



Búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de hongos aislados de ambientes marinos. Fase I.

Adriana Rocío Romero Otero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2016

Búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de hongos aislados de ambientes marinos. Fase I.

Adriana Rocío Romero Otero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Química

Director:

Ph.D. Freddy Alejandro Ramos Rodríguez

Línea de investigación en microbiología marina

Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016

A mi familia

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, mi universidad, por permitirme realizar mis estudios de pregrado y maestría.

A la División de Investigación de la sede Bogotá (DIB-UNAL) por financiar el proyecto de investigación. A la Facultad de Ciencias y el Departamento de Química por la Beca auxiliar docente y su apoyo en la Convocatoria de Jóvenes Investigadores.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) por el soporte y las colaboraciones al proyecto. Particularmente a la Profesora Ibonne García y a la Profesora Nubia Moreno.

Al PhD. Marcelino Gutiérrez y a los integrantes de INDICASAT-AIP por su colaboración durante la estancia de investigación. Agradecimientos especiales a Christopher Boya por compartir su conocimiento y experiencia.

A mis muy queridos profesores Leonardo Castellanos y Freddy Ramos, que han contribuido enormemente a mi formación académica y como persona.

A todos los integrantes del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia”, que han participado activamente en mi formación y me han brindado su apoyo y amistad.

A toda mi familia, especialmente mi mamá, que con su amor y cuidado me da fuerza de enfrentar todos los retos y a mis mejores amigas Silvia y Vivian, que son parte de mi familia, que siempre me han acompañado, escuchado y apoyado.

Resumen

Colombia, un país con vocación agrícola, presenta problemas relacionados con el uso intensivo de agroquímicos para el control de fitopatógenos, los cuales han generado resistencia a los tratamientos convencionales. La tendencia actual en la producción agrícola es el uso de métodos ambientalmente amigables para el control de plagas y enfermedades, estos incluyen el uso de microorganismos como biocontroladores o como productores de compuestos de origen natural, ya que pueden ser menos tóxicos, presentar menor persistencia en el ambiente y mayor selectividad contra los patógenos.

Durante las últimas décadas las investigaciones en productos naturales marinos han dirigido su mirada hacia los microorganismos, y dentro de estos hacia los hongos aislados de ambientes marinos, los cuales han mostrado ser una fuente rica en compuestos con diversas actividades biológicas y que permitiría un suministro sustentable de los compuestos, fracciones o extractos de interés. Entre las actividades biológicas que han mostrado los metabolitos producidos por estos hongos, la actividad antimicrobiana ha sido ampliamente estudiada.

Así, con el ánimo de contribuir al estudio químico de los hongos que pueden cultivarse a partir de muestras recolectadas en el mar Caribe colombiano y evaluar su actividad como productores de compuestos antimicrobianos, con una perspectiva guiada hacia el control de fitopatógenos, se planteó este proyecto de maestría.

En este estudio, se evaluaron un total de 15 aislamientos de hongos filamentosos obtenidos de ambientes marinos en el Caribe colombiano, los cuales se cultivaron por duplicado en dos medios líquidos durante tres semanas. Las fracciones obtenidas a partir del extracto en acetato de etilo de estos cultivos, fueron evaluadas contra las bacterias fitopatógenas *Burkholderia glumae* ATCC 33617, *B. gladioli* ATCC 37041, and *B. platarii* ATCC 43733, patógenas del arroz. Encontrando que diez de los microorganismos evaluados son capaces de producir compuestos activos en alguno de los dos medios. Las cepas con mayor actividad fueron: *Purpureocillium lilacinum* PNM-67, *Fusarium solani* PNM-76 y *Fusarium striatum* PNM-AC10.

Los ensayos de actividad antimicrobiana, perfiles de cromatografía líquida (HPLC-DAD-ELSD) y los reportes de cada especie, sirvieron como criterios para seleccionar a *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 como la cepa más interesante para hacer estudios de derreplicación. Este estudio se inició por obtención de perfiles químicos por HPLC-MS/MS y la aplicación de técnicas de dos métodos de derreplicación química. Por un lado, derreplicando directamente listas de picos de ion molecular obtenidas a través de *MZmine2* y por otro, haciendo uso de la construcción de redes moleculares (*molecular networks*) con espectros de MS/MS, una herramienta recientemente ofrecida por GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*). Los resultados de la derreplicación nos permitieron identificar al aislamiento PNM-67 *Purpureocillium lilacinum* como una cepa con diversidad metabólica y detectar en este, la presencia de compuestos peptídicos como la familia de las leucinostatinas, previamente reportadas en el género, junto con aeurobasidinas y la sansalvamida A.

Finalmente, el estudio químico de los extractos en el medio PDB del hongo *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 permitió la identificación de cuatro compuestos precursores de la leucinostatina A, para los cuales no se encontraron reportes en las bases de datos especializadas (Antimarin y Scifinder), los cuales se denominaron lilacininas A-D. Los compuestos 1 (lilacinina A) y 3 (lilacinina C) presentaron una actividad antimicrobiana moderada, siendo activos contra la bacteria *B. gladioli* a una concentración de 0.25 mg/mL.

Este trabajo contribuyó a la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos con actividad biológica aprovechable. Los resultados que aquí se muestran, evidencian el potencial de los hongos aislados de muestras marinas como productores de sustancias con actividad antimicrobiana contra bacterias fitopatógenas. Constituyéndose como un primer paso que sienta las bases para el desarrollo de procesos de base biotecnológica, que contribuyan al desarrollo sostenible de la industria agrícola del país.

Palabras clave: Derreplicación, Redes moleculares, Fitopatógenos, *Purpureocillium lilacinum*.

Abstract

Agriculture represents an important part of the Colombian economy. One of the most common problems related with agricultural practices is the rising of resistant strains of phytopathogens as a consequence of the intensive use of agrochemicals. Currently, environmental friendly methods to control plagues and diseases are widely encouraged, and microorganisms represent a remarkable alternative among these methods. They can be used either as biocontrol agents or as a source of bioactive compounds. These compounds from natural sources are expected to be less toxic, more selective to control pathogens and less prevalent in the environment, indicating that they represent an advantageous alternative to treat diseases and plagues.

In the last decades, marine natural products research has focused its attention on microorganisms and especially on marine-derived fungi. They constitute an outstanding source of bioactive compounds and also, they can be grown in laboratory conditions, a feature that constitutes a valuable approximation to solve the “supply problem” because they represent a sustainable source of compounds, fractions or extracts of interest. Within the bioactive compounds isolated from fungi the antimicrobial activity has been widely studied.

Therefore, this work was designed with the aim to contribute with the study of fungi isolated from samples collected at the Colombian Caribbean by evaluating their capability to produce antimicrobial compounds. In this work, fifteen strains obtained from marine sources were cultivated by duplicate in two different culture media for three weeks. Later, the extracts obtained in ethyl acetate were fractionated and the biological activity of the obtained fractions was evaluated. Fractions were tested against the rice pathogens *Burkholderia glumae* ATCC 33617, *B. gladioli* ATCC 37041 and *B. platarii* ATCC 43733. The most active strains were: *Purpureocillium lilacinum* PNM-67, *Fusarium solani* PNM-76 and *Fusarium striatum* PNM-AC10.

Antimicrobial assays, HPLC-DAD-ELSD chromatograms and strains previous reports, were used as criteria to select PNM-67 *Purpureocillium lilacinum* as the most interesting strain for its later chemical dereplication study.

The dereplication study started with the analysis of the samples by HPLC-MS/MS. The obtained results were analysed by two dereplication methodologies. The first methodology was based on a conventional approach where the molecular ion lists obtained through MZmine2 software were directly dereplicated. On the other hand, a mass networking strategy was considered. In this, MS/MS data are used to construct networks through the data-driven platform offered by the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking). The obtained results allowed us to identify the strain *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 as a metabolic diverse strain and detect some peptide type compounds such as: the leucinostatins family, previously reported to this genus; along with some aeurobasidins and the sansalvamide A.

Finally, the ethyl acetate extract of *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 grown in PDB media was studied. This allowed the identification of four precursors leucinostatin A, whose structures were not found in databases (Antimarin and Scifinder), and were named as lilacinins A-D. Compounds **1** (lilacinin A) and **3** (lilacinin C) exhibited mild activity against *B. gladioli* at a concentration of 0.25 mg/mL.

This work contributed to the search of new sources of compounds with promising biological activity. The results suggest that fungi from marine environments are a potential source of compounds with antimicrobial activity against phytopathogen bacterias. Our findings constitute the first stage in a biotechnological process, that may contribute to the sustainable development of the agricultural industry in our country.

Keywords: Dereplication, Molecular networks, Phytopathogen, *Purpureocillium lilacinum*.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Abreviaturas	XVIII
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 Fitopatógenos y su control	5
1.2 Productos naturales de microorganismos.....	7
1.3 Productos naturales de microorganismos marinos	8
1.4 Productos naturales de hongos marinos.....	10
1.5 Compuestos antimicrobianos aislados de hongos marinos	13
2. Screening de la actividad antimicrobiana de hongos aislados de ambientes marinos contra fitopatógenos de plantas	17
2.1 Introducción.....	17
2.1.1 Efecto de las condiciones de cultivo de hongos en la producción de compuestos	18
2.2 Metodología.....	19
2.2.1 Muestreo	19
2.2.2 Recuperación y preservación de microorganismos de las cepas	20
2.2.3 Identificación molecular de hongos por secuenciación de ITSs.....	21
2.2.4 Cultivo de las cepas seleccionadas	22
2.2.5 Obtención del extracto y fraccionamiento	23
2.2.6 Evaluación actividad antimicrobiana de extractos.....	23
2.2.7 Perfilado por UHPLC-DAD-ELSD	24
2.3 Resultados y discusión.....	24
2.3.1 Condiciones de cultivo seleccionadas	24
2.3.2 Identificación de los hongos recuperados de ambientes marinos.....	25
2.3.3 Obtención de extractos orgánicos.....	27
2.3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana contra fitopatógenos	29
2.3.5 Perfilado por UHPLC-DAD-ELSD	31
2.4 Conclusiones	34

3. Derreplicación de los extractos metanólicos de <i>Purpureocillium lilacinum</i> PNM-67.	35
3.1 Metodología.....	39
3.1.1 Análisis por LC-MS/MS.....	39
3.1.2 Derreplicación directa	39
3.1.3 Construcción de redes neurales.....	42
3.2 Resultados y discusión	44
3.2.1 Derreplicación directa	44
3.2.2 Derreplicación por redes moleculares	46
3.3 Conclusiones	51
4. Aislamiento e identificación de compuestos a partir del extracto del cultivo de <i>Purpureocillium lilacinum</i>.	53
4.1 Materiales y métodos	54
4.1.1 General.....	54
4.1.2 Ensayos de actividad antimicrobiana.....	55
4.1.3 Evaluación del efecto de la agitación y el tiempo de cultivo en la actividad antimicrobiana.....	56
4.1.4 Cultivo y extracción en mayor volumen de la cepa PNM-67	56
4.1.5 Fraccionamiento y aislamiento	56
4.2 Resultados y discusión	58
4.2.1 Elucidación del compuesto 1.....	59
4.2.2 Elucidación del compuesto 2.....	64
4.2.3 Elucidación del compuesto 3.....	69
4.2.4 Elucidación del compuesto 4.....	70
4.2.5 Resultados de actividad antimicrobiana.....	72
4.3 Conclusiones	73
5. Conclusiones y recomendaciones.....	75
5.1 Conclusiones	75
5.2 Recomendaciones.....	76
Bibliografía.....	99

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Metabolitos secundarios producidos por hongos agrupados por familias químicas (Figura adaptada de Wiemann, et al.(56)).	9
Figura 1-2: Estructuras de la Plinabulina y la Halimida (74).	10
Figura 1-3: Número de compuestos nuevos encontrados en hongos aislados del mar desde 1970 hasta mediados del 2014 (52,69,91,92).	11
Figura 1-4: Algunos ejemplos de compuestos activos aislados de hongos marinos en fases preclínicas (94).	13
Figura 1-5: Estructuras de la cefalosporina C y de un compuesto sintético derivado, la Cefalotina. (95)	13
Figura 1-6: Ejemplos de compuestos aislados de hongos derivados del mar con actividad antimicrobiana reportada.	14
Figura 2-1: Fotografía de algunas de las cepas tras las tres semanas de cultivo en los medios usados (los tres medios de la izquierda corresponden a medio Wickerham y los tres de la derecha a PDB; de arriba hacia abajo se encuentran los cultivos de las cepas PNM-AC03, PNM-67 y PNM-41).	27
Figura 2-2: Perfiles de UHPLC-ELSD de la fracción de acetato de cultivos en PDB que mostraron mayores diferencias.	31
Figura 2-3: Ejemplo de la diferencia en la producción metabólica debida al medio de cultivo, en la cepa PNM-41.	33
Figura 2-4: Perfiles de UHPLC-ELSD de la fracción metanólica del cultivo en PDB de diferentes cepas de la misma especie.	33
Figura 3-1: Diagrama de resumen de los resultados de derreplicación directa para la fracción metanólica del hongo PNM-67 sembrado en PDB.	45
Figura 3-2: Red molecular para la fracción metanólica del extracto obtenido del cultivo en PDB del hongo PNM-67.	47
Figura 3-3: Red molecular que contiene a las Leucinostatinas. El rombo marca la coincidencia con la base de datos por comparación de los espectros de MS/MS. También se señalan algunas masas que dieron coincidencia por el método de derreplicación directa.	48
Figura 3-4: Red molecular que relaciona los iones 1074,32, 1086,34 y 1088,34 que coincidieron por derreplicación directa con miembros de la familia de las Aureobasidinas, U2, G y B respectivamente.	50
Figura 4-1: Esquema de separación del extracto de la cepa PNM-67 con agitación.	56

Figura 4-2:	Esquema de separación del extracto de la cepa PNM-67 con agitación. (PNM67-A).	56
Figura 4-3:	Subestructuras del compuesto 1 formados por correlaciones en COSY y HMBC. La numeración de las subestructuras corresponde a la numeración dada a los residuos en la tabla 4-1.	61
Figura 4-4:	Estructura plana del compuesto 1 , algunas correlaciones clave de HMBC y análisis de fragmentación por masas.	63
Figura 4-5:	Subestructuras de los residuos identificados en el compuesto 2 , basados en las correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC.	66
Figura 4-6:	Estructura plana del compuesto 2 , algunas correlaciones clave de HMBC y análisis de fragmentación por masas.	68
Figura 4-7:	Estructura plana propuesta para el compuesto 3 .	69
Figura 4-8:	Estructura plana propuesta para el compuesto 4 .	71

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Composición de los medios de cultivos utilizados.....	22
Tabla 2-2: Datos de origen e identificación de los 15 organismos trabajados.....	26
Tabla 2-3: Masas promedio de los extractos crudos obtenidos para cada una de las cepas en los dos medios.....	28
Tabla 3-1: Coincidencias presentadas con moléculas reportadas para especies del género <i>Purpureocillium</i>	45
Tabla 3-2: Picos sin coincidencias con la base de datos Antimarin caracterizados por sus <i>m/z</i> observados.	46
Tabla 4-1: Datos de RMN- ¹ H (400 MHz) y RMN- ¹³ C (100 MHz) del compuesto 1 medidos en metanol- <i>d</i> ₄	62
Tabla 4-2: Datos de masas para el compuesto 1	63
Tabla 4-3: Asignación de señales para el compuesto 2	66
Tabla 4-4: Datos de masas para el compuesto 2	68
Tabla 4-5: Iones detectados en el espectro de masas para el compuesto 3	69
Tabla 4-6: Datos de masas para el compuesto 4	71

Abreviaturas

Abreviatura	Término
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>
CTAB	<i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i>
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol- d_4
ACN	Acetonitrilo
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography
DAD	Diode Arrangement Detector
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
MS	<i>Mass spectrometry</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
ELSD	<i>Evaporative light scattering detector</i>
m/z	Relación masa-carga
ppm	Partes por millón
SPE	Solid Phase Extraction
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
Hz	Hertz
CC	Cromatografía en Columna
δ	Desplazamiento químico
J	Constante de acoplamiento
s	Singlete
bs	Singlete ancho
d	Doblete
dd	Doble doblete
q	Cuarteto

<i>t</i>	Triple
<i>m</i>	Multiplet
<i>APT</i>	<i>Attached Proton Test</i>
<i>HSQC</i>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
<i>HMBC</i>	<i>Heteronuclear Correlation through multiple bond coherence</i>
<i>COSY</i>	<i>Correlation Spectroscopy</i>

Introducción

El hombre siempre ha dirigido su mirada hacia la naturaleza en busca de sustancias con actividad biológica. En sus orígenes, y por mucho tiempo, los estudios estuvieron dirigidos exclusivamente hacia los productos naturales vegetales, puesto que venían de organismos que compartían su hábitat. Un ambiente mucho más hostil para el ser humano como el océano, el cual representaba una fuente casi exclusivamente de alimentos, permaneció inexplorado hasta hace relativamente poco tiempo (1). Este biotopo constituye aproximadamente tres cuartas partes de la superficie de la tierra y actualmente representa una fuente rica de nuevos compuestos químicos, particularmente en ambientes tropicales debido a la diversidad biológica allí presente (2,3).

Al respecto, nuestro país no sólo se encuentra en la zona intertropical sino que adicionalmente cuenta con dos mares, los cuales, a pesar de los esfuerzos de un pequeño grupo de investigadores, siguen siendo poco explorados desde el punto de vista químico. El grupo de “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia durante sus más de 30 años de trayectoria, se ha encargado de contribuir al estudio de diversos organismos presentes en el Caribe Colombiano, encontrando una gran variedad de moléculas con actividades biológicas interesantes provenientes principalmente de macroorganismos marinos, particularmente esponjas y octocorales (4).

A pesar de que la química de los macroorganismos marinos ha sido más ampliamente estudiada, han sido pocos los ejemplos de su aplicación. Esto se debe principalmente al desafío que representa encontrar un suministro suficiente de compuesto que permitan hacer extracciones ambiental y económicamente viables. El interés mundial en los microorganismos marinos surge entonces gracias al reconocimiento de éstos como una fuente importante de sustancias con diversas actividades biológicas y como una alternativa al problema de

suministro de los productos naturales marinos con miras a un posible aprovechamiento de estos recursos (3).

Los microorganismos, al no tener estructuras que les permitan defenderse o competir por los nutrientes, han desarrollado la capacidad de producir diversos compuestos que les permiten adaptarse al medio. Muchos de estos compuestos han mostrado ser útiles en diversas aplicaciones biomédicas al presentar propiedades como anticancerígenos, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, entre muchas otras (5,6).

Dentro de los microorganismos, los estudios realizados en hongos marinos como fuente de compuestos han generado gran interés en las últimas décadas, tal y como lo refleja el número de publicaciones y el creciente número de nuevas moléculas reportadas de estos microorganismos (Figura 1-1, marco teórico). Estos compuestos son de especial interés químico puesto que algunos de ellos poseen una estructura única y podrían ser interesantes como cabezas de serie estructurales para usos farmacológicos, así como para su aplicación en la protección de animales y plantas (7).

Entre el amplio espectro de aplicaciones de los compuestos bioactivos producidos por microorganismos, se destacan aquellos útiles para el control de enfermedades en cultivos comerciales como un campo interesante para el desarrollo de productos biotecnológicos, no sólo por el impacto económico que el control de estas enfermedades representa a nivel local y mundial sino también porque surgen como una alternativa a los métodos tradicionales de control con biocidas de origen sintético, los cuales presentan efectos nocivos a nivel toxicológico y favorecen el surgimiento de cepas resistentes a estos tratamientos (8,9).

Debido al interés que han despertado los microorganismos marinos, el grupo de investigación durante los últimos años ha venido desarrollando una línea de microbiología marina, haciendo énfasis en los metabolitos secundarios con potencial actividad biológica. Esta línea que empezó con el estudio de bacterias marinas (10–12), planteó en el 2013 un proyecto de trabajo de grado – pregrado, en el cual se evaluó la actividad antimicrobiana de una cepa fúngica aislada de ambientes de manglar (13). Los resultados de este trabajo, junto con el creciente interés mundial en estos microorganismos, dieron las bases para continuar con la investigación en hongos marinos.

Este trabajo atiende a dos problemas principales: En primer lugar, iniciar la exploración de la diversidad química de hongos aislados de ambientes marinos con los que cuenta el país; y en segundo lugar contribuir a la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana, haciendo énfasis en esta primera fase en la actividad antimicrobiana contra cepas de bacterias fitopatógenas del género *Burkholderia* spp. las cuales atacan cultivos de arroz, cebolla y algunas especies ornamentales, entre otras (14).

1. Marco teórico

1.1 Fitopatógenos y su control

Muchos microorganismos producen sustancias benéficas aprovechables por el ser humano. Sin embargo, existen otros de estos organismos que lo afectan y que son conocidos como patógenos, los cuales pueden causar daño directamente al ser humano o provocar enfermedades en organismos de los cuales depende, tales como animales y plantas (15,16).

Colombia, un país con vocación agrícola presenta problemas relacionados con el uso intensivo de agroquímicos para el control de fitopatógenos. El auge de las grandes extensiones de monocultivos y sus técnicas de mantenimiento han traído consigo efectos negativos, entre los que se encuentra el mayor reporte de organismos patógenos y de su resistencia a los tratamientos convencionales (8).

Un ejemplo de esto es el arroz (*Oryza sativa* Linneo.). Este se considera uno de los principales productos alimenticios a nivel mundial, siendo el sustento para la mitad de la población, al aportar cerca del 50% de sus calorías diarias para estas personas (17). En Colombia se producen alrededor de 780 mil toneladas de arroz por semestre (18) y se calcula que una persona promedio (de un hogar que consume arroz) consume 1,6 libras por semana (19). Este cultivo de tanta importancia en nuestro país se ve afectado, entre otras, plagas por las bacterias fitopatógenas *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*, responsables de causar el “añublo bacteriano de la panícula del arroz”, enfermedad que es capaz de ocasionar pérdidas en la producción hasta del 75% (20,21). Las grandes pérdidas se deben principalmente a la producción de espigas infértiles o granos infectados, los cuales se caracterizan por su coloración marrón y la pobre formación de almidón (22). Además, en suelos afectados, puede presentarse inhibición de la germinación de las semillas y reducción de los nuevos brotes de la planta (23).

Las actuales técnicas de control de estas enfermedades se basan principalmente en el uso de pesticidas, los cuales tienen importantes desventajas como su alta toxicidad y persistencia en el ambiente. Sus efectos tóxicos afectan a todos los organismos en contacto directo con el cultivo, incluyendo entre otros casos, a microorganismos benéficos y a humanos (9). Adicionalmente, debido a la difícil degradación de las sustancias usadas, estas pueden permanecer durante un largo tiempo afectando a varias generaciones de organismos y además pueden contaminar fuentes hídricas con lo que se aumenta su área de impacto. Más allá de las consideraciones ambientales, estas sustancias han perdido eficacia para el control de algunas enfermedades debido al surgimiento de resistencia por parte de las cepas patógenas, lo cual puede ser causado por la misma persistencia de estos pesticidas en el ambiente (24,25).

Es por todo lo anterior que ha surgido la necesidad de encontrar nuevas estrategias de control, más eficientes y amigables con el ambiente, lo cual ha llevado a intensificar los esfuerzos de investigación acerca del uso de microorganismos antagónicos y productos naturales microbianos para cubrir dicho requerimiento. Estos últimos, al ser sustancias biodegradables son candidatos atractivos para el desarrollo de agro químicos (26).

Tradicionalmente, compuestos producidos por bacterias (como la kasugamicina, polioxinas, validamicina, blastidina-S, oxitetraciclina y estreptomycin) son comercialmente empleados como fungicidas y bactericidas. Sin embargo, también existen algunos ejemplos de fungicidas pertenecientes a la familia de las Estrobilurinas (azoxistrobina, fenamidona, fluoxastrobin, piraclostrobina, trifloxistrobin), entre las que se encuentran análogos sintéticos de compuestos naturales aislados de diferentes especies de hongos entre ellas *Strobilurus tenacellus*, a la que deben su nombre (27).

Los hongos junto con las actinobacterias han mostrado ser los mayores productores de compuestos antimicrobianos. Si bien, en el caso de la industria agrícola, los compuestos aislados de hongos son más usados en el control de nemátodos e insectos patógenos (28) y hasta el momento no se han desarrollado productos comerciales a partir de sustancias de hongos derivados de ambientes marinos, sí existen ejemplos de estudios que muestran su

capacidad como productores de compuestos con actividad antimicrobiana contra fitopatógenos (29–31).

1.2 Productos naturales de microorganismos

Los microorganismos son considerados como las formas de vida más antiguas y más ampliamente extendidas en el mundo, siendo capaces de prosperar en ambientes hostiles desde hace millones de años (32). A lo largo de este tiempo los microorganismos han desarrollado una gran diversidad biológica y química, inherente a la necesidad de competencia y adaptación al medio (33,34).

Los productos naturales son sustancias que tradicionalmente reposan en el corazón de la química orgánica. Son reconocidos como productos naturales sustancias de peso molecular limitado (normalmente inferior a los 3000 Dalton) y con una gran variedad estructural. Según definiciones más pragmáticas, son sustancias que no parecen tener un papel explícito en la economía interna del organismo que las produce y por eso también son conocidas como metabolitos secundarios, siendo usados los dos términos de forma equivalente (35,36). Al no estar involucrados directamente en las etapas de crecimiento, desarrollo o reproducción del organismo, son principalmente producidos después de la fase de crecimiento activo y bajo condiciones de estrés o deficiencia (37). Adicionalmente, se cree que son responsables la interacción entre el organismo que los produce y su ambiente (38). Recientemente, este tipo de compuestos son también descritos como metabolismo especializado (39,40).

A pesar de que para muchos metabolitos secundarios producidos por microorganismos su función biológica aun continua en discusión, estos han sido de gran interés y utilidad para la especie humana (36,41,42). Los microorganismos constituyen la fuente de fármacos más promisoria, produciendo la mayoría de los medicamentos usados hoy en día (43).

A raíz del descubrimiento de la penicilina en la década de 1920 se creyó que los microorganismos del suelo eran la más grande fuente de nuevos productos naturales bioactivos (44,45). Sin embargo, en las últimas décadas se ha venido desarrollando el estudio de microorganismos de otros ambientes, como endófitos de plantas, ambientes extremos y ambientes marinos, entre otros, los cuales han resultado igualmente o incluso más

interesantes que los organismos de ambientes terrestres, debido a las estructuras químicas novedosas que se han descubierto en estas fuentes novedosas (46-49).

En este sentido, los océanos tienen una diversidad de microorganismos increíblemente grande (50). Sin embargo, se conoce muy poco de esa diversidad, estimándose que en el mejor de los casos se han logrado identificar cerca del 0,1 % de las especies presentes en estos ambientes (51-53). La comunidad científica ahora es consciente de que sólo una pequeña fracción de la diversidad microbiana ha sido sistemáticamente muestreada y que la producción de metabolitos especializados puede ocurrir en taxones microbianos inesperados (54,55), por lo tanto es de esperarse que el océano siga siendo una fuente muy importante de nuevos metabolitos microbianos.

De igual forma, hay una consciencia de que incluso en microorganismos conocidos, el número de rutas biosintéticas para metabolitos codificados en el genoma es más grande que el número de metabolitos detectados con metodologías de rutina de laboratorio (55). Esta observación sugiere que hasta ahora se ha muestreado solamente una pequeña fracción del “parvoma” o “metaboloma”, es decir, el conjunto de moléculas pequeñas producidas por un organismo vivo (56).

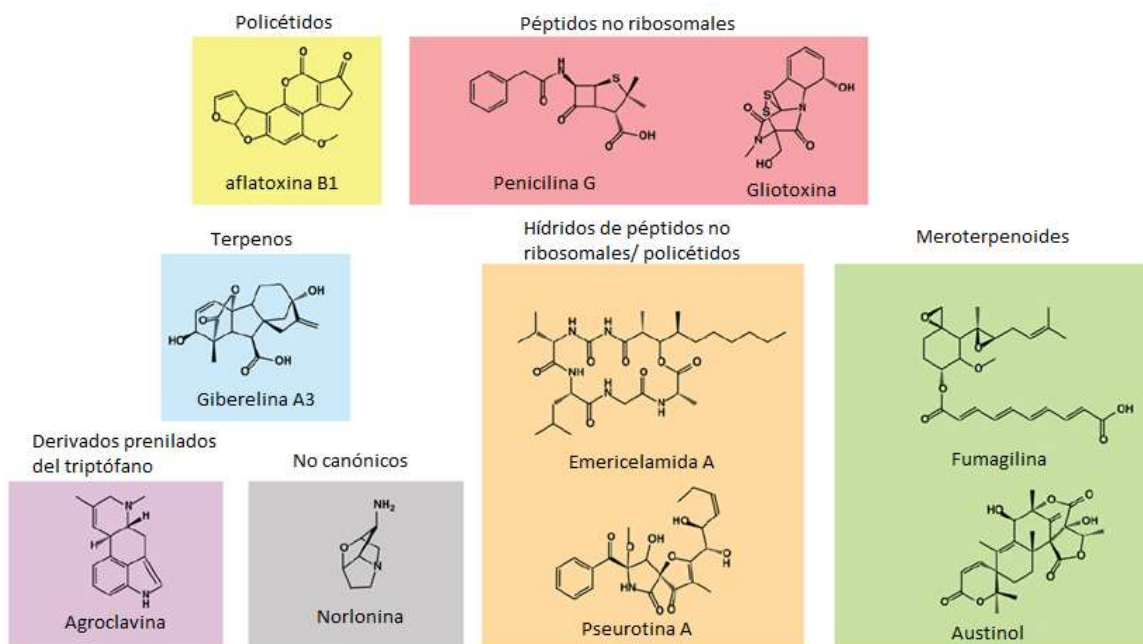
En el caso particular de los compuestos producidos por hongos, existe una gran diversidad química representada en distintos tipos de metabolitos principalmente péptidos no ribosomales, policétidos, terpenos, derivados prenilados del triptófano, entre otros (Figura 1-1) (57,58). Adicionalmente, se han identificados compuestos producidos por rutas biosintéticas híbridas en varias especies de hongos (59,60). La producción de cada clase de metabolito requiere de un complejo enzimático específico que provee la estructura base de este tipo de moléculas, estos son llamados: policétido sintasa (PKSs, por su nombre en inglés), sintasa de péptidos no ribosomales (NRPSs, por su nombre en inglés), Sintasa/ciclasa de terpenos (TCs, por su nombre en inglés) (57).

1.3 Productos naturales de microorganismos marinos

Los océanos cubren más del 70% de la superficie de nuestro planeta y los microorganismos dan cuenta de gran parte de la diversidad genética y metabólica de los océanos (61). Si bien,

esta no es bien conocida en muchas regiones, si puede asociarse a la variedad de sustratos presentes en el ambiente y por lo tanto a la diversidad de los macroorganismos (62). Es así como Colombia al ser un país reconocido como megadiverso no sólo cuenta con una gran variedad de organismos superiores sino también de microorganismos.

Figura 1-1: Metabolitos secundarios producidos por hongos agrupados por familias químicas (Figura adaptada de Wiemann, et al.(57)).



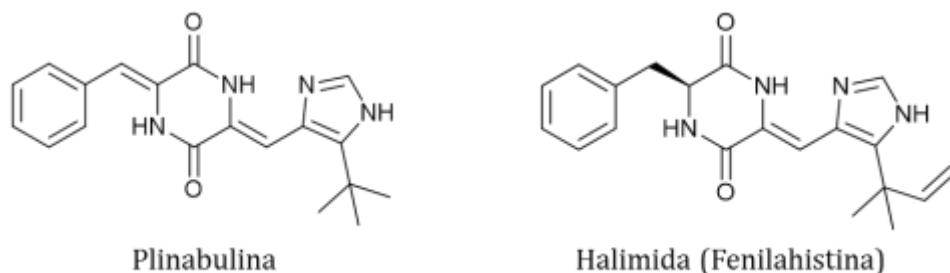
A pesar de esta gran diversidad, hasta ahora sólo se han descrito y nombrado aproximadamente unos 5000 microorganismos de ambientes marinos (63,64). Este bajo número se debe principalmente a la falta de información esencial sobre la biología y los requerimientos de estos organismos para crecer en el laboratorio (51).

En cuanto a su capacidad para producir compuestos, los organismos que habitan los ambientes marinos, incluidos los microorganismos, se ven forzados a desarrollar fisiologías y procesos de adaptación singulares debido al medio desafiante en el que se encuentran. La producción de metabolitos secundarios como mecanismo de adaptación generó propiedades únicas en estos organismos; por ejemplo, una característica distintiva y ampliamente extendida en los organismos marinos, es la incorporación de átomos de halógenos como bromo o cloro, unidos por enlaces covalentes a los compuestos orgánicos (65–67). Esas características únicas hacen

que a partir de la década de 1970 los investigadores comienzan a concentrarse en los océanos como una fuente nueva e inexplorada de compuestos bioactivos (68).

Es de resaltar que los organismos marinos en general han demostrado tener una enorme habilidad para la producción de compuestos con aplicaciones como anti-cancerígenos, antiinflamatorios y antimicrobianos (69,70). Con el avance en este campo de investigación, los esfuerzos se han enfocado a programas de evaluación biomédica, y hasta ahora, en un periodo de estudios relativamente corto, varios fármacos han sido desarrollados teniendo como punto de partida productos naturales marinos. A la fecha, han sido aprobados siete compuestos como medicamentos y veintitrés más se encuentran en diferentes fases clínicas (71). Entre los compuestos que han llegado a fases clínicas se destaca la Plinabulina, el cual es un derivado sintético de la fenilalhistina (phenylalhistin) o halimida un compuesto natural del hongo *Aspergillus ustus*, recuperado de una fuente marina no reportada (Figura 1-2) (72-75). Este compuesto suministrado junto con Docetaxel se encuentra actualmente en fase clínica III para el tratamiento del carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC, *non-small-cell lung carcinoma*) (76).

Figura 1-2: Estructuras de la Plinabulina y la Halimida (75).



1.4 Productos naturales de hongos marinos

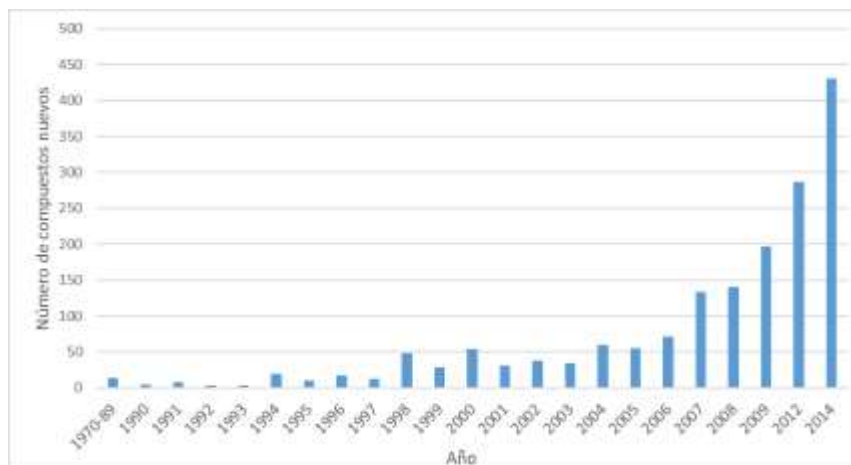
Los hongos marinos son un grupo definido ecológicamente, más que taxonómicamente o fisiológicamente. De acuerdo a la definición clásica aceptada en la comunidad científica, los hongos marinos se dividen en dos grupos: hongos marinos obligados y facultativos. Los hongos marinos obligados son aquellos que crecen y esporulan exclusivamente en hábitats marinos o de estuario, mientras que los facultativos son aquellos que provienen de hábitats de agua dulce o terrestre que son capaces de crecer (e incluso esporular) en el mar (77).

Sin embargo, el estado sexual o teleomorfo de los hongos no siempre se presenta o es tan diferente morfológicamente del estado asexual, que hace que sean descritos los dos estados, equivocadamente, como especies diferentes. Esto dificulta en gran medida la clasificación de los hongos y su catalogación como marinos o no marinos. Es por eso que se ha adoptado el término hongos derivados del mar (*marine-derived fungi*), con el cual se incluyen todos los hongos aislados de ambientes marinos y de estuarios que pueden ser marinos o no (78).

Sí bien hay descripción de hongos derivados del mar desde finales del siglo XIX, es entre las décadas de 1940 y 1950 cuando comienzan a estudiarse estos microorganismos de una forma sistemática y surge la micología marina (77,79–81). No obstante, el estudio de los metabolitos secundarios de los hongos marinos es mucho más reciente y por lo tanto todavía existen en el mar muchos nichos ecológicos que no han sido explorados.

Hasta ahora, la mayor diversidad de hongos marinos parece encontrarse en las regiones tropicales, áreas que se caracterizan por la abundancia en materia orgánica que favorece el desarrollo de estos organismos heterótrofos (82). Los estudios de hongos aislados del mar Caribe son principalmente biológicos, enfocándose en su diversidad e interacción con macroorganismos (83–88), encontrando pocos ejemplos de la evaluación de la actividad biológica de sus extractos (89,90) y sólo un ejemplo de un estudio químico, el cual fue realizado en nuestro grupo de investigación (13).

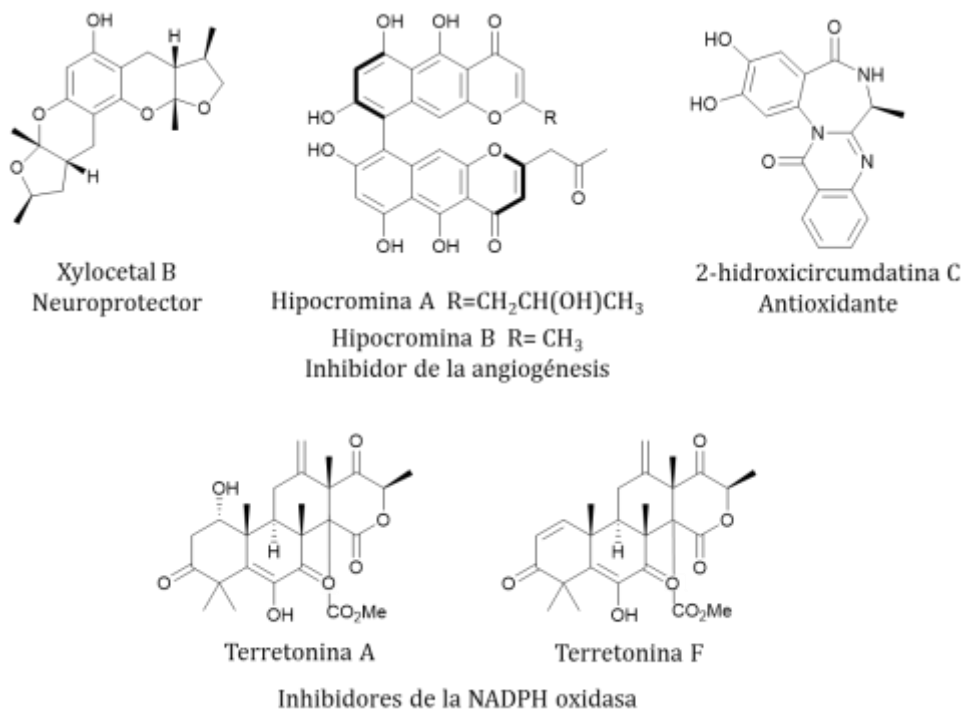
Figura 1-3: Número de compuestos nuevos encontrados en hongos aislados del mar desde 1970 hasta mediados del 2014 (53,70,91,92).



