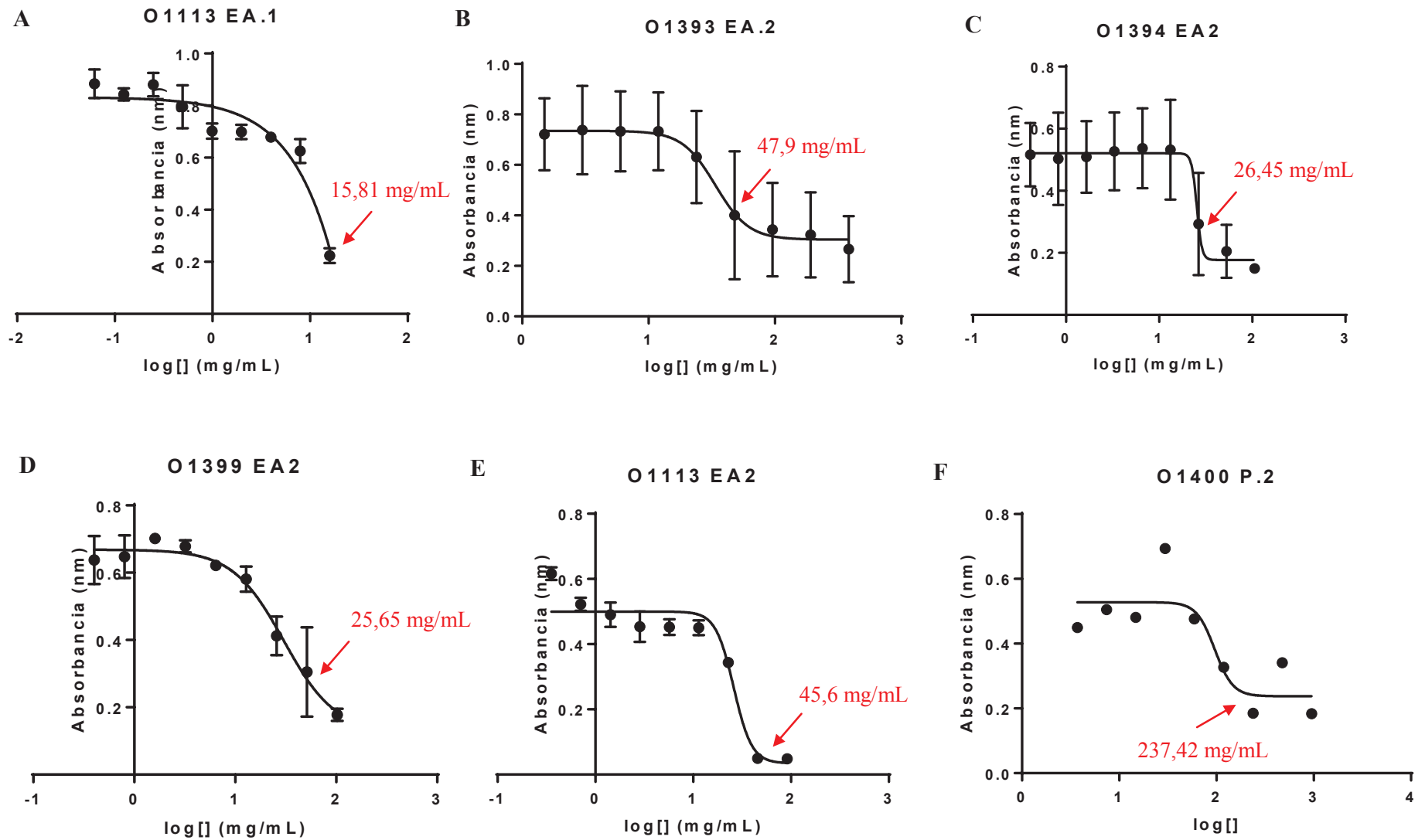
**Figura 11.** Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método por difusión directa en el agar. En las placas A y B, la bacteria ensayada fue *S. marcescens*, en las placas C, D y E se ensayó con *E. coli* y en la placa F, con *S. enterica*. **A:** Inhibición parcial con los extractos O1393 EA.2, O1399 DCM.2 y O1399 EA.2 **B:** Inhibición parcial con los extractos O1113 EA.2 y O1394 EA.2 **C:** Inhibición total con el extracto O1113 EA.2. **D:** Inhibición parcial con los extractos O1393 EA.2, O1399 DCM.2 y O1399 EA.2. **E:** Inhibición parcial con los extractos O1113 EA.2 y O1394 EA.2 **F:** Inhibición parcial con los extractos O1393 EA.2, O1399 DCM.2 y O1393.EA.2.



