

## **Indice general**

	<b>Página</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Formulación del Marco Teórico	1
1.2 Antecedentes bibliográficos	5
1.3 Planteamiento del problema	13
1.4 Formulación de la hipótesis	13
1.5 Objetivo general	14
1.5.1 Objetivos específicos	14
<b>2 Materiales y Métodos</b>	<b>15</b>
2.1 Material vegetal	15
2.2 Aislamiento de hongos endófitos	16
2.3 Identificación y conservación de los aislados	16
2.4 Cultivo de los aislados en medio líquido	17
2.5 Cultivo en medio sólido	17
2.6 Obtención de extractos crudos	18
2.7 Actividad antimicrobiana	18
2.7.1 Difusión en agar	18
2.7.2 Ensayo de microdilución	19
2.7.2.1 Actividad antifúngica	19
2.7.2.2 Actividad antibacteriana	20
2.8 Ensayos de inhibición enzimática	21
2.8.1 Inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE)	21
2.8.2 Inhibición de la $\beta$ -D-glucosidasa	22
2.8.3 Inhibición de la $\beta$ -glucuronidasa	23
2.9 Ensayos de citotoxicidad	23
2.9.1 Citotoxicidad sobre fibroblastos	23
2.9.2 Citotoxicidad sobre células gástricas	24

2.10 Preparación de derivados	25
2.10.1 Acetilación	25
2.10.2 Metilación de ácidos grasos (esterificación de Fisher)	25
2.11 Identificación de metabolitos secundarios por HPLC	25
2.12 Medios de cultivo	26
2.12.1 Medios sólidos	26
2.12.2 Medios de cultivo líquido	26
2.13 Elucidación estructural	27
2.13.1 Resonancia magnética nuclear	27
2.13.2 Espectroscopía ultravioleta/visible	27
2.13.3 Espectroscopía de masas (MS)	27
2.13.4 GC-MS	28
2.13.5 Espectroscopía infrarroja (IR)	28
2.13.6 Punto de fusión	28
2.13.7 Rotación óptica	28
2.14 Técnicas Cromatográficas	28
2.14.1 Cromatografía en placa fina (TLC)	28
2.14.2 Cromatografía en columna	29
2.14.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	29
2.15 Solventes y Reactivos	29
<b>3 Resultados</b>	<b>30</b>
3.1 Aislamiento de hongos	30
3.2 Cultivo en medio líquido	32
3.3 Actividad biológica de los extractos	34
3.3.1 Actividad antimicrobiana	34
3.3.1.1 Ensayo de difusión en agar	34
3.3.1.2 Ensayos de microdilución	36
3.4 Metabolitos activos de aislados seleccionados	41
3.4.1 Hongo E-3	42

3.4.2 <i>Penicillium janczewskii</i> K.M.Zalesky (E-7)	44
3.4.3 <i>Microsphaeropsis olivacea</i> (Bonord.) Hohn (E-16)	51
3.4.3.1 Cultivo en medio sólido	51
3.4.3.2 Cultivo en medio líquido	52
3.5 Bioactividad de los compuestos aislados	59
3.5.1 Actividad antimicrobiana	59
3.5.1.1 Ensayo de difusión en agar	59
3.5.1.2 Microdilución en medio líquido	61
3.5.2 Otros ensayos realizados: inhibición enzimática	62
3.5.3 Citotoxicidad	63
3.6 Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios por HPLC	64
3.6.1 Cuantificación de metabolitos de <i>Microsphaeropsis olivacea</i> .	64
3.6.2 Cuantificación de metabolitos de <i>Penicillium janczewskii</i>	67
3.7 Producción de peniprequinolona, gliovictina y pseurotina A por <i>Penicillium janczewskii</i> en cultivo líquido.	70
4 Discusión	71
4.1 Hongos endófitos de gimnospermas nativas	71
4.2 Distribución, producción de metabolitos secundarios y bioactividad de especies relacionadas de hongos endófitos	72
4.3 Actividad biológica de los extractos	79
4.4 Compuestos activos de los endófitos E-3, <i>Penicillium janczewskii</i> (E-7) y <i>Microsphaeropsis olivacea</i> (E-16)	81
4.5 Precursores biogénicos de los compuestos aislados	86
4.6 Producción de metabolitos por hongos endófitos cultivados en diferentes medios	88
4.7 Cinética de producción de metabolitos por <i>Penicillium janczewskii</i> en medio líquido	89

<b>5 Conclusiones y Proyecciones de la Tesis</b>	<b>91</b>
5.1 Aspectos originales de la tesis	91
5.2 Contribución al conocimiento científico y/o tecnológico	91
5.3 Propuestas de investigación como consecuencia del estudio	93
<b>6 Referencias bibliográficas</b>	<b>95</b>
<b>7 Anexos</b>	<b>117</b>
<b>7.1 Manuscritos publicados o en prensa (2001-2004)</b>	<b>117</b>
7.1.1 Derivados de la tesis	117
7.1.2 otros	117
<b>7.2 Presentaciones a Congresos</b>	<b>118</b>
7.2.1 Derivados de la tesis	118
7.2.1.1 Nacionales	118
7.2.1.2 Internacionales	118
7.2.2 Otros	119
7.2.2.1 Nacionales	119
7.2.2.2 Internacionales	119

## Abreviaturas:

°C	Grados Celsius
[ $\alpha$ ]	Rotación óptica
$\delta$	Desplazamiento químico
$\mu\text{L}$	$10^{-6}$ Litro
$\mu\text{M}$	$10^{-6}$ Mol
EtOAc	Acetato de etilo
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
BF <sub>3</sub>	Trifluoruro de boro
s.a.	Singlete ancho
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CFU	Unidad formadora de colonias
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopia de correlación
c	Cuarteto (en conexión con datos de RMN)
d	Doblete (en conexión con datos de RMN)
DAD	Detector con arreglo de diodo
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
EtOH	Etanol
GC	Cromatografía de gas
HCl	Acido clorhídrico
HMBC	Hetero nuclear multiple bond correlation
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hz.	Hertz
IC <sub>50</sub>	concentración que inhibe el 50 % de crecimiento
Int. Rel.	Intensidad relativa
IR	Infra rojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
m	Multiplete (en conexión con datos de RMN)
MeOH	Metanol
MeOH-d <sub>4</sub>	Metanol deuterado
MIC	Concentración inhibitoria mínima
mg	$10^{-3}$ Gramo
MHz	Mega Hertz
ppm	Partes por millón
R <sub>f</sub>	Relación de dos distancias recorridas
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPM	Revoluciones por minuto
s	Singlete (en conexión con datos de RMN)
t	Triplete (en conexión con datos de RMN)