El potencial de los hongos, así como de otros microorganismos, para producir moléculas únicas y originales, puede provenir de procesos metabólicos o genéticos de adaptación para enfrentar una combinación específica de parámetros fisicoquímicos y es posible que las características únicas de los ambientes marinos como alta salinidad, baja temperatura, falta de luz y alta presión induzcan en los hongos la síntesis de sustancias únicas (82,93).

A pesar de que desde mediados del siglo pasado se reportan sustancias producidas por hongos marinos, el estudio de los metabolitos secundarios empieza a realizarse con más fuerza a partir de mediados de la década de 1990. El comportamiento creciente que ha tenido estos estudios en los últimos años se puede apreciar por el número de compuestos nuevos aislados a partir de estos microorganismos (Figura 1-3). En la última revisión sobre el tema, que comprende 1378 metabolitos nuevos publicados en el año 2014 de distintas fuentes marinas, se reportan 426 compuestos obtenidos a partir de hongos de ambientes marinos (70), lo constituye el 30.9% del total. Es evidente entonces, el gran potencial para la producción de compuestos de estos organismos y el interés creciente que genera su estudio.

Figura 1-4: Algunos ejemplos de compuestos activos aislados de hongos marinos en fases preclínicas (94).

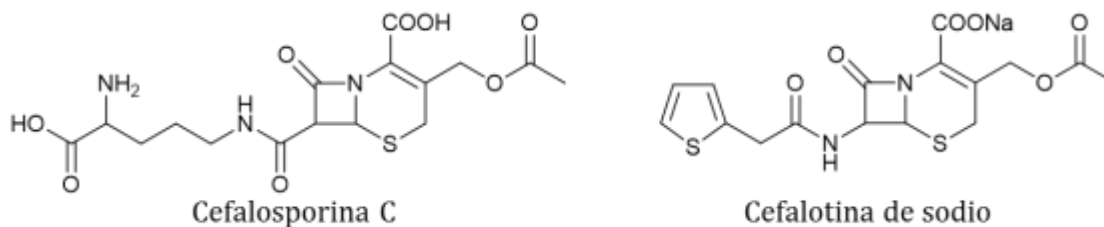


Entre los metabolitos reportados de hongos derivados de ambientes marinos se destacan los policétidos, terpenos y alcaloides, importantes no sólo por su abundancia y variedad estructural, sino por los reportes de su actividad biológica (53,95) (Figura 1-4).

1.5 Compuestos antimicrobianos aislados de hongos marinos

El primer reporte de antimicrobianos a partir de hongos aislados del mar se remonta a la identificación casi fortuita de la cefalosporina C en la década 1940 a partir de *Acremonium chrysogenum* (antes conocido como *Cephalosporium acremonium*). Esta molécula se convirtió en un compuesto plantilla para el desarrollo de los antibióticos modernos de la familia de las cefalosporinas indispensables hoy en día para el tratamiento de infecciones bacterianas (Figura 1-5) (96).

Figura 1-5: Estructuras de la cefalosporina C y de un compuesto sintético derivado, la Cefalotina. (96)



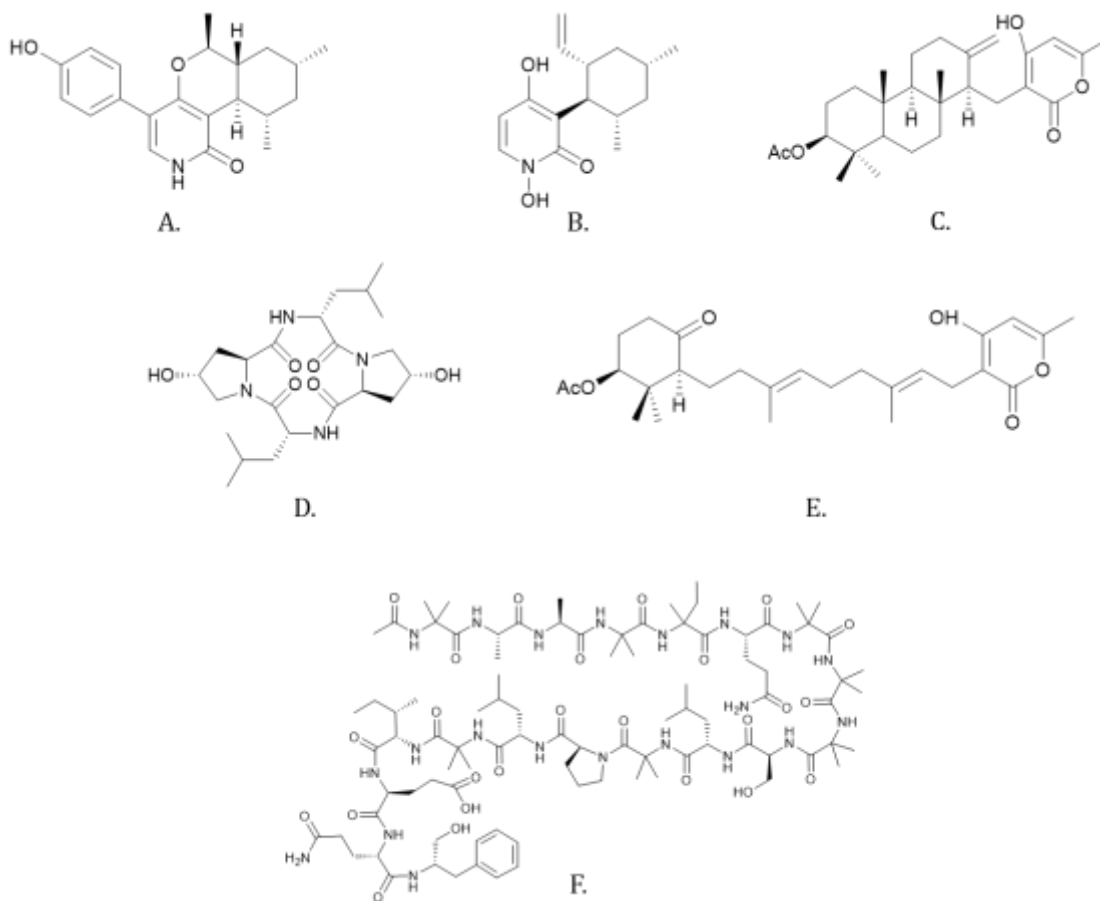
La búsqueda de nuevos antibióticos es necesaria para combatir bacterias resistentes que se están propagando en diferentes sectores como el clínico o el agrícola. Es por esto que constantemente se muestran nuevos reportes de investigaciones que evalúan la actividad antimicrobiana de compuestos aislados hongos marinos.

Por ejemplo Wu et al. reportan la obtención de dos compuestos activos, tricodina A y piridoxatina (A y B Figura 1-6, respectivamente), contra *Staphylococcus epidermidis* a partir del medio de cultivo de *Trichoderma* sp. cepa MF106 aislada del mar de Groenlandia, para los cuales se obtuvieron valores de IC₅₀ de 24 μ M y 4 μ M respectivamente (93).

A partir del cultivo del hongo *Neosartorya paulistensis* (KUFC 7897) asociado a una esponja, lograron la extracción de dos compuestos (C y E, Figura 1-6) que mostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (97).

Algunos ejemplos de moléculas aisladas de hongos con actividad contra fitopatógenos se exponen a continuación. El péptido cíclico aislado del co-cultivo *Phomopsis* sp. K38 y *Alternaria* sp. E33 que muestra actividad contra los hongos patógenos de plantas *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* y *Fusarium graminearum* (98) (D, Figura 1-6). Adicionalmente, diferentes especies del género *Trichoderma* aisladas de la esponja *Psammocinia* sp. fueron evaluadas como biocontroladores encontrando que dos aislamientos identificados como *T. atroviride* y *T. asperelloides* mostraron causar una efectiva disminución en el marchitamiento fúngico de plantas de frijol, causado por *Rhizoctonia solani*, y también indujeron la repuesta de defensa en plántulas de pepino contra *Pseudomonas syringae* pv. lachrimans (30). De otra cepa de *T. atroviride* aislada de la esponja *Axinella polypoides* fueron aislados ocho péptidos con actividad bactericida, la estructura de uno de ellos se muestra en la Figura 1-6 F (31).

Figura 1-6: Ejemplos de compuestos aislados de hongos derivados del mar con actividad antimicrobiana reportada.



En lo que respecta a nuestro país, las investigaciones sobre la química de los microorganismos, en general, están hasta ahora en su fase inicial. Es por esto que es especialmente importante el desarrollo de proyectos que contribuyan al conocimiento en este campo, particularmente de aquellos provenientes de ambientes poco explorados, como es el mar.

Por otro lado, la contribución a la búsqueda de sustancias antimicrobianas con potencial aplicación en el control de fitopatógenos busca darle a esta investigación en ciencias básicas una perspectiva hacia el aprovechamiento del conocimiento aquí generado. Para esto se propuso: la evaluación de los extractos obtenidos de una colección de hongos aislados de ambientes marinos contra bacterias patógenas del arroz, cultivo de gran importancia comercial en el país; así como, el estudio químico de uno de estos extractos que mostraran actividad contra los fitopatógenos.

Por lo tanto, en esta investigación propuesta como la primera fase se pretendió contribuir al conocimiento químico de los microorganismos marinos del Caribe Colombiano, con miras a su uso futuro en el control de fitopatógenos, constituyéndose así como un primer paso para la generación de procesos de base biotecnológica para la obtención de compuestos potencialmente aprovechables, apoyando las estrategias planteadas en el documento CONPES 3697 de 2011 “Política para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad”(99).

2. Screening de la actividad antimicrobiana de hongos aislados de ambientes marinos contra fitopatógenos de plantas

2.1 Introducción

Los microorganismos suelen encontrarse en gran abundancia en las diferentes muestras de donde son recolectados. Por ejemplo, en un gramo de suelo (100), en la hoja de un árbol (101), etc., pueden encontrarse del orden de cientos o miles de microorganismos diferentes.

Debido a esta abundancia, en el estudio de los productos naturales de microorganismos se deben emplear estrategias de selección de muestras que permitan escoger los organismos más interesantes según el enfoque que se le dé a la investigación. Estas estrategias pueden basarse en: criterios biológicos, cuando se quiere enfocar el estudio en un género determinado de organismos; criterios químicos, seleccionando aquellos organismos capaces de producir especies químicas específicas; criterios de actividad biológica, cuando se seleccionan los organismos que son capaces de producir compuestos con una actividad biológica particular.

En el caso de este estudio, al buscar compuestos con actividad antimicrobiana, la capacidad de producir compuestos capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos es uno de los principales criterios de selección de muestras. De esta manera, basados en criterios de actividad biológica se usaron ensayos de actividad antimicrobiana contra bacterias del género *Burkholderia* como uno de los filtros principales para la selección del organismo a estudiar. Sin embargo, para la selección de la muestra se debieron tener en cuenta otras variables como la evaluación de la diversidad metabólica según sus perfiles cromatográficos y los resultados de la identificación de los organismos, esto con el fin de seleccionar los microorganismos más interesantes al integrar estos tres criterios: actividad, información taxonómica y diversidad química.

2.1.1 Efecto de las condiciones de cultivo de hongos en la producción de compuestos

La producción metabólica de los microorganismos en general puede verse afectada por diversos factores como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura, el tiempo de cultivo, la agitación, etc. (102). Los cambios en cualquiera de estas variables pueden llevar al aumento o disminución en la producción de un metabolito determinado, incluso hasta la no producción del mismo.

Sin embargo, en los ensayos preliminares, dónde se evalúan diferentes especies de hongos que pueden tener respuestas muy variables a las mismas condiciones de cultivo, normalmente la mayoría de estas variables se mantienen constantes (103). Determinando entonces el hongo más promisorio bajo unas únicas condiciones de cultivo.

Los hongos tienen requerimientos nutricionales relativamente simples y la mayoría de las especies son capaces de sobrevivir en condiciones aeróbicas si se les suministra una fuente de carbono, nitrógeno, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento. Los macronutrientes, suministrados en concentraciones del orden milimolar, comprenden fuente de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio; y micronutrientes, suministrados a concentraciones del orden micromolar o de trazas (104).

Al ser quimioorganotrofos, los hongos necesitan determinados compuestos orgánicos para su suministro de carbono estructural y energía. Los azúcares son ampliamente usados para el crecimiento de hongos y pueden ir desde las hexosas simples, como la glucosa, a los polisacáridos, como el almidón y la celulosa.

Los hongos son no diazótrofos (no pueden fijar nitrógeno) y por lo tanto necesitan ser suplidos de compuestos nitrogenados, ya sea en formas inorgánicas, como sales de amonio, o en formas orgánicas como aminoácidos, aminos y amidas. La mayoría de los hongos (aunque no todas las levaduras) son también proteolíticos y pueden hidrolizar proteínas a través de proteasas secretadas extracelularmente para liberar aminoácidos para su crecimiento.

En términos de requerimientos de oxígeno la mayoría de los hongos son aerobios. Siendo el oxígeno el sustrato para la respiración y otras funciones enzimáticas oxidativas. Además, es esencial para la síntesis de ergosterol y de ácidos grasos, de tal manera que a mayor concentraciones de oxígeno en el medio la síntesis de estos dos tipos de compuestos se ve favorecida (105).

Sin embargo, el rol de los nutrientes no se restringe a proveer una fuente de energía y material para el crecimiento, sino que también en algunos casos cumplen una función regulatoria o de moléculas señalizadoras en el desarrollo de los hongos, de tal manera que, la presencia o ausencia de ciertos componentes puede activar o silenciar ciertas rutas biosintéticas y factores de patogenicidad (106).

Además de la disponibilidad de nutrientes, otro de los reguladores de la producción metabólica es la etapa de desarrollo del microorganismo. A pesar de que desde hace tiempo la biosíntesis de productos naturales es asociada con la diferenciación celular o el desarrollo de los de los hongos, fue hasta relativamente hace poco que se aclaró el mecanismo de conexión entre los dos procesos (36). Un avance crítico al respecto, fue el establecimiento de una ruta de desarrollo controlada por proteínas-G en *Aspergillus nidulans* que regula tanto la esporulación como la biosíntesis de productos naturales (107,108). Desde ese momento varios estudios han revelado detalles de otras moléculas y otras rutas que conectan los procesos químicos con la diferenciación celular en hongos (36).

Así, en este marco de ideas, en este capítulo se presentan los criterios para la selección de las condiciones usadas para el cultivo de los hongos trabajados, así como la integración de los resultados de actividad, los perfiles cromatográficos e identificación molecular, empleados para la selección de una cepa su derreplicación química y posterior estudio químico.

2.2 Metodología

2.2.1 Muestreo

Dentro de las actividades del grupo de investigación en la línea de microbiología marina, se realizaron dos muestreos, en diferentes locaciones y fechas, de los cuales se lograron obtener los hongos de ambientes marinos que fueron evaluados en este trabajo.

La primera recolección se llevó a cabo en la playa Casa Grande, desembocadura de la quebrada Valencia, Santa Marta, Colombia (F. Ramos, L. Castellanos). Se recolectaron diferentes sustratos (sedimentos, hojas y corteza de manglar, etc.) poniéndolos en contacto directo con PDA enriquecido y con antibiótico (papa 200 g, dextrosa 20 g, peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, sal marina 18 g, tetraciclina 170 mg, agar 15 g).

El segundo muestreo fue realizado en Providencia y Santa Catalina, por buceo autónomo, obteniendo diversos tipos de muestras como algas, octocorales y sedimentos. Las muestras de organismos vivos fueron fragmentos que no superaron los 2 cm³ y las de sedimentos fueron del orden de 5 cm³, por lo que no se causó un efecto negativo significativo en los organismos colectados o el hábitat de estos. Cada muestra fue sembrada por duplicado en agar ISP2 y agar Avena enriquecido con sales para ser transportados al laboratorio del grupo en Bogotá (L.A. Betancur, L. Castellanos).

2.2.2 Recuperación y preservación de microorganismos de las cepas

De las muestras de la primera recolecta, en el área de manglar antes mencionada, se seleccionó aquella que mostraba una mayor diversidad en morfologías macroscópicas de los hongos que crecieron a las cuatro semanas de la recolección. La muestra seleccionada fue un trozo de corteza sumergida de manglar blanco *Laguncularia racemosa*. Se realizaron repiques sucesivos y cultivos por dilución de esporas de cada una de las morfologías presentes en la caja de recolección original, obteniendo así cuatro cultivos con morfología diferente.

Para la segunda recolecta los métodos utilizados fueron inicialmente planteados para obtención de actinobacterias marinas. Sin embargo, dadas las semejanzas en las condiciones de cultivo de estas bacterias con los hongos, estos procedimientos también permitieron la obtención de cepas fúngicas. La recuperación se realizó empleando el procedimiento reportado por Maldonado et al., 2009 (109) con modificaciones propuestas por la Dra. Zulma Suarez (Vecol) (110). Brevemente, el procedimiento de recuperación consistió en tomar uno de los duplicados preservados de cada muestra en cada uno de los medios (25 muestras x 2 medios). El agar de cada caja se fragmentó finamente con una aguja estéril. El contenido de cada caja se transfirió a tubos para centrifugación estériles de 50 mL. A cada tubo se le adicionó solución salina (0.85 % NaCl) y se homogenizaron en un vórtex, para luego adicionar 50 mg de

CaCO₃ por tubo. Los sobrenadantes obtenidos se incubaron a 26 °C por 1 semana. A cada tubo para centrifugación se le adicionaron 2 mL de solución salina (0.85 % NaCl); luego se tomaron 1 mL de la suspensión y se prepararon diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ con solución salina estéril y Tween 80 (1 mL/L). Finalmente, se hizo un sembrado masivo con 100 µL de la dilución usando perlas de vidrio estériles, para luego inocular la dilución en cajas de Petri con 20 mL de agar-caseína-almidón (ACA). Las cajas se incubaron a 26 °C por un periodo de 4 a 6 semanas. Esta recuperación de microorganismos fue realizada como parte de los trabajos doctorales de Luz Adriana Betancur y Sandra Naranjo, los cuales lograron recuperar hongos de ambientes marinos, además de otras colecciones de microorganismos. Los microorganismos obtenidos fueron registrados en el banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (110).

De estas recolecciones se obtuvieron 15 cepas de hongos que actualmente se encuentran preservadas en tres formas diferentes. Conservadas a corto plazo mediante cultivos en agar los cuales se repican cada 30 días aproximadamente. Conservadas a largo plazo en crioviales de 2 mL con una suspensión esporas en solución de glicerol al 50% a 4°C y a -20°C.

2.2.3 Identificación molecular de hongos por secuenciación de ITSs

Todos los organismos fueron cultivados en PDA durante dos semanas, luego en condiciones estériles se raspó el micelio de la superficie del agar (aproximadamente 0.5 g) y fue depositado en tubos cónicos para centrifugación de 2 mL con 5 perlas de zirconio para realizar la ruptura celular en un molino de perlas. Luego se adicionó 700 µL de buffer de extracción CTAB 1% previamente calentado a 57°C y se mezcló vigorosamente para luego incubar los tubos por 1 hora a 57°C. Trascurrido este tiempo, se adicionaron 700 µL de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Esto se mezcló por inversión durante 20 minutos y se centrifugó por 20 minutos a 13000 g a temperatura ambiente. Luego, la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 mL, en donde se adicionó acetato de sodio 3M en un volumen correspondiente a la décima parte de la fase acuosa transferida. Se le añadió un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y luego se conservó a -20°C durante la noche. Se centrifugaron los tubos durante 20 minutos a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70%; se centrifugó nuevamente a 6000g durante 5 minutos; se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con 500 µL más de etanol. Posteriormente se dejó evaporar el exceso de etanol a 37°C durante 20 minutos para luego suspender el pellet en 100 µL de solución de EDTA tris 10 mM y 1 µL de ARNasa (invitrogen ®, Carlsbad, USA) (20 mg/mL) y se dejó incubar por

1 hora a 37°C. Se realizó la evaluación de la integridad de ADN mediante un gel de Agarosa 1% en buffer TBE 0.5X. Las reacciones de amplificación se realizaron en 25 µL usando 2.5 µL de buffer TBE 10X, 1.5 µL de cloruro de magnesio 25mM, 0.3 µL de mezcla de dNTPs 20mM, 0.5 µL de cada iniciador (ITS1 y ITS4) a una concentración de 20 µM, 0.3 µL de Taq-DNA polimerasa 5 unidades(Invitrogen®), 15.4 µL de agua miliQ y 4 µL de ADN ajustado a 200 ng. La amplificación se realizó en el termociclador iCycler (Bio-Rad ®) con un paso inicial de desnaturalización de (95°C, 2 minutos) y luego 30 ciclos de: desnaturalización (95°C, 1 minuto), asociación (50°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 1 minutos) seguidos por un paso de extensión final (72°C, 2 minutos). Los amplímeros obtenidos se secuenciaron en sentido derecho y reverso por duplicado, posteriormente se ensamblaron y se analizaron mediante BLAST contra la base de datos del GenBank. para obtener la identidad posible de las cepas estudiadas. Esta parte del trabajo se realizó con la guía de la Profesora Ibonne García del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, siguiendo modificaciones a las técnicas de extracción de ADN propuesta por Stirling (111) y la amplificación por PCR reportada por Pérez-Vera et al (112).

2.2.4 Cultivo de las cepas seleccionadas

Las cepas se cultivaron en 2 medios de cultivo, PDB y Medio líquido Wickerham, cuya composición se describe en la tabla 1. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 500 mL en los cuales se añadían 100 mL de medio del respectivo medio. Los organismos se inocularon en condiciones estériles en los medios de cultivo frescos mediante 3 plugs de agar (diámetro de 1 cm) de un cultivo en agar del organismo de una semana de edad. Los hongos se dejaron crecer sin agitación, con periodos de 12h de luz y 12 horas de oscuridad, a temperatura del laboratorio, por tres semanas. Se realizaron duplicados de todos los cultivos (113).

Tabla 2-1: Composición de los medios de cultivos utilizados.

Medio PDB	g/L	Medio líquido Wickerham	g/L
Papa	200.0	Extracto de Malta	3.0
Dextrosa	20.0	Dextrosa	10.0
Peptona	5.0	Peptona	5.0

Extracto de levadura	3.0	Extracto de levadura	3.0
pH	6.5	Sal marina	24.4
		pH	7.2

2.2.5 Obtención del extracto y fraccionamiento

La extracción se realizó por partición en AcOEt, extrayendo al mismo tiempo tanto sobrenadante como micelio. Un volumen de AcOEt igual al volumen del cultivo se añadió a los Erlenmeyer y se mantuvieron en contacto durante la noche para inactivar las esporas. Luego de este periodo, se llevaron los cultivos a un baño de ultra sonido durante 20 min para causar ruptura celular y favorecer el proceso de extracción. Posteriormente se hace un recambio del solvente y se vuelve a llevar al baño de ultrasonido por 15 minutos, repitiendo este proceso dos veces. El extracto se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio (113,114). Este extracto crudo se fraccionó utilizando cartuchos de extracción en fase sólida DIOL (1 g), para obtener tres fracciones de diferentes polaridades: Hexano-Acetato de etilo (8:2), acetato de etilo y metanol. Las fracciones fueron usadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana y para obtener perfiles cromatográficos por UHPLC-DAD-ELSD.

2.2.6 Evaluación actividad antimicrobiana de extractos

Se evaluó la actividad antibacteriana contra las bacterias patógenas del arroz *Burkholderia glumae* ATCC 33617, *B. gladioli* ATCC 37041, and *B. platarii* ATCC 43733, las cuáles fueron gentilmente suministradas por el banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Para el ensayo se empleó el método de dilución en agar con algunas modificaciones (115). Brevemente, los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, adicionando 200 μ L de agar KB, 30 μ L de inóculo de bacteria (las bacterias se cultivaron en medio líquido LB por 24 horas y su densidad óptica se ajustó a 0.5 para el ensayo) y 20 μ L de la fracción a ensayar a una concentración de 10.0 mg/ml. De tal manera, la concentración final de la fracción en cada pozo fue 200 μ g/pozo. Las muestras se disolvieron en AcOEt o MeOH de acuerdo a su solubilidad, haciendo controles de estos dos solventes. Como control positivo se utilizó gentamicina a una concentración de 0,2 μ g/pozo. Cada muestra se ensayó por triplicado.

2.2.7 Perfilado por UHPLC-DAD-ELSD

Las muestras fueron analizadas usando un equipo de cromatografía líquida UHPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 (Germering, Alemania) con detector DAD y acoplado a un detector LT-ELSD Sedex 85 (Alfortville, Francia). Se usó una columna Acclaim RSLC 120 (100 × 2.10mm, 2.2 μm). Los solventes empleados en la elución fueron: agua (fase A) y acetonitrilo (MeCN) (fase B) en un gradiente que inicio con 10% de la fase B y se incrementó de forma linear hasta 100% en 7 minutos, manteniendo esta proporción por 5 minutos, con un flujo de 0.5 mL/min. Para los análisis cromatográficos se usó MeCN grado cromatografía líquida Merck (Darmstadt, Alemania) y agua desionizada filtrada en un equipo Millipore Simplicity (Molsheim, Francia), luego éstos fueron filtrados por una membrana de nylon de tamaño de poro de 0.22 μm (CNW Technologies, Shangai, China). Las fracciones fueron disueltas en MeCN o mezclas MeCN-agua para una concentración final de 1 mg/mL. Para cada análisis se inyectaron 10 μL. El detector DAD realizó barridos entre 200 y 400 nm. Los parámetros del detector ELSD fueron: 80°C de temperatura, ganancia 10, filtro 2.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Condiciones de cultivo seleccionadas

Basados en lo anteriormente expuesto, se decidió el uso de dos medios para la evaluación de los organismos. Por un lado, basándonos en el protocolo de Kjer et al. (113) se seleccionó el medio Wickerham (ver composición en la tabla 2-1). Por el otro apoyados en los resultados de trabajos previos realizados en el grupo de investigación se seleccionó el medio PDB (*Potato Dextrose Broth*). La principal diferencia entre los dos medios es la presencia de sal y la reducción de las fuentes de carbono en el medio Wickerham. Otros parámetros de cultivo, como tiempo, temperatura y condiciones de oxigenación se mantuvieron constantes y, por lo tanto, sus efectos en la fase inicial de la selección no se evaluaron.

Las condiciones de oxigenación en los cultivos a escala de laboratorio, dependen de la proporción volumen de cultivo/volumen de recipiente y de la agitación. Frecuentemente, se usan relaciones entre volumen de cultivo-volumen de recipiente entre 2:5 y 1:5 (29,93,113,116). En este estudio se escogió trabajar con una relación de 1:5 y trabajar en

condiciones estáticas. Hay reportes donde estas condiciones son preferidas ya que permiten la formación de estructuras de reproducción que, como se presentó anteriormente, han sido relacionadas con la producción de ciertos metabolitos (93,113,117,118).

2.3.2 Identificación de los hongos recuperados de ambientes marinos

Este trabajo representa una de las primeras aproximaciones en el país que busca evaluar la diversidad química a partir de hongos aislados de ambientes marinos y su posible aplicación, con un enfoque hacia la obtención de compuestos antimicrobianos para el control de fitopatógenos del arroz. Por lo tanto, uno de los primeros retos fue identificar el tipo de hongos que fueron aislados de las muestras marinas recolectadas. La identificación por claves taxonómicas está primordialmente basada en la descripción morfológica de estructuras reproductivas, las cuales en muchas ocasiones no se observan en las condiciones de laboratorio (119), dificultando así el proceso de identificación y haciendo necesario emplear técnicas de identificación molecular (100).

Los resultados de la secuenciación del gen ITSs de los hongos abordados en este trabajo se presentan resumidos en la Tabla 2-2, donde también se relacionan con las muestras de las que fueron aislados. La identificación molecular mostro que 11 de los 15 aislamientos corresponden a hongos del género *Fusarium* y sólo cuatro aislamientos pertenecen a otros géneros identificados como *Acremonium*, *Galactomyces*, *Purpureocillium* y *Nectria*. Estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta, incluyendo ambientes marinos (118,120,121). De estos, *Fusarium* es conocido por las diferentes especies que muestran patogenicidad en plantas (122–124). Como se puede observar, en algunos de los casos sólo se determinó un género como la máxima similitud (p. ej. *Fusarium* sp. y *Acremonium* sp).

La comparación por BLAST con las secuencias del GenBank, a pesar de que es comúnmente usada, tiene algunos problemas, como la falta de un mecanismo de verificación de la correcta identificación de estas secuencias, por lo tanto, es frecuente encontrar identificaciones incompletas o erróneas (125–127). Una de las posibles soluciones a este inconveniente, es basarse en criterios de identificación adicionales como claves taxonómicas, caracterizaciones bioquímicas o la secuenciación de otros fragmentos de ADN. Sin embargo, para los objetivos de este estudio, la identificación preliminar por ITSs, que nos permitió la identificación de las

muestras a nivel de género resulta suficiente. En posteriores etapas de la investigación se abordará la identificación de las cepas de interés a nivel de especie.

Tabla 2-2: Datos de origen e identificación de los 15 organismos trabajados.

Código interno	Muestra	Tipo de Muestra	Medio de muestreo	Recolección	Identificación (Máximo % similitud con BLAST)
PNM-41	<i>Codium</i>	Alga	Avena	2	<i>Fusarium solani</i> (99 %)
PNM-67	<i>Niphates digitalis</i>	Esponja	Avena	2	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (99 %)
PNM-76	<i>Arena espacio abierto 60 pies</i>	Sedimento	Avena	2	<i>Fusarium solani</i> (99 %)
PNM-104a	<i>Dictyota</i> sp.	Alga	ISP2	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (100 %)
PNM-104b	último lavado <i>Dictyota</i> sp.	Alga	ISP2	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (99 %)
PNM-105	último lavado <i>Dictyota</i> sp.	Alga	ISP2	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (99 %)
PNM-119	<i>Pez Loro</i>	Pez	Avena	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (99 %)
PNM-120b	<i>Pez Loro</i>	Pez	Avena	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (99 %)
PNM-122	<i>Codium</i> sp.	Alga	Avena	2	<i>Fusarium solani</i> (99 %)
PNM-177	<i>Eunicea fusca</i>	Octocoral	Avena	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (99 %)
PNM-221	<i>Dictyota</i> sp.	Alga	ISP2	2	<i>Acremonium</i> sp. (99 %)
PNM-AC03	<i>Laguncularia racemosa</i>	Corteza sumergida de manglar	PDA con sales	1	<i>Fusarium</i> sp. (99 %)
PNM-AC06	<i>Laguncularia racemosa</i>	Corteza sumergida de manglar	PDA con sales	1	<i>Nectria ipomoeae</i> (100 %)
PNM-AC08	<i>Laguncularia racemosa</i>	Corteza sumergida de manglar	PDA con sales	1	<i>Galactomyces candidum</i> (99 %)

PNM-AC10	<i>Laguncularia racemosa</i>	Corteza sumergida de manglar	PDA con sales	1	<i>Fusarium striatum</i> (99 %)
-----------------	------------------------------	------------------------------	---------------	---	---------------------------------

1 Playa Casa Grande, desembocadura de la quebrada Valencia, Santa Marta, Colombia (F. Ramos, L. Castellanos).

2 Providencia y Santa Catalina (L.A. Betancur, L. Castellanos).

2.3.3 Obtención de extractos orgánicos

Asegurar la recolección de hongos estrictamente marinos no es fácil y la mayoría de los protocolos de recolección dan lugar al aislamiento de cepas que no necesariamente están metabólicamente activas en el medio marino, es posible que sean arrastradas de otras fuentes y sobrevivan como propágulos latentes (128). Las condiciones aquí trabajadas no son lo suficiente restrictivas, por lo que no es posible asegurar que los hongos recuperados sean microorganismos marinos. A pesar de esto, fue posible evidenciar la tolerancia de los mismos a condiciones salinas dado que los 15 aislamientos crecieron en el medio Wickerham, el cual contiene una concentración de sal marina de 18 g/L. Esta concentración corresponde a cerca de la mitad de la concentración promedio de sal en el mar, que es de 35 g/litro (129). Las concentraciones de sal marina inferiores a las condiciones naturales son las más usadas, puesto que en general, concentraciones altas de sal inhiben el crecimiento y la producción metabólica de los hongos (91,130,131).

Figura 2-1: Fotografía de algunas de las cepas tras las tres semanas de cultivo en los medios usados (los tres medios de la izquierda corresponden a medio Wickerham y los tres de la derecha a PDB; de arriba hacia abajo se encuentran los cultivos de las cepas PNM-AC03, PNM-67 y PNM-41).



El resultado del uso de medios diferentes puede ser observado en la Figura 2-1, donde las diferencias más notables fueron el cambio en la coloración y en la textura del cultivo, ya que para varias de las cepas el medio PDB permitió la esporulación y la producción de exudados que pudieron ser observados como pequeñas gotas sobre el cultivo. También se observó, en general, una mayor producción de extracto crudo usando el medio PDB (Tabla 2-3), con excepción de las cepas PNM-67 y PNM-AC10. Para las cuales se obtuvo alrededor de un 20% menos de extracto en el medio PDB, respecto a los extractos de estos hongos obtenidos en el medio Wickerham; y la cepa PNM-AC08 para la cual no se obtuvo una diferencia significativa entre los dos medios.

Tabla 2-3: Masas promedio de los extractos crudos obtenidos para cada una de las cepas en los dos medios.

Código Interno	Masa promedio de extracto en medio Wickerham (mg)	Masa promedio de extracto en medio PDB (mg)
PNM-41	15,2	38.7
PNM-67	21.6	18.0
PNM-76	16.1	93.4
PNM-104a	30.0	67.8
PNM-104b	33.9	43.1
PNM-105	23.7	34.4
PNM-119	35.8	61.9
PNM-120b	26.5	46.8
PNM-122	13.2	89.3
PNM-177	51.6	93.8
PNM-221	24.6	38.0
PNM-AC03	24.6	41.7
PNM-AC06	38.4	59.7
PNM-AC08	25.9	25.6
PNM-AC10	15.7	13.6

2.3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana contra fitopatógenos

La capacidad de los extractos orgánicos de hongos de controlar el crecimiento de bacterias del género *Burkholderia*, tomadas en este trabajo como modelo para evaluar la actividad antimicrobiana, se resume en la Tabla 2-4, donde se presentan las cepas activas especificando en cuál de los medios se logró observar actividad, en la columna identificada como medio activo.

Tabla 2-4: Resumen de resultados de actividad antimicrobiana contra bacterias del género *Burkholderia*.

Código interno	Identificación (Máximo % similitud con BLAST)	Activa	Medio activo	Fracción activa	<i>B. gladioli</i>	<i>B. glumae</i>	<i>B. plantarii</i>
PNM-41	<i>Fusarium solani</i>	Sí	PDB	Metanol	-	-	+
PNM-67	<i>Purpureocillium lilacium</i>	Sí	PDB	Metanol	++	-	++
PNM-76	<i>Fusarium solani</i>	Sí	PDB	Metanol	++	-	++
PNM-104a	<i>Fusarium oxysporum</i>	Sí	PDB	Metanol	+	+	+
PNM-104b	<i>Fusarium oxysporum</i>	Sí	W	Metanol	+	+	+
PNM-105	<i>Fusarium oxysporum</i>	No			-	-	-
PNM-119	<i>Fusarium oxysporum</i>	No			-	-	-
PNM-120b	<i>Fusarium oxysporum</i>	No			-	-	-
PNM-122	<i>Fusarium solani</i>	No			-	-	-
PNM-177	<i>Fusarium oxysporum</i>	No			-	-	-
PNM-221	<i>Acremonium sp.</i>	Sí	W	Hexano/Acetato de etilo	-	-	+
PNM-AC03	<i>Fusarium sp.</i>	Sí	PDB	Metanol	++	-	-
PNM-AC06	<i>Nectria ipomoeae</i>	Sí	W	Acetato de etilo	-	-	+
PNM-AC08	<i>Galactomyces candidum</i>	Sí	PDB	Metanol	-	++	+
			W	Metanol	++	+	-
PNM-AC10	<i>Fusarium striatum</i>	Sí	PDB	Metanol	++	++	-
			W	Metanol	++	-	++

++ Las dos réplicas de la fracción resultaron activas.

+ Sólo una de las réplicas de la fracción resultó activa.

- Ninguna de las réplicas fueron activas.

Los resultados indican que diez de las 15 cepas de hongos son activas frente al menos una de las bacterias evaluadas. Es interesante observar que algunas de las muestras que fueron identificadas como la misma especie no presentan el mismo perfil de actividad. Por ejemplo, la cepa PNM-76 presentó actividad contra dos de las bacterias mientras que la cepa PNM-122 no presentó actividad, aun cuando las dos cepas se identificaron como *Fusarium solani*. También es interesante notar que diez de los doce extractos identificados como activos corresponden a fracciones solubles en metanol, por lo que es de esperarse que los compuestos activos sean de polaridad media a alta.

En cuanto al efecto de los dos medios de cultivo en la producción de extractos activos, se observó que los dos medios aquí evaluados permiten la producción de metabolitos activos. A pesar de que hay un mayor número de fracciones activas para extractos obtenidos de cultivos en PDB, se observó que las cepas PNM-221 y PNM-104a presentaron actividad sólo en el medio Wickerham. La diversidad de resultados obtenidos no permitió generalizar una conclusión sobre cuál de los dos medios resultó mejor que el otro en la evaluación inicial de la actividad. Estos resultados están de acuerdo con otros reportes en donde se concluye que no hay un único medio de cultivo que permita evaluar adecuadamente la capacidad de producción de metabolitos de cepas diferentes (103,130,131), sugiriendo la pertinencia de continuar usando al menos dos medios de cultivo en los futuros screening de actividad a realizar dentro de las investigaciones del grupo.