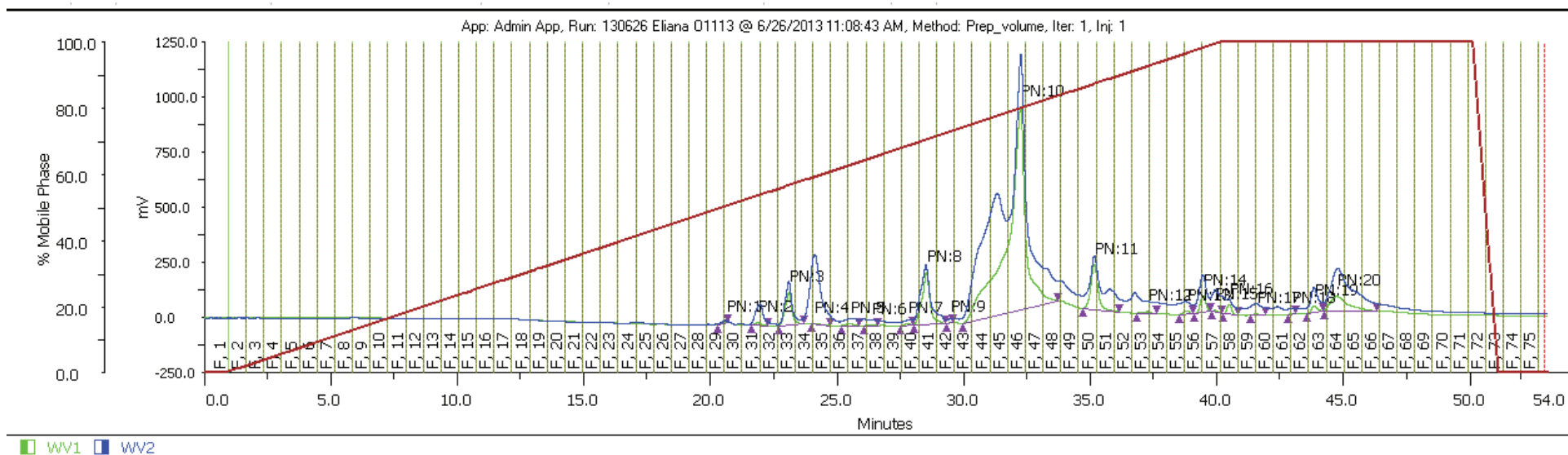
**Figura 12.** Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método por difusión directa en el agar. En las placas A y B, la bacteria ensayada fue *S aureus*. En la placa C, se ensayó con *P. aeruginosa*. **A:** Inhibición parcial con el extracto O1055 DCM.1 **B:** Inhibición parcial con el extracto O1111 DCM.1 **C:** Inhibición parcial con el extracto O1393 EA.2 y O1399 EA.2. (Fotografías A y B tomadas de la base de datos de la CEQCA).



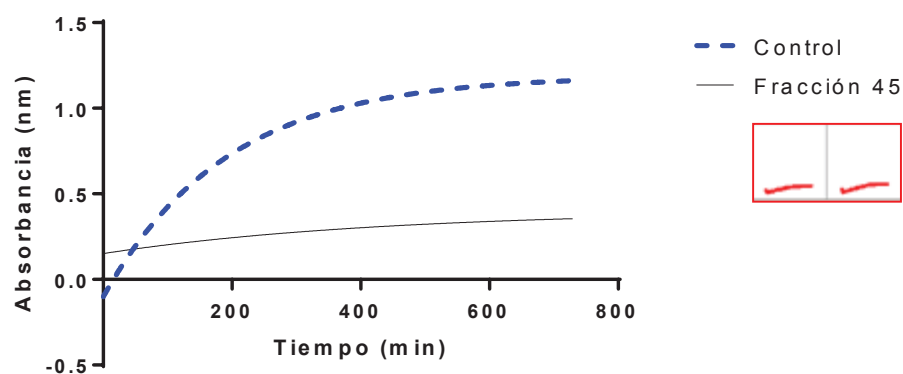
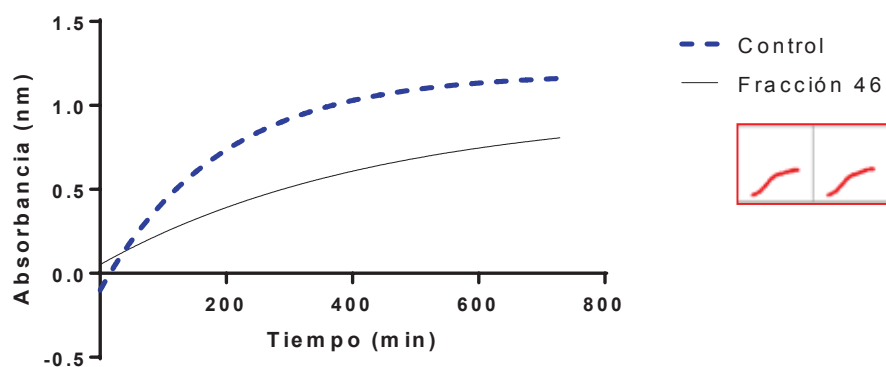
**Figura 13.** Resultados del ensayo de inhibición bacteriana con el método de inhibición por difusión con discos. Para todos los casos, la bacteria ensayada fue *S. aureus*, excepto para la placa E, cuya bacteria ensayada fue *E. coli*. Extractos ensayados: A: O1113 DCM.1 y O1113 EA.1 B: O1399 EA.2 y O1111 DCM.1 C: O1393 EA.2 y O1394 EA.2 D: O1400 P.1 E: O1113 EA.2.



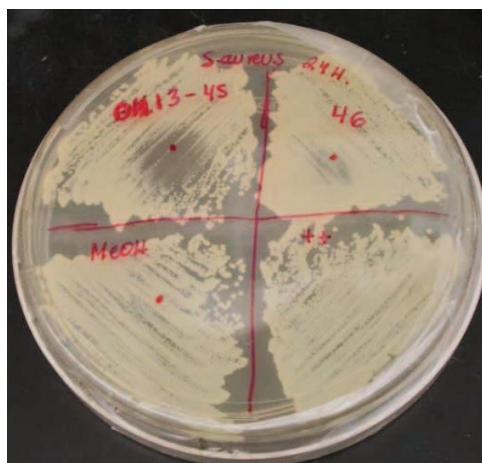
**Figura 14.** Gráficas de Absorbancia vs Concentración construidas con los datos del ensayo de microdilución para determinar la CMI, la cual se muestra con una flecha para cada caso. A: O1113 EA.1 B: O1393 EA.2 C: O1394 EA.2 D: O1399 EA.2 E: O1113 EA.2 F: O1400 P.2