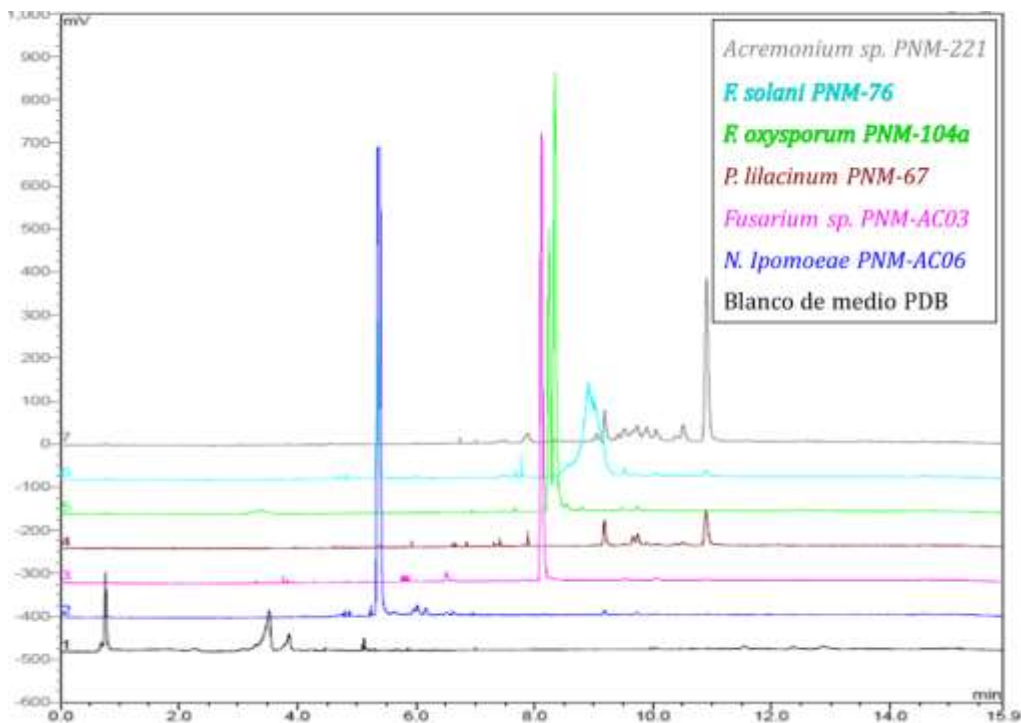
En lo que se refiere a las cepas más activas, los resultados mostraron que las cepas PNM-67 (*Purpureocilium lilacinum*), PNM-76 (*Fusarium solani*) y PNM-AC10 (*Fusarium striatum*) presentan la mejor actividad contra las bacterias evaluadas, al ser activos contra dos de las tres bacterias. Sin embargo, se decidió concentrar los esfuerzos de derreplicación y estudio químico en la cepa *Purpureocillium lilacinum* PNM-67, puesto que las cepas pertenecientes al género *Fusarium* a pesar de tener algunos reportes de su uso como biocontroladores (132,133), también presentan múltiples reportes como fitopatógenos y podrían no resultar adecuadas para el futuro desarrollo de productos para la protección de plantas, mientras que cepas de *Purpureocillium* han sido más ampliamente reportadas como agentes de bio-control de hongos fitopatógenos, nematodos e insectos (124,134,135).

2.3.5 Perfilado por UHPLC-DAD-ELSD

Todas las fracciones obtenidas a partir del cultivo de las 15 cepas de los hongos, en los dos medios por duplicado (180 fracciones), fueron analizadas por UHPLC-DAD-ELSD, con el fin de hacer una evaluación preliminar de la diversidad metabólica presente en los aislamientos abordados en este estudio.

En cuanto a las fracciones que mayor diversidad metabólica mostraron, fueron las de acetato de etilo y las de metanol, puesto que en estos cromatogramas se observó la mayor cantidad de picos resueltos. De otro lado, las fracciones de hexano-acetato de etilo 8:2 en general mostraron pocos picos, con tiempos de retención muy cercanos en las diferentes muestras. En cuanto a las fracciones de Acetato de etilo, aunque de interés por el perfil cromatográfico, sólo una de ellas mostró ser activa según los resultados de la Tabla 2-4. Este comportamiento de aparente poca diversidad metabólica en las fracciones hexano-acetato de etilo 8:2, junto con el hecho de que sólo una de las fracciones de acetato de etilo mostró ser activa, dirigió los análisis del perfil cromatográfico hacia los perfiles obtenidos a partir de las fracciones de metanol.

Figura 2-2: Perfiles de UHPLC-ELSD de la fracción de acetato de etilo de cultivos en PDB que mostraron mayores diferencias.



Los perfiles cromatográficos de la fracción metanólica en general mostraron ser diferentes del blanco de medio. Una vez establecidas las diferencias con el blanco de medio, los resultados obtenidos al comparar las fracciones para los 15 hongos, permitieron observar tres comportamientos en los perfiles de los extractos:

Primero, la obtención de perfiles cromatográficos con diferencias evidentes en la composición química, como los presentados en la Figura 2-2, lo cual al correlacionarlo con los resultados de identificación de los organismos da cuenta de los diferentes organismos encontrados. Se puede observar que los organismos diferentes tienen perfiles químicos distintos, estos cambios en el perfil cromatográfico se observan incluso en muestras de hongos del mismo género. Por ejemplo, los hongos *Fusarium solani* PNM-76 y *Fusarium oxysporum* PNM-104a presentan perfiles claramente diferentes, este último presenta dos picos bien resueltos entre 8.2-8.5 min; mientras *F. solani* PNM-76 presenta picos no resueltos alrededor de 9 min. Por otro lado, el hongo PNM-AC03, que también pertenece al género *Fusarium*, presenta un perfil distinto a los dos mencionados con un único pico en 8 min.

En segundo lugar, se observó la diferencia en la producción metabólica debida a los diferentes medios de cultivo (Figura 2-3). Por ejemplo, para la cepa PNM-41, estas diferencias se observan no sólo por el cambio en la cantidad de compuestos producidos (ver picos con tiempos de retención en 9 y 11 min), sino también en compuestos diferentes que sólo se encuentran en el cultivo en uno de los medios (ver pico con tiempo de retención en 5.5 min).

Un tercer grupo de extractos fueron aquellos con perfiles cromatográficos similares. Las comparaciones de los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos permitieron identificar la presencia de cepas metabólicamente similares, lo que sugirió que se trataba de aislamientos redundantes de cepas de la misma especie, lo cual se corroboró con los resultados de la identificación por secuenciación de los genes ITS (Figura 2-4).

De esta manera, apoyados en la integración de la información obtenida de la identificación molecular de las 15 cepas aisladas de ambientes marinos, de la evaluación de la actividad biológica y de los perfiles cromatográficos obtenidos por UHPLC-DAD-ELSD, se seleccionó la cepa *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 para estudios de derreplicación química. Esta cepa es

una de las más activas aquí ensayadas, presentando actividad contra dos de las bacterias patógenas evaluadas; además, presentó un perfil cromatográfico claramente diferente a los otros hongos evaluados. Estos resultados, junto con la información recolectada en la revisión bibliográfica acerca de este hongo evidencian el potencial para la producción de compuestos antimicrobianos y su uso extendido como biocontrolador (124,134-136).

Figura 2-3: Ejemplo de la diferencia en la producción metabólica debida al medio de cultivo, en la cepa PNM-41.

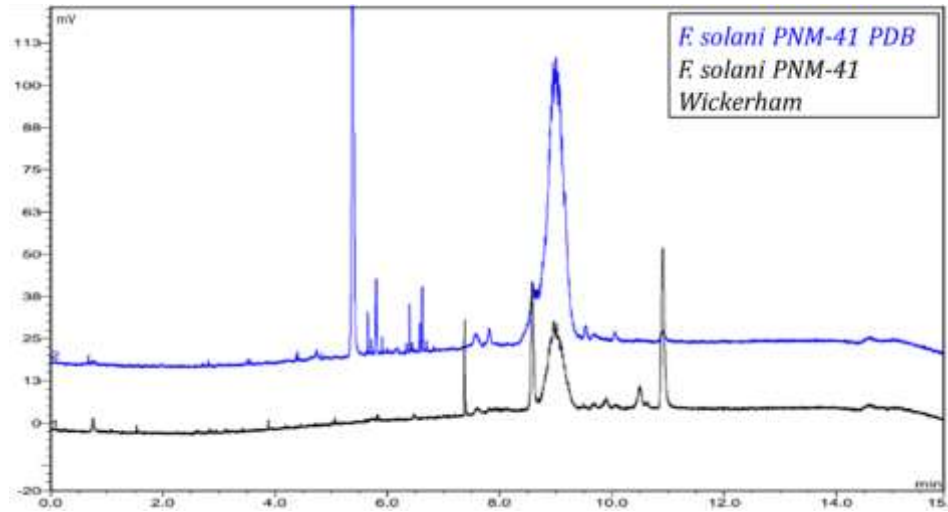
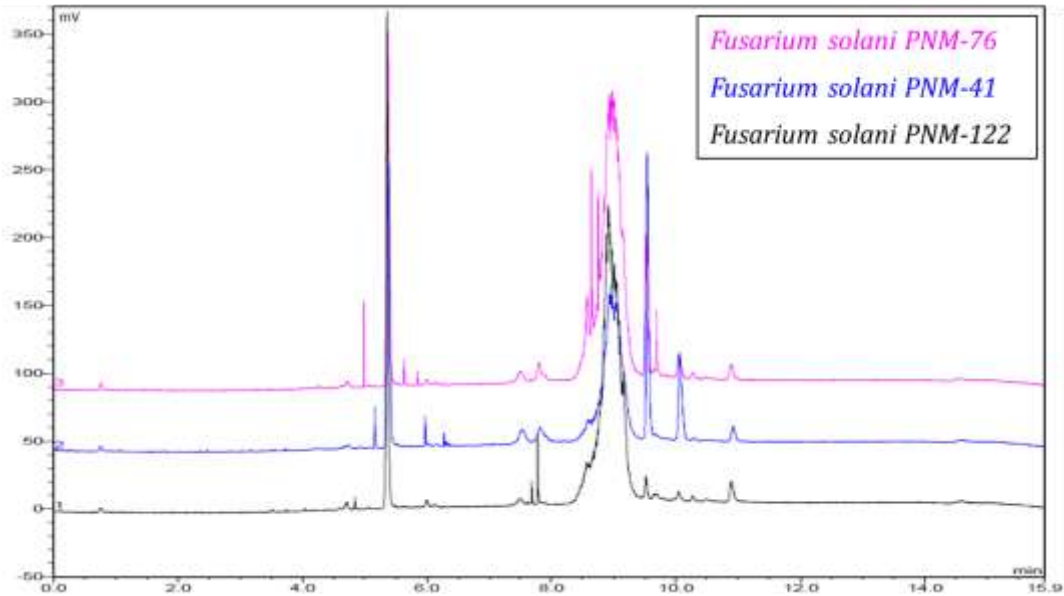


Figura 2-4: Perfiles de UHPLC-ELSD de la fracción metanólica del cultivo en PDB de diferentes cepas de la misma especie.



2.4 Conclusiones

Se logró la implementación de metodologías para la selección de cepas de hongos para su posterior estudio químico, basados en criterios taxonómicos, de actividad biológica y de comparación de sus perfiles cromatográficos. La integración de varios criterios de selección, permite la elección de cepas con una perspectiva enfocada hacia la aplicación para el control de fitopatógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos.

La identificación molecular de las 15 cepas de hongos recuperadas mostró que estas pertenecen a géneros de amplia distribución tanto en ambientes terrestres como marinos, dentro de los cuales predominaron especies del género *Fusarium*. También se encontraron cepas de los géneros *Purpurecillum*, *Acremonium*, *Galactomyces* y *Nectria*.

Todos los hongos evaluados demostraron ser capaces de crecer en medio Wickerham y en medio PDB, por lo que se puede concluir que se trata de cepas que pueden resistir concentraciones de sal de al menos 18 g/L, pero que ésta no es necesaria para su crecimiento.

Diez de las cepas 15 cepas evaluadas resultaron ser activas contra al menos una de las bacterias fitopatógenas, *Burkholderia glumae*, *B. plantarii* y *B. gladioli*. Las cepas más activas fueron PNM-67 (*Purpureocilium lilacinum*), PNM-76 (*Fusarium solani*) y PNM-AC10 (*Fusarium striatum*), cada una de las cuales, presentaron actividad contra dos de las tres bacterias evaluadas.

Los perfiles por UHPLC-ELSD resultaron ser una herramienta útil que permite evaluar de manera preliminar la variabilidad metabólica que puedan existir entre diferentes cepas de microorganismos.

La integración de la información obtenida por secuenciación del gen ITS y la actividad antibacteriana contra las cepas de bacterias fitopatógenas permitió identificar a *P. lilacinum* (PNM67) como la cepa mayor interés para su posterior estudio químico.

3. Derreplicación de los extractos metanólicos de *Purpureocillium lilacinum* PNM-67.

A pesar del gran potencial de los compuestos de origen natural para su aplicación en diferentes productos como el desarrollo de medicamentos o productos agroindustriales, uno de los factores principales que limitan su posible aplicación es el proceso de identificación de compuestos que consume cantidades apreciables de recursos y tiempo, tanto en el aislamiento y la purificación de compuestos como en la interpretación de espectros de resonancia magnética nuclear y espectros de masas para la elucidación estructural. Adicionalmente, este gran esfuerzo a menudo conlleva a la identificación de compuestos ya conocidos cuya aplicabilidad resulta difícil o poco conveniente (137).

En nuestro caso particular, a pesar de que los hongos continúan siendo una fuente relativamente sub-explorada (138,139), un inconveniente que pueden presentar respecto a la búsqueda de compuestos activos es la producción de micotóxicas, las cuales se pueden encontrar en diferentes especies de hongos (140). Por esto, hay una necesidad especial de aplicar técnicas de identificación eficientes de compuestos producidos por hongos para detectar la presencia de entidades químicas conocidas, incluyendo micotóxicas y otros compuestos de relevancia biológica (141).

Así, para optimizar los esfuerzos en la identificación de compuestos de origen natural resulta útil la implementación de técnicas de derreplicación, las cuales permiten la identificación temprana de compuestos conocidos sin la inversión tradicional de tiempo en el aislamiento y la elucidación estructural (142). Esto se logra por la comparación de datos espectroscópicos de los compuestos, obtenidos de manera preliminar en los primeros pasos de extracción y fraccionamiento del extracto, incluso por el análisis directo del material biológico sin extraer, con los datos espectroscópicos de compuestos conocidos reportados en bases de datos. La

identificación temprana de compuestos conocidos y su actividad biológica reportada o potencial permite concentrar los esfuerzos del trabajo en el laboratorio hacia el descubrimiento de compuestos nuevos (1).

Si bien la derreplicación no es un concepto nuevo (143,144), éste ha ganado importancia en los últimos años debido al incremento en la sensibilidad de los instrumentos analíticos (145). Las primeras estrategias de derreplicación se enfocaron mayormente en extractos de plantas, donde la habilidad de caracterizarlas taxonómicamente basados en morfología (al menos a nivel género) permitía prever la presencia de compuestos conocidos aislados de los taxones bajo investigación, trabajo que se hacía tradicionalmente desde la revisión bibliográfica (141). Sin embargo, esta aplicación de la derreplicación se ve seriamente limitada cuando se aplica a organismos cuya taxonomía no es clara o siquiera conocida (141,145).

Tradicionalmente, el proceso de derreplicación involucra la extracción del organismo fuente, seguida de su análisis por técnicas espectrométricas o espectroscópicas acopladas a cromatografía, cada una con sus propias ventajas y limitaciones. Las aproximaciones más comunes han sido GC-MS LC-UV, LC-MS, LC-MS/MS y LC-NMR o combinaciones de estas (146–148). Dentro de estas, los métodos de derreplicación que se basan en el uso de LC-MS y LC-MS/MS han mostrado ser muy sensibles y proveen información estructural (masa molecular de baja o de alta resolución, fórmula molecular), las cuales se pueden usar para la búsqueda en la mayoría de las bases de datos comerciales (145).

A pesar de los avances instrumentales en la identificación de compuestos, las herramientas computacionales para derreplicación están aún en etapas de desarrollo. La investigación en metabolómica ha estimulado el desarrollo de métodos computacionales precisos para la identificación rápida y de alto rendimiento (*high-throughput*) de compuestos en mezclas biológicas complejas (137). Afortunadamente, los estudios en productos naturales y la metabolómica comparten usan las mismas técnicas de identificación de compuestos, y se considera que son “dos caras de la misma moneda”(1, 11).

Si bien, durante la década de 1960 se desarrollaron los primeros métodos computacionales para el análisis de espectros de masas de moléculas pequeñas (usualmente moléculas por

debajo de 3000 Da (150–153), actualmente, el análisis computacional por espectrometría de masas de moléculas pequeñas es visto como más complejo y menos desarrollado que la proteómica computacional la cual se desarrolló tres décadas después (154–157). Esto gracias a que se han de asumir retos computacionales mayores debido a la gran diversidad estructural de los compuestos y a sus patrones de fragmentación poco usuales y muy característicos de cada tipo de compuestos (158).

En este sentido, uno de los desarrollos computacionales más recientes es el concepto de redes espectrales, también conocido como redes moleculares (159), el cual fue introducido por Bandeira et al. en 2007 (160) y hace referencia al uso de algoritmos de alineamiento para relacionar compuestos sin tener como requisito conocer su identidad (161,162). El análisis por redes (*networks*) de sistemas no matemáticos surge a partir de la publicación de los documentos de Watts y Strogatz en 1998 (163) y Barabási y Albert en 1999 (164). Estos documentos son las piedras angulares que popularizaron la noción de que sistemas complejos pueden ser vistos como redes en las cuales los componentes del sistema son representados como nodos y las conexiones entre ellos (*edges*), representan sus interacciones (165). Esta aproximación ha sido aplicada a muchas disciplinas, incluyendo sistemas biológicos, sociales, neurociencia y ciencias de la computación (166).

En el caso de las redes moleculares o redes espectrales, los nodos corresponden a espectros y las conexiones entre ellos representan la semejanza entre pares de espectros. Las redes moleculares permiten de esta manera descubrir variantes novedosas de compuestos conocidos, así como nuevas familias de compuestos, relacionándose así con el concepto de derreplicación previamente presentado (158,159). Adicionalmente, la alta sensibilidad de la espectrometría de masas junto la información estructural que esta técnica provee, hace posible la detección y en algunos casos la identificación de compuestos minoritarios que difícilmente serían detectables o aislables por las metodologías tradicionales de un laboratorio de productos naturales (167).

La aproximación de la derreplicación por redes moleculares analiza los componentes conectados de una red molecular. En contraste con la aproximación tradicional por librerías de espectros en la cual únicamente se comparan espectros que tengan el ion molecular de la misma masa, las redes moleculares revelan la relación entre espectros con diferente ion

molecular, pero que comparten el perfil de fragmentación lo que permite analizar diferentes variaciones de compuestos relacionados (158). Estos perfiles de fragmentación son obtenidos a partir del espectro MS/MS de los compuestos presentes en el extracto o fracción analizada. De esta manera, desde que haya un espectro anotado dentro de los elementos conectados de una red espectral, su anotación puede propagarse a todos los componentes que se encuentren conectados (160).

De otro lado, *Purpureocillium lilacinum*, el hongo seleccionado para aplicar las técnicas de derreplicación, fue descrito inicialmente como *Penicillium lilacinum* en 1910 y luego reportado como *Paecilomyces lilacinus*, hasta el 2011 cuando empezó a ser descrito como perteneciente al nuevo género *Purpureocillium* (168,169). Bajo todos estos nombres, este microorganismo ha venido siendo estudiado por la producción de compuestos activos de diferentes familias químicas como polisacáridos, α -pironas, xanthonas, antraquinonas y péptidos, entre otros (170–174). Dentro de los péptidos, son especialmente importantes leucinostatinas, que empezaron a ser estudiadas por su actividad antimicrobiana (175,176). Arai et al. (175) inicialmente describieron a las Leucinostatinas como antibióticos de tipo peptídico con un alto contenido de residuos de leucina, de las que deriva su nombre. Posteriormente, en 1980 empiezan a proponerse la composición y estructura de esta familia de antibióticos (177,178), de la cual se han descrito 24 estructuras (179,180). Estos compuestos conocidos son susceptibles de ser derreplicados por las diferentes técnicas antes descritas y de esta forma permitirá enfocar los esfuerzos en fracciones y compuestos de interés, ya sea por la novedad de sus estructuras o por su actividad biológica.

En este capítulo se presenta la aplicación de dos técnicas de derreplicación para la identificación preliminar de los posibles compuestos responsables de la actividad antimicrobiana presentes en extractos de *Purpureocillium lilacinum* PNM-67. En una primera aproximación, se presentarán los resultados obtenidos al aplicar la derreplicación directa del ion pseudomolecular en la base de datos Antimarin (base de datos de compuestos obtenidos de organismos marinos y microorganismos). En una segunda aproximación, se hará la derreplicación por la construcción de redes moleculares con espectros MS/MS con las herramientas ofrecidas por GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking).

3.1 Metodología

3.1.1 Análisis por LC-MS/MS

Los análisis por LC-MS/MS se realizaron en INDICASAT (Pánama), en el grupo de investigación del Dr. Marcelino Gutierrez, siguiendo el protocolo que se describe a continuación: Las muestras fueron analizadas usando un equipo de UHPLC Agilent 1290 Infinity acoplado a un detector micrOTOF-QF III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). El escaneo de masas MS se realizó en un rango de m/z entre 50-2500, mientras que el escaneo MS/MS se hizo en un rango de m/z entre 50-1800. Las condiciones de ESI fueron: modo positivo; temperatura del capilar 200°C ;4.5 kV VCap; el nebulizador fue fijado en 2.0 Bar; y un flujo de gas de 8 mL/min. Para el escaneo de MS/MS se usó el modo “auto MS/MS” con los siguientes parámetros: energía de colisión de 10.0 eV; presión en el analizador por tiempo de vuelo (TOF) se mantuvo a menos de 3.0×10^{-7} Torr. La fracción metanólica del hongo PNM-67 junto con el blanco de medio, fueron disueltas en metanol para obtener una concentración final de 0.6 mg/mL y fueron inyectadas en una columna Phenomenex Kinetex C18 reversed-phase high-performance (50×2.10 mm, $1.7 \mu\text{m}$). Los solventes usados en la elución fueron: agua con ácido fórmico 0.1 % (fase A) y metanol (fase B). El análisis cromatográfico inició con 10 % de la fase B y se incrementó de forma lineal hasta 100% en 7 minutos, manteniendo esta proporción por otros 9 minutos, para volver a las condiciones iniciales en 1 minuto. El flujo fue de 0,3 mL/min. El instrumento fue calibrado usando un patrón de reserpina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

3.1.2 Derreplicación directa

- **Conversión de datos**

Una vez adquiridos los datos de masas fueron calibrados y convertidos al formato *.mzXML* en el programa *DataAnalysis* de Bruker, para poder ser analizados en el programa *MZmine 2.19*.

- **Tratamiento por *MZmine 2.19***

Este programa permite la construcción de matrices de datos de masas que en este caso se utilizaron para la derreplicación directa. Para la construcción de dichas matrices se siguió un proceso que incluyó los siguientes pasos: filtrado de ruido, detección de masas, construcción

de cromatogramas, deconvolución de picos, filtrado de isótopos, detección de aductos y finalmente un alineamiento entre las réplicas de cada fracción y los blancos de medio. Este programa es de libre acceso y la descripción de los módulos utilizados que se presenta a continuación se hizo con base en el manual del programa (181).

- Filtrado de datos crudos (*Raw data filtering*)

Este módulo contiene varias formas de filtrado que pueden ser aplicadas a todos los archivos de datos crudos. En este estudio se utilizó la corrección de línea base (*Baseline correction*), la cual fue diseñada para compensar cambios graduales en la línea base del cromatograma mediante la detección de la línea base y sustrayéndola de los valores de intensidad de los datos crudos. Los parámetros usados en este módulo fueron: *m/z bin width* de 1.000; *Smoothing* de 100000; *Asymmetry* 0.001.

- Detección de masas (*Mass detection*)

En este módulo se generan unas listas de masas (iones) por cada *scan* en los archivos de los datos crudos. En este estudio se usó el algoritmo *Centroid mass detector*, el cual asume que cada señal por encima de un nivel dado de ruido es un ion detectado. El nivel de ruido por tanto se define como la mínima intensidad de un dato puntual para ser considerado parte del cromatograma y todos los datos por debajo de ese nivel de intensidad serán ignorados. Ese nivel se determina de acuerdo a la calidad de los datos, es especialmente útil tener en cuenta inyecciones que no incluyan muestra (inyecciones del solvente usado para disolver las muestras). En este estudio se usó un nivel de ruido de 8.0×10^3 .

- Construcción de cromatogramas (*Chromatogram building*)

Este módulo toma las listas de masas generadas para cada *MS scan* y construye un cromatograma para cada masa que pueda ser detectada continuamente a lo largo de los *scans* generando finalmente una lista depurada de picos. Este módulo usa parámetros de tolerancia de *m/z* (*m/z tolerance*), duración mínima en tiempo (*Min time span*) y altura mínima (*Min height*); para el estudio se utilizaron 0.05 *m/z*, 0.2 min, 1.0×10^3 , respectivamente. La lista de masas creada en el paso anterior, es procesada en orden decreciente de intensidad y cada ion es conectado con el cromatograma apropiado de acuerdo al parámetro de tolerancia de *m/z*. Cuando no se encuentra un cromatograma que

coincida, un nuevo cromatograma es creado con la m/z del ion. Cuando un cromatograma es terminado (no hay más picos con m/z a los cuales ser conectado), su duración en tiempo (*time span*) e intensidad (*height*) son evaluadas de acuerdo a los parámetros establecidos. Aquellos cromatogramas que se ajusten a los parámetros son añadidos a la lista de picos final.

- Deconvolución de picos (*Peak deconvolution*)

Luego de la construcción de cromatogramas es necesaria la deconvolución de picos individuales. En el programa se ofrecen varios algoritmos que permiten hacer este proceso. Para este estudio fue utilizado *Baseline cut-off*, este algoritmo remueve la parte más baja de los cromatogramas debajo de una línea base determinada. Los picos que estén por encima del nivel de la línea base son reconocidos si completan los requerimientos mínimos de altura y duración. Los parámetros usados fueron: *Baseline level* 8.0×10^3 ; *Min peak height* 1.0×10^4 ; *Peak duration range* 0.2-4.0 min.

- Agrupamiento de isótopos (*Isotopic peak grouper*)

Este módulo pretende encontrar aquellos picos en la lista de picos que hagan parte del mismo patrón isotópico. Cuando estos picos son encontrados, solamente aquel pico más alto se mantiene en la lista. Los parámetros usados fueron: *m/z tolerance* 1.2 m/z *Retention time tolerance* 0.2 min.

- Detección de aductos (*Adduct search*)

Este módulo identifica y etiqueta los aductos presentes en una lista de picos. Los aductos son identificados bajo dos condiciones: el tiempo de retención del ion original y del aducto debe ser el mismo; y la diferencia de masa entre el ion original y el aducto debe ser igual a uno de los aductos seleccionados como posibles. Los parámetros usados en este módulo fueron: *Retention time tolerance* 0.05 min; *m/z tolerance* 0.05 m/z ; *Max relative adduct peak height* 100 %.

- Alineamiento

El propósito del alineamiento es unir picos correspondientes encontrados en diferentes muestras en la lista de picos. De esta manera se genera una matriz en donde se relacionan los

picos de la lista de picos, ubicados en las filas, con las muestras o archivos de datos crudos, los cuales serán ubicados en las columnas. Esto permite reconocer los picos en común que las fracciones comparten y los picos que estas fracciones comparten con los blancos de medio de cultivo, permitiendo excluir estos últimos del análisis.

El algoritmo usado fue *RANSAC alignment*, este alinea en la primera ronda cada muestra contra la lista de picos en la primera muestra y luego sobre el promedio de todas las listas de picos alineados, en el resto del proceso. Este proceso corrige cualquier desviación lineal o no lineal en los tiempos de retención de los cromatogramas mediante la creación de un modelo de desviación. Los parámetros utilizados en este módulo son: *m/z tolerance* 0.15 m/z; *Retention time tolerance* 0.5 min; *Retention time tolerance after correction* 0.1 min; *RANSAC Iterations* 100000; *Minimum number of points* 60.

▪ Derreplicación

Una vez obtenida la matriz de alineamiento, esta se exportó a Excel y allí se eliminaron aquellos picos que coincidían con los blancos de solvente y de medio de cultivo, así como los picos etiquetados como aductos. De tal manera se obtuvo una lista depurada de los picos presentes en la muestra y estos fueron derreplicados manualmente haciendo uso de las bases de datos especializadas en compuestos aislados de organismos marinos y microorganismos Antimarin 2013.

3.1.3 Construcción de redes neurales

Para la construcción de estas redes se hizo uso de la plataforma libre *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS, <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>)(74). Los archivos de cromatografía luego de ser calibrados y convertidos al formato *.mzXML* en el programa *DataAnalysis* de Bruker son cargados a la plataforma mediante el programa de libre acceso *Filezilla* (<https://filezilla-project.org>). Una vez cargados, en esta plataforma se seleccionan las muestras con las cuales se desea construir las redes, las librerías de espectros a las cuales se tiene acceso desde la plataforma (Librerías de GNPS que incluyen espectros del MassBank, ReSpect y NIST) y los parámetros de construcción de las redes.

Los datos son inicialmente simplificados formando espectros consenso donde espectros que exhiban picos precursores, relación masa-carga (m/z) y patrones de fragmentación idénticos son unidos. Para simplificar los datos, estos primero fueron filtrados removiendo todos los picos de MS/MS en un rango de ± 17 Da alrededor del ion precursor. Luego se filtraron los espectros de masas, de tal manera que, en cada ventana de 50 Da a lo largo del espectro se escogieron sólo los seis picos de mayor intensidad. Luego los datos fueron agrupados en *MS-Cluster* con una tolerancia de masa del ion precursor de 2.0 Da y una tolerancia de masa para los fragmentos de MS/MS de 0.3 Da, creando así los espectros consenso. Los espectros consenso que al final del proceso sólo contengan un espectro fueron descartados.

Posteriormente, con estos espectros consenso se calcularon vectores de semejanza, para cada posible par de espectros se determinó el grado de similitud con un cálculo de coseno modificado que toma en cuenta las intensidades relativas de los fragmentos, así como la diferencia de m/z del ion precursor entre los espectros que están siendo comparados (159). Los pares de espectros que tienen semejanzas significativas (es decir, con un mínimo de seis fragmentos coincidentes y un valor de coseno mayor a 0.69) son reportados como una red molecular donde a cada espectro se le permitió conectarse a 10 espectros con los que presente mayor valor de coseno. Un valor de coseno de 1 indica que los espectros son idénticos y un valor cercano a cero que son muy diferentes.

Finalmente, estos datos fueron importados al programa de visualización gratuito *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org>) para la visualización de las redes de MS/MS. *Cytoscape* produce una representación visual de las redes moleculares, para la visualización se utilizó el algoritmo *Force-directed layout*. En la visualización cada nodo representa un espectro consenso para un ion padre dado y el grosor de las conexiones indica el valor de semejanza entre el par de espectros conectados, para valores mayores de semejanza el grosor de la conexión será mayor. Las redes moleculares fueron construidas teniendo tanto los archivos de las muestras de interés como los blancos de medio y de solvente. De esta forma, se eliminaron aquellas redes que contenían espectros consenso provenientes de los archivos de los blancos.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Derreplicación directa

Al analizar los datos de HPLC-MS/MS haciendo uso del programa *MZmine 2.19* para la fracción metanólica de la cepa PNM-67 cultivada en el medio PDB se obtuvo una lista de 95 picos de m/z superiores a 400. No se tuvieron en cuenta masas por debajo de m/z 400 ya que muchas de ellas coincidían con picos del medio.

Cada una de las masas de esta lista fueron buscadas en la base de datos Antimarin versión 2013, encontrando que 11 de ellas presentaron coincidencias con sustancias previamente reportadas para hongos del género *Purpureocillium*, diez pertenecientes a la familia de las leucinostatinas y una de ellas con la Sphingofungina-F (Tabla 3-1); 54 coincidieron con sustancias reportadas para otros géneros de hongos (algunas de ellas presentaron coincidencia con más de una molécula) y 30 picos no presentaron coincidencias (Figura 3-1), sugiriendo que aproximadamente uno de cada tres compuestos detectados en el extracto podría ser nuevo.

Las leucinostatinas, cuya estructura se presentará más adelante en este capítulo, son una clase de antibióticos peptídicos lineales que se caracterizan por tener en su estructura nueve residuos incluyendo aminoácidos no proteínogénicos como la *cis*-4-metil-L-prolina, hidroxileucina y α -Aib, así como residuos de ácidos grasos en el N-terminal (179,182). Esta molécula anfifílica muestra una alta preferencia por las conformaciones en α -hélice incluyendo motivos 3_{10} -helicoidales, debida a la presencia del residuo Aib (183), relacionados con la actividad biológica encontrada en la leucinostatinas (49,51). La mayoría de los miembros de esta familia de péptidos tienen actividad antimicrobiana reportada (135,176,185) y para algunos de ellos se han reportado otras actividades, como antiviral (186), antiprotozoaria (187), contra el cáncer (188), entre otras (189,190). Por su lado, la Sphingofungina F, hace parte de la familia de las sphingofunginas que son compuestos tipo esfingosina y son inhibidores de la enzima serinpalmitoil transferasa (191,192). Algunos de los miembros de esta familia poseen potente actividad antifúngica, sin embargo la Sphingofungina F mostró una actividad moderada en estos ensayos (174,193).

Figura 3-1: Diagrama de resumen de los resultados de derreplicación directa para la fracción metanólica del hongo PNM-67 sembrado en PDB.



Tabla 3-1: Coincidencias presentadas con moléculas reportadas para especies del género *Purpureocillium*.

Nombre	m/z observado	$[M+H]^+$ Reportado
Leucinostatina K	1234.7768	1234.8399
Leucinostatina A; Leucinostatina U	1218.7944	1218.8399
Leucinostatina R	1202.7969	1202.8499
Leucinostatina A2	1200.7882	1200.8299
Leucinostatina B2	1186.7711	1186.8199
Leucinostatina H	1134.7398	1134.79
Leucinostatina N	1120.7329	1120.77
Leucinostatina D	1118.7475	1118.79
Leucinostatina F	1104.7249	1104.78
Leucinostatina C; Leucinostatina T	1090.7222	1090.76
Sphingofungina F	402.3037	402.2850

De otro lado, en cuanto a las moléculas sin coincidencias pueden interpretarse como posibles compuestos nuevos (Tabla 3-2). Sin embargo, es muy poca la información que nos proporciona la relación masa - carga (m/z) para proponer una posible identidad. Entre estos iones de compuestos posiblemente nuevos, 14 presentan masas por encima de 1090 m/z , estos por la

presencia de las leucinostatinas podrían estar relacionados con esta familia de moléculas, cuyos iones moleculares reportados se encuentran en valores de m/z entre 1090 y 1314 (179).

Tabla 3-2: Picos sin coincidencias con la base de datos Antimarin caracterizados por sus m/z observados.

	m/z observado		m/z observado		m/z observado
1	1355.7700	11	1108.7100	21	883.5624
2	1334.7938	12	1106.7289	22	860.5608
3	1333.7709	13	1105.7469	23	856.5630
4	1250.8047	14	1091.7272	24	839.5387
5	1221.8052	15	1045.6578	25	834.5728
6	1220.1517	16	1026.3315	26	814.5330
7	1182.3385	17	945.6059	27	796.4736
8	1172.7646	18	939.2930	28	795.5179
9	1143.8047	19	927.5549	29	790.5512
10	1132.7574	20	905.5695	30	734.5343

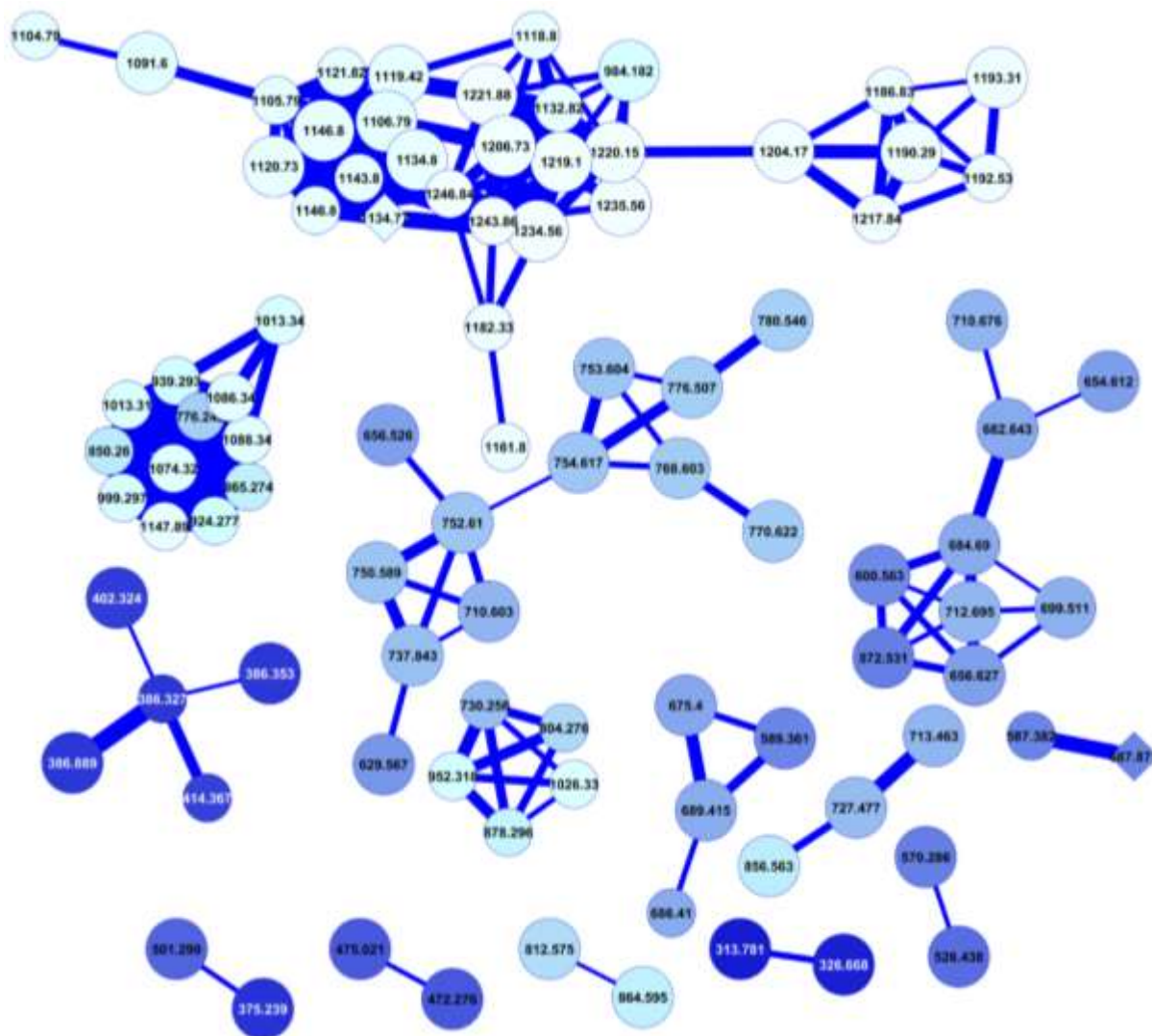
3.2.2 Derreplicación por redes moleculares

Una de las limitaciones de la derreplicación directa es que sólo se compara la masa de ion molecular $[M+H]^+$ con las bases datos, desaprovechando así la información sobre la estructura que podría brindar un espectro de MS/MS. La fragmentación en espectrometría de masas de cada molécula individual puede resultar en un espectro único y característico de MS/MS. Estos pueden ser aprovechados para la construcción de redes neurales que organicen grandes conjuntos de datos de espectros de masas basados en semejanza entre los patrones de fragmentación de iones precursores diferentes pero relacionados por su fragmentación (159). Dentro de las ventajas del uso de redes moleculares se encuentra que al estar organizados los espectros por similitud en su patrón de fragmentación la identificación de análogos y compuestos relacionados se vuelve más fácil.

En la Figura 3-2 se muestra la red molecular construida para la fracción metanólica de la cepa PNM-67 cultivada en PDB. Donde cada círculo representa un espectro identificado por la masa

de su ion precursor $[M+H]^+$ y el grosor de las conexiones indica el valor de semejanza entre el par de espectros conectados, establecido por la similitud en su patrón de fragmentación observado por MS/MS. Para valores mayores de semejanza el grosor de la conexión será mayor. Dentro de la red se observan dos rombos que representan espectros de la muestra que tuvieron coincidencias con espectros en las librerías de GNPS, la Leucinostatina H (m/z 1134,77; semejanza de 0.73) y la Sansalvamida A (m/z 587,87; semejanza 0.71). El valor mínimo de semejanza para reportar coincidencia con la base de datos fue fijado en 0.69, generalmente se usan valores entre 0,5 y 0,7 en este tipo de trabajos (159).

Figura 3-2: Red molecular para la fracción metanólica del extracto obtenido del cultivo en PDB del hongo PNM-67.

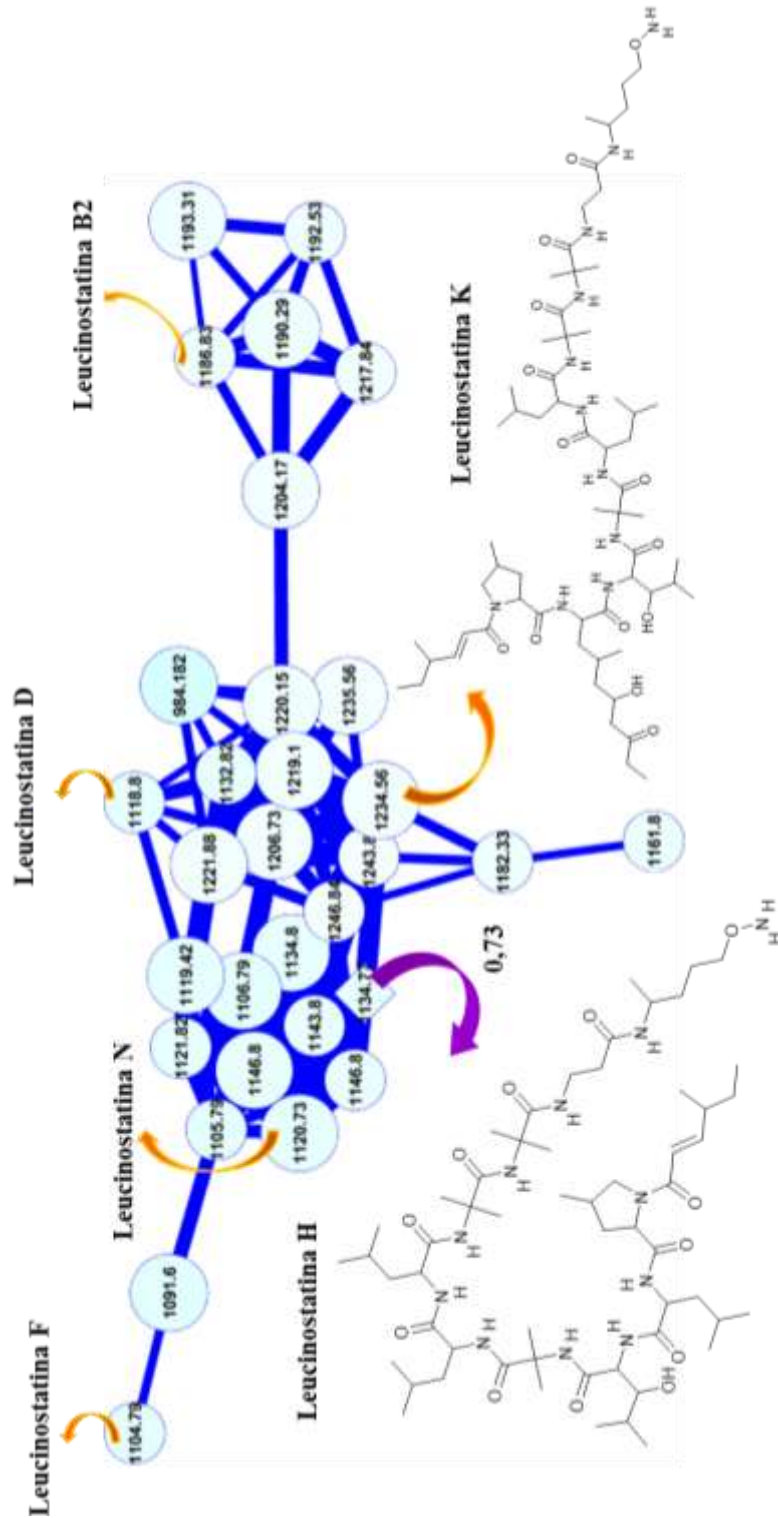


A pesar del bajo número de coincidencias con las bases de datos de MS/MS disponibles en la plataforma de GNPS, la red molecular nos permite relacionar 30 iones más con las Leucinostatinas (Figura 3-3), dentro de los que se espera encontrar otros miembros de esta familia de compuestos, análogos u otros péptidos relacionados. En esta red se confirma la presencia de las leucinostatinas B2 (m/z 1186.83), D (m/z 1118.80), F (m/z 1104.79) y K (m/z 1234.56), compuestos identificados según el procedimiento de derreplicación directa mostrado en la Tabla 3-1. Sin embargo, su identificación se asume como tentativa ya que no se conectaron directamente a un espectro en las librerías de referencia. Esto puede deberse a que no se encuentren estos espectros en las librerías o a que no cumplen con los parámetros establecidos para el análisis. De los compuestos derreplicados por el método directo mostrados en la Tabla 3-1 sólo seis leucinostatinas se encuentran en la red molecular, probablemente porque su fragmentación no se ajustó a los parámetros de formación de las redes moleculares, puesto que se requieren al menos seis iones en cada espectro para generar los espectros consenso y con estos calcular los valores de semejanza.

Dentro de la red de las leucinostatinas también es posible encontrar siete de los iones que se habían propuesto como posibles compuestos nuevos mediante la derreplicación directa (m/z 1221.8052, 1220.1517, 1182.3385, 1143.8047, 1132.7574, 1105.7469 y 1091.7272), de tal manera que se confirma el supuesto de su relación con las leucinostatinas el cual se había hecho de acuerdo con rango de m/z en el cual se encontraban.

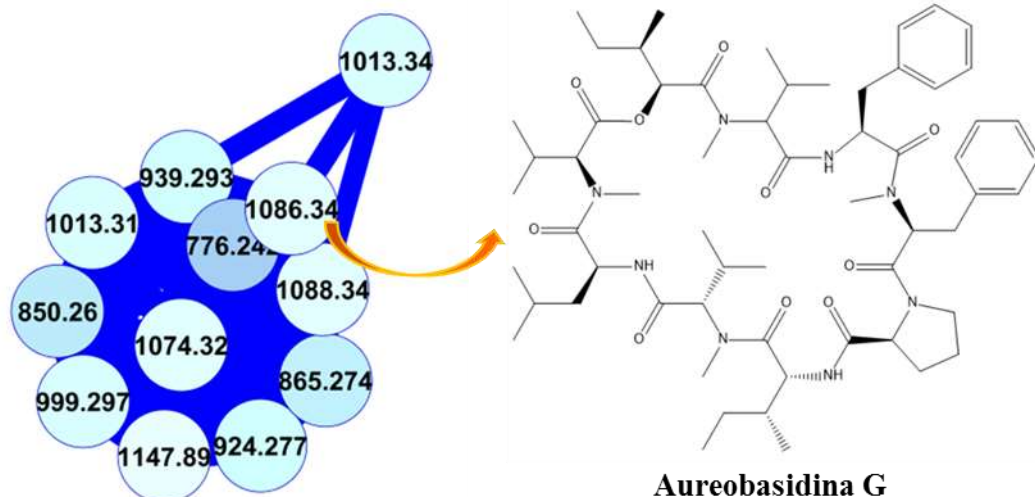
La otra coincidencia con la librería de espectros fue con la sansalvamida A. Este compuesto es un depsipéptido cíclico de cinco residuos, aislado de un hongo del género *Fusarium*, recuperado de un pasto marino *Halodule wrightii* recolectado dentro de la laguna de Little San Salvador Island, Bahamas (118). Este compuesto junto con sus análogos sintéticos ha mostrado una potente actividad contra células tumorales (118,194,195).

Figura 3-3: Red molecular que contiene a las Leucinostatinas. El rombo marca la coincidencia con la base de datos por comparación de los espectros de MS/MS. También se señalan algunas masas que dieron coincidencia por el método de derreplicación directa.



De otro lado, en la Figura 3-4 se observa la ampliación de la red molecular en dónde se relacionan iones cuya masa coincide con compuestos tipo aureobasidinas (m/z 1074.32, m/z 1086.34, m/z 1088.34) por el método de derreplicación directa. Las aureobasidinas son péptidos cíclicos reportados para el hongo *Aureobasidium pullulans* (116,196–198) por lo que no sería común encontrarlas en hongos de un género diferente. Sin embargo, el hecho de que estos iones se agrupen en una misma red molecular nos confirma una relación estructural entre sí, lo que nos indica que pueden tratarse de péptidos semejantes a las aureobasidinas.

Figura 3-4: Red molecular que relaciona los iones 1074,32, 1086,34 y 1088,34 que coincidieron por derreplicación directa con miembros de la familia de las Aureobasidinas, U2, G y B respectivamente.



En cuanto a las otras redes con los espectros consenso no analizados y que cuya masa de ion pseudomolecular no coincide con la lista de derreplicación directa, no se pueden hacer conclusiones acerca de su identidad. De acuerdo al análisis de las redes moleculares sólo se puede asegurar que son metabolitos producidos por el hongo que no están estructuralmente relacionados con componentes del medio de cultivo.

Finalmente, el número total de espectros consenso en la red molecular que se muestra en la Figura 3-2 es de 93, con masas por encima de 313.78 m/z . Este es un número cercano al número de los picos que se analizaron por la técnica de derreplicación directa (95 compuestos con iones por encima de 400 m/z). Sin embargo, hay que recordar que las dos técnicas tienen

métodos de filtrado que evalúan parámetros de calidad diferentes. En la derreplicación directa se tienen en cuenta parámetros como la intensidad y la presencia por un determinado tiempo de retención de los iones en el primer escaneo de masas, asumiendo los picos como iones pseudomoleculares. Mientras que los parámetros de las redes moleculares se enfocan más en la fragmentación de cada ion pseudomolecular.

De esta manera, los dos métodos nos permiten dar cuenta de la riqueza metabólica de la cepa estudiada. De los iones detectados por los dos métodos algunos se pudieron relacionar con las leucinostatinas, 17 en el caso de la derreplicación directa (diez por comparación en la base de datos y siete más que se encontraron en la red molecular de las leucinostatinas) y 31 para la derreplicación a través de redes moleculares. El resto de los iones, 78 en el primer caso y 62 para el segundo, pertenecen a otro tipo de compuestos, mostrando así la diversidad química que puede ser encontrada en este microorganismo.

Una de las mayores limitantes de las técnicas de derreplicación, en general, es la cantidad de información contenida en las bases de datos con las que se compara la información obtenida de las muestras (137,167). En el caso de las redes moleculares, la limitante es más evidente, puesto que siendo una herramienta reciente y que además se basa en la comparación de todo el espectro de masas de las moléculas y no sólo en la comparación de algunos valores de masas, sus bases de datos no son tan nutridas ni tan variadas como se requiere. De acuerdo con los creadores de la plataforma GNPS, sólo el 1.01% de todos los datos analizados han encontrado coincidencia con espectros en la base de datos (74), lo que da cuenta de las limitaciones de la librería. Es así como se entienden las bajas coincidencias de los datos aquí analizado con espectros en las librerías. Sin embargo, vale la pena anotar que la plataforma permite que se ingresen nuevos espectros anotados, por lo que su uso y retroalimentación por los usuarios permitirá en un futuro aumentar la base de datos de la plataforma GNPS.

3.3 Conclusiones

El análisis por derreplicación directa permitió la identificación de diez leucinostatinas (tabla 3-1) y de la sphingofungin-F, apoyados en la información del ion pseudomolecular $[M+H]^+$ y la información disponible en la base de datos Antimarin. Esta misma derreplicación mostró la

existencia de 30 iones sin coincidencias en las bases de datos, dando una buena idea de la alta diversidad metabólica presente en el extracto metanólico de *P. lilacinum*.

La construcción de redes moleculares permitió identificar, dos moléculas por semejanza con espectros en las librerías a la leucinostatina H y a la sansalvamida A, junto con posibles compuestos nuevos análogos de las Leucinostatinas y una familia de péptidos similares a las aureobasidinas. Las Leucinostatinas son propuestas como las posibles responsables de la actividad antimicrobiana aquí encontrada, ya que son los compuestos más predominantes en el análisis y su actividad ha sido ampliamente reportada. Adicionalmente, las redes moleculares permitieron la detección de 30 espectros consenso relacionadas con las leucinostatinas.

De esta manera se estableció que el hongo *Purpureocillum lilacinum* PNM-67 es un productor de compuestos peptídicos, particularmente de leucinostatinas. Las técnicas de derreplicación mostraron que su fracción metanólica del extracto en acetato de etilo puede contener una diversidad interesante de compuestos diferentes al medio de cultivo (95 por derreplicación directa y 93 por redes moleculares), que valdría la pena explorar.

.

4. Aislamiento e identificación de compuestos a partir del extracto del cultivo de *Purpureocillium lilacinum*.

La cepa *Purpureocillium lilacinum* PNM-67, aislada del mar Caribe colombiano, fue inicialmente seleccionada para su análisis por técnicas de derreplicación debido a la actividad antimicrobiana que mostró la fracción metanólica de su extracto, contra las bacterias *B. gladioli* y *B. plantarii*. Esta especie ha sido reconocida por su actividad antimicrobiana y su uso como agente biocontrolador ha sido ampliamente reportado en literatura (124,134–136). Según los resultados de derreplicación, *P. lilacinum* PNM-67 mostró ser una cepa productora de compuestos peptídicos, especialmente de una familia de antibióticos denominados leucinostatinas. Estos compuestos deben su nombre a la presencia de varios residuos de leucina (175) y se caracterizan, además, por tener en su estructura una secuencia lineal de nueve residuos que incluyen aminoácidos no proteinogénicos como el ácido α -aminoisobutírico (α -Aib), *cis*-4-metil-L-prolina y β -hidroxileucina, así como residuos de ácidos grasos en el N-terminal (179,182).

A partir de estrategias derreplicación tradicional y derreplicación apoyada en redes moleculares, en el capítulo anterior se determinó la presencia de al menos 31 compuestos relacionados con las leucinostatinas. De estos se logró proponer la identidad de algunas leucinostatinas. Sin embargo, compuestos de otros tipos además de análogos de leucinostatinas fueron identificados en la mezcla, pero hasta el momento no se ha evaluado su papel como los posibles responsables de la actividad antimicrobiana encontrada.

En el presente capítulo, inicialmente se presentará los resultados de la evaluación de diferentes condiciones de cultivo, evaluando cultivos en agitación y estacionarios por una, dos y tres semanas. Luego, se presentarán los resultados del estudio químico de los extractos obtenidos de *P. lilacinum* para las dos condiciones de cultivo seleccionadas (cultivo en agitación por una semana y cultivo estacionario por tres semanas), realizado con la intención de confirmar la presencia de las leucinostatinas como los compuestos responsables de la actividad biológica. Aquí se reporta el aislamiento e identificación de cuatro compuestos obtenidos a partir del extracto en condiciones estacionarias de cultivo, a los que también se les evaluó su actividad antimicrobiana contra las bacterias *B. glumae*, *B. plantarii* y *B. gladioli*.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 General

Para los medios de cultivo se usó agua destilada, Glucosa R.A (Pareac, Barcelona, España), Peptona (OXOID, Hampshire, Inglaterra), Extracto de levadura (OXOID, Hampshire, Inglaterra), Papa comercial de variedad “pastusa”.

Las extracciones se realizaron con acetato de etilo (AcOEt) grado analítico (Merck, Darmstadt, Alemania) destilado. Para el fraccionamiento y las columnas abiertas se usó metanol (MeOH) para cromatografía líquida (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Alemania), n-hexano R.A. (Merck, Darmstadt, Alemania), AcOEt y agua desionizada y filtrada en un equipo de filtración Millipore Simplicity (Molsheim, Francia) y luego filtrada nuevamente a través de una membrana de nylon de tamaño de poro de 0.22 μm (CNW Technologies, Shanghai, China). Para los análisis cromatográficos por UHPLC se usó MeOH y acetonitrilo (MeCN) LiChrosolv grado cromatografía líquida (Merck, Darmstadt, Alemania).

Como soportes cromatográficos para cromatografía en columna abierta se usaron resinas Sephadex LH-20 Pharmacia Biotech (Upsala, Suecia) y RP-18 con tamaño de partícula 40-63 μm (Merck, Darmstadt, Alemania).

Para la cromatografía líquida preparativa se utilizó un equipo UHPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 (Germering, Alemania) con detector DAD y acoplado a un detector LT-ELSD Sedex 85 (Sedere, Alfortville, Francia).

Los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker Advance 400 (400.13 MHz) empleando como solventes CDCl_3 (Merck, Darmstadt, Alemania) con grado de deuteración 99.8 % y metanol- d_4 (Merck, Darmstadt, Alemania) con grado de deuteración 99.8 %, usando la señal residual del solvente como estándar interno, tomando para el cloroformo (δ_{H} 7.26; δ_{C} 77.0) y para el metanol (δ_{H} 3.31 and 4.87. δ_{C} 49.1).

Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies). La ionización se realizó bajo los siguientes parámetros: modo positivo; energía de colisión de 10 eV; el nebulizador fue fijado en 50 psi: el flujo de gas fue 11 L/min y la temperatura 325°C. El escaneo de masas MS se realizó en un rango de m/z entre 100-3000, mientras que el escaneo MS/MS se hizo en un rango de m/z entre 50-1500. Para el escaneo de MS/MS se usaron los siguientes parámetros: Fragmentor 175 V, Skimmer 75 V, Vpp 750 V.

4.1.2 Ensayos de actividad antimicrobiana

Los ensayos para evaluar los cambios en la producción de compuestos en diferentes condiciones de cultivo se realizaron en cajas de 96 pozos, siguiendo una modificación del método de microdilución en caldo (115). Cada extracto se probó en cuatro contracciones diferentes (300 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, 150 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, 75 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, 37.5 $\mu\text{g}/\text{pozo}$) cada una de ellas por triplicado. Se usaron como control positivo gentamicina en una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{pozo}$; y como control negativo se usó metanol y extracto del medio sin inocular. Se adicionó en cada pozo 200 μL KB líquido, 30 μL de inóculo de bacteria (las bacterias se cultivaron en medio líquido LB por 24 horas y su densidad óptica se ajustó a 0,5 para el ensayo) y 20 μL del extracto a ensayar en la concentración adecuada para lograr las cantidades arriba descritas por cada pozo. Para determinar el crecimiento o inhibición de los microorganismos se realizaron lecturas de densidad óptica en un equipo lector de placas AccuReader Metertech (Taipei, Taiwan) por absorbancia a 600 nm. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente con concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, 25 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, 6.2 $\mu\text{g}/\text{pozo}$.

4.1.3 Evaluación del efecto de la agitación y el tiempo de cultivo en la actividad antimicrobiana.

Se realizaron cultivos de la cepa PNM-67 en medio PDB de 100 mL de medio en Erlenmeyers de 500 mL, evaluando el cultivo con agitación y sin agitación, durante una, dos y tres semanas. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura y periodos de luz previamente descritos. La agitación se realizó en un agitador Orbital HD-3000 Dimaq (Medellín, Colombia) a 130 rpm. Los cultivos fueron extraídos con acetato de etilo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo 2. Los extractos se evaluaron en el bioensayo en las condiciones descritas en el numeral 4.1.2.

4.1.4 Cultivo y extracción en mayor volumen de la cepa PNM-67

Se realizaron dos tipos de cultivo a mayor volumen de la cepa PNM-67. En un caso, la cepa fue cultivada en Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de medio de 100 mL, durante tres semanas, sin agitación, en medio PDB, hasta lograr un volumen total de 3,8 L de medio de cultivo. La segunda técnica de cultivo incluyó el uso de agitación (130 rpm, en el equipo anteriormente descrito) en el mismo medio y volúmenes del cultivo anterior, por una semana, para lograr un volumen total del medio de cultivo de 4,3 L. Las extracciones se realizaron en AcOEt siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo 2. Luego de que el extracto se secó en el rotaevaporador se resuspendió MeOH y se filtró usando una pipeta con celita, esto con el objetivo de retener las esporas que por su tamaño no pudieron ser retiradas de otra forma. De esta manera se obtuvieron 873 mg de extracto del cultivo sin agitación (extracto E) y 1529 mg de extracto crudo con agitación (extracto A).

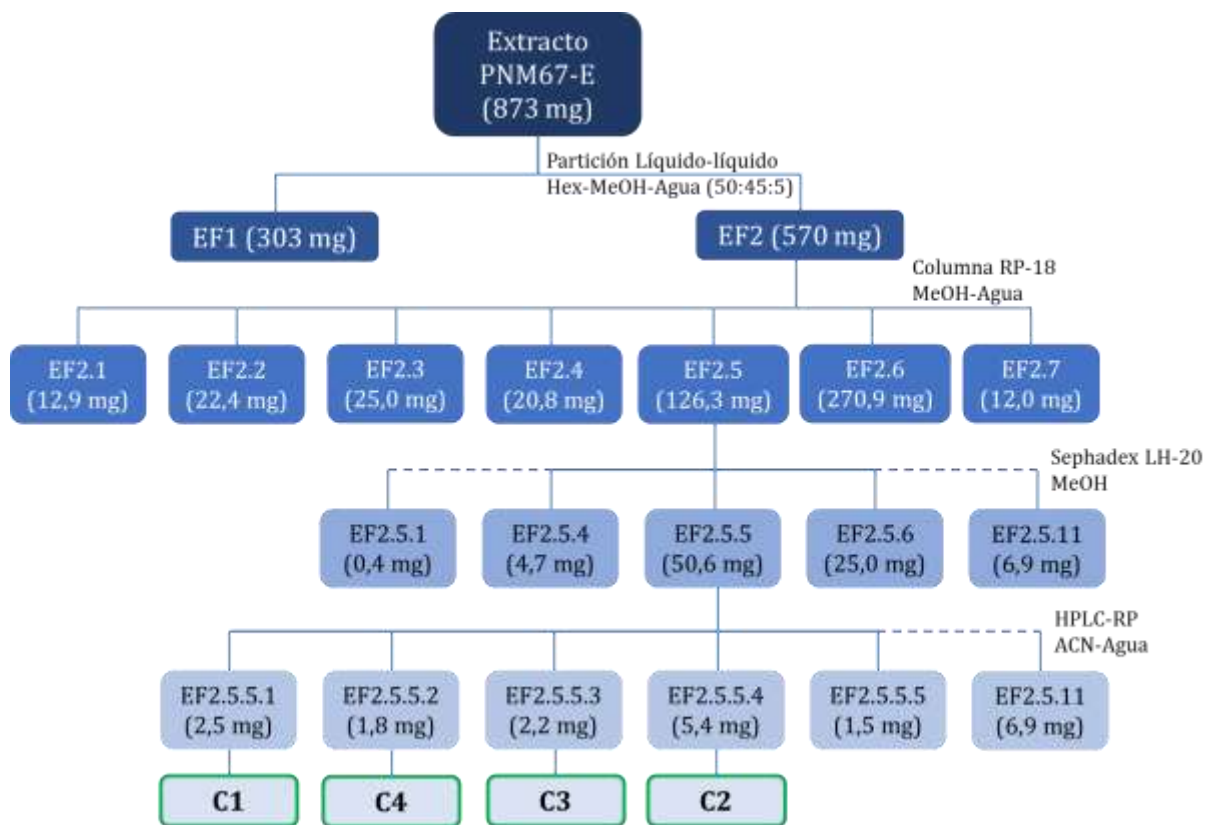
4.1.5 Fraccionamiento y aislamiento

- Extracto del cultivo estacionario de la cepa PNM-67

Se realizó una partición hexano/metanol-agua (50:45:5) como primer paso de fraccionamiento. Así, se obtuvo una fracción de hexano de 303 mg (EF1) y una de metanol-agua de 570 mg (EF2). Esta fracción metanol-agua se fraccionó por columna abierta de RP-18 utilizando como fase móvil mezclas de Metanol/Agua en un gradiente discontinuo de polaridad decreciente (0:10; 1:9; 3:7; 5:5; 7:3; 10:0) y una última fracción de Acetonitrilo para obtener seis fracciones (EF2.1 a EF2.6). Con la fracción eluida con metanol-agua 7:3 (EF2.5,

126 mg) se realizó una separación por exclusión por tamaño con una resina Sephadex LH-20 eluida con metanol, de la que se obtuvieron 11 fracciones EF2.5.1 a EF2.5.11. De una de ellas, EF2.5.5 (50 mg), se realizó cromatografía líquida preparativa en fase reversa utilizando una columna Kromasil C8 (10 x 250 mm, 5 μ m; flujo de 2 mL/min), de la que se logró aislar el compuesto **1** (2.5 mg), **2** (5.4 mg), **3** (1.8 mg) y **4** (2.2 mg) (Anexo A). El proceso de fraccionamiento del extracto E se resume en la Figura 4-1.

Figura 4-1: Esquema de separación del extracto de la cepa PNM-67 estacionario.

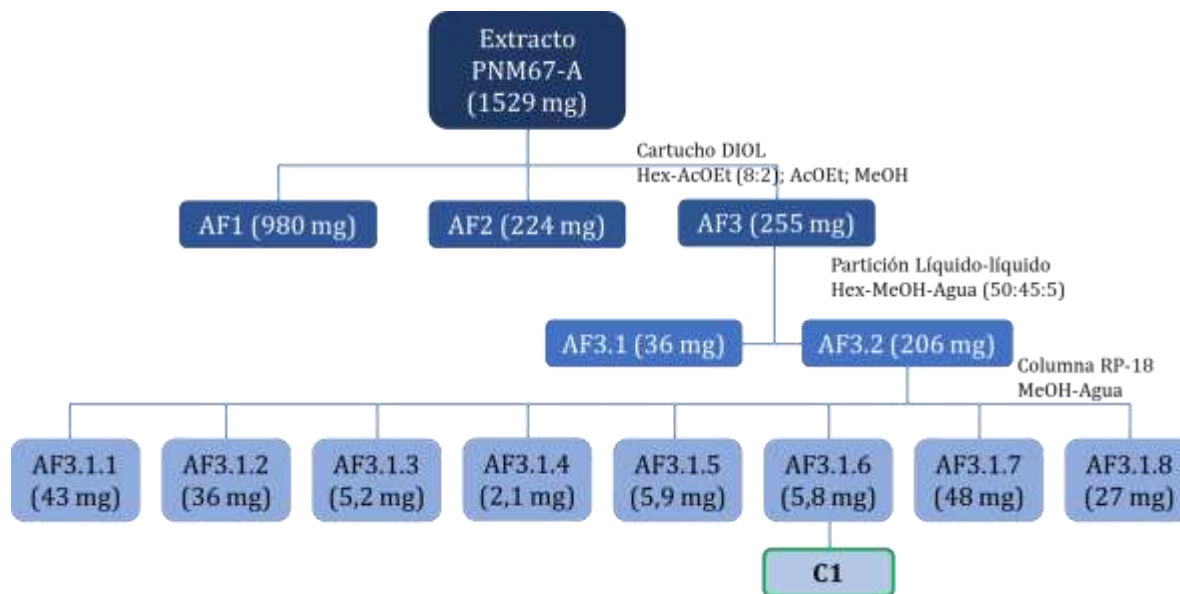


- Extracto del cultivo con agitación de la cepa PNM-67

El extracto obtenido del cultivo con agitación (extracto A) fue sometido a fraccionamiento en un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) DIOL de 5g para obtener tres fracciones: Hexano-AcOEt 8:2 (AF1); AcOE (AF2); MeO (AF3). Obteniendo 980 mg, 224 mg y 255 mg de estas fracciones, respectivamente. A la fracción metanólica se le hizo una partición hexano-metanol-agua (50:45:5) para retirar los compuestos de baja polaridad obteniendo dos fracciones AF3.1 (36 mg) y AF3.2 (206 mg). A esta fracción AF3.2 se le realizó un fraccionamiento en columna abierta RP-18 utilizando como fase móvil mezclas de Metanol-

Agua en un gradiente discontinuo de polaridad decreciente (3:7; 5:5; 7:3; 10:0), de la que se obtuvieron ocho fracciones AF3.2.1 a AF3.2.8. De este proceso, que se resume en la Figura 4-2, se logró aislar nuevamente el compuesto **1** (5.8 mg).

Figura 4-2: Esquema de separación del extracto de la cepa PNM-67 con agitación. (PNM67-A).



4.2 Resultados y discusión

La cepa *Purpureocillum lilacinum* PNM-67, seleccionada en este trabajo había mostrado previamente actividad contra las bacterias del género *Burkholderia* únicamente en el medio PDB, por lo que se decidió realizar su cultivo este medio.

En una primera aproximación a evaluar el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de compuestos bioactivos, se evaluó el efecto de la duración del cultivo (tiempo de cultivo) y la agitación sobre la inhibición del crecimiento bacteriano. Para esto se realizaron seis ensayos, tres de ellos se cultivaron con agitación (130 rpm) y tres de ellos estacionarios. Para los dos casos se realizó la extracción de uno de los cultivos en la semana uno, dos y tres.

A todos los extractos crudos se les evaluó la actividad antimicrobiana contra la bacteria *Burkholderia plantarii*, la cual es la más sensibles de las tres bacterias antes usadas, a cuatro

concentraciones diferentes (300 $\mu\text{g/pozo}$, 150 $\mu\text{g/pozo}$, 75 $\mu\text{g/pozo}$ y 37,5 $\mu\text{g/pozo}$). Las condiciones de cultivo con mejores resultados en la inhibición del crecimiento de las *B. plantarii*. fueron: el cultivo estacionario durante tres semanas, que presentó una clara diferencia en absorbancia respecto a los otros extractos hasta la concentración de 75 $\mu\text{g/pozo}$, y el cultivo durante una semana en agitación que lo hizo hasta los 150 $\mu\text{g/pozo}$. Basados en estos resultados, se escogieron estas dos condiciones para realizar los cultivos a mayor escala, ya que, aunque es más activo el cultivo estacionario por tres semanas, resulta interesante poder producir extractos activos en menor tiempo y en condiciones de agitación que son las más utilizadas en los cultivos a mayor escala.

La producción de extracto fue mayor para el cultivo PNM67-A que para el cultivo PNM67-E, mostrando que por cada 100 mL de cultivo en el primer caso se obtuvieron 35.6 mg mientras que para el cultivo estacionario se obtuvieron 23.0 mg. En los cultivos con agitación hay una mayor oxigenación, así como una disponibilidad más homogénea de nutrientes, lo que favorece la producción de biomasa y la masa de extracto obtenida. Sin embargo, la producción de biomasa no está necesariamente correlacionada con la producción de compuestos bioactivos, sino con la producción de moléculas de baja polaridad, como se evidencia en los diagramas de fraccionamiento, los cuales muestran a las fracciones menos polares del extracto como las que concentran la mayor cantidad de masa en el fraccionamiento. Adicionalmente, en el capítulo dos se mostró que las fracciones menos polares no presentaron actividad, la cual sólo se presentó en la fracción metanólica de este extracto. Por esta razón, la derreplicación (capítulo 3) y los trabajos de aislamiento y elucidación se centraron en los compuestos presentes en las fracciones de metanol. De este proceso de aislamiento se lograron aislar cuatro compuestos (1 a 4), cuya elucidación se presenta a continuación.

4.2.1 Elucidación del compuesto 1

El compuesto **1** se logró aislar de los dos cultivos realizados. Del cultivo con agitación (A) se obtuvieron 5,8 mg y del cultivo estacionario (E) se obtuvieron 2,5 mg. Su rotación óptica tuvo un valor de $[\alpha]_D = 50.0$ ($c = 0.22$, CHCl_3). La fórmula molecular del compuesto **1** se estableció como $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$ mediante el espectro de masas obtenido por HR-ESI-MS, el cual mostró un ión en m/z 453.2993 correspondiente al ión pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6^+$, 453.2959) y por el ión en m/z 475.2805 correspondiente al aducto de sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{NaO}_6^+$, 475.2851).

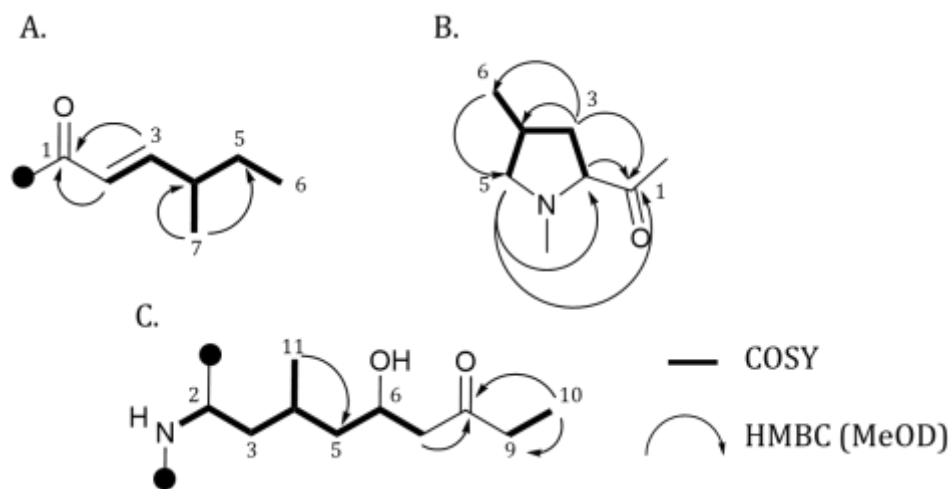
En el espectro de RMN-¹H (400 MHz, metanol-*d*₄ (MeOD), Tabla 4-1, Anexo B) se observaron señales para dos protones olefínicos en δ_{H} 6.64 (1H, dd, $J = 15.3, 8.1$ Hz) y 6.02 (1H, d, $J = 15.3, 0.7$ Hz), característicos de protones olefínicos con una configuración *trans*. También mostró tres señales de metinos unidos a heteroátomo en δ_{H} 4.44 (1H, m), 4.38 (1H, m) y 4.16 (1H, m). Se observaron señales para tres metilenos diasterotópicos en δ_{H} 3.88 (1H, m) y 3.17 (1H, m); δ_{H} 2.39 (1H, m) y 1.53 (1H, m); δ_{H} 1.77 (1H, m) y 1.55 (1H, m). Adicionalmente se observan otros cuatro metilenos homotópicos en δ_{H} 2.55 (2H, d, $J = 6.5$), 2.51 (2H, m), 1.39 (2H, m) y 1.36 (2H, m) junto con tres metinos en δ_{H} 2.28 (1H, m), 2.23 (1H, m) y 1.80 (1H, m). Finalmente, se observaron señales para cinco metilos δ_{H} 1.09 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 1.03 (3H, d, $J = 6.7$), 0.95-1.00 (6H, m) y 0.87 (3H, t, $J = 7.4$ Hz).

En los espectros de RMN-¹³C y APT (Attached Proton Test) (100 MHz, metanol-*d*₄, Tabla 4-1, Anexo C y D, respectivamente) se observan señales para 23 carbonos que se describirán a continuación: Una señal a campo bajo correspondiente al carbonilo de una cetona en δ_{C} 213.2 (C), dos carbonilos en δ_{C} 174.5 (C) y 167.2 (C), un doble enlace en δ_{C} 153.0 (CH) y 121.2 (CH), tres metinos enlazados a heteroátomo δ_{C} 66.9 (CH), 62.5 (CH) y 52.6 (CH), junto con una señal de metileno unido a heteroátomo en δ_{C} 55.9 (CH₂). Adicionalmente, se observaron señales para otros tres metinos en δ_{C} 39.6 (CH), 34.9 (CH) y 27.4 (CH), junto con seis señales más de metilenos en δ_{C} 50.9 (CH₂), 46.5 (CH₂), 40.6 (CH₂), 38.8 (CH₂), 37.5 (CH₂), y 30.1 (CH₂). Se observaron también señales para cinco metilos en δ_{C} 21.0 (CH₃), 19.6 (CH₃), 16.9 (CH₃), 12.0 (CH₃) y 7.8 (CH₃). Todos los experimentos monodimensionales para esta molécula fueron tomados en metanol-*d*₄ (MeOD) y cloroformo-*d* (CDCl₃).

La asignación de las señales del experimento de RMN-¹H a las de los carbonos observados en RMN-¹³C se realizó por el análisis del espectro HSQC medido en MeOD (Anexo E). Las correlaciones observadas en espectros de COSY medido en MeOD (Anexo F) y el espectro HMBC medido con valores de $J = 7$ Hz en MeOD (Anexo G) permitieron formar las subestructuras que se muestran en la Figura 4-3. Estas subestructuras corresponden a el ácido 4-metilhex-2-enóico (MeHA, por su nombre en inglés); 4-metilprolina (MePro); y el ácido 2-amino-6-hidroxi-4-metil-8-oxodecanóico (AHMODA, por su nombre en inglés).

Mediante las correlaciones de los espectros de HMBC (MeOD) tomados con J de 3 Hz; Figura 4.3; Anexo H y su ampliación, Anexo I) se logró establecer la secuencia de los residuos, como se presenta a continuación: La secuencia MeHA – MePro se estableció al observarse la correlación del protón sobre el carbono alfa de la MePro (δ_H 4.38) con el carbonilo del residuo MeHA en δ_C 167.1. Esta propuesta se confirmó por la correlación observada entre uno de los protones diasterotópicos de sobre la posición 5 del residuo MePro en δ_H 3.38 y el carbonilo en δ_C 167.1 del residuo MeHA.

Figura 4-3: Subestructuras del compuesto **1** formados por correlaciones en COSY y HMBC. La numeración de las subestructuras corresponde a la numeración dada a los residuos en la tabla 4-1.