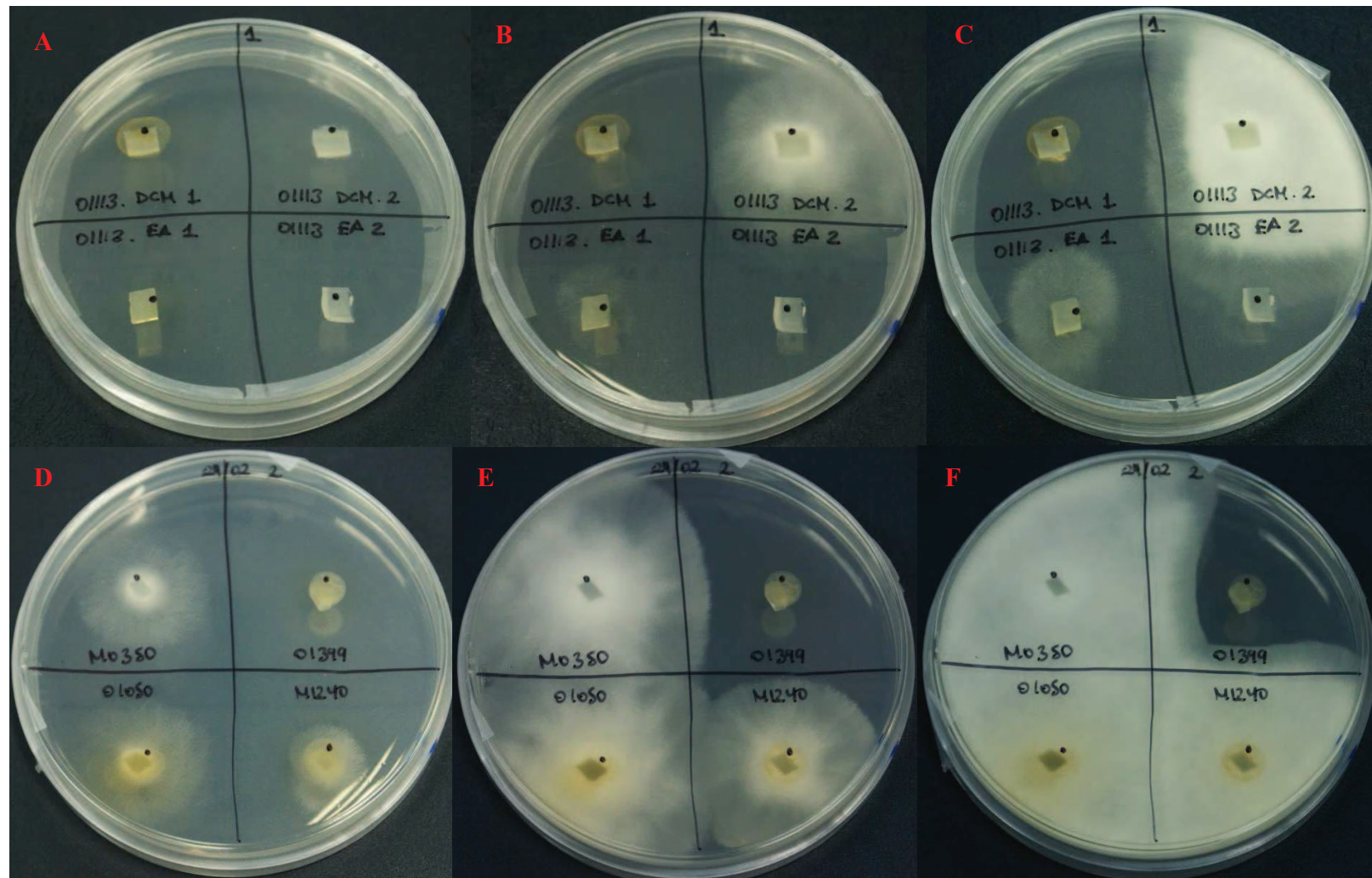
**Figura 15.** Cromatograma resultante de la corrida de HPLC del extracto O1113 DCM.1. Se presume bioactividad de las fracciones 43 a la 49 por tener los picos más altos a las longitudes de onda analizadas (azul: 215 nm; verde: 254 nm).

**A****Curva de crecimiento-Fracción 45 (O1113 DCM.1)****B****Curva de crecimiento Fracción 46 (O1113 DCM.1)**

**Figura 16.** Curvas de crecimiento de Absorbancia vs Tiempo construidas a partir de los datos del ensayo de microdilución. **A:** Fracción 45. **B:** Fracción 46. Los pequeños recuadros en rojo representan el resultado automático del lector al finalizar las lecturas.



**Figura 17.** Ensayo de inhibición mediante aplicación directa en el agar para las fracciones 45 y 46 del extracto O1113 DCM.1.



**Figura 18.** Resultados de los ensayos de inhibición contra *Pythium ultimum*. **A:** Placa de un día, no se observa crecimiento. **B:** Placa de dos días. No existe crecimiento del hongo en contacto con el extracto O1113 DCM.1 ni O1113 EA.2. El hongo en contacto con extracto O1113 DCM.2 casi cubrió la totalidad de su cuadrante. Se observan algunas hifas emergentes de aquel en contacto con el extracto O1113 EA.1. **C:** Placa de tres días. No se observa ningún crecimiento con el extracto O1113 DCM.1, y un crecimiento casi imperceptible con el extracto O1113 EA.2, a diferencia de los extractos O1113 EA.1 y O1113 DCM.2, en los cuales sí se observa crecimiento. **D, E y F:** Placa de uno, dos y tres días, respectivamente. No hay evidencia de crecimiento con el extracto O1399 P.1 en ninguna de las placas, al contrario de los otros extractos peptídicos.