A pesar de que se intentó la detección del carbono 1 del residuo AHMODA, de manera directa por experimentos de RMN- ^{13}C , APT, y de manera indirecta por experimentos HMBC a diferentes valores de J y en solventes como MeOD, $CDCl_3$ y piridina- d_5 , esta detección no fue posible en nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo, su presencia se propone basados en dos evidencias: de un lado, los desplazamientos de carbono e hidrógeno de la posición 2 de este residuo en δ_H 4.44, que concuerdan con los desplazamientos para el residuo de AHMODA reportados en otros trabajos (184,199,200); adicionalmente, la interpretación del experimento APT mostró que el carbono en δ_C 52.6 corresponde a un metino (CH) y las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales sólo permiten explicar dos de sus tres enlaces. La ausencia de esta señal

puede deberse a fenómenos de equilibrio de formas resonantes del carboxilo, afectadas por el pH en el que se realizaron las mediciones.

Tabla 4-1: Datos de RMN-¹H (400 MHz) y RMN-¹³C (100 MHz) del compuesto **1** medidos en metanol-*d*₄.

Residuo	Posición	δ _C en ppm	δ _H en ppm (mult., J en Hz)
MeHA	1	167.2 (C)	
	2	121.2 (CH)	6.18 (dd, J = 15.3 y 0.7 Hz)
	3	153.0 (CH)	6.64 (dd, J = 15.3 y 8.1 Hz)
	4	39.6 (CH)	2.23 (m)
	5	30.1 (CH ₂)	1.39 (m)
	6	12.0 (CH ₃)	0.87 (t, J = 7.4 Hz)
	7	19.6 (CH ₃)	1.03 (d, J = 6.7 Hz)
MePro	1	174.5 (C)	
	2	62.5 (CH)	4.38 (dd, J = 15.3 Hz y 0.7 Hz)
	3	38.8 (CH ₂)	2.39 (m) y 1.53 (m)*
	4	34.9 (CH)	2.28 (m)
	5	55.9 (CH ₂)	3.88 (dd, J = 9.6 y 7.5 Hz) y 3.17 (m)
	6	16.9 (CH ₃)	1.09 (d, J = 6.5 Hz)
AHMODA	1	ND**	
	2	52.6 (CH)	4.44 (m)
	3	40.6 (CH ₂)	1.77 (m) y 1.55 (m)*
	4	27.4 (CH)	1.80 (m)
	5	46.5 (CH ₂)	1.36 (m)
	6	66.9 (CH)	4.16 (m)
	7	50.9 (CH ₂)	2.55 (d, J = 6.5)
	8	213.2 (C)	
	9	37.5 (CH ₂)	2.51 (m)
	10	7.8 (CH ₃)	0.99 (m)*
	11	21.0 (CH ₃)	0.96 (m)*
	NH	ND**	7.42 (d, J = 7.6 Hz)

* Protones solapados en el espectro de RMN-¹H, los desplazamientos fueron determinados por las correlaciones en los espectros bidimensionales.

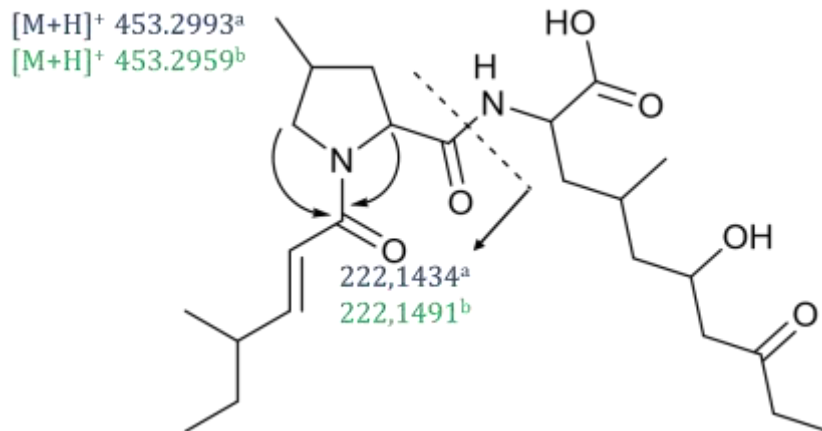
** ND = No detectado.

De otro lado, el espectro de MS/MS (Anexo J) mostró un ión en m/z 453.2993 correspondiente al ión pseudomolecular $[M+H]^+$ de fórmula $C_{24}H_{40}N_2O_6$, el cual incluye la presencia del carboxilo terminal del residuo AHMODA. Adicionalmente, el ion observado en el espectro MS/MS realizado sobre el ion padre en m/z 453.2993 mostró el fragmento en m/z 222.1434 el cual corresponde a la pérdida del residuo AHMODA (Tabla 4-2).

Tabla 4-2: Datos de masas para el compuesto 1.

Ion o fragmento	m/z observada	m/z calculada	Error (ppm)
$[M+H]^+$	453.2993	453.2959	7.5
$[M+Na]^+$	475.2805	475.2851	9.7
$[M+K]^+$	491.2590	491.2507	16.9
$[2M+Na]^+$	927.5740	927.5810	7.5
$[M-AHMODA]^+$	222.1434	222.1491	25.7

Figura 4-4: Estructura plana del compuesto 1, algunas correlaciones clave de HMBC y análisis de fragmentación por masas; a. Masas observadas; b. Masas calculadas.



En cuanto a la posible configuración para cada uno de estos residuos, se encontró en literatura que la estructura de las leucinostatinas había sido determinada mediante la hidrólisis de la molécula y la evaluación de cada residuo de forma independiente. Los centros quirales de cada residuo se determinaron por comparación de datos de dicroísmo circular, IR, rotación óptica y difracción de Rayos-X, con reportes previos y estándares de los residuos conocidos (184,201–203). De esa manera se determinó que en la estructura de las leucinostatinas se

tienen los residuos: ácido (4S,2E)-4-metilhex-2-enoico, *cis*-4-metil-L-prolina, ácido (2S,4S,6S)-2-amino-6-hidroxi-4-metil-8-oxodecanóico, *threo*-L- β -hidroxileucina, dos α -Aib, dos L-leucina y β -alanina (202–204). Posteriormente, mediante análisis de cristalografía de rayos-x cálculos de energía conformacional, se determinó la estereoquímica absoluta para la molécula encontrando que su estructura se pliega formando un α -helice (205).

De esta manera se identificó al compuesto **1** como un péptido de tres residuos con secuencia MeHA – MePro – AHMODA, el cual, si bien corresponde a los tres primeros residuos de la Leucinostatina A, hasta nuestro conocimiento, luego de revisar en bases de datos especializadas (Scifinder y Antimarin), esta es la primera vez que se aísla como producto natural. Este compuesto se denominó lilacinina A.

4.2.2 Elucidación del compuesto 2

El compuesto **2** se aisló del cultivo estacionario del cual se obtuvieron 5.4 mg. Su rotación óptica tuvo un valor de $[\alpha]_D = 10.1$ ($c = 0.26$, CHCl_3). La fórmula molecular del compuesto **2** se estableció como $\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_{10}$ mediante el espectro de masas obtenido por HR-ESI-MS, el cual mostró un ión en m/z 780.5194 correspondiente al ión pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_{10}$, m/z 780.5198) y por el ión en m/z 802.4979 correspondiente al aducto de sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{NaO}_{10}$, m/z 802.5017).

En el espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Tabla 4-3, Anexo K) se observaron algunas señales similares a las obtenidas para el compuesto **1**, ligeramente desplazadas, y varias señales nuevas. Se observaron cuatro señales características de hidrógenos unidos a nitrógeno (NH) característicos de péptidos en δ_{H} 7.95 (1H, brs), 7.89 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 6.7$ Hz) y 7.30 (1H, s); dos protones olefínicos en δ_{H} 6.85 (1H, dd, $J = 15.2$ y 7.6 Hz) y 6.17 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), característicos de una configuración *trans* de un sistema α,β -insaturado; señales de seis metinos unidos a heteroátomos en δ_{H} 4.36 (1H, m), 4.32 (1H, m), 4.30 (1H, m), 4.19 (1H, m), 4.05 (1H, m) y 3.68 (1H, m). Señales correspondientes a cinco metilenos diasterotópicos en δ_{H} 3.90 (1H, m) y 3.25 (1H, m); δ_{H} 2.65 (1H, m) y 2.44 (1H, m); δ_{H} 2.53 (1H, m) y 1.55 (1H, m); δ_{H} 1.82 (1H, m) y 1.70 (1H, m); δ_{H} 1.59 (1H, m) y 1.27 (1H, m) y señales de tres metilenos homotópicos en δ_{H} 2.51 (2H, m), 1.73 (2H, m) y 1.45 (2H, m). Se observa también, la presencia de otros cuatro metinos en δ_{H} 2.38 (1H, m), 2.33 (1H, m), 1.86 (1H, m) y dos señales

sobrelapadas en 1.71 (2H, m). Finalmente, a campo alto, se observan señales correspondientes a 11 metilos en δ_{H} 1.58 (3H, s), 1.54 (3H, s), 1.14 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.06-1.11 (9H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.86-0.96 (9H, m) y 0.82 (3H, d, $J = 6.6$ Hz).

En los espectros de RMN- ^{13}C y APT (100 MHz, CDCl_3 , Tabla 4-3, Anexo L y M, respectivamente) se observan señales para 39 carbonos, con señales similares a las observadas para el compuesto **1**: una señal correspondiente al carbonilo de la cetona de AHMODA en δ_{C} 214.3 (C); señales para cinco carbonilos en δ_{C} 176.4 (C), 173.4 (C), 172.9 (C), 172.3 (C) y 167.2 (C); las señales del doble enlace del residuo HeMA en δ_{C} 155.5 (CH) y 118.7 (CH). El espectro mostró además señales para seis metinos enlazados a heteroátomos en δ_{C} 77.7 (CH), 65.1 (CH), 63.7 (CH), 58.3 (CH), 55.8 (CH) y 52.4 (CH), junto con una señal para un metileno unido a heteroátomo en δ_{C} 55.0 (CH_2) correspondiente a la posición cinco de la MePro y un carbono cuaternario en δ_{C} 57.6 (C). Se observaron señales para cinco metinos en δ_{C} 38.6, 33.7, 31.2, 28.3 y 24.8, junto con siete señales más de metilenos en δ_{C} 48.6, 41.5, 39.1, 38.2, 37.1, 35.6 y 29.0. También se observaron señales para 11 metilos, en δ_{C} 25.7, 25.5, 23.3, 21.3, 21.2, 19.9, 19.2, 18.9, 16.9, 11.8 y 7.6.

La asignación de las señales del experimento de RMN- ^1H a las de los carbonos observados en RMN- ^{13}C se realizó por el análisis del espectro HSQC (Anexo N). Las correlaciones observadas en espectros COSY (Anexo O) y los espectros HMBC medidos con valores de $J = 5$ (Anexo P) permitieron formar las subestructuras que se muestran en la Figura 4-5. Estas subestructuras coinciden con los residuos HeMA, MePro y AHMODA, presentes en el compuesto **1**, junto con la β -hidroxileucina (HyLeu, por su nombre en inglés), ácido α -aminoisobutírico (Aib) y Leucina (Leu).

La secuencia MeHA – MePro – AHMODA - HyLeu – Aib – Leu para el compuesto **2** (figura 4-5), se propone con base en las correlaciones en HMBC entre protones sobre el nitrógeno (N-H) con carbonilos del residuo anterior como sigue: la correlación del protón N-H de la leucina (δ_{H} 7.44) con el carboxilo del residuo Aib (δ_{C} 176.4); la correlación del protón N-H del Aib (δ_{H} 7.30) con el carboxilo del mismo Aib (δ_{C} 176.4) y con el carboxilo del residuo HyLeu (δ_{C} 172.3); la correlación del protón N-H del residuo Hyleu (δ_{H} 7.89, asignado por COSY) con el carboxilo del residuo AHMODA (δ_{C} 173.4). La secuencia propuesta se apoya también en las fragmentaciones vistas en el espectro de masas (Figura 4-6, Anexo Q), en la que el fragmento observado en m/z 222.1492 corresponde a los residuos MeHA-MePro, fragmentación que también se observó en

el compuesto **1**. Finalmente se observó un fragmento en m/z 649.4232, concordante con el ión $[M-\text{Leu}]^+$, indicando la posición de un residuo de leucina en el extremo carboxilo terminal.

Figura 4-5: Subestructuras de los residuos identificados en el compuesto **2**, basados en las correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC.

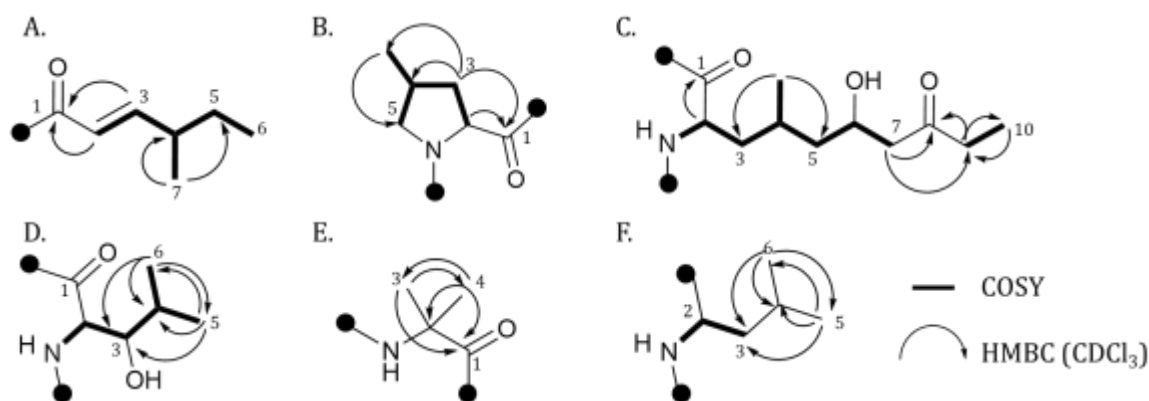


Tabla 4-3: Asignación de señales para el compuesto **2**.

Residuo	Posición	δ_C en ppm	δ_H en ppm (mult., J en Hz)
MeHA	1	167.2 (C)	
	2	118.7 (CH)	6.17 (d, $J = 15.2$ Hz)
	3	155.5 (CH)	6.85 (dd, $J = 15.2$ y 7.6 Hz)
	4	38.6 (CH)	2.33 (m)
	5	29.0 (CH ₂)	1.45 (m)
	6	11.8 (CH ₃)	0.90 (m)
	7	18.9 (CH ₃)	1.09 (m)
MePro	1	172.9 (C)	
	2	63.7 (CH)	4.30 (m)
	3	38.2 (CH ₂)	2.53 (m) y 1.55 (m)
	4	33.7 (CH)	2.38 (m)
	5	55.0 (CH ₂)	3.90 (m) y 3.25 (m)
	6	16.9 (CH ₃)	1.14 (d, $J = 6.4$ Hz)

AHMODA	1	173.4 (C)	
	2	55.8 (CH)	4.05 (m)
	3	35.6 (CH ₂)	1.73 (m)
	4	28.3 (CH)	1.86 (m)
	5	41.5 (CH ₂)	1.59 (m) y 1.27 (m).
	6	65.1 (CH)	4.19 (m)
	7	48.6 (CH ₂)	2.65 (m) y 2.44 (m)
	8	214.3 (C)	
	9	37.1 (CH ₂)	2.51 (m)
	10	7.6 (CH ₃)	1.08 (m)
	11	21.2 (CH ₃)	1.00 (3H, d, J = 6.7 Hz)
	NH		7.95 (br s)
HyLeu	1	172.3 (C)	
	2	58.3 (CH)	4.31 (m)
	3	77.7 (CH)	3.68 (m)
	4	31.2 (CH)	1.71 (m)
	5	19.9 (CH ₃)	1.07 (m)*
	6	19.2 (CH ₃)	0.82 (d, J = 6.6 Hz)
	NH		7.89 (d, J = 7.0 Hz)
Aib	1	176.4 (C)	
	2	57.4 (C)	
	3	25.7 (CH ₃)	1.54 (s)
	4	25.5 (CH ₃)	1.58 (s)
	NH		7.30 (s)
Leu	1	ND**	
	2	52.4 (CH)	4.36 (m)
	3	39.1 (CH ₂)	1.82 (m) y 1.70 (m)
	4	24.8 (CH)	1.71 (m)
	5	21.3 (CH ₃)	0.87
	6	23.3 (CH ₃)	0.93
	NH		7.44 (d, J = 6.7 Hz)

Las diferencias entre las masas detectadas y las calculadas (Tabla 4-4), muestran en general una buena concordancia de los datos observados con los calculados. De manera interesante, en el compuesto **2** se logró la detección del carbono **1** del residuo AHMODA asignado a la señal en δ_c 173.4 (C). Sin embargo, el carboxilo terminal del residuo Leu no se logró detectar, posiblemente por el mismo fenómeno de equilibrio de formas resonantes del carboxilo.

Figura 4-6: Estructura plana del compuesto **2**, algunas correlaciones clave de HMBC, COSY y análisis de fragmentación por masas; a. Masas observadas; b. Masas calculadas.

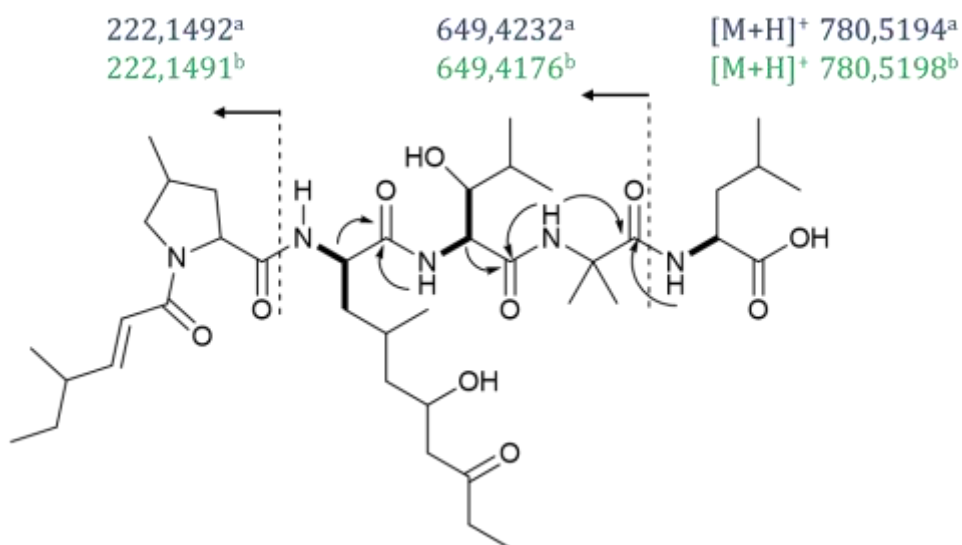


Tabla 4-4: Datos de masas para el compuesto **2**.

Ion o fragmento	m/z observada	m/z calculada	Error (ppm)
$[M+H]^+$	780.5194	780.5198	0.5
$[M+Na]^+$	802.4979	802.5017	4.7
$[M-Leu+H]^+$	649.4232	649.4176	8.6

La secuencia establecida para el compuesto **2** es la misma reportada para los seis primeros residuos de la Leucinostatina A (184). Sin embargo, luego de revisar en bases de datos especializadas (Scifinder y Antimarin), el aislamiento del compuesto **2**, no ha sido previamente descrito en literatura, por lo que el compuesto fue nombrado lilacinina B.

Resulta interesante observar que la relación masa carga correspondiente al ión pseudo molecular $[M+H]^+$ se encuentra representada en la red molecular (Figura 3-2) como un espectro consenso con m/z 780.546, perteneciendo a una red no analizada con anterioridad compuesta por 12 espectros consenso con m/z entre 629.567 y 780.546.

4.2.3 Elucidación del compuesto 3

El compuesto **3** fue aislado del HPLC preparativo de la fracción EF2.5.5 y se obtuvieron 2.2 mg. Su rotación óptica tuvo un valor de $[\alpha]_D = + 48.5$ ($c = 0.11$, $CHCl_3$). La fórmula molecular del compuesto **3** se estableció como $C_{34}H_{58}N_4O_9$ mediante el espectro de masas obtenido por HR-ESI-MS, el cual mostró un ión en m/z 667.4366 correspondiente al ión pseudomolecular $[M+H]^+$ (Calculado para $C_{34}H_{59}N_3O_9$, m/z 667.4282) y por el ión en m/z 689.4135 correspondiente al aducto de sodio $[M+Na]^+$ (calculado para $C_{34}H_{58}N_4NaO_9^+$, m/z 689.4101).

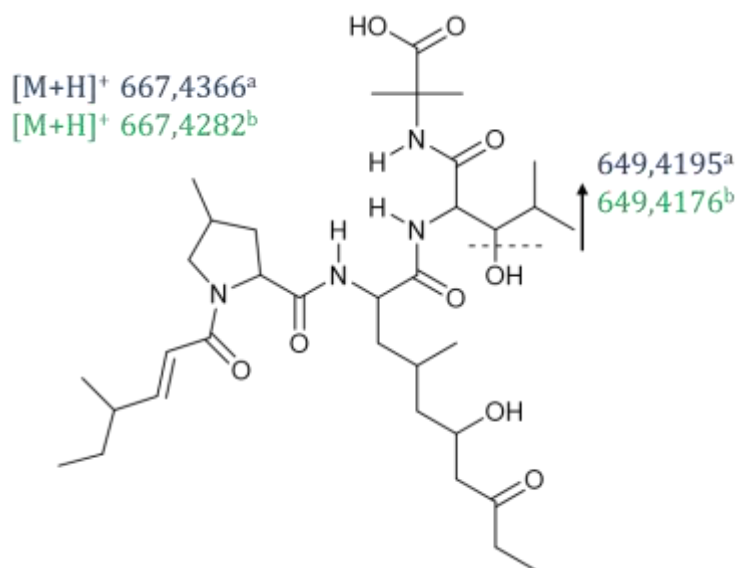
Tabla 4-5: Iones detectados en el espectro de masas para el compuesto 3.

Ion o fragmento	m/z observada	m/z calculada	Error (ppm)
$[M+H]^+$	667.4366	667.4282	12.6
$[M+Na]^+$	689.4135	689.4101	4.9
$[M+K]^+$	705.3859	705.3841	2.6
$[M-H_2O+H]^+$	649.4195	649.4176	2.9

Este compuesto, a juzgar por su espectro de RMN- 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Anexo R), se encuentra en alta pureza. En él, se observaron varias señales similares a las obtenidas para el compuesto **2**. Se observaron los desplazamientos para 3 hidrógenos unidos a nitrógeno en δ_H 7.87 (1H, brs), 7.76 (1H, d, $J = 8.8$ Hz) y 7.29 (1H, s); señales de los protones olefínicos en δ_H 6.86 (1H, dd, $J = 15.1$ y 7.7 Hz) y 6.11 (1H, d, $J = 15.2$ Hz) características del residuo MeHA; se observaron señales para cuatro metinos unidos a heteroátomos, en δ_H 4.59 (1H, d, $J = 8.7$), 4.30 (1H, m), 4.19 (1H, m) y 4.12 (1H, m); señales de uno de los protones diasterotópicos de la posición 5 de la 4-metilprolina en δ_H 3.22 (1H, m); señales entre 2.7 y 1.2 ppm que corresponderán a los metilenos y metinos del resto de la molécula; señales de los singletes en δ_H 1.60 y 1.56 característicos del residuo de Aib. Por último, se observan las señales correspondientes a ocho

metilos en δ_H 1.13 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 1.02-1.08 (9H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.84-0.91 (6H, m) y 0.80 (3H, d, $J = 6.5$ Hz).

Figura 4-7: Estructura plana propuesta para el compuesto **3**; a. Masas observadas; b. Masas calculadas.



Sin embargo, la cantidad obtenida del compuesto **3** resultó insuficiente para obtener espectros de RMN-¹³C o espectros bidimensionales con la calidad suficiente como para abordar la elucidación de su estructura por RMN. A pesar de esto, los datos obtenidos por RMN-¹H, MS (Tabla 4-5) y el análisis del espectro obtenido de masas MS/MS (Anexo S), permiten detectar la ausencia del residuo de leucina en comparación con la estructura del compuesto **2**. Estos datos permiten proponer que la estructura del compuesto **3** tiene la secuencia MeHA – MePro – AHMODA - HyLeu – AiB, como se muestra en la Figura 4-7, la cual corresponde a los cinco primeros residuos de la Leucinostatina A. Nuevamente, luego de revisar en bases de datos especializadas (Scifinder y AntiMarin), el aislamiento del compuesto **3**, no ha sido previamente descrito en literatura, por lo que el compuesto fue nombrado lilacinina C.

4.2.4 Elucidación del compuesto 4

Al igual que los compuestos anteriores el compuesto **4** se aisló del cultivo estacionario (E) y tras el proceso de aislamiento se obtuvieron 1.8 mg. Este compuesto se encuentra en mezcla

con el compuesto **1** y **3**. sin embargo, al ser este el compuesto mayoritario de la mezcla y conocer los patrones de fragmentación de los compuestos **1-3**, fue posible proponer su estructura de acuerdo a los datos de espectrometría de masas y su espectro de RMN-¹H.

La fórmula molecular del compuesto **4** se estableció como C₃₀H₅₁N₃O₈ mediante el espectro de masas obtenido por HR-ESI-MS, el cual mostró un ión en *m/z* 582.3884 correspondiente al ión pseudomolecular [M+H]⁺ (Calculado para C₃₀H₅₂N₃O₈, *m/z* 582.3749).

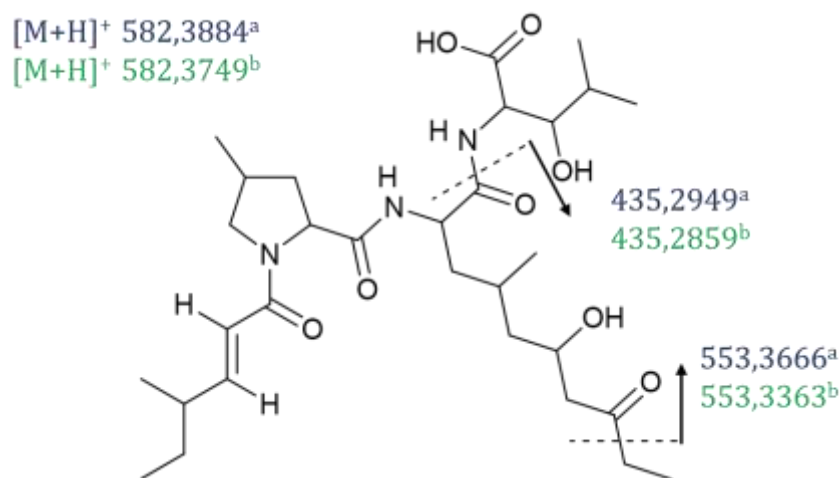
Tabla 4-6: Datos de masas para el compuesto **4**.

Ion o fragmento	<i>m/z</i> observada	<i>m/z</i> calculada	Error (ppm)
[M+H] ⁺	582.3884	582.3749	23.2
[M-H ₂ O+H] ⁺	564.3666	564.3649	3.0
[M-HyLeu+H] ⁺	435.2949	435.2859	20.7

En el espectro de RMN-¹H (Anexo T) se observaron algunas señales similares a las obtenidas para el compuesto **1**: Se observó una señal para un hidrógeno unido a nitrógeno (NH) en δ_H 7.52 (1H, d, *J* = 6.7 Hz); señales para dos protones olefínicos en δ_H 6.82 (1H, dd, *J* = 15.2 y 7.9 Hz) y 6.05 (1H, d, *J* = 15.2 Hz); señales para tres metinos unidos a heteroátomo en δ_H 4.6 (1H, m), 4.5 (1H, m) y 4.2 (1H, m); señales para los protones diaterotópicos de un residuo de MePro en δ_H 3,70 y 3,15; señales entre δ_H 1.2 y 2.7 de los metinos y de los metilenos homo y diasterotópicos de la molécula. Finalmente, entre δ_H 0.8 y 1.2 se observan metilos que por su alto solapamiento resultan difíciles de analizar.

En la Tabla 4-6 se presenta el análisis de los iones observados en el espectro de masas en el cual se logró ver el ion pseudomolecular [M+H]⁺ junto con algunas fragmentaciones, que incluyen la pérdida de una molécula de agua y la pérdida del fragmento de HyLeu (Anexo U). De esta manera se propone para el compuesto **4** la estructura que se presenta en la Figura 4-8, la cual corresponde a la secuencia MeHA – MePro – AHMODA – HyLeu, los cuatro primeros residuos de la Leucinostatina A, el cual no había sido previamente reportado en la naturaleza, por lo que se nombró como lilacinina D.

Figura 4-8: Estructura plana propuesta para el compuesto **4**; a. Masas observadas; b. Masas calculadas.



4.2.5 Resultados de actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados a concentraciones entre 50 $\mu\text{g/pozo}$ y 6.2 $\mu\text{g/pozo}$. Sólo los compuestos 1 y 3 fueron activos contra la bacteria *B. gladioli* a 50 $\mu\text{g/pozo}$, lo que corresponde a una concentración de 442 μM para el compuesto 1 y 300 μM para el compuesto 3. Si bien son activos a una concentración (en $\mu\text{g/pozo}$) ligeramente menor a la encontrada para el extracto, se puede considerar que tienen una actividad moderada, ya que para compuestos puros se espera que sean activos a concentraciones mucho menores respecto al extracto de donde provienen. Estos compuestos podrían ser considerados precursores de las leucinostatinas. Estas están constituidas por nueve residuos en una conformación α -hélice, la cual ha sido relacionada con su actividad biológica (185,206). Puede que, al no encontrarse todos los residuos, la conformación que adquieran estos precursores sea tal que no puedan interactuar de la misma manera que la leucinostatina A y por eso tener una actividad menor.

De acuerdo al orden de elución de los compuestos (no se describieron en orden de elución, ver Anexo A), a medida que se aumenta el número de residuos la lipofílicidad es mayor y por lo tanto también es mayor su retención en las columnas en fase reversa que fueron utilizadas. Es posible que los picos no resueltos del cromatograma después del minuto 50 correspondan a

las leucinostatinas. Sin embargo, luego de algunos intentos no se logró mejorar la resolución de los compuestos que eluyeron luego de 50 min.

Vale la pena resaltar que la producción de leucinostatinas se da en concentraciones menores a las encontradas para las lilacininas A-D, de acuerdo a la intensidad de los picos observados en el anexo A, lo cual sugiere que esta cepa de *P. lilacinium* PNM-67 es un mejor productor de lilacininas que de las leucinostatinas en términos de concentración. A pesar de esto, podría ocurrir que las leucinostatinas producidas, a pesar de su menor concentración, sean los compuestos más activos del extracto. Estas afirmaciones sugieren la importancia de continuar con el estudio de los compuestos presentes en el extracto aquí fraccionado, lo cual será abordado en futuros trabajos del grupo de investigación.

De otro lado, sólo el compuesto 2 se encuentra representado en la red molecular (Figura 3-2), haciendo parte de una red independiente compuesta por 12 iones. Estos podrían tratarse de otros precursores con modificaciones en los primeros residuos que den cuenta de la diversidad observada en la red de leucinostatinas.

4.3 Conclusiones

En cuanto a las condiciones de cultivo evaluadas, se encontró que el extracto más activo se produjo en condiciones de cultivo estacionarias durante tres semanas. El segundo cultivo que presentó buena actividad fue el que se realizó en condiciones de agitación durante una semana.

Los extractos obtenidos de los cultivos en agitación tuvieron un buen rendimiento en masa de extracto, sin embargo, gran parte de esta masa se debe a compuestos de baja polaridad que no resultaron activos en las pruebas de actividad realizadas anteriormente.

De los dos cultivos fue posible aislar la lilacinina A (compuesto **1**), el cual se encontró en mayor cantidad en el extracto con agitación (A), 5.9 mg, mientras que en el extracto E se obtuvieron 2.5 mg. Este compuesto presentó actividad a una concentración de 50 µg/pozo contra *B. gladioli*.

Por otro lado, del extracto estacionario (E) fue posible aislar tres metabolitos denominados lilacininas B, C y D (compuestos **2**, **3** y **4**. 5.4, 2.2 y 1.8 mg, respectivamente). Entre ellos el compuesto **3** presentó los mismos valores de actividad antimicorbiana contra *B. gladioli* que el compuesto **1**.

El compuesto **2** aquí aislado concuerdan con uno de los iones detectados en las redes moleculares. Si bien no se pudo confirmar directamente la presencia de las leucinostatinas que se habían derreplicado en el capítulo anterior, sí se aislaron compuestos precursores de estas con una actividad modera contra las bacterias patógenas. Esto se puede considerar como otro argumento para confirmar la presencia de este tipo de moléculas en la fracción metanólica de *Purpureocillium lilacinum* PNM-67.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se evaluó la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de las fracciones de los extractos de acetato de etilo 15 cepas de hongos que fueron aislados a partir de muestras marinas, encontrando que diez de estos organismos son productores de compuestos antimicrobianos.

Teniendo en consideración estos resultados, junto con la identificación de las muestras por secuenciación del gen ITS y el análisis de los perfiles metabólicos se seleccionó a la cepa *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 para realizar los procesos de derreplicación y posterior estudio químico. En este punto se hizo evidente la necesidad de la integración de varios criterios de selección de muestras, ya que de esta manera no sólo se seleccionó una muestra activa sino también metabólicamente interesante y promisoria para su aplicación en el control de fitopatógenos.

En este estudio se implementaron dos técnicas de derreplicación, una de ellas, la construcción de redes moleculares es una técnica recientemente publicada siendo este trabajo una de las primeras aplicaciones en el país. Estos análisis permitieron la identificación tentativa de diez leucinostatinas, la sansalvamida A, Sphingofungina F y una familia de compuestos tipo aureobasidinas.

En el estudio químico del hongo *Purpureocillium lilacinum* PNM-67 se aislaron e identificaron cuatro compuestos precursores de la leucinostatina A, para los cuales no se encontraron reportes en las bases de datos especializadas (Antimarin y Scifinder), denominados lilacininas A-D. Los compuestos **1** (lilacinina A) y **3** (lilacinina C) presentaron una actividad antimicrobiana moderada, siendo activos contra la bacteria *B. gladioli* a una concentración de 0.25 mg/mL (50 µg/pozo).

5.2 Recomendaciones

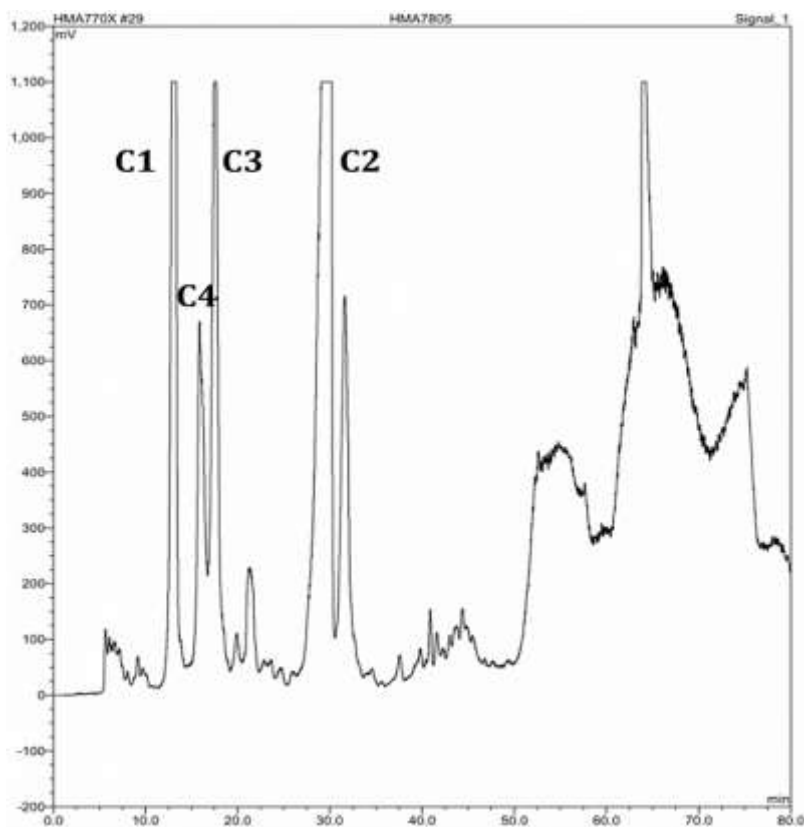
Se recomienda continuar con el estudio químico del hongo *Purpureocillium lilacinum* PNM-67, con el fin de confirmar la presencia de otros compuestos detectados por la derreplicación realizada y que podrían ser los responsables de la actividad biológica de la fracción metanólica de su extracto, así como de otros compuestos posiblemente novedosos identificados en los estudios de derreplicación aquí realizados.

En cuanto a las lilacininas A-D, se recomienda hacer estudios que permitan proponer la configuración absoluta de los residuos de estos compuestos.

En cuanto a su posible uso como controlador de fitopatógenos, se recomienda evaluar el hongo y su extracto metanólico contra un panel más amplio de organismos patógenos de plantas. Teniendo en cuenta los reportes de este hongo como biocontrolador, se pueden tener en consideración no sólo otras bacterias patógenas, sino también hongos, nematodos e insectos que afecten cultivos de importancia comercial para el país.

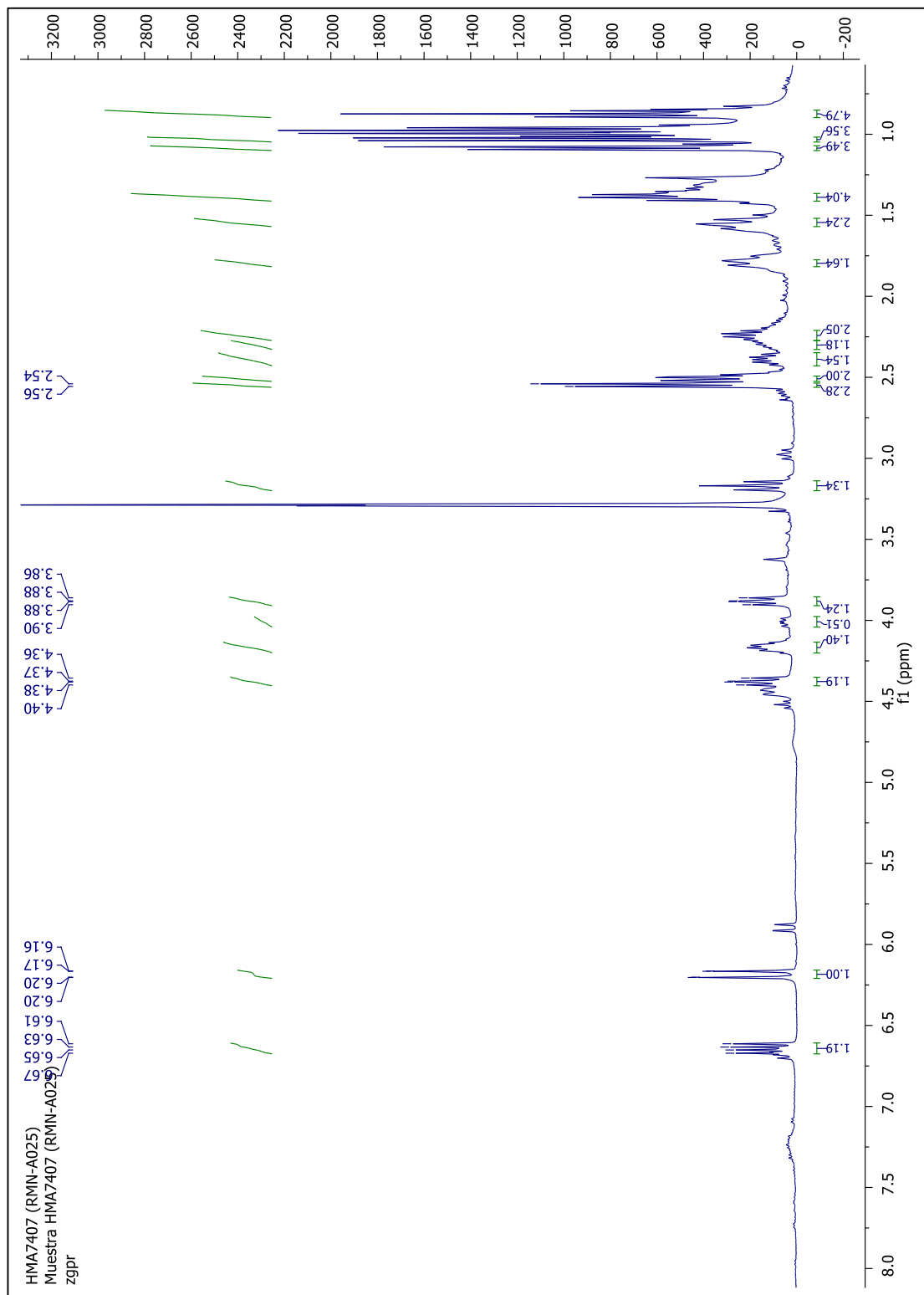
Una vez se hayan determinado los principales responsables de la actividad biológica, se deben realizar estudios más profundos de la evaluación de las condiciones de cultivo con el fin de encontrar las condiciones más favorables para la producción de dicho compuesto, así como la eficacia y seguridad de su aplicación en pruebas en invernadero y en campo.

A. Anexo: Cromatograma de HPLC preparativo de la fracción EF2

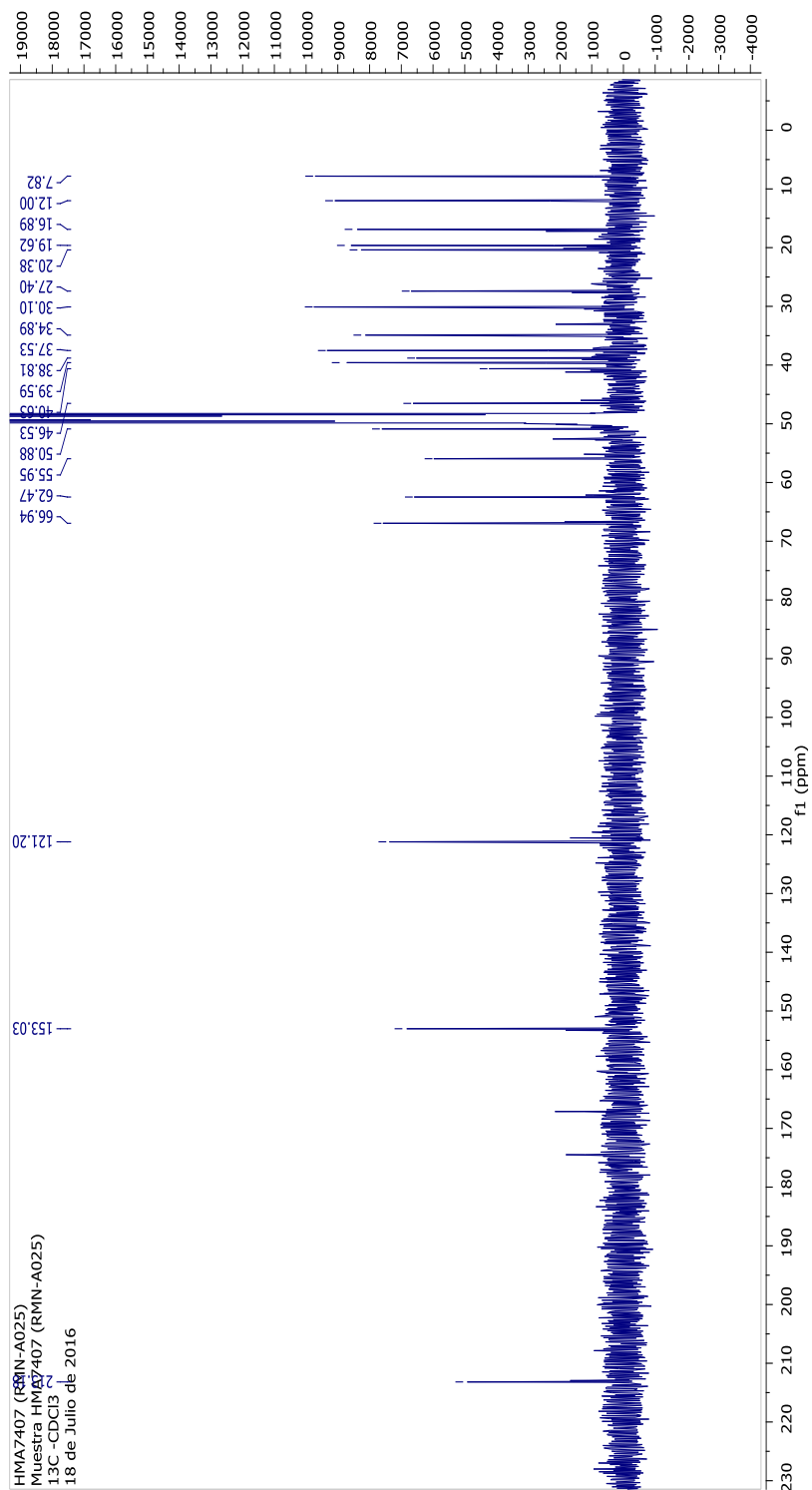


La cromatografía se llevó a cabo en un equipo UHPLC Thermo Dionex descrito anteriormente, en una columna Kromasil C8 (10 x 250 mm, 5 μ m) con un flujo de 2 mL/min en un gradiente de agua (fase A) y metanol (fase B) descrito a continuación: inicio con 70% de la fase B; se incrementó en forma lineal hasta 80 % B en 25 min; luego otro incremento hasta 90 % B en 15 min, se mantuvo esta proporción por 10 minutos; para luego hacer un incremento hasta 100 % B en 10 minutos, manteniendo estas condiciones durante 13 minutos, finalmente se retornó a las condiciones iniciales de 70 % B que se mantuvieron por 5 minutos para estabilizar la columna.

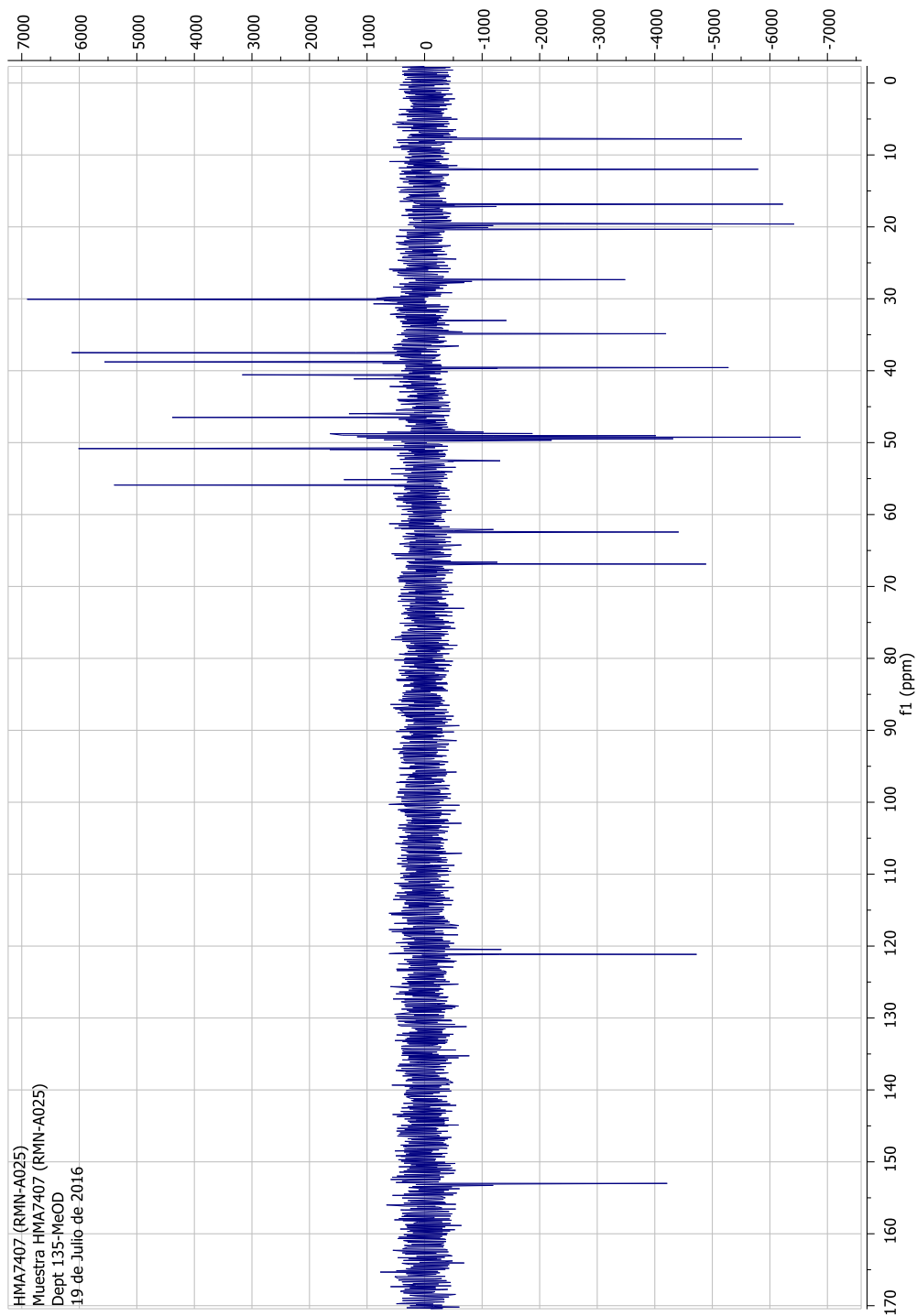
B. Anexo: RMN-¹H del compuesto 1 (MeOD, 400 MHz).



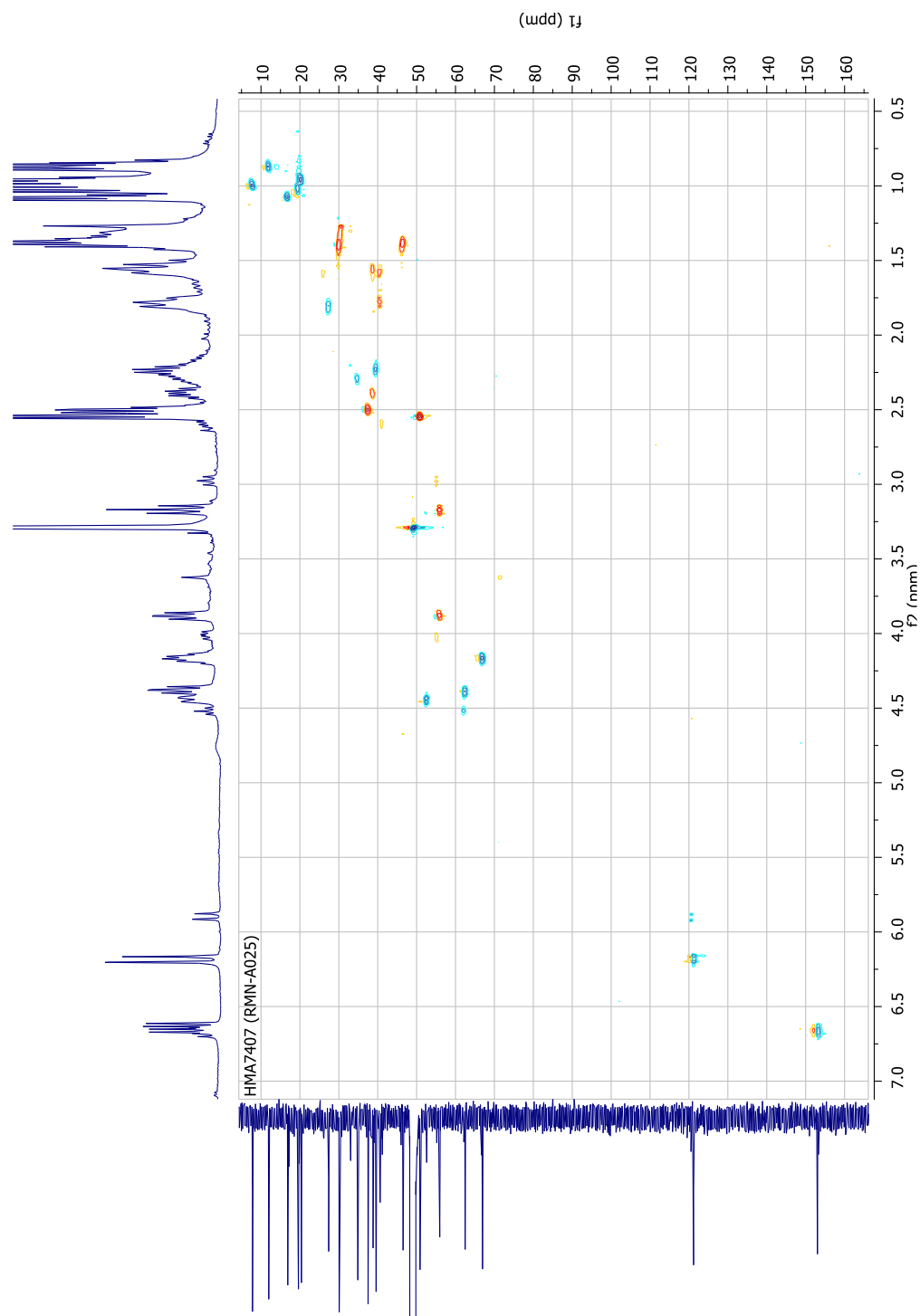
C. Anexo: RMN-¹³C del compuesto 1 (MeOD, 100 MHz).



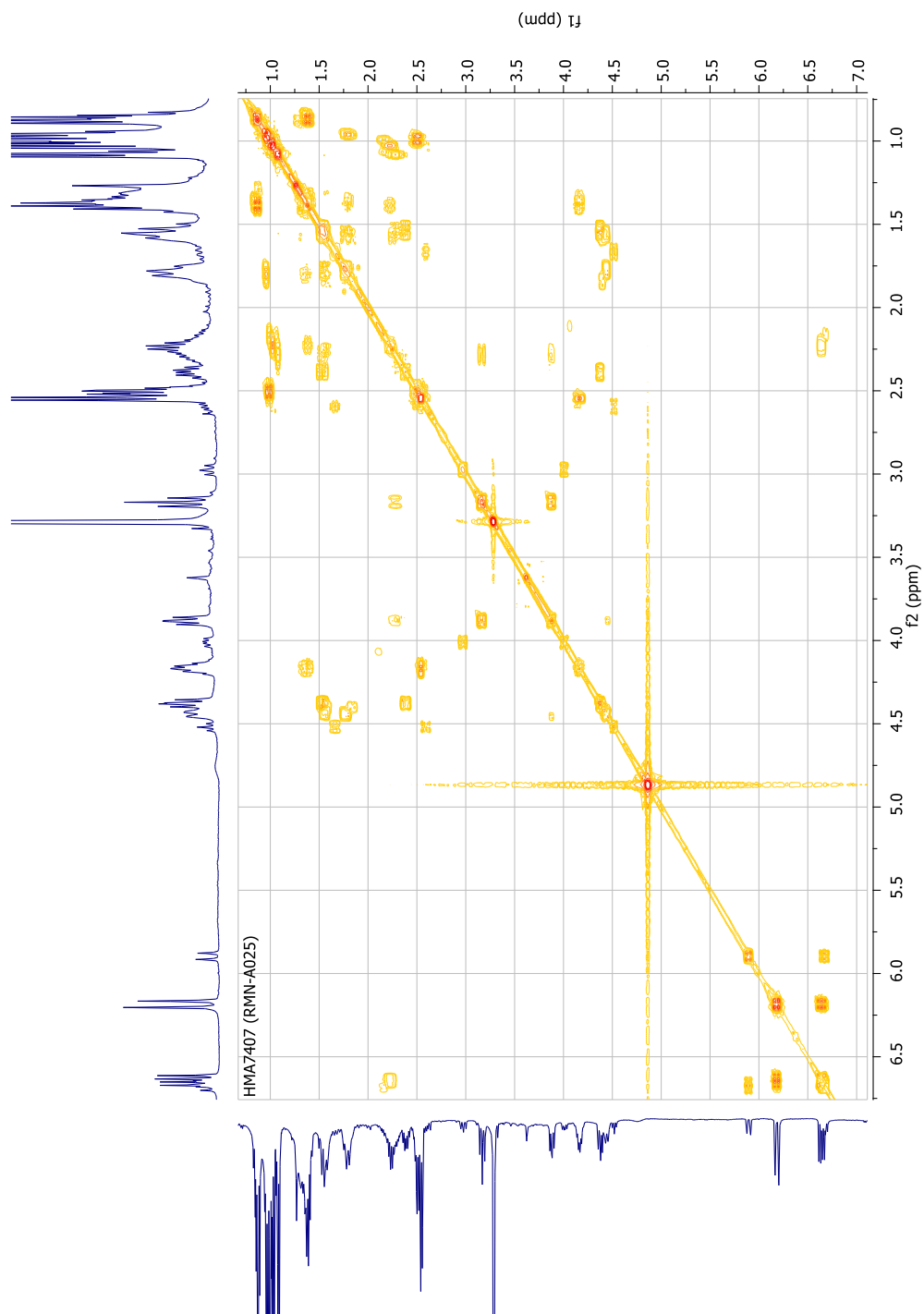
D. Anexo: APT del compuesto 1 (MeOD, 100 MHz).



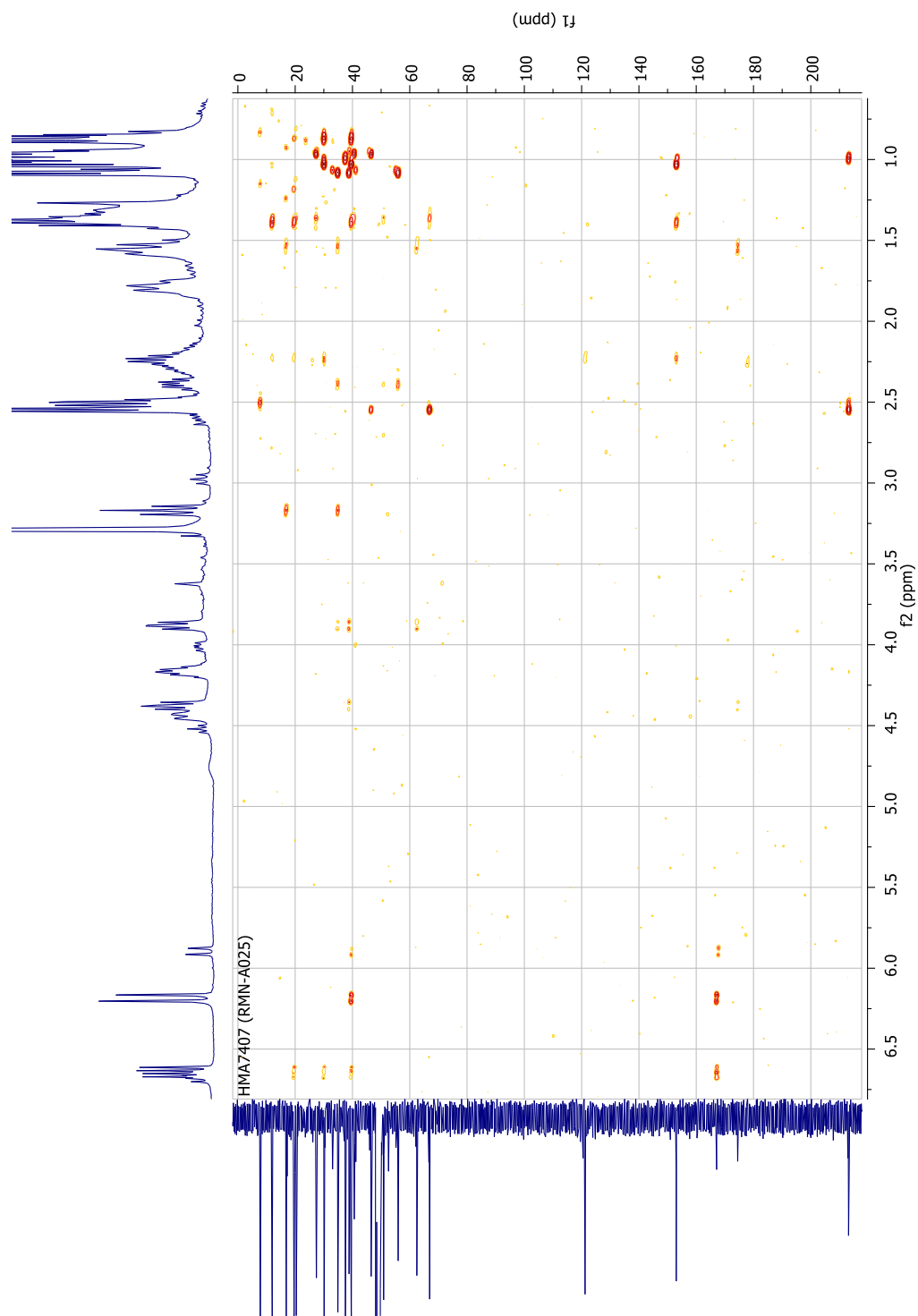
E. Anexo: HSQC del compuesto 1 (MeOD).



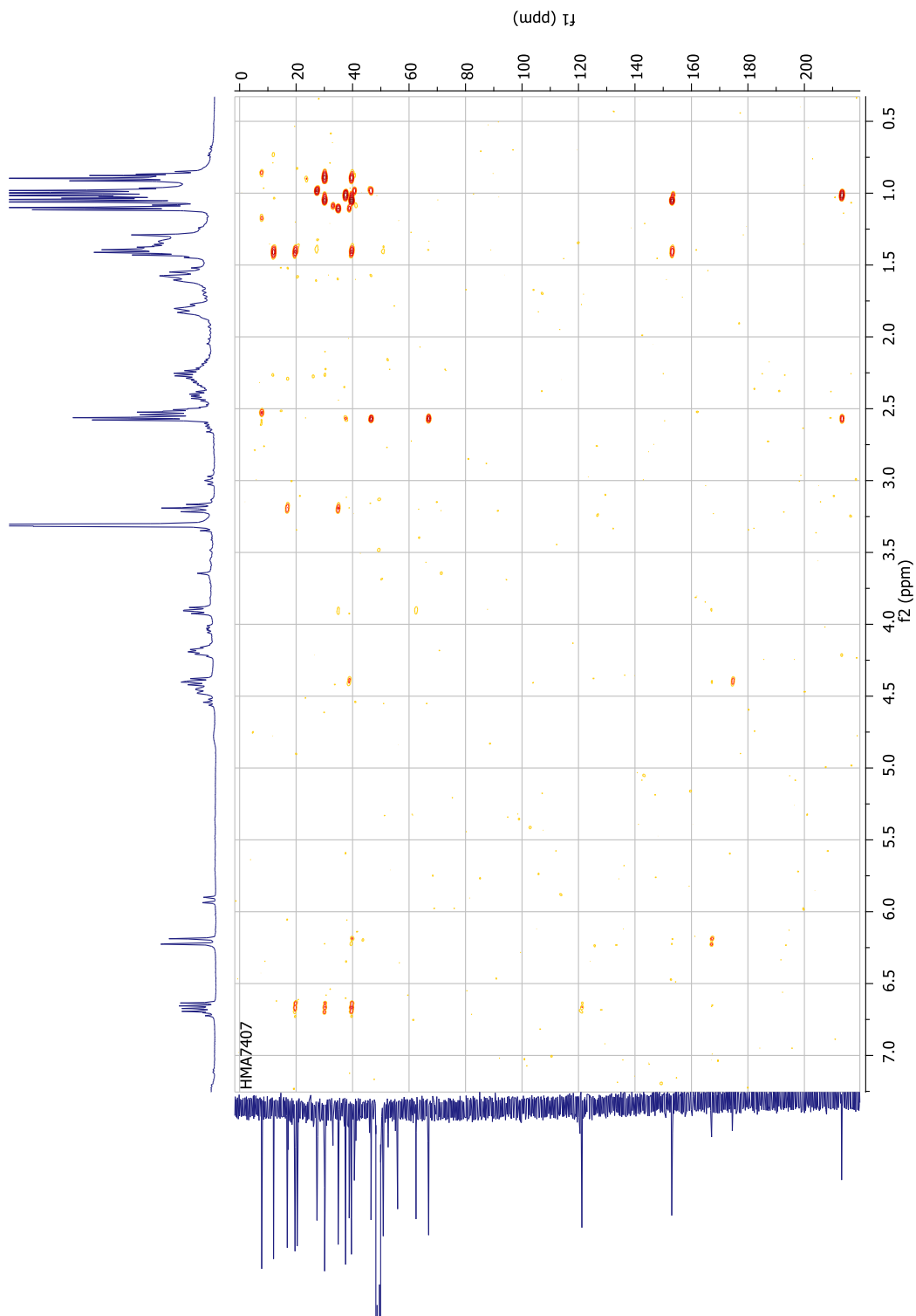
F. Anexo: COSY del compuesto 1 (MeOD).



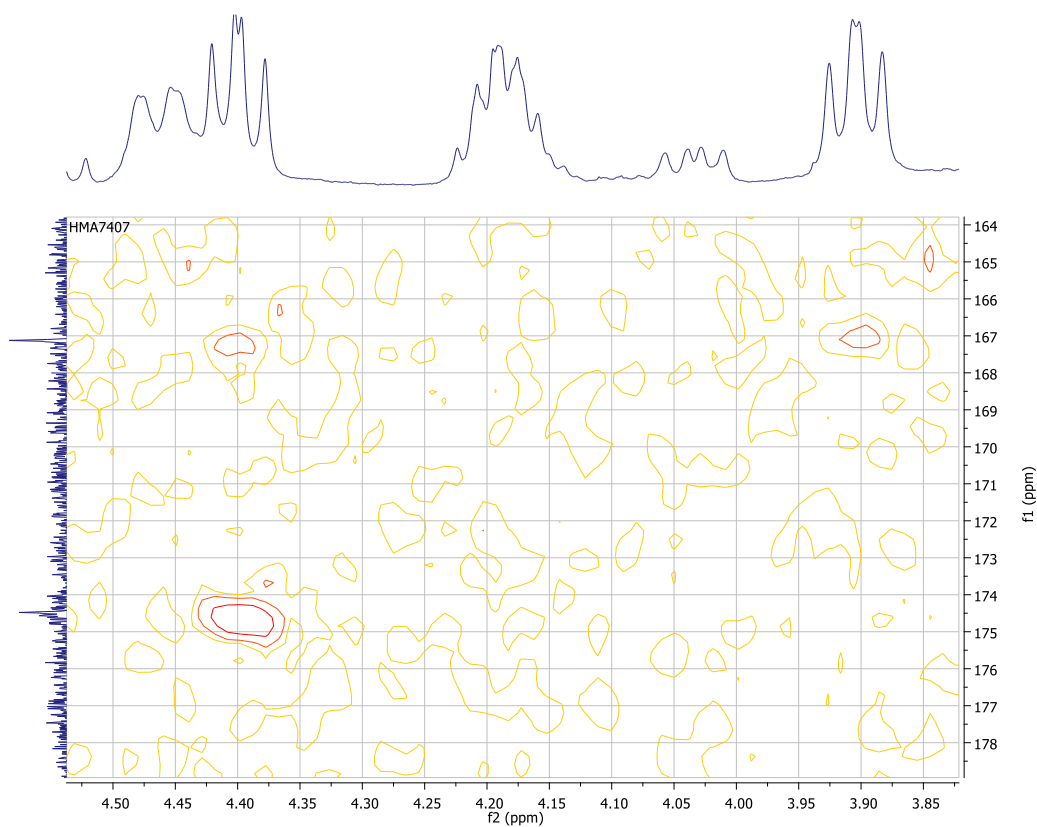
G. Anexo: HMBC del compuesto 1 (CDCl₃, *J* de 7 Hz).



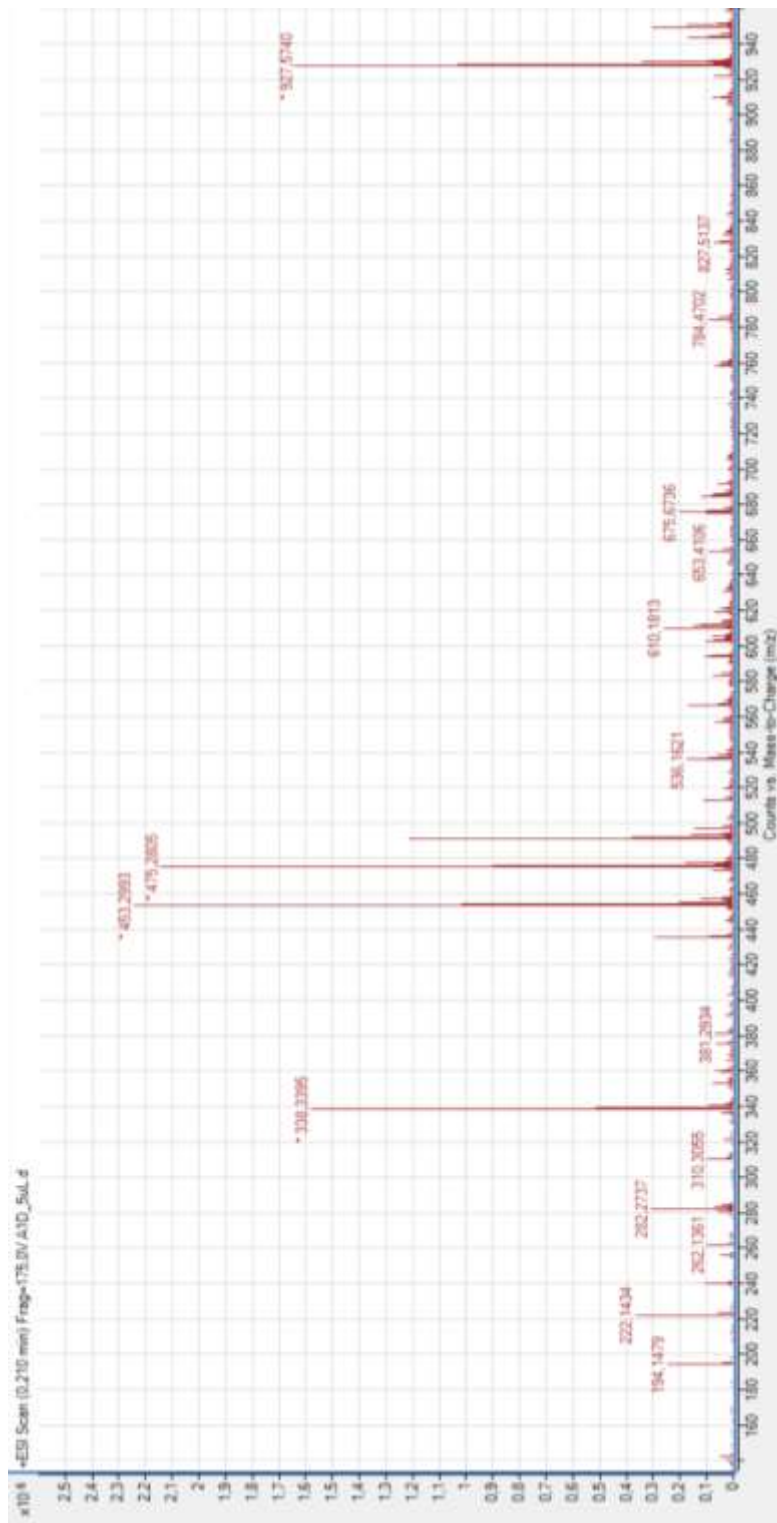
H. Anexo: HMBC del compuesto 1 (MeOD, J de 3 Hz).



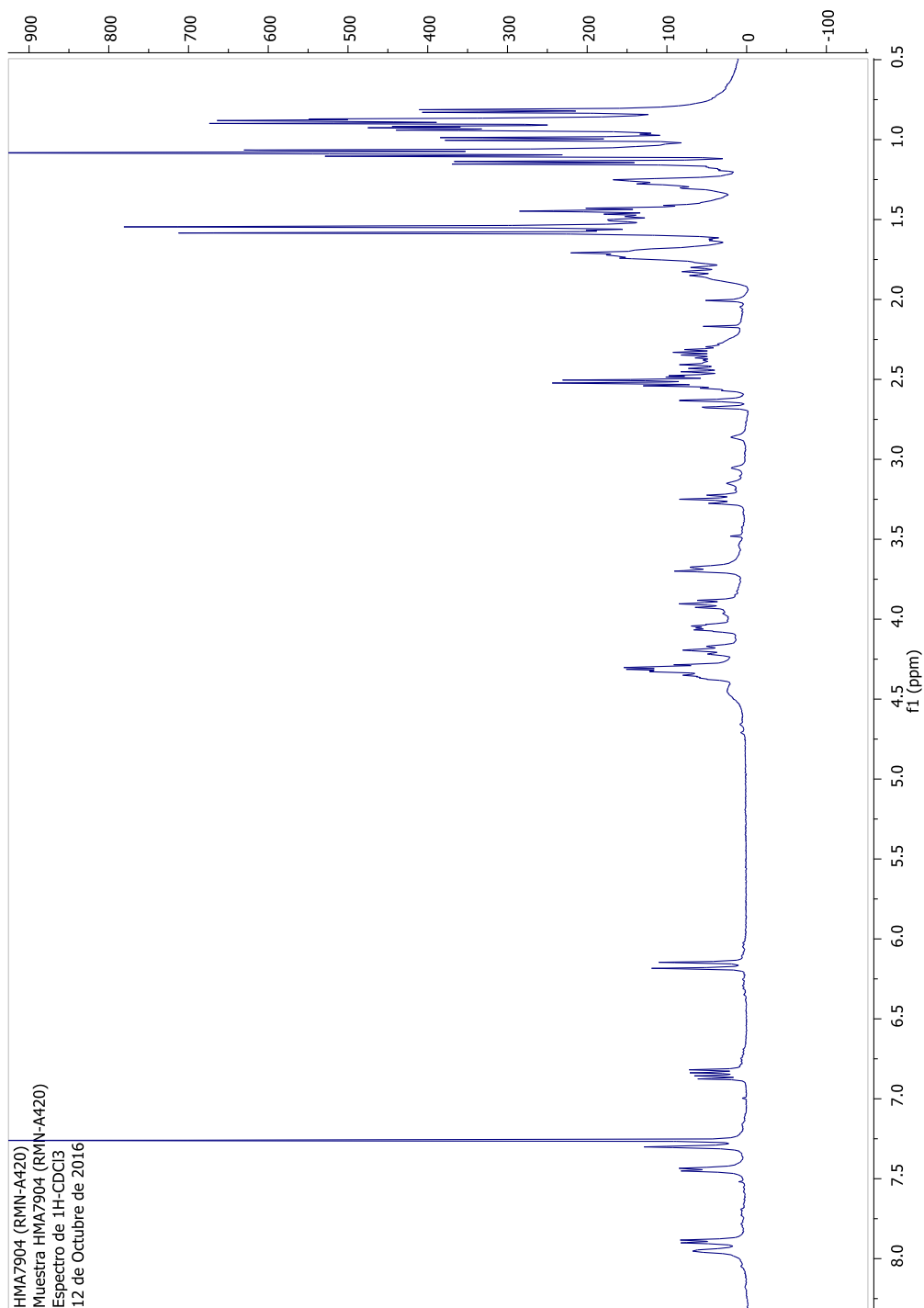
I. Anexo: Ampliación del espectro HMBC del compuesto 1 (MeOD, J de 3 Hz).



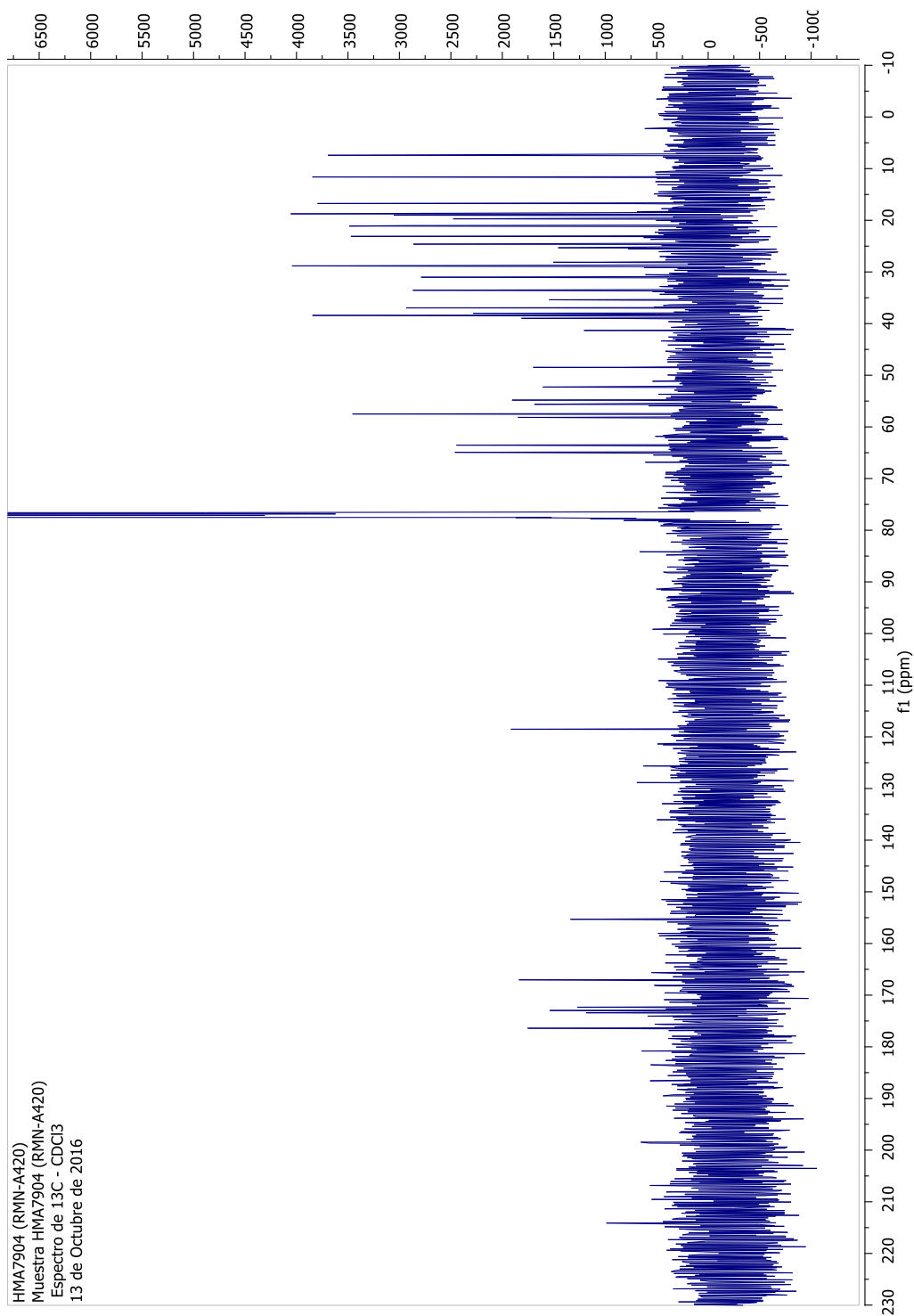
J. Anexo: Espectro de masas del compuesto 1.