## 10. TABLAS

Tabla 1. Hongos endófitos elegidos para el estudio

Código CEQCA	Provincia	Planta hospedera			Endófito			
		Familia	Especie	Altitud a la cual fue colectada (msnm)	División	Orden	Especie	
1	M1214	Manabí	Rubiaceae	<i>Simira</i> sp.	147	Ascomycota	Xylariaceae	<i>Entonaema pallida</i>
2	M1240	Manabí	Mimosaceae	Mimosaceae sp. 1	45	Ascomycota	Xylariaceae	<i>Xylaria</i> sp.
3	O1055	Orellana	Piperaceae	<i>Piper</i> sp. 2	233	Ascomycota	Pleosporales	sp. 1
4	M1179	Manabí	Violaceae	Violaceae sp. 1	90	Ascomycota	Halosphaeriaceae	<i>Periconia</i> sp.
5	O1090	Orellana	Meliaceae	<i>Guarea kunthiana</i>	214	Ascomycota	Pleosporales	sp. 2
6	O1111	Orellana	Violaceae	<i>Corynostylis arborea</i>	214	Ascomycota		sp.
7	M1193	Manabí	Arecaceae	Arecaceae sp.1	153	Ascomycota	Xylariales	sp. 1
8	O1113	Orellana	Combretaceae	Combretaceae sp. 1	210	Basidiomycota	Marasmiaceae	sp
9	O1393	Orellana	Malvaceae	<i>Herrania marie</i>	235	Ascomycota	Nectriaceae	<i>Fusarium solani</i>
10	O1400	Orellana	Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i>	235	Ascomycota	Xylariaceae	sp. 2
11	O1394	Orellana	Malvaceae	<i>Herrania marie</i>	235	Ascomycota	Diaporthaceae	<i>Diaporthe helianthi</i>
12	O1399	Orellana	Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i>	235	Ascomycota	Xylariaceae	<i>Xylaria laevis</i>

**Tabla 2.** Información de los organismos elegidos en base a los criterios de selección

	<b>Código</b>	<b>Accesión</b>	<b>PRIMER</b>	<b>PRIMER</b>	<b>Porcentaje de</b>	<b>MAX</b>	<b>Posible especie nueva</b>	<b>Actividad contra</b>
	<b>CEQCA</b>	<b>GenBank</b>	<b>F</b>	<b>R</b>	<b>cobertura</b>	<b>ID</b>		<b>bacteria</b>
<b>1</b>	M1214*	KC771479	ITS 1	ITS 4	96%	99%	Sí	No probado
<b>2</b>	M1240*	KC771483	ITS 1	ITS 4	99%	99%	-	Sí
<b>3</b>	O1055*	KC771506	ITS 1	ITS 4	71%	92%	Sí	Sí
<b>4</b>	M1179*	KC771468	ITS 1	ITS 4	93%	96%	Sí	No
<b>5</b>	O1090*	KC771509	ITS 1	ITS 4	82%	94%	Sí	No
<b>6</b>	O1111*	KC771513	ITS 1	ITS 4	100%	100%	-	Sí
<b>7</b>	M1193*	KC771473	ITS 1	ITS 4	99%	99%	-	Sí
<b>8</b>	O1113*	KC771514	ITS 1	ITS 4	98%	90%	-	Sí
<b>9</b>	O1393	JX476948	ITS 1	ITS 4	100%	100%	-	Sí
<b>10</b>	O1400	JX476952	SR7R	NS4	100%	100%	-	Sí
<b>11</b>	O1394	JX476949	ITS 1	ITS 4	99%	98%	-	Sí
<b>12</b>	O1399	JX476951	ITS 1	ITS 4	100%	99%	-	Sí

\*: Hongos que ya poseían extractos orgánicos (fracción DCM y EA) dentro de la Colección. Secuencias de los primers: ITS 1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS 4: TCCTCCGCTTATTGATATGC; SR7R: TTAAAAGCTCGTAGTTGAAC; NS4: CTTCCGTCAATTCCTTAAG.

**Tabla 3.** Condiciones para el cultivo de hongos

#	Código CEQCA	Fracción a obtener	Tiempo de cultivo (días)	Observaciones
1	M1214	DCM.1/EA.1	32	Sin agitación.
		P.1	33	Sin agitación.
2	M1240	DCM.1/EA.1	21	Sin agitación.
		P.1	33	Sin agitación.
3	O1055	DCM.1/EA.1	21	Sin agitación.
		P.1	16	Sin agitación.
4	M1179	DCM.1/EA.1	31	Sin agitación.
		P.1	22	Sin agitación.
5	O1090	DCM.1/EA.1	55	Sin agitación.
		P.1	23	Sin agitación.
6	O1111	DCM.1/EA.1	41	Sin agitación.
		P.1	20	Sin agitación.
7	M1193	DCM.1/EA.1	37	Sin agitación.
		P.1	20	Sin agitación.
8	O1113	DCM.1/EA.1	25	Sin agitación.
		DCM.2/EA.2	89	Agitación constante. Cultivado principalmente el micelio con presencia de exudado café.
		P.1	35	En agitación constante.
9	O1393	DCM.1/EA.1	35	Sin agitación.
		DCM.2/EA.2	30	En agitación 20 días, sin agitación 10 días.
		P.1	62	Sin agitación.

DCM: Fracción obtenida con diclorometano EA: Fracción obtenida con etil acetato. P: Fracción peptídica. Los números junto a las siglas representan el número de veces que se obtuvo el extracto. El cultivo inició en un matraz de 250mL y posteriormente se transfirió a 1L. Todos los hongos fueron cultivados a temperatura ambiente.

**Tabla 3.** Condiciones para el cultivo de hongos (*continuación*)

#	Código CEQCA	Fracción a obtener	Tiempo de cultivo (días)	Observaciones
10	O1400	DCM.1/EA.1	18	Sin agitación.
		P.1	41	Sin agitación.
		P.2	43	30 días en agitación, 13 días sin agitación.
11	O1394	DCM.1/EA.1	15	Sin agitación.
		DCM.2/EA.2	55	17 días en agitación, 38 días sin agitación.
		P.1	47	Sin agitación.
		P.2	34	24 días en agitación y 10 días sin agitación
12	O1399	DCM.1/EA.1	25	Sin agitación.
		DCM.2/EA.2	54	30 días en agitación, 24 días sin agitación.
		P.1	50	Sin agitación.

DCM: Fracción obtenida con diclorometano EA: Fracción obtenida con etil acetato. P: Fracción peptídica. Los números junto a las siglas representan el número de veces que se obtuvo el extracto. El cultivo inició en un matraz de 250mL y posteriormente se transfirió a 1L. Todos los hongos fueron cultivados a temperatura ambiente.