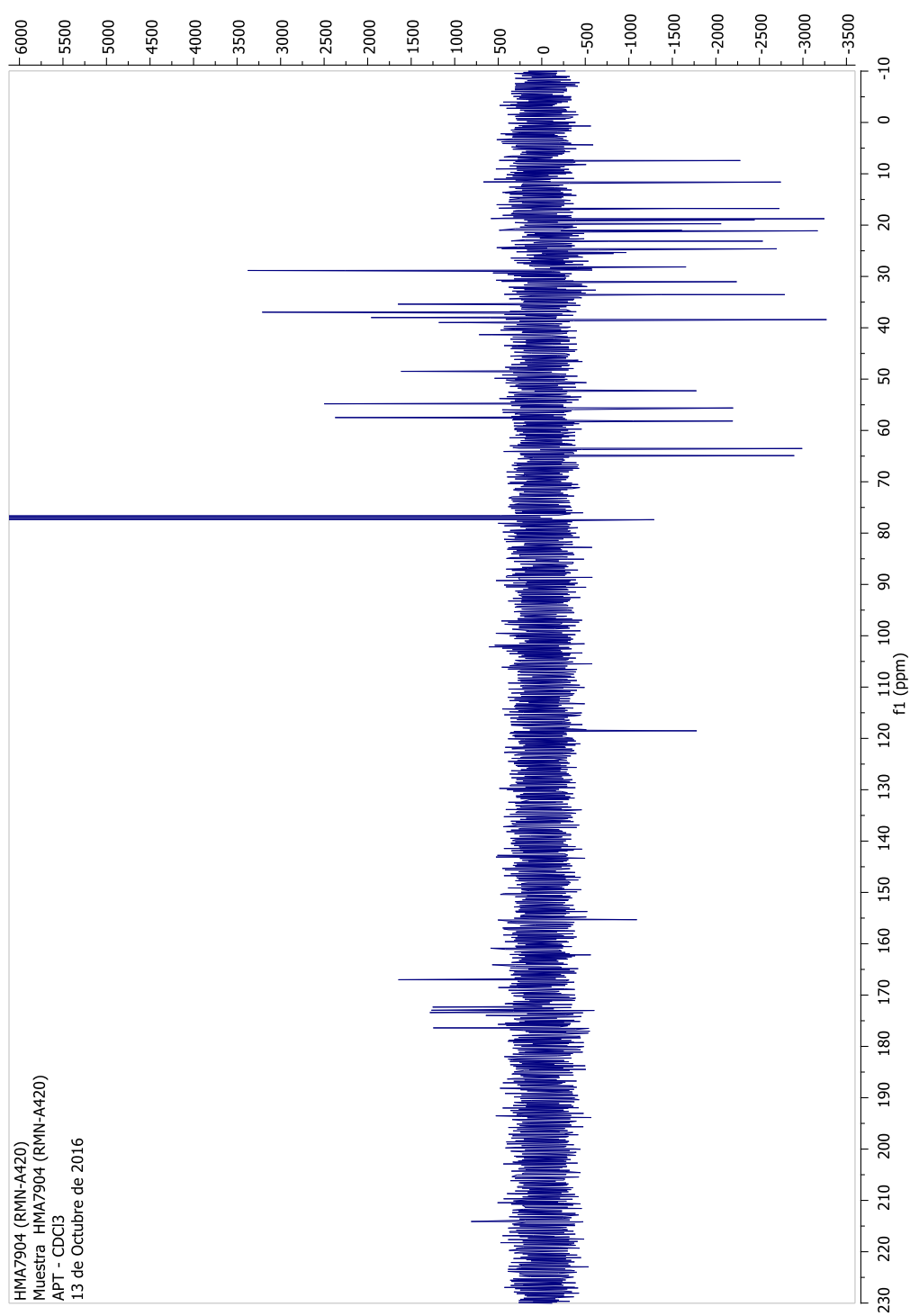
K. Anexo: RMN-¹H del compuesto 2 (CDCl₃, 400 MHz).



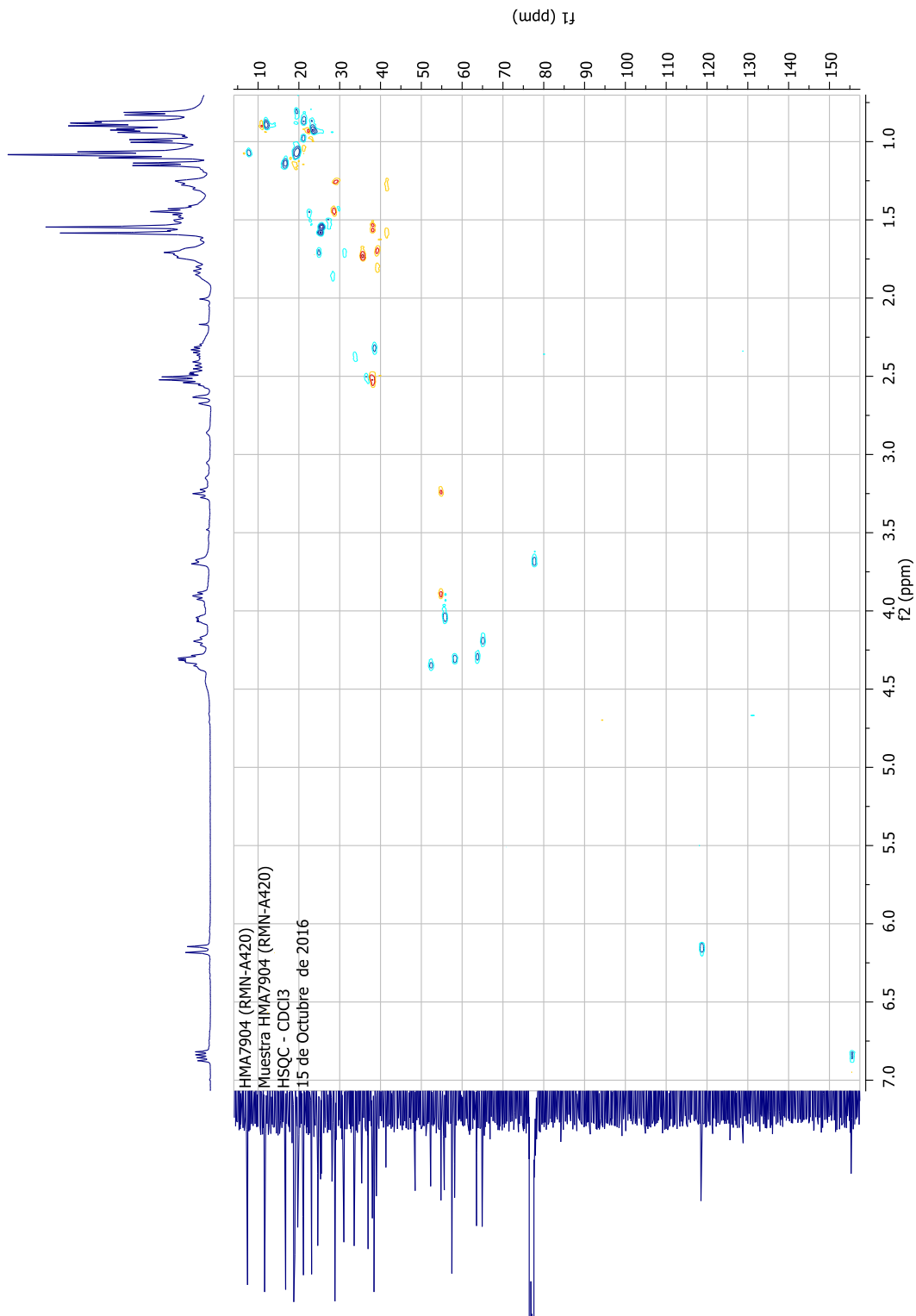
L. Anexo: RMN-¹³C del compuesto 2 (CDCl₃, 100 MHz).



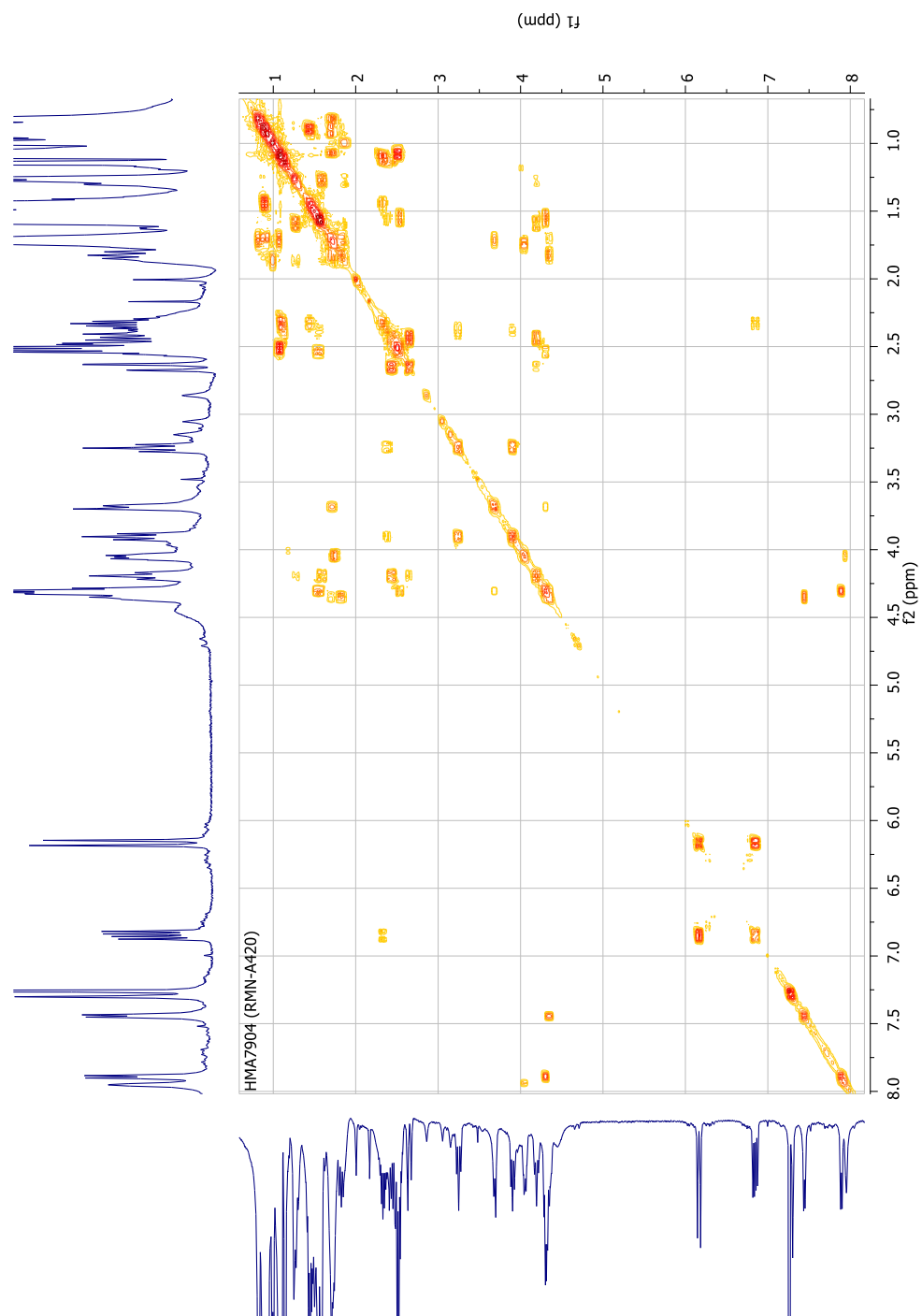
M. Anexo: APT del compuesto 2 (CDCl₃, 100 MHz).



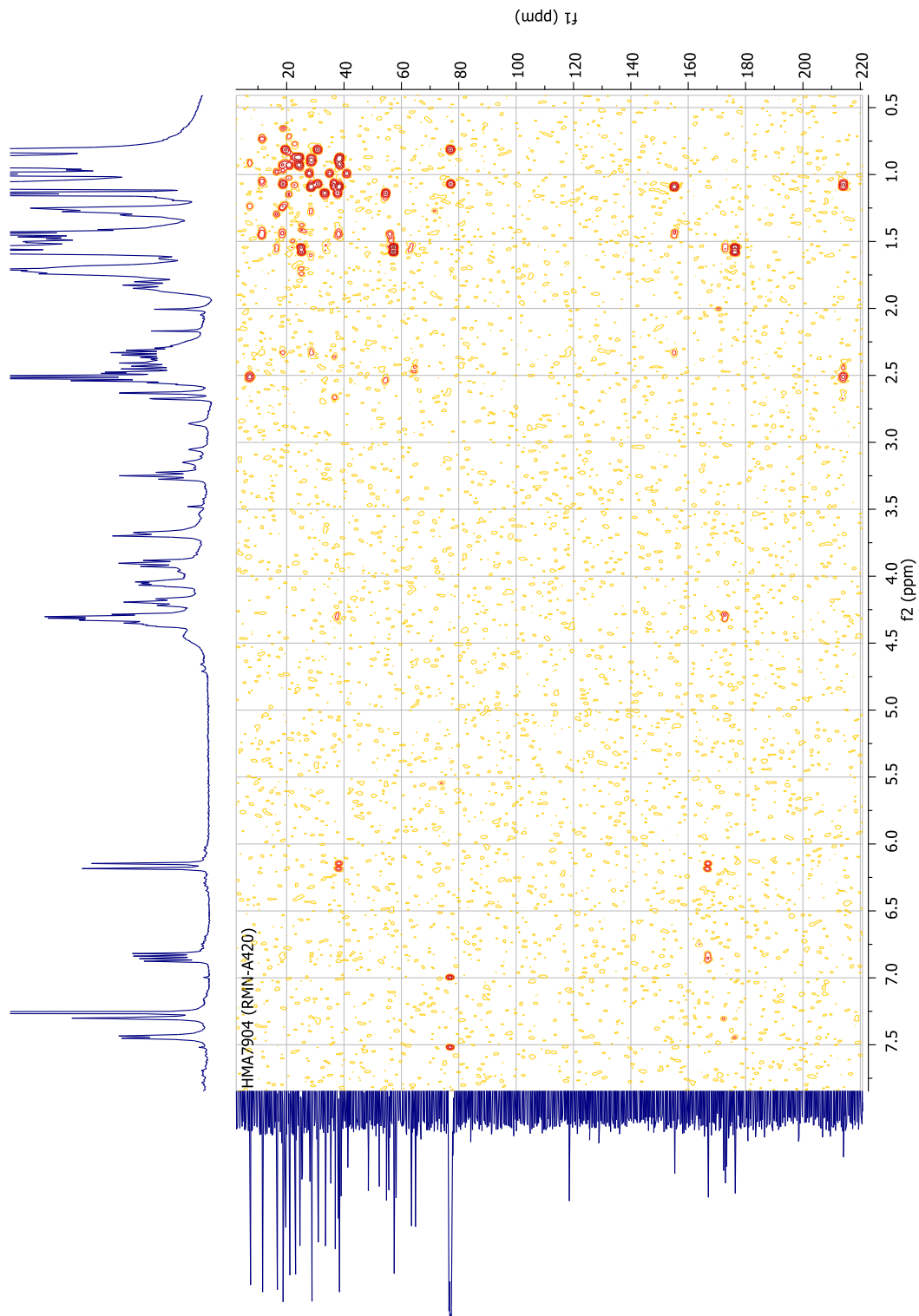
N. Anexo: HSQC del compuesto 2 (CDCl₃, 400 MHz).



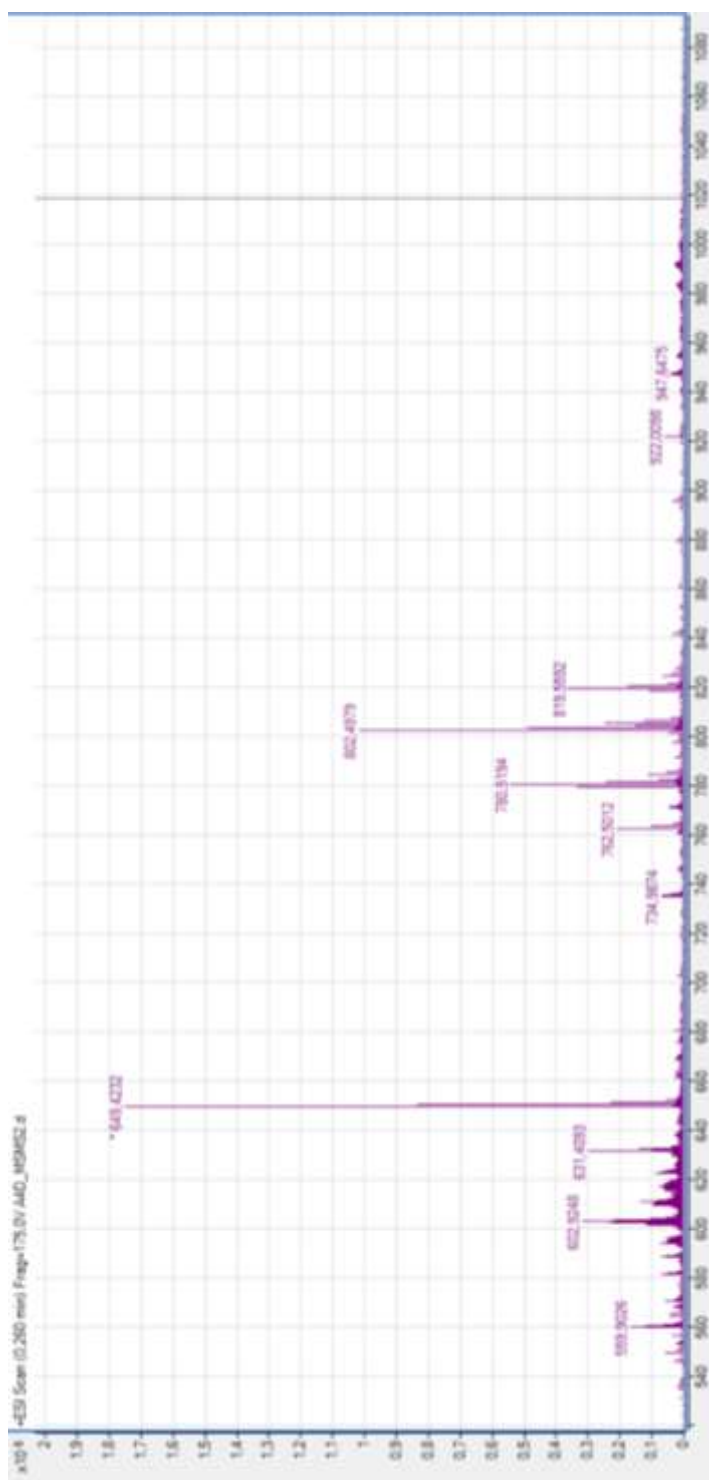
O. Anexo: COSY del compuesto 2 (CDCl₃, 400 MHz).



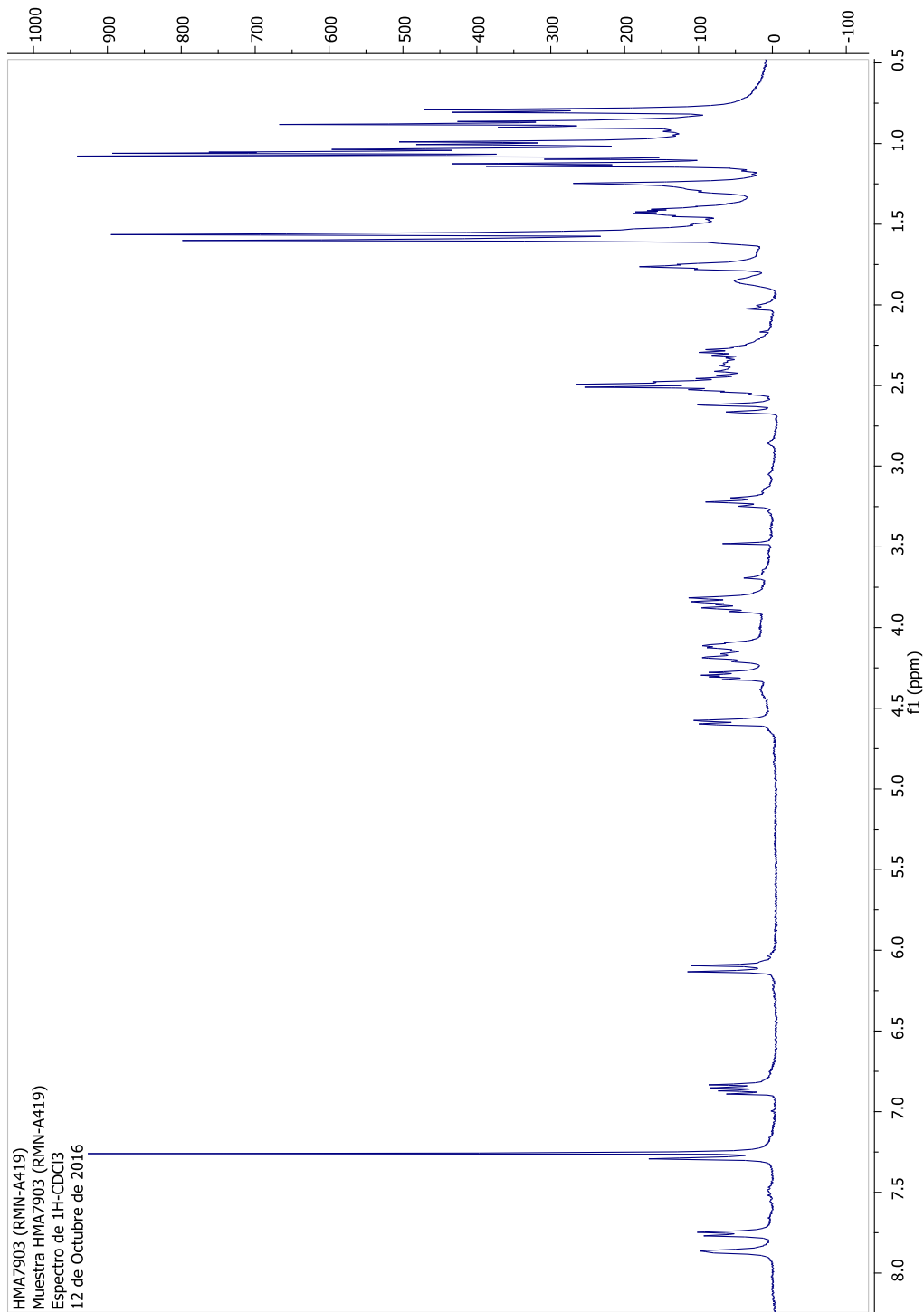
P. Anexo: HMBC del compuesto 2 (CDCl₃, 400 MHz).



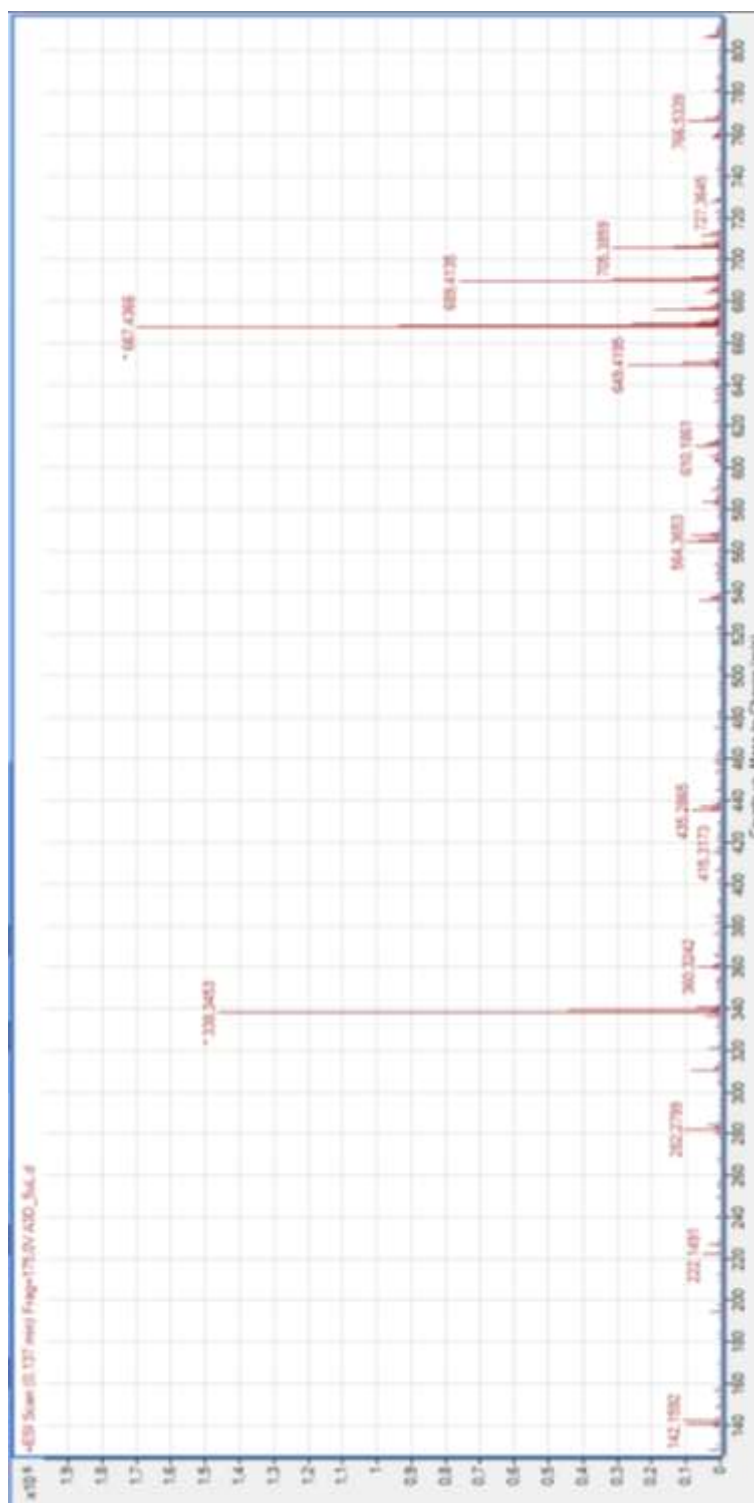
Q. Anexo: Espectro de masas del compuesto 2.



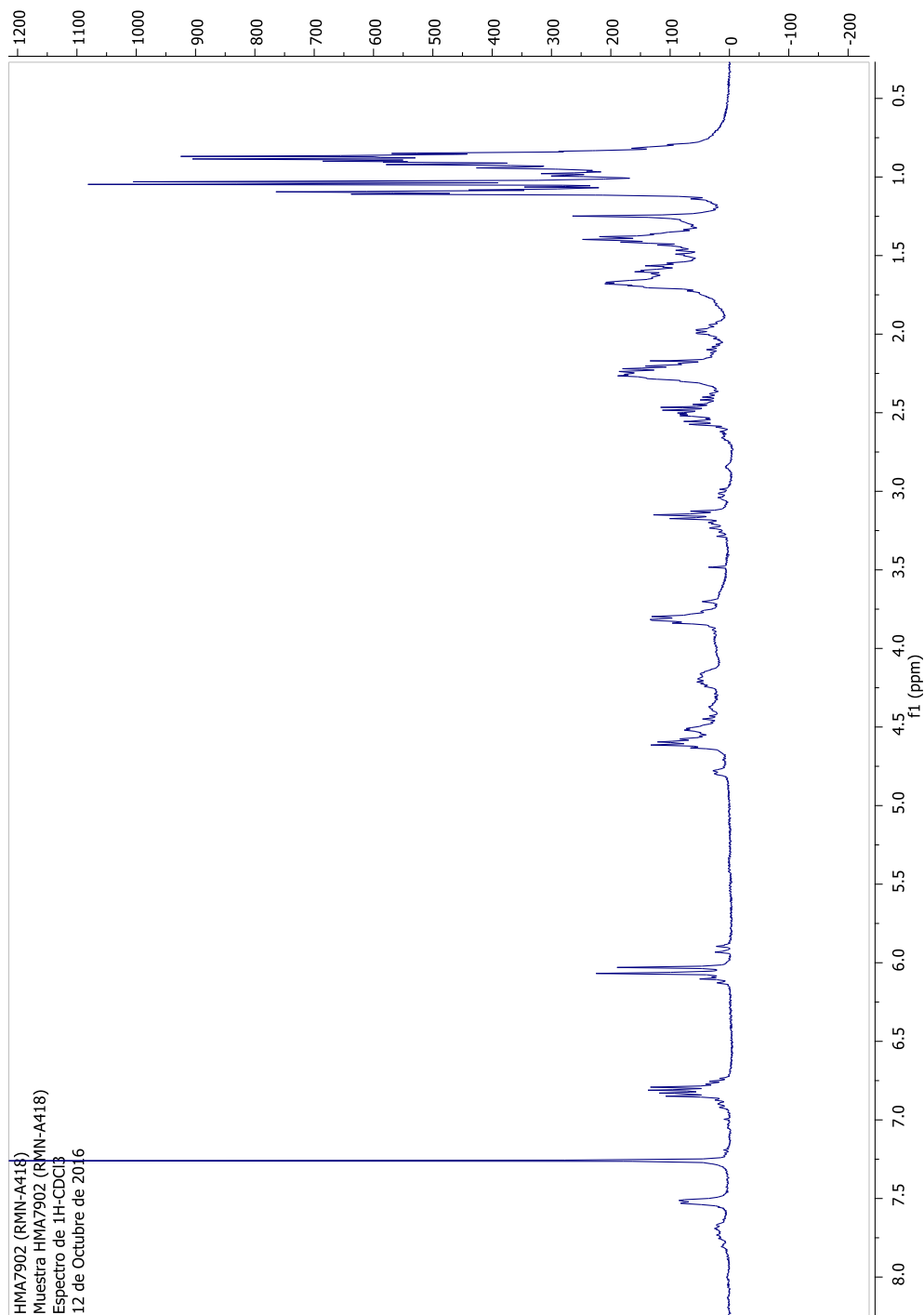
R. Anexo: RMN-¹H del compuesto 3 (CDCl₃, 400 MHz).



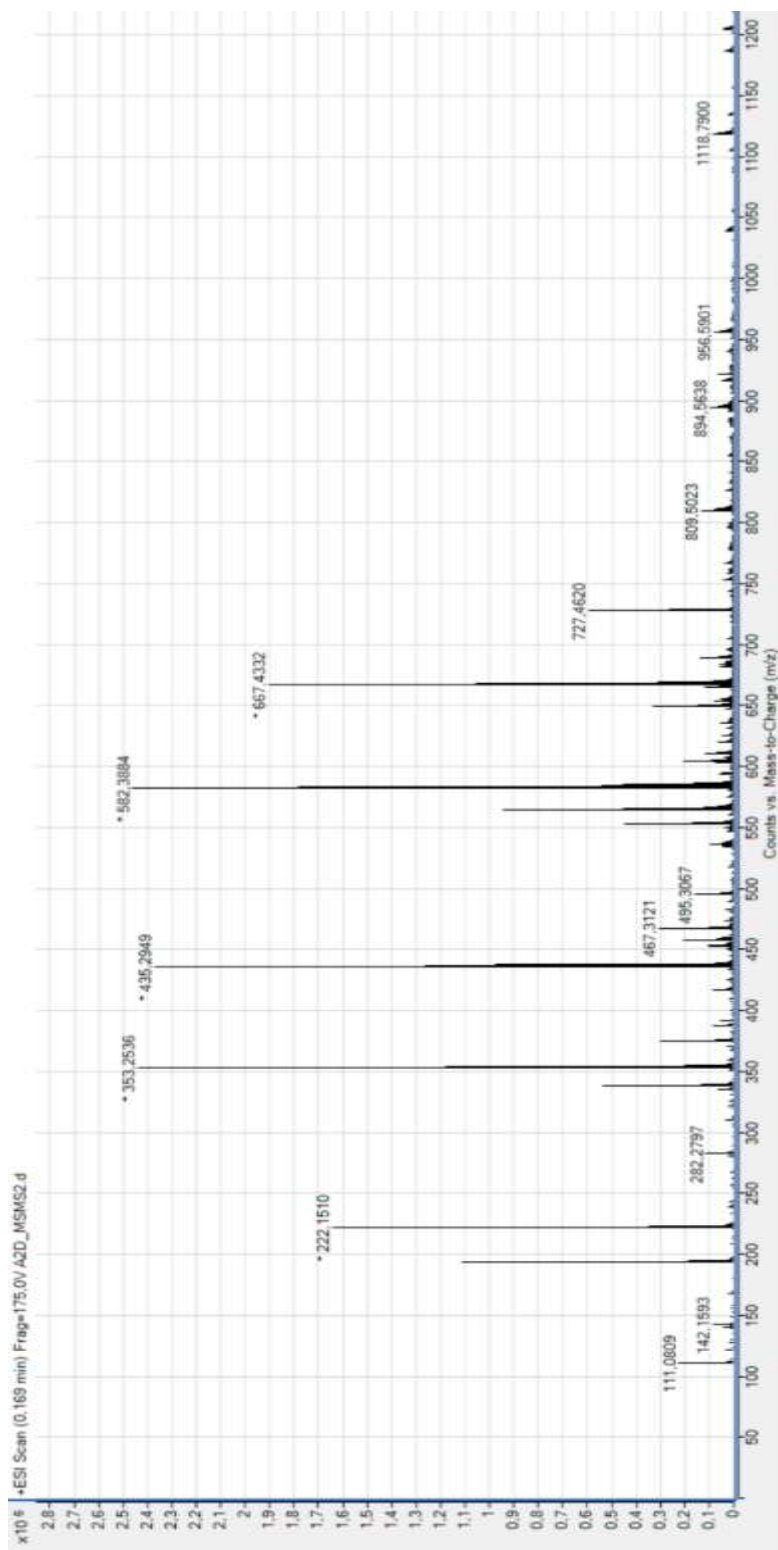
S.Anexo: Espectro de masas del compuesto 3.