**Tabla 4.** Peso seco de los extractos y concentraciones aproximadas

#	ID extracto	Solvente orgánico	Peso extracto (mg)	MeOH para resuspender (µL)	Concentración aproximada (mg/mL)	Fecha de obtención
1	M1214	DCM.1	9,1	100	91	29/04/2013
		EA.1	26,3		263	
2	M1240	DCM.1	24,5	100	245	18/04/2013
		EA.1	9,6		96	
3	O1055	DCM.1	1,5	100	15	07/05/2013
		EA.1	7,5		75	
4	M1179	DCM.1	8,2	200	41	17/05/2013
		EA.1	3,9		19,5	
5	O1090	DCM.1	32,5	300	108,33	10/06/2013
		EA.1	8,6		28,66	
6	O1111	DCM.1	6,5	200	32,5	16/05/2013
		EA.1	9,7		48,5	
7	M1193	DCM.1	24,4	1500	16,26	13/04/2012
		EA.1	3,86	1800	2,14	
8	O1113	DCM.1	52,7	1500	35,13	25/04/2012
		DCM.2	7,9	500	15,8	16/04/2014
		EA.1	31,7	2000	15,85	25/04/2012
		EA.2	69,9	700	91,2	16/04/2014
9	O1393	DCM.1	25,2	500	50,4	30/10/2013
		DCM.2	57,8	500	115,6	10/04/2014
		EA.1	92,3	500	184,6	30/10/2013
		EA.2	191,6	500	383,2	10/04/2014
10	O1400	DCM.1	1,6	500	3,2	30/09/2013
		EA.1	45,9		91,8	
11	O1394	DCM.1	4,1	700	5,85	02/10/2013
		DCM.2	24,2	500	48,4	5/05/2014
		EA.1	12,1	700	17,28	02/10/2013
		EA.2	52,9	500	105,8	5/05/2014
12	O1399	DCM.1	1,6	500	3,2	07/10/2013
		DCM.2	11,5	500	23	30/04/2014
		EA.1	6,4	500	12,8	07/10/2013
		EA.2	51,3	500	102,6	5/05/2014

Fracciones con el número 2: Obtenidas por segunda vez

**Tabla 5.** Pesos y concentraciones aproximadas de todos los extractos peptídicos

#	ID extracto	Masa extracto (mg)	H <sub>2</sub> O para resuspender ( $\mu$ L)	Concentración aproximada (mg/mL)	Fecha de obtención
1	M1214.1P	107,9	1000	107,9	03/05/2013
2	M1240.1P	95,3	1000	95,3	30/04/2013
3	O1055.1P	302,9	1000	302,9	03/05/2013
4	M1179.1P	301,4	1000	301,4	09/05/2013
5	O1090.1P	74,8	1000	74,8	20/05/2013
6	O1111.1P	97,8	1000	97,8	26/04/2013
7	M1193.1P	170,2	1000	170,2	08/05/2013
8	O1113.1P	35,1	500	70,2	27/02/2014
9	O1393.1P	117,6	1000	117,6	27/11/2013
10	O1400.1P	32,9	1000	32,9	24/10/2013
	O1400.2P	284,9	300	949,67	25/07/2014
11	O1394.1P	94,2	1000	94,2	14/11/2013
	O1394.2P	93,3	1000	93,3	15/07/2014
12	O1399.1P	184,6	1000	184,6	01/11/2013

**Tabla 6.** Resultados de los bioensayos con el método de difusión directa en el agar contra las bacterias ATCC® ensayadas

#	ID Extracto	Fracción	Bacterias				
			<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853™	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™	<i>S. marcescens</i> ATCC® 13880™	<i>S. enterica</i> ATCC® 13076™
1	M1214	DCM.1	-	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	-	-	-	-	-
2	M1240	DCM.1	-	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	+	-	-	-	-
3	O1055	DCM.1	+	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	+	-	-	-	-
4	M1179	DCM.1	-	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	-	-	-	-	-
5	O1090	DCM.1	-	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	-	-	-	-	-
6	O1111	DCM.1	+	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	+	-	-	-	+
7	M1193	DCM.1	-	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	-	-	-	-	-

-: Sin inhibición; +: Inhibición parcial; ++: Inhibición total

**Tabla 6.** Resultados de los bioensayos con el método de difusión directa en el agar contra las bacterias ATCC® ensayadas (continuación)

#	ID Extracto	Fracción	Bacterias				
			<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853™	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™	<i>S. marcescens</i> ATCC® 13880™	<i>S. enterica</i> ATCC® 13076™
8	O1113	DCM.1	++	-	-	-	-
		DCM.2	+	-	+	-	-
		EA.1	++	-	-	-	-
		EA.2	+	-	++	+	-
		P.1	-	-	-	-	-
9	O1393	DCM.1	-	-	-	-	-
		DCM.2	-	-	-	-	-
		EA.1	-	+	-	+	+
		EA.2	++	+	+	+	+
		P.1	-	-	-	-	-
10	O1400	DCM.1	-	-	-	-	-
		EA.1	-	-	-	-	-
		P.1	+	-	-	-	-
		P.2	++	-	-	-	-

-: Sin inhibición; +: Inhibición parcial; ++: Inhibición total. En azul se destacan los extractos cuya segunda fracción tiene mayor bioactividad que la primera.

**Tabla 6.** Resultados de los bioensayos con el método de difusión directa en el agar contra las bacterias ATCC® ensayadas (continuación)

#	ID Extracto	Fracción	Bacterias				
			<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 <sup>TM</sup>	<i>E. coli</i> ATCC® 25922 <sup>TM</sup>	<i>S. marcescens</i> ATCC® 13880 <sup>TM</sup>	<i>S. enterica</i> ATCC® 13076 <sup>TM</sup>
11	O1394	DCM.1	-	-	-	-	-
		DCM.2	-	-	-	-	-
		EA.1	+	-	-	-	-
		EA.2	++	+	+	+	-
		P.1	+	-	-	-	-
		P.2	+	-	-	-	-
12	O1399	DCM.1	+	-	-	-	-
		DCM.2	+	-	-	+	+
		EA.1	+	+	-	+	+
		EA.2	++	+	+	+	+
		P.1	-	-	-	-	-

-. Sin inhibición; +: Inhibición parcial; ++: Inhibición total. En azul se destacan los extractos cuya segunda fracción tiene mayor bioactividad que la primera.

**Tabla 7.** Resultados de los ensayos con el método de disco de difusión para los que presentaron inhibición total con el método de difusión directa en el agar

ID extracto	Fracción	Bacteria inhibida	Concentración del extracto (mg/mL)	Diámetros de la zona de inhibición (mm)			Diámetro promedio (mm)	Tipo*
				1	2	3		
O1113	DCM.1	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	35,13	17	17	19	17,67	Intermedio
O1113	EA.1	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	15,85	12	13	12	12,33	Resistente
O1113	EA.2	<i>E. coli</i> ATCC® 25922 <sup>TM</sup>	91,2	12	9	10	10,33	Resistente
O1399	EA.2	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	102,6	8	7	9	8	Resistente
O1393	EA.2	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	383,2	8	9	9	8,67	Resistente
O1394	EA.2	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	105,8	8	8	9	8,33	Resistente
O1400	P.2	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923 <sup>TM</sup>	949,67	9	9	9	9	Resistente

\*: Según criterios del CLSI (2012)

Criterios para la interpretación de las medidas de halos de inhibición

Tipo*	Diámetro del halo (mm)
<b>Susceptible</b>	$\geq 20$
<b>Intermedio</b>	15 a 19
<b>Resistente</b>	$\leq 14$

\*: Según CLSI (2012)

**Tabla 8.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los extractos que presentaron inhibición total

ID extracto	Fracción	Concentración total aproximada (mg/mL)	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/mL)	Bacteria inhibida
O1113	DCM.1	35,13	ND	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
O1113	EA.1	15,85	15,85	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
O1113	EA.2	91,2	45,6	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™
O1399	EA.2	102,6	25,65	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
O1393	EA.2	383,2	47,9	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
O1394	EA.2	105,8	26,45	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™
O1400	P.2	949,67	237,42	<i>S. aureus</i> ATCC® 25923™

ND: No determinada

Criterios para la interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Tipo*	CMI (mg/mL)
<b>Susceptible</b>	$\leq 0,004$
<b>Intermedio</b>	0,008 a 0,016
<b>Resistente</b>	$\geq 0,032$

\*: Según CLSI (2012)

**Tabla 9.** Fracciones resultantes de las corridas de HPLC

<b>ID Extracto</b>	<b>Total de fracciones colectadas</b>	<b>Fracciones colectadas</b>
O1111.P1	39	7-12 17-40 42-50
O1055. P1	48	9-22 23-56
O1394.P	29	17-45
O1400. P	18	1-18
O1399. P	34	17-50
O1393. P	34	17-50
O1113 DCM 1	41	28-68

**Tabla 10.** Posibles compuestos presentes en la fracción 45 del extracto O1113 DCM.1 identificados por su masa y su fórmula molecular según la base de datos del diccionario de productos naturales (CHEMnetBASE.com)

#	Fórmula	Masa (Da)	Posibles compuestos	Reportado en	Organismo	Actividad reportada	Referencia
1	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222,0902	Asparvenona	<i>Aspergillus parvulus</i>	Hongo	N.E.	Chao <i>et al.</i> 1974
			Ácido anodendroico	<i>Piper aduncum</i>	Planta	N.E.	Orjala <i>et al.</i> 1994
			Arthrospatriol C	<i>Arthrospira truncata</i>	Hongo	N.E.	Ayer <i>et al.</i> 1992
			Deoxyradicinol	<i>Alternaria</i> sp.	Hongo endófito	N.E.	Lou <i>et al.</i> 2013
2	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206,0948	Acremina D	<i>Acremonium</i> sp.	Hongo endófito	N.E.	Assante <i>et al.</i> 2005
			Trisnorcebrodolidina	<i>Cyathus bulleri</i>	Hongo	N.E.	Ayer <i>et al.</i> 1980
			Vibrallactona A	<i>Boreostereum vibrans</i>	Hongo	N.E.	Liu <i>et al.</i> 2006
3	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	266,0796	Acremonona B	<i>Acremonium</i> sp.	Hongo	N.E.	Rukachaisirikul <i>et al.</i> 2012
			Antafumicina A	<i>Aspergillus</i> sp.	Hongo	N.E.	Varga <i>et al.</i> 2007
			Arthrinona	<i>Arthrinium</i> sp.	Hongo	N.E.	Qian-Cutrone <i>et al.</i> 1994
			Dihydrocitrinona	<i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Aspergillus carneus</i>	Hongos	N.E.	Patterson <i>et al.</i> 1987
			Djalonensina	<i>Anthocleista djalonensis</i>	Planta	Citotóxica	Chien <i>et al.</i> 1977
			Gymnastona	<i>Gymnaster koraiensis</i>	Planta	N.E.	Onocha <i>et al.</i> 2003
			Jensenona	<i>Eucaliptus</i> sp.	Planta	Antiherviboria	Dat <i>et al.</i> 2004
			Luisol B	<i>Streptomyces</i> sp.	Bacteria	N.E.	McLean <i>et al.</i> 2004
			Pestalotiopyrona H	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Hongo	N.E.	Cheng <i>et al.</i> 1999
			Multiforisina A	<i>Gelasinospora multiforis.</i>	Hongo	Inmunosupresiva	Xu <i>et al.</i> 2011

N.E.: No encontrado

**Tabla 10.** Posibles compuestos presentes en la fracción 45 del extracto O1113 DCM.1 identificados por su masa y su fórmula molecular según la base de datos del diccionario de productos naturales (CHEMnetBASE) (*continuación*)

#	Fórmula	Masa (Da)	Posibles compuestos	Reportado en	Organismo	Actividad reportada	Referencia
4	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O	250,0852	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
5	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	281,2	Scalusamida A	<i>Penicillium citrinum</i>	Hongo	Antibacterial/antifúngica	Tsuda <i>et al.</i> 2005
6	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	265,1688	Brasilamida A	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Hongo endófito	N.E.	Liu <i>et al.</i> 2010
			Similina b	<i>Sporormiella similis</i>	Hongo	Antifúngica	Weber <i>et al.</i> 1992
7	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub>	414,2782	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
8	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	293,1635	Delavayina C	<i>Incarvillea delavayi</i>	Planta	N.E.	Nakamura <i>et al.</i> 2000
			Pandamarilactonina H	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	Planta	N.E.	Tan <i>et al.</i> 2010
			Salinosporamida E	<i>Salinispora tropica</i>	Bacteria	N.E.	Reed <i>et al.</i> 2007
			Streptimidona	<i>Streptomyces rimosus</i>	Bacteria	N.E.	Kondo <i>et al.</i> 2000
9	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S	237,047	Xanthiazona	<i>Xanthium strumarium</i>	Planta	N.E.	Pandey & Rather 2012
10	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>	249,174	Alangina A	<i>Alangium salviifolium</i>	Planta	Antibacterial	Pandian <i>et al.</i> 2006
11	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	364,1304	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

N.E.: No encontrado

**Tabla 11.** Porcentaje diario de crecimiento de *Pythium ultimum* con cada extracto en relación al control

#	ID Extracto	Fracción	Día 1	Día 2	Día 3
1	M1214	DCM.1	0,00	25,00	64,17
		EA.1	25,06	95,00	100,00
		P.1	72,92	100,00	100,00
2	M1240	DCM.1	95,24	100,00	100,00
		EA.1	90,23	100,00	100,00
		P.1	54,17	100,00	100,00
3	O1055	DCM.1	92,73	100,00	100,00
		EA.1	90,23	100,00	100,00
		P.1	77,08	100,00	100,00
4	M1179	DCM.1	92,73	100,00	100,00
		EA.1	75,19	100,00	100,00
		P.1	68,75	100,00	100,00
		DCM.1	80,20	100,00	100,00
5	O1090	EA.1	65,16	100,00	100,00
		P.1	77,08	100,00	100,00
6	O1111	DCM.1	30,08	71,67	81,67
		EA.1	72,68	100,00	100,00
		P.1	54,17	75,00	100,00
7	M1193	DCM.1	90,23	100,00	100,00
		EA.1	85,21	100,00	100,00
		P.1	81,25	100,00	100,00

**Tabla 11.** Porcentaje diario de crecimiento de *Pythium ultimum* con cada extracto en relación al control (*continuación*)

#	ID Extracto	Fracción	Día 1	Día 2	Día 3
8	O1113	DCM.1	0,00	0,00	0,00*
		DCM.2	12,53	63,33	57,50
		EA.1	0,00	11,67	15,00
		EA.2	0,00	0,00	14,17
		P.1	66,67	133,33	100,00
9	O1393	DCM.1	35,09	100,00	100,00
		EA.1	80,20	100,00	100,00
		P.1	62,50	100,00	100,00
10	O1400	DCM.1	102,76	100,00	100,00
		EA.1	87,72	100,00	100,00
		P.1	64,58	100,00	100,00
11	O1394	DCM.1	92,73	100,00	100,00
		EA.1	47,62	100,00	100,00
		P.1	27,08	68,33	100,00
12	O1399	DCM.1	0,00	45,00	100,00
		EA.1	45,11	100,00	100,00
		P.1	0,00	0,00	0,00**

\*: El hongo murió al entrar en contacto con el extracto. No volvió a crecer en una placa fresca de PDA.

\*\* : El hongo fue inhibido al entrar en contacto con el extracto. Creció nuevamente al sembrarlo en una placa fresca de PDA.

## 11. ANEXOS

Anexo 1. Moléculas con potencial terapéutico aisladas de hongos endófitos<sup>1</sup>

Molécula	Endófito productor	Planta hospedera	Aplicaciones
Paclitaxel (Taxol®)	<i>Taxomyces andreanae</i> , aunque también pueden producirlo <i>Taxodium distichum</i> ; <i>Wollemia nobilis</i> ; <i>Phyllosticta spinarum</i> ; <i>Bartalinia robillardoides</i> ; <i>Pestalotiopsis terminaliae</i> ; <i>Botryodiplodia theobromae</i> .	<i>Taxus brevifolia</i>	Diterpeno útil contra el cáncer de seno y de ovarios. Interfiere con la multiplicación de las células cancerígenas.
Pestacina e isopestacina	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Antioxidantes. Protegen a las células de daños causados por radicales libres asociados a enfermedades degenerativas tales como Alzheimer.
Colutelina A	<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Pteromischum</i> sp.	Péptido inmunosupresivo para prevenir el rechazo de órganos trasplantados, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes.
Subglutinol A y B	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Pirenos diterpenos con actividad inmunosupresiva.
Ciclosporina A	Múltiples cepas de <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Bysochlamys</i> y <i>Septoria</i> .	Múltiples hospederos	Inmunosupresivo.
Naftaleno Ácido nodulispórico	<i>Muscodor vitigenus</i> <i>Nudilosporium</i> sp	<i>Paullinia paullinioides</i> <i>Bontia daphnoides</i>	Insecticida Insecticida
Xantonas	<i>Phomopsis</i> sp	Múltiples hospederos	Actividad antiparasítica contra <i>Plasmodium falciparum</i> .

<sup>1</sup> Guo *et al.*, 2011; Pimentel *et al.* 2011; Kaul *et al.*, 2012

Anexo 2. Esquema para el montaje de los ensayos de microdilución en placas de 96 pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	a	a/2	a/4	a/8	a/16	a/32	a/64	a/128	a/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 1</b>
<b>B</b>	a	a/2	a/4	a/8	a/16	a/32	a/64	a/128	a/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 1</b>
<b>C</b>	a	a/2	a/4	a/8	a/16	a/32	a/64	a/128	a/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 1</b>
<b>D</b>	b	b/2	b/4	b/8	b/16	b/32	b/64	b/128	b/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 2</b>
<b>E</b>	b	b/2	b/4	b/8	b/16	b/32	b/64	b/128	b/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 2</b>
<b>F</b>	b	b/2	b/4	b/8	b/16	b/32	b/64	b/128	b/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 2</b>
<b>G</b>	c	c/2	c/4	c/8	c/16	c/32	c/64	c/128	c/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 3</b>
<b>H</b>	c	c/2	c/4	c/8	c/16	c/32	c/64	c/128	c/256	CP	CN	CE	<b>Extracto 3</b>

a, b y c: concentraciones más altas de los extractos 1, 2 y 3 en mg/mL. Las diluciones seriadas se realizan en factores de  $\frac{1}{2}$  para cada vez. Todos los pocillos contienen caldo+inóculo+extracto de prueba, excepto los controles. CP: Control positivo (caldo+inóculo+Penicilina/Estreptomicina 1X); CN: Control negativo (caldo+inóculo+metanol); CE: Control de esterilidad (caldo únicamente).

Anexo 3. Parámetros para la corrida de HPLC

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Primera fracción colectada	1
Volumen de la muestra ( $\mu\text{l}$ )	1500
Flujo (ml/min)	10
% de solvente orgánico al iniciar la corrida	0
% de solvente orgánico al finalizar la corrida	100
Duración de la corrida (min)	40
Longitud de onda analizada 1 (nm)	254
Volumen de cada fracción colectada ( $\mu\text{l}$ )	7000
Longitud de onda analizada 2 (nm)	215
Tiempo de lavado de la columna al finalizar la corrida (min)	10
% de solvente orgánico usado para el lavado	100

## Anexo 4. Análisis estadísticos en DCA para los diámetros (mm) medidos en los ensayos con discos de inhibición

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%			
					Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
					O1113 DCM.1	3	17,67	1,155
O1113 EA.1	3	12,33	,577	,333	10,90	13,77	12	13
O1113 EA.2	3	10,33	1,528	,882	6,54	14,13	9	12
O1399 EA.2	3	8,00	1,000	,577	5,52	10,48	7	9
O1393 EA.2	3	8,67	,577	,333	7,23	10,10	8	9
O1394 EA.2	3	8,33	,577	,333	6,90	9,77	8	9
O1400 P.2	3	9,00	,000	,000	9,00	9,00	9	9
Total	21	10,62	3,354	,732	9,09	12,15	7	19

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	213,619	6	35,603	43,980	,000
Intra-grupos	11,333	14	,810		
Total	224,952	20			

Anexo 4. Análisis estadísticos en DCA para los diámetros (mm) medidos en los ensayos con discos de inhibición (*continuación*)

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de			
Levene	gl1	gl2	Sig.
2,529	6	14	,072

### Pruebas post hoc (Tukey al 0,05)

ID_Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
O1399 EA.2	3	8,00		
O1394 EA.2	3	8,33		
O1393 EA.2	3	8,67		
O1400 P.2	3	9,00		
O1113 EA.2	3	10,33	10,33	
O1113 EA.1	3		12,33	
O1113 DCM.1	3			17,67
Sig.		,076	,163	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 5. Análisis estadísticos (ANOVA encajado y prueba de Tukey 0,05) para los ensayos con de inhibición de *Pythium ultimum*

<b>Factores inter-sujetos</b>			
		Etiqueta del valor	N
ID_extracto	1,0	M1214	9
	2,0	M1240	9
	3,0	O1055	9
	4,0	M1179	9
	5,0	O1090	9
	6,0	O1111	9
	7,0	M1193	9
	8,0	O1113	15
	9,0	O1393	9
	10,0	O1400	9
	11,0	O1394	9
	12,0	O1399	9
Fracción	1,0	DCM.1	36
	2,0	EA.1	36
	3,0	P.1	36
	4,0	DCM.2	3
	5,0	EA.2	3
Día	1,00	Día 1	38
	2,00	Día 2	38
	3,00	Día 3	38

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje\_crecimiento

<b>Origen</b>		<b>Suma de cuadrados tipo I</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Intersección	Hipótesis	661277,479	1	661277,479	61,958	,010
	Error	24546,846	2,300	10672,962 <sup>a</sup>		
ID_extracto	Hipótesis	62026,190	11	5638,745	11,509	,000
	Error	48239,671	98,456	489,963 <sup>b</sup>		
Fracción	Hipótesis	3741,537	4	935,384	1,923	,113
	Error	46687,386	96	486,327 <sup>c</sup>		
Día	Hipótesis	19767,859	2	9883,930	20,324	,000
	Error	46687,386	96	486,327 <sup>c</sup>		

Anexo 5. Análisis estadísticos (ANOVA encajado y prueba de Tukey 0,05) para los ensayos con de inhibición de *Pythium ultimum* (continuación)

**Media cuadrática esperada**

Origen	Componente de la varianza			
	Var(Fracción)	Var(Día)	Var(Error)	Término cuadrático
Intersección	34,263	38,000	1,000	Intersección, ID_extracto
ID_extracto	,158	,000	1,000	ID_extracto
Fracción	19,500	,000	1,000	
Día	,000	38,000	1,000	
Error	,000	,000	1,000	

**Pruebas post hoc: Porcentaje\_crecimiento (Tukey al 0,05)**

ID_extracto	N	Subconjunto		
		1	2	3
O1113	15	29.3913		
O1399	9	43.3456	43.3456	
M1214	9		64.6833	64.6833
O1111	9		76.1411	76.1411
O1394	9			81.7511
O1393	9			86.4211
dimension1 O1090	9			91.3822
M1179	9			92.9633
M1240	9			93.2933
O1400	9			95.0067
M1193	9			95.1878
O1055	9			95.5600
Sig.		,967	,074	,119

## PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

### DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Eliana Estefanía Veloz Villavicencio, C.I. 1723164602, autora del trabajo de graduación titulado “Evaluación de la capacidad antibiótica y antifúngica de los extractos orgánicos y peptídicos provenientes de la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA)”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, diciembre de 2014

Srta. Eliana Estefanía Veloz Villavicencio

C.I. 1723164602