T. Anexo: RMN-¹H del compuesto 4 (CDCl₃, 400 MHz).



U. Anexo: Espectro de masas del compuesto 4.



Bibliografía

1. Gerwick WH, Moore BS. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chem Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jan;19(1):85–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.014>
2. Fenical W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem Rev* [Internet]. American Chemical Society ; 1993 Jul [cited 2016 Oct 23];93(5):1673–83. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00021a001>
3. Debbab A, Aly AH, Lin WH, Proksch P. Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. *Microb Biotechnol* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2010 Sep [cited 2016 Oct 23];3(5):544–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x>
4. Castellanos L, Ramos F. Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia [Internet]. [cited 2016 Dec 13]. Available from: <http://ciencias.bogota.unal.edu.co/gruposdeinvestigacion/pnmarinos/>
5. Bhadury P, Mohammad BT, Wright PC. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer-Verlag; 2006 May 21 [cited 2016 Oct 23];33(5):325–37. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-005-0070-3>
6. Newman DJ, Hill RT. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer-Verlag; 2006 Jul 6 [cited 2016 Oct 23];33(7):539–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-006-0115-2>
7. Bhatnagar I, Kim S-K. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. *Mar Drugs* [Internet]. Molecular Diversity Preservation International; 2010 Oct 15 [cited 2016 Oct 23];8(10):2673–701. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/8/10/2673/>

8. Hyakumachi M, Takahashi H, Matsubara Y, Someya N, Shimizu M, Kobayashi K, et al. Recent studies on biological control of plant diseases in Japan. *J Gen Plant Pathol* [Internet]. 2014 Jul 9;80(4):287–302. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10327-014-0524-4>
9. Ali U, Syed JH, Malik RN, Katsoyiannis A, Li J, Zhang G, et al. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: A review [Internet]. Vols. 476–477, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V.; 2014. p. 705–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.107>
10. Correa Velandia H. Estudios de bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias con actividad biológica Fase IV [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2007. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8095/1/198011.2012.pdf>
11. Pinzón Espinosa AC. Metabolitos mayoritarios y evaluación de actividad antimicrobiana de bacterias aisladas del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* del Caribe colombiano [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2012. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8846/1/angelapinzonespinosa.2012.pdf>
12. Martínez Matamoros D. Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de bacterias del phylum Firmicutes aisladas del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* recolectado en la isla de providencia [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2012. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/10743/1/197566.2012.pdf>
13. Romero Otero AR. Selección de cepas de hongos micromicetos aislados de área de manglar del caribe colombiano con posible actividad antimicrobiana. Universidad de Colombia; 2013.
14. Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Ait Barka E. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2008 [cited 2016 Nov 25];32(4). Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00113.x>
15. Tsonos J, Vandenheuvel D, Briers Y, De Greve H, Hernalsteens J-P, Lavigne R. Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters. *Vet Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2016 Oct 30];171(3):460–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513005002>

16. Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh J-W. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2013 Nov 5 [cited 2016 Oct 24];97(22):9621–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5206-1>
17. SIPSA (Sistema de información de precios y abastecimiento del sector agropecuario), Rural M de A y D, DANE. El arroz: producción en Colombia. Boletín mensual: Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria [Internet]. Colombia; 2013 [cited 2016 Aug 22];1–3. Available from: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_junio_2013.pdf
18. DANE. Área sembrada de arroz mecanizado creció 27,1 % en primer semestre de 2015 [Internet]. Comunicado de prensa. 2015 [cited 2016 Aug 26]. p. 1–2. Available from: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/arroz/cp_arroz_Isem15.pdf?phpMyAdmin=a9ticq8rv198vhk5e8cck52r11
19. DANE. Encuesta nacional de arroz mecanizado [Internet]. Boletín técnico. 2015 [cited 2016 Aug 26]. p. 14. Available from: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/arroz/bol_arroz_Isem15.pdf?phpMyAdmin=a9ticq8rv198vhk5e8cck52r11
20. Zhou-qi C, Bo Z, Guan-lin X, Bin L, Shi-wen H. Research Status and Prospect of *Burkholderia glumae*, the Pathogen Causing Bacterial Panicle Blight. *Rice Sci* [Internet]. 2016 May [cited 2016 Aug 22];23(3):111–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672630816300014>
21. Flórez Zapata NMV, Vélez D. Determination of the Infeccion of *Burkholderia glumae* in Comercial Colombian Rice Varieties. *Rev Fac Nac Agron Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín*; 2011;64(2):6093–104.
22. Zhou XG. First Report of Bacterial Panicle Blight of Rice Caused by *Burkholderia glumae* in South Africa. *Plant Dis* [Internet]. The American Phytopathological Society; 2014 Apr [cited 2016 Oct 30];98(4):566–566. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-13-0913-PDN>
23. Ham JH, Melanson RA, Rush MC. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol Plant Pathol* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2011 May [cited 2016 Oct

- 30];12(4):329–39. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1364-3703.2010.00676.x>
24. Casida JE. The greening of pesticide-environment interactions: some personal observations. *Environ Health Perspect* [Internet]. National Institute of Environmental Health Science; 2012 Apr [cited 2016 Oct 30];120(4):487–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472325>
25. Baek S-Y, Jurng J, Chang Y-S. Spatial distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and dechlorane plus in Northeast Asia. *Atmos Environ* [Internet]. 2013 [cited 2016 Oct 30];64:40–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231012008746>
26. Le Dang Q, Shin TS, Park MS, Choi YH, Choi GJ, Jang KS, et al. Antimicrobial Activities of Novel Mannosyl Lipids Isolated from the Biocontrol Fungus *Simplicillium lamellicola* BCP against Phytopathogenic Bacteria. *J Agric Food Chem* [Internet]. American Chemical Society; 2014 Apr 16 [cited 2016 Oct 24];62(15):3363–70. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf500361e>
27. Vincelli P. QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. *Plant Heal Instr* [Internet]. 2002 [cited 2016 Oct 30]; Available from: <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>
28. Copping LG, Duke SO. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manag Sci* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 2007 Jun [cited 2016 Aug 23];63(6):524–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ps.1378>
29. Li C, Wang J, Luo C, Ding W, Cox DG. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine mangrove fungi. *Nat Prod Res* [Internet]. Taylor & Francis; 2014 May 3 [cited 2016 Oct 29];28(9):616–21. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.887074>
30. Gal-Hemed I, Atanasova L, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS, Viterbo A, Yarden O. Marine Isolates of *Trichoderma* spp. as Potential Halotolerant Agents of Biological Control for Arid-Zone Agriculture. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011 Aug 1;77(15):5100–9. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00541-11>
31. Panizel I, Yarden O, Ilan M, Carmeli S. Eight New Peptaibols from Sponge-Associated

- Trichoderma atroviride*. Mar Drugs [Internet]. 2013 Dec 11;11(12):4937–60. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/11/12/4937/>
32. Bertrand J-C, Brochier-Armanet C, Gouy M, Westall F. For Three Billion Years, Microorganisms Were the Only Inhabitants of the Earth. In: Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015 [cited 2016 Oct 10]. p. 75–106. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9118-2_4
 33. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2010 Jan 30 [cited 2016 Oct 11];8(1):15–25. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2259>
 34. Ghoul M, Mitri S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. Trends Microbiol [Internet]. 2016 Oct [cited 2016 Oct 11];24(10):833–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16300749>
 35. Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? J Nat Prod [Internet]. 1989;52(6):1189–208. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50066a001>
 36. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2002 Sep [cited 2016 Oct 12];66(3):447–59, table of contents. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208999>
 37. Iupac. secondary metabolites. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology [Internet]. Research Triangle Park, NC: IUPAC; [cited 2016 Oct 11]. Available from: <http://goldbook.iupac.org/S05526.html>
 38. Li S, Wang P, Yuan W, Su Z, Bullard SH, Ibáñez AJ, et al. Endocidal Regulation of Secondary Metabolites in the Producing Organisms. Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 Jul 8 [cited 2016 Oct 12];6:29315. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep29315>
 39. Nützmänn H-W, Osbourn A. Gene clustering in plant specialized metabolism. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2014 [cited 2016 Nov 25];26:91–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166913006836>
 40. Weng J-K, Noel JP. The remarkable pliability and promiscuity of specialized

- metabolism. Cold Spring Harb Symp Quant Biol [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012 [cited 2016 Nov 25];77:309–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269558>
41. Goma G. Advances in Biochemical Engineering [Internet]. Vol. 61, Biochimie. 1979 [cited 2016 Oct 12]. XIX-XX. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908479801923>
 42. Abrudan MI, Smakman F, Grimbergen AJ, Westhoff S, Miller EL, van Wezel GP, et al. Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2016 Oct 12];112(35):11054–9. Available from: <http://www.pnas.org/content/112/35/11054.long>
 43. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jan 9 [cited 2016 Oct 13];62(1):5–16. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ja.2008.16>
 44. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Aug 18 [cited 2016 Oct 13];65(8):385–95. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ja.2012.27>
 45. Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E, Ziemert N. Antibiotic drug discovery. Microb Biotechnol [Internet]. Wiley-Blackwell; 2016 Sep [cited 2016 Oct 13];9(5):541–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12388>
 46. Zheng Y-K, Qiao X-G, Miao C-P, Liu K, Chen Y-W, Xu L-H, et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. Ann Microbiol [Internet]. 2016 Jun 25;66(2):529–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-015-1153-7>
 47. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycol Res [Internet]. 2002 Sep;106(9):996–1004. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208601501>
 48. Liu X, Ashforth E, Ren B, Song F, Dai H, Liu M, et al. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. J Antibiot (Tokyo)

- [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Aug 7 [cited 2016 Oct 13];63(8):415–22. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ja.2010.56>
49. Stevenson A, Burkhardt J, Cockell CS, Cray JA, Dijksterhuis J, Fox-Powell M, et al. Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life. *Environ Microbiol* [Internet]. 2015 Feb;17(2):257–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12598>
50. Karl DM. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 Oct [cited 2016 Oct 18];5(10):759–69. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1749>
51. Stewart EJ. Growing Unculturable Bacteria. *J Bacteriol* [Internet]. 2012 Aug 15;194(16):4151–60. Available from: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00345-12>
52. Simon C, Daniel R. Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2011 Feb [cited 2016 Oct 20];77(4):1153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169428>
53. Rateb ME, Ebel R, Bugni TS, Ireland CM, Saleem M, Ali MS, et al. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat Prod Rep* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2011 [cited 2016 Oct 13];28(2):290. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0np00061b>
54. Letzel A-C, Pidot SJ, Hertweck C. A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world. *Nat Prod Rep* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2013 [cited 2016 Oct 20];30(3):392–428. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2NP20103H>
55. Monciardini P, Iorio M, Maffioli S, Sosio M, Donadio S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2014 May [cited 2016 Oct 20];7(3):209–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12123>
56. Davies J, Ryan KS. Introducing the Parvome: Bioactive Compounds in the Microbial World. *ACS Chem Biol* [Internet]. American Chemical Society; 2012 Feb 17 [cited 2016 Oct 20];7(2):252–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb200337h>

57. Wiemann P, Keller NP. Strategies for mining fungal natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2014 Feb 22 [cited 2016 Oct 13];41(2):301–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-013-1366-3>
58. Hoffmeister D, Keller NP, Bennett J, Chung K, Gill M, Steglich W, et al. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2007 [cited 2016 Nov 21];24(2):393–416. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B603084>
59. Lin H-C, Chooi Y-H, Dhingra S, Xu W, Calvo AM, Tang Y. The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β -*trans*-bergamotene. *J Am Chem Soc* [Internet]. NIH Public Access; 2013 Mar 27 [cited 2016 Nov 21];135(12):4616–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488861>
60. Maiya S, Grundmann A, Li X, Li S-M, Turner G. Identification of a Hybrid PKS/NRPS Required for Pseurotin A Biosynthesis in the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* [Internet]. WILEY-VCH Verlag; 2007 Sep 24 [cited 2016 Nov 21];8(14):1736–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.200700202>
61. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. National Academy of Sciences; 2006 Aug 8 [cited 2016 Oct 24];103(32):12115–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880384>
62. Jones EBG. Are there more marine fungi to be described? *Bot Mar* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2016 Oct 24];54(4):343–54. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/botm.2011.54.issue-4/bot.2011.043/bot.2011.043.xml>
63. Wang X, Mao Z-G, Song B-B, Chen C-H, Xiao W-W, Hu B, et al. Advances in the Study of the Structures and Bioactivities of Metabolites Isolated from Mangrove-Derived Fungi in the South China Sea. *Mar Drugs* [Internet]. 2013 Sep 30;11(10):3601–16. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/11/10/3601/>
64. Snelgrove P. *An Ocean of Discovery: Biodiversity Beyond the Census of Marine Life.*

- Planta Med [Internet]. Georg Thieme Verlag KG; 2016 Apr 19 [cited 2016 Oct 14];82(09/10):790–9. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-103934>
65. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jan 19 [cited 2016 Oct 24];8(1):69–85. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2487>
 66. Villa FA, Gerwick L. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. *Immunopharmacol Immunotoxicol* [Internet]. Taylor & Francis; 2010 Jun 5 [cited 2016 Oct 24];32(2):228–37. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08923970903296136>
 67. Sashidhara K V., White KN, Crews P. A Selective Account of Effective Paradigms and Significant Outcomes in the Discovery of Inspirational Marine Natural Products. *J Nat Prod* [Internet]. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy; 2009 Mar 27 [cited 2016 Oct 24];72(3):588–603. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np800817y>
 68. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Mar Drugs* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014 Feb 17 [cited 2016 Oct 24];12(2):1066–101. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/2/1066/>
 69. Newman D, Cragg G. Marine-Sourced Anti-Cancer and Cancer Pain Control Agents in Clinical and Late Preclinical Development. *Mar Drugs* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014 Jan 14 [cited 2016 Oct 24];12(1):255–78. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/1/255/>
 70. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2016;33(3):382–431. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5NP00156K>
 71. Mayer A. Marine Pharmacology: Clinical Development [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 24]. Available from: <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>
 72. Yakushiji F, Tanaka H, Muguruma K, Iwahashi T, Yamazaki Y, Hayashi Y. Water-Soluble Prodrug of Antimicrotubule Agent Plinabulin: Effective Strategy with Click Chemistry.

- Chem - A Eur J [Internet]. WILEY-VCH Verlag; 2011 Nov 4 [cited 2016 Oct 24];17(45):12587–90. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201102293>
73. Hayashi Y, Yamazaki-Nakamura Y, Yakushiji F. Medicinal Chemistry and Chemical Biology of Diketopiperazine-Type Antimicrotubule and Vascular-Disrupting Agents. Chem Pharm Bull [Internet]. The Pharmaceutical Society of Japan; 2013 [cited 2016 Oct 24];61(9):889–901. Available from: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/cpb/c13-00404?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>
 74. Wang M, Carver JJ, Phelan V V, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nat Biotechnol [Internet]. Nature Research; 2016 Aug 9 [cited 2016 Aug 24];34(8):828–37. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.3597>
 75. Gomes N, Lefranc F, Kijjoa A, Kiss R. Can Some Marine-Derived Fungal Metabolites Become Actual Anticancer Agents? Mar Drugs [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015 Jun 19 [cited 2016 Oct 25];13(6):3950–91. Available from:
<http://www.mdpi.com/1660-3397/13/6/3950/>
 76. BeyondSpring Pharmaceuticals. Broadening Our Developmental Pipeline [Internet]. 2016. Available from: <http://www.beyondspringpharma.com/en/pipeline/>
 77. Kohlmeyer J, Kohlmeyer E. Marine mycology : the higher fungi. Academic Press; 1979. 690 p.
 78. Jones EBG, Suetrong S, Sakayaroj J, Bahkali AH, Abdel-Wahab MA, Boekhout T, et al. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. Fungal Divers [Internet]. 2015 Jul 30;73(1):1–72. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s13225-015-0339-4>
 79. Jones EBG. Fifty years of marine mycology. Fungal Divers [Internet]. 2011 Sep 4;50(1):73–112. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13225-011-0119-8>
 80. Barghoorn E, Linder D. Marine fungi: their taxonomy and biology. Farlowia. 1944;1:395–467.
 81. Vishniac HS. DIVISION OF MYCOLOGY*: MARINE MYCOLOGY. Trans N Y Acad Sci

- [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 1955 Feb [cited 2016 Aug 22];17(4 Series II):352–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2164-0947.1955.tb01756.x>
82. Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SA, Sutthiwong N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;26:56–61.
 83. González M del C, Herrera T, Ulloa M, Hanlin RT. Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico. *Mycoscience*. Elsevier; 1998;39(2):115–21.
 84. Toledo-Hernández C, Bones-González A, Ortiz-Vázquez OE, Sabat AM, Bayman P. Fungi in the sea fan *Gorgonia ventalina*: diversity and sampling strategies. *Coral Reefs* [Internet]. Springer-Verlag; 2007 Aug 13 [cited 2016 Oct 29];26(3):725–30. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00338-007-0252-8>
 85. Zuluaga-Montero A, Ramírez-Camejo L, Rauscher J, Bayman P. Marine isolates of *Aspergillus flavus*: Denizens of the deep or lost at sea? *Fungal Ecol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2016 Oct 29];3(4):386–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504810000371>
 86. Gonzalez MC, Hanlin RT, Ulloa M. A checklist of higher marine fungi of Mexico. *Mycotaxon*. Mycotaxon; 2001;80:241–53.
 87. Moree WJ, Yang JY, Zhao X, Liu W-T, Aparicio M, Atencio L, et al. Imaging Mass Spectrometry of a Coral Microbe Interaction with Fungi. *J Chem Ecol* [Internet]. Springer US; 2013 Jul 24 [cited 2016 Oct 29];39(7):1045–54. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-013-0320-1>
 88. Ramírez-Camejo LA, Zuluaga-Montero A, Lázaro-Escudero M, Hernández-Kendall V, Bayman P. Phylogeography of the cosmopolitan fungus *Aspergillus flavus*: is everything everywhere? *Fungal Biol*. 2012;116(3):452–63.
 89. Caballero-George C, Bolaños J, Ochoa E, Carballo JL, Cruz JA, Elizabeth Arnold A. Protocol to isolate sponge-associated fungi from tropical waters and an examination of their cardioprotective potential. *Curr Trends Biotechnol Pharm*. 2010;4(4):881–99.
 90. Christophersen C, Crescente O, Frisvad JC, Gram L, Nielsen J, Nielsen PH, et al. Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia* [Internet]. Kluwer Academic Publishers; 1998 [cited 2016 Oct 29];143(3):135–8. Available from:

- <http://link.springer.com/10.1023/A:1006961500325>
91. Bugni TS, Ireland CM, Fenical W, Bernan VS, Greenstein M, Maiese WM, et al. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2004 [cited 2016 Oct 13];21(1):143. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b301926h>
 92. Blunt JW, Copp BR, Keyzers R a, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2014;31(2):160. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389707>
 93. Wu B, Oesker V, Wiese J, Schmaljohann R, Imhoff J. Two New Antibiotic Pyridones Produced by a Marine Fungus, *Trichoderma* sp. Strain MF106. *Mar Drugs* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014 Mar 6 [cited 2016 Oct 29];12(3):1208–19. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/3/1208/>
 94. Mayer A. M. S., Rodriguez A. D., Taglialatela-Scafati O. FN. Marine Pharmacology in 2009 – 2011 : Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms. *Mar Drugs* [Internet]. 2013 Jul 16;11(7):2510–73. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/11/7/2510/>
 95. Duarte K, Rocha-Santos TAP, Freitas AC, Duarte AC. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Apr;34(1):97–110. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.10.014>
 96. Proksch P, Ebel R, Edrada R, Riebe F, Liu H, Diesel A, et al. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. *Bot Mar* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2016 Oct 29];51(3). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bot.2008.51.issue-3/bot.2008.014/bot.2008.014.xml>
 97. Gomes N, Bessa L, Buttachon S, Costa P, Buaruang J, Dethoup T, et al. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Tryptoquivalines and Meroditerpenes Isolated from the Marine-Derived Fungi *Neosartorya paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunoda*, and the Soil Fungi *N. fischeri* and *N. siamensis*. *Mar Drugs* [Internet]. Multidisciplinary Digital

- Publishing Institute; 2014 Jan 28 [cited 2016 Oct 29];12(2):822–39. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/2/822/>
98. Li C, Wang J, Luo C, Ding W, Cox DG. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine mangrove fungi. *Nat Prod Res* [Internet]. 2014 May 3;28(9):616–21. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.887074>
 99. Departamento Nacional de Planeación. Política para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad (Documento CONPES 3697) [Internet]. 2011. Available from: <https://www.cbd.int/doc/measures/abs/post-protocol/msr-abs-co-es.pdf>
 100. Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, et al. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2004 Aug [cited 2016 Oct 31];58(2):169–88. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701204000983>
 101. Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Apr [cited 2016 Oct 31];182(2):314–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
 102. Yin W, Keller NP. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol* [Internet]. The Microbiological Society of Korea; 2011 Jun 30 [cited 2016 Oct 26];49(3):329–39. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-011-1009-1>
 103. VanderMolen KM, Raja HA, El-Elimat T, Oberlies NH, Bills G, Platas G, et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cited 2016 Oct 30];3(1):71. Available from: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-3-71>
 104. Walker GM, White NA. Introduction to Fungal Physiology. In: *Fungi* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cited 2016 Nov 3]. p. 1–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470015330.ch1>
 105. Choi SY, Ryu DDY, Rhee JS. Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*.

- Biotechnol Bioeng [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1982 May [cited 2016 Nov 20];24(5):1165–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260240513>
106. Deng Y, Yang F, Naqvi NI. The role of nutrients in fungal development and pathogenesis. In: Fungal Biomolecules [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [cited 2016 Nov 20]. p. 201–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118958308.ch15>
 107. Hicks JK. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Galpha protein-dependent signaling pathway. EMBO J [Internet]. EMBO Press; 1997 Aug 15 [cited 2016 Nov 1];16(16):4916–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305634>
 108. Wang Y, Geng Z, Jiang D, Long F, Zhao Y, Su H, et al. Characterizations and functions of regulator of G protein signaling (RGS) in fungi. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2013 Sep 6 [cited 2016 Nov 1];97(18):7977–87. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5133-1>
 109. Maldonado LA, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana ET. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. Antonie Van Leeuwenhoek [Internet]. Springer Netherlands; 2009 Feb 21 [cited 2016 Oct 16];95(2):111–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-008-9294-3>
 110. Betancur LA, Naranjo-Gaybor SJ, Vinchira-Villarraga DM, Moreno-Sarmiento NC, Maldonado LA, Suarez-Moreno ZR, et al. Marine Actinobacteria as a Source of Compounds for Phytopathogen Control: An integrative Metabolic-Profilng / Bioactivity and Taxonomical Approach. PLoS One. 2017;(Pendiente).
 111. Stirling D. DNA Extraction from Fungi, Yeast, and Bacteria. In: Bartlett JMS, Stirling D, editors. PCR Protocols [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2003. p. 53–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-384-4:53>
 112. Pérez-Vera O a, Yáñez-Morales MD, Alvarado-Rosales D, Cibrian-Tovar D, García-Díaz SE. Fungi associated to eucalyptus, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. Agrociencia [Internet]. 2005;39(3):311–8. Available from: <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2005/may-jun/art-8.pdf>

113. Kjer J, Debbab A, Aly AH, Proksch P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat Protoc* [Internet]. 2010;5(3):479–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.233>
114. Vansteelandt M, Kerzaon I, Blanchet E, Fossi Tankoua O, Robiou Du Pont T, Joubert Y, et al. Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. *Fungal Biol* [Internet]. 2012 Sep;116(9):954–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614612001171>
115. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* [Internet]. Elsevier; 2016;6(2):71–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
116. Yoshikawa Y, Ikai K, Umeda Y, Ogawa A, Takesako K, Kato I, et al. Isolation, structures, and antifungal activities of new aureobasidins. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1993 [cited 2016 Aug 30];46(9):1347–54. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/46.1347?from=CrossRef>
117. Calvo AM. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2008 Jul [cited 2016 Nov 1];45(7):1053–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184508000509>
118. Belofsky GN, Jensen PR, Fenical W. Sansalvamide: A new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Tetrahedron Lett* [Internet]. 1999 Apr [cited 2016 Aug 25];40(15):2913–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403999003937>
119. Horton TR. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant Soil* [Internet]. Kluwer Academic Publishers; 2002 [cited 2016 Nov 20];244(1/2):29–39. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020268020563>
120. Höller U, Wright AD, Matthee GF, König GM, Draeger S, Aust H-J, et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol Res* [Internet]. 2000 Nov;104(11):1354–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208614896>
121. Rédou V, Navarri M, Meslet-Cladière L, Barbier G, Burgaud G. Species richness and

- adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2015 May 15 [cited 2016 Aug 25];81(10):3571–83. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769836>
122. Hofer K, Barmeier G, Schmidhalter U, Habler K, Rychlik M, Hückelhoven R, et al. Effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight in spring barley. *Crop Prot* [Internet]. 2016 Oct [cited 2016 Aug 25];88:18–27. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219416301181>
123. Kelly A, Proctor RH, Belzile F, Chulze SN, Clear RM, Cowger C, et al. The geographic distribution and complex evolutionary history of the NX-2 trichothecene chemotype from *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2016 Aug 25];95:39–48. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184516300937>
124. Gondal AS, Munawar M, Khan SA, Javed N, Ul Haq I. Bio-management of tomato wilt complex caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Nematology* [Internet]. 2015 Apr 23;17(4):479–85. Available from:
<http://booksandjournals.brillonline.com/content/journals/10.1163/15685411-00002882>
125. Jayasiri SC, Hyde KD, Ariyawansa HA, Bhat J, Buyck B, Cai L, et al. The Faces of Fungi database: fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. *Fungal Divers* [Internet]. Springer Netherlands; 2015 Sep 3 [cited 2016 Nov 21];74(1):3–18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13225-015-0351-8>
126. Hibbett DS, Taylor JW. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Jan 3 [cited 2016 Nov 21];11(2):129–33. Available from:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2963>
127. Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K-H, Kõljalg U, et al. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. Fairhead C, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2006 Dec 20 [cited 2016 Nov 21];1(1):e59. Available from:

- <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000059>
128. Jones EBG, Suetrong S, Sakayaroj J, Bahkali AH, Abdel-Wahab MA, Boekhout T, et al. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Divers* [Internet]. Springer Netherlands; 2015 Jul 30 [cited 2016 Oct 25];73(1):1–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13225-015-0339-4>
 129. Talley LD, Pickard GL, Emery WJ, Swift JH, Talley LD, Pickard GL, et al. Chapter 3 – Physical Properties of Seawater. In: *Descriptive Physical Oceanography*. 2011. p. 29–65.
 130. Kossuga MH, Romminger S, Xavier C, Milanetto MC, Valle MZ do, Pimenta EF, et al. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. Sociedade Brasileira de Farmacognosia; 2012 Apr [cited 2016 Oct 30];22(2):257–67. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 131. Yang LH, Miao L, Lee OO, Li X, Xiong H, Pang K-L, et al. Effect of culture conditions on antifouling compound production of a sponge-associated fungus. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. Springer-Verlag; 2007 Mar 29 [cited 2016 Oct 30];74(6):1221–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0780-0>
 132. Larkin RP, Fravel DR. Mechanisms of Action and Dose-Response Relationships Governing Biological Control of Fusarium Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* [Internet]. The American Phytopathological Society ; 1999 Dec [cited 2016 Dec 14];89(12):1152–61. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO.1999.89.12.1152>
 133. Waweru B, Turoop L, Kahangi E, Coyne D, Dubois T. Non-pathogenic *Fusarium* oxysporum endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). *Biol Control* [Internet]. 2014 Jul [cited 2016 Dec 14];74:82–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964414000784>
 134. Hotaka D, Amnuaykanjanasin A, Maketon C, Siritutsoontorn S, Maketon M. Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* CKPL-053 in controlling *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) in orchid farms in Thailand. *Appl Entomol Zool* [Internet]. Springer Japan; 2015 Aug 27 [cited 2016 Aug 26];50(3):317–29. Available from:

- <http://link.springer.com/10.1007/s13355-015-0339-6>
135. Castillo Lopez D, Zhu-Salzman K, Ek-Ramos MJ, Sword GA, Porrás-Alfaro A, Bayman P, et al. The Entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both Greenhouse and Field Conditions. Wilkinson TL, editor. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2014 Aug 5 [cited 2016 Aug 26];9(8):e103891. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103891>
 136. Brand D, Roussos S, Pandey A, Zilioli PC, Pohl J, Soccol CR. Development of a Bionematicide With *Paecilomyces lilacinus* to Control *Meloidogyne incognita*. Appl Biochem Biotechnol [Internet]. Humana Press; 2004 [cited 2016 Nov 22];118(1-3):081-8. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:118:1-3:081>
 137. Mohamed A, Nguyen CH, Mamitsuka H. Current status and prospects of computational resources for natural product dereplication: a review. Brief Bioinform [Internet]. 2016 Mar;17(2):309-21. Available from: <http://bib.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/bib/bbv042>
 138. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? Am J Bot [Internet]. Botanical Society of America; 2011 Mar [cited 2016 Nov 9];98(3):426-38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613136>
 139. Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycol Res. Elsevier; 1991;95(6):641-55.
 140. Gloer JB. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. In: Kubicek CP, Druzhinina IS, editors. Environmental and Microbial Relationships [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cited 2016 Nov 21]. p. 257-83. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-71840-6_15
 141. El-Elimat T, Figueroa M, Ehrmann BM, Cech NB, Pearce CJ, Oberlies NH. High-Resolution MS, MS/MS, and UV Database of Fungal Secondary Metabolites as a Dereplication Protocol for Bioactive Natural Products. J Nat Prod [Internet]. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy; 2013 Sep 27 [cited 2016 Nov 9];76(9):1709-16. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np4004307>

142. Wolfender J-L, Marti G, Ferreira Queiroz E. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. *Curr Org Chem* [Internet]. Bentham Science Publishers; 2010 Oct 1 [cited 2016 Aug 23];14(16):1808–32. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1385-2728&volume=14&issue=16&spage=1808>
143. Beutler JA, Alvarado AB, Schaufelberger DE, Andrews P, McCloud TG. Dereplication of Phorbol Bioactives: *Lynghya majuscula* and *Croton cuneatus*. *J Nat Prod* [Internet]. American Chemical Society; 1990 Jul [cited 2016 Nov 3];53(4):867–74. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50070a014>
144. Marini-Bettòlo GB, Nicoletti M, Patamia M, Galeffi C, Messina I. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier; 1981 Aug [cited 2016 Nov 3];213(1):113–27. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300806391>
145. Lang G, Mayhudin NA, Mitova MI, Sun L, van der Sar S, Blunt JW, et al. Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts. *J Nat Prod* [Internet]. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy; 2008 Sep [cited 2016 Aug 23];71(9):1595–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np8002222>
146. Lambert M, Wolfender J-L, Stærk D, Christensen SB, Hostettmann K, Jaroszewski JW. Identification of Natural Products Using HPLC-SPE Combined with CapNMR. *Anal Chem* [Internet]. American Chemical Society; 2007 Jan [cited 2016 Nov 9];79(2):727–35. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0616963>
147. Konishi Y, Kiyota T, Draghici C, Gao J-M, Yeboah F, Acoca S, et al. Molecular Formula Analysis by an MS/MS/MS Technique To Expedite Dereplication of Natural Products. *Anal Chem* [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Nov 9];79(3):1187–97. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac061391o>
148. Mitova MI, Murphy AC, Lang G, Blunt JW, Cole ALJ, Ellis G, et al. Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts. 2. The Isolation of Chrysaibol, an Antibiotic Peptaibol from a New Zealand Sample of the Mycoparasitic Fungus *Sepedonium chrysospermum*. *J Nat Prod* [Internet]. 2008 Sep;71(9):1600–3. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np800221b>

149. Robinette SL, Brüscheiler R, Schroeder FC, Edison AS. NMR in Metabolomics and Natural Products Research: Two Sides of the Same Coin. *Acc Chem Res* [Internet]. American Chemical Society; 2012 Feb 21 [cited 2016 Nov 9];45(2):288–97. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar2001606>
150. Lederberg J. How DENDRAL was conceived and born. In: *Proceedings of ACM conference on History of medical informatics* - [Internet]. New York, New York, USA: ACM Press; 1987 [cited 2016 Nov 22]. p. 5–19. Available from: <http://portal.acm.org/citation.cfm?doid=41526.41528>
151. Lederberg J. Topological mapping of organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1965 Jan [cited 2016 Nov 21];53(1):134–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16578584>
152. Mun IK, McLafferty FW. Computer Methods of Molecular Structure Elucidation from Unknown Mass Spectra. In 1981 [cited 2016 Nov 22]. p. 117–24. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1981-0173.ch008>
153. Smith DH, Gray NAB, Nourse JG, Crandell CW. The dendral project: recent advances in computer- assisted structure elucidation. *Anal Chim Acta* [Internet]. Elsevier; 1981 Nov [cited 2016 Nov 22];133(4):471–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267001954145>
154. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 1994 Nov [cited 2016 Nov 22];5(11):976–89. Available from: [http://link.springer.com/10.1016/1044-0305\(94\)80016-2](http://link.springer.com/10.1016/1044-0305(94)80016-2)
155. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1999 Dec 1 [cited 2016 Nov 22];20(18):3551–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%2528SICI%25291522-2683%252819991201%252920%253A18%253C3551%253A%253AAID-ELPS3551%253E3.0.CO%253B2-2>
156. Gasteiger J, Hanebeck W, Schulz KP. Prediction of mass spectra from structural information. *J Chem Inf Model* [Internet]. American Chemical Society; 1992 Jul 1 [cited

- 2016 Nov 22];32(4):264–71. Available from: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/ci00008a001>
157. Scheubert K, Hufsky F, Böcker S. Computational mass spectrometry for small molecules. *J Cheminform* [Internet]. Springer; 2013 Mar 1 [cited 2016 Nov 22];5(1):12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23453222>
158. Mohimani H, Pevzner PA. Dereplication, sequencing and identification of peptidic natural products: from genome mining to peptidogenomics to spectral networks. *Nat Prod Rep* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2016;33(1):73–86. Available from: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/np/c5np00050e>
159. Watrous J, Roach P, Alexandrov T, Heath BS, Yang JY, Kersten RD, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Jun 26;109(26):E1743–52. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203689109>
160. Bandeira N, Tsur D, Frank A, Pevzner PA. Protein identification by spectral networks analysis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(15):6140–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1851064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
161. Pevzner PA. Efficiency of Database Search for Identification of Mutated and Modified Proteins via Mass Spectrometry. *Genome Res* [Internet]. 2001 Feb 1;11(2):290–9. Available from: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.154101>
162. Tsur D, Tanner S, Zandi E, Bafna V, Pevzner PA. Identification of post-translational modifications by blind search of mass spectra. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2005 Dec 27;23(12):1562–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt1168>
163. Watts DJ, Strogatz SH. Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 1998 Jun 4 [cited 2016 Nov 9];393(6684):440–2. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/30918>
164. Albert-László B, Réka A. Emergence of Scaling in Random Networks. *Science* (80-) [Internet]. 1999 Oct 15 [cited 2016 Nov 9];286(5439):509–12. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.286.5439.509>
165. Ma’ayan A. Introduction to Network Analysis in Systems Biology. *Sci Signal* [Internet]. 2011 Sep 13;4(190):tr5. Available from:

- <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2001965>
166. Malliaros FD, Vazirgiannis M. Clustering and community detection in directed networks: A survey. *Phys Rep* [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Nov 9];533(4):95–142. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0370157313002822>
167. Covington BC, McLean JA, Bachmann BO, Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AMM, et al. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites. *Nat Prod Rep* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2017 [cited 2016 Nov 22];417:141–7. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6NP00048G>
168. Mycobank. *Purpureocillium* [Internet]. Available from: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=475160&Fields=All>
169. Luangsa-ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong S-B, Borman AM, Hywel-Jones NL, et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Aug [cited 2016 Nov 22];321(2):141–9. Available from: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>
170. Elbandy M, Shinde PB, Hong J-K, Bae K-S, Kim M-A, Lee S-M, et al. α -Pyrones and Yellow Pigments from the Sponge-Derived Fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Bull Korean Chem Soc* [Internet]. Korean Chemical Society; 2009 Jan 20 [cited 2016 Nov 22];30(1):188–92. Available from: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=JCGMCS&py=2009&vnc=v30n1&sp=188>
171. Karen Schmidt †, Ulrike Riese †, Zengzhi Li ‡ and, Matthias Hamburger* †. Novel Tetramic Acids and Pyridone Alkaloids, Militarinones B, C, and D, from the Insect Pathogenic Fungus *Paecilomyces militaris*. American Chemical Society; 2003;
172. Madariaga-Mazón A, González-Andrade M, González M del C, Glenn AE, Cerda-García-Rojas CM, Mata R. Absolute Configuration of Acremoxanthone C, a Potent Calmodulin Inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *J Nat Prod* [Internet]. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy; 2013 Aug 23 [cited 2016 Nov 22];76(8):1454–60. Available from:

- <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np4002477>
173. Mosadeghzad Z, Zuriati Z, Asmat A, Gires U, Wickneswari R, Pittayakhajonwut P, et al. Chemical components and bioactivity of the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp. Collected from Tinggi Island, Malaysia. *Chem Nat Compd* [Internet]. Springer US; 2013 Sep 19 [cited 2016 Nov 22];49(4):621–5. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10600-013-0693-y>
174. Horn WS, Smith JL, Bills GF, Raghoobar SL, Helms GL, Kurtz MB, et al. Sphingofungins E and F: Novel serinepalmitoyl transferase inhibitors from *Paecilomyces variotii*. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1992 [cited 2016 Nov 8];45(10):1692–6. Available from:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/45.1692?from=CrossRef>
175. Arai T, Mikami Y, Fukushima K, Utsumi T, Yazawa K. A new antibiotic, Leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1973 [cited 2016 Nov 22];26(3):157–61. Available from:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/26.157?from=CrossRef>
176. Ishiguro K, Arai T. Action of the peptide antibiotic leucinostatin. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. American Society for Microbiology; 1976 Jun [cited 2016 Nov 22];9(6):893–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/945714>
177. Sato M, Beppu T, Arima K. Properties and Structure of a novel peptide antibiotic No. 1907. *Agric Biol Chem* [Internet]. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry; 1980 [cited 2016 Aug 30];44(12):3037–40. Available from:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bbb1961/44.3037?from=CrossRef>
178. Isogai A, Susuki A, Higashikawa S, Kuyama S, Tamura S. Isolation and biological activity of a peptidal antibiotic P168. *Agric Biol Chem* [Internet]. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry; 1981 [cited 2016 Aug 30];45(4):1023–4. Available from:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bbb1961/45.1023?from=CrossRef>
179. Martinez AFC, Moraes LAB. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of five new leucinostatins produced by *Paecilomyces lilacinus* CG—189. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 Mar 3 [cited 2016 Nov 22];68(3):178–84. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/ja.2014.120>

180. Wang G, Liu Z, Lin R, Li E, Mao Z, Ling J, et al. Biosynthesis of Antibiotic Leucinostatins in Bio-control Fungus *Purpureocillium lilacinum* and Their Inhibition on *Phytophthora* Revealed by Genome Mining. Lin X, editor. PLOS Pathog [Internet]. Public Library of Science; 2016 Jul 14 [cited 2016 Dec 1];12(7):e1005685. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005685>
181. MZ mine Development Team. MZmine 2 manual [Internet]. [cited 2016 Nov 7]. Available from: <http://mzmine.sourceforge.net/manual.pdf>
182. Degenkolb T, Brückner H. Peptaibiotics: Towards a Myriad of Bioactive Peptides Containing C α -Dialkylamino Acids? Chem Biodivers [Internet]. WILEY-VCH Verlag; 2008 Sep 24 [cited 2016 Nov 23];5(9):1817–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.200890171>
183. Toniolo C, Benedetti E. The polypeptide 310-helix. Trends Biochem Sci. Elsevier Current Trends; 1991;16:350–3.
184. Mori Y, Tsuboi M, Suzuki M, Fukushima K, Arai T. Structure of leucinostatin A, new peptide antibiotic from *Paecilomyces lilacinus* A-267. J Chem Soc Chem Commun [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 1982 [cited 2016 Nov 17];(2):94. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c39820000094>
185. Fresta M, Ricci M, Rossi C, Furneri PM, Puglisi G. Antimicrobial Nonapeptide Leucinostatin A-Dependent Effects on the Physical Properties of Phospholipid Model Membranes. J Colloid Interface Sci [Internet]. Academic Press; 2000 Jun [cited 2016 Nov 23];226(2):222–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979700968164>
186. Muroi M, Suehara K, Wakusawa H, Suzuki K, Sato T, Nishimura T, et al. Novel Blockade of Cell Surface Expression of Virus Glycoproteins by Leucinostatin A. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1996 [cited 2016 Nov 23];49(11):1119–26. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/49.1119?from=CrossRef>
187. Ishiyama A, Otoguro K, Iwatsuki M, Namatame M, Nishihara A, Nonaka K, et al. In vitro and in vivo antitrypanosomal activities of three peptide antibiotics: leucinostatin A and B, alamethicin I and tsushimycin. J Antibiot (Tokyo). 2009;62:303–8.
188. Kawada M, Inoue H, Ohba S-I, Masuda T, Momose I, Ikeda D. Leucinostatin A inhibits

- prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. *Int J Cancer* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2009 [cited 2016 Nov 23];126(4):n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24915>
189. Dosio F, Ricci M, Brusa P, Rossi C, Cattel L. Antibody-targeted leucinoestatin A. *J Control Release*. Elsevier; 1994;32(1):37–44.
190. Lardy H, Reed P, Lin CH. Antibiotic inhibitors of mitochondrial ATP synthesis. *Fed Proc* [Internet]. 1975 Jul [cited 2016 Nov 23];34(8):1707–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/124269>
191. Vanmiddlesworth F, Giacobbe RA, Lopez M, Garrity G, Bland JA, Bartizal K, et al. Sphingofungins A,B,C, and d; a new family of antifungal agents. I. Fermentation, isolation, and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1992 [cited 2016 Nov 23];45(6):861–7. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/45.861?from=CrossRef>
192. Lee K-Y, Oh C-Y, Ham W-H. Total Synthesis of Sphingofungin F. American Chemical Society; 2002;
193. Gan F-F, Yang S-B, Luo Y-C, Yang W-B, Xu P-F. Total Synthesis of Sphingofungin F Based on Chiral Tricyclic Iminolactone. *J Org Chem* [Internet]. American Chemical Society; 2010 Apr 16 [cited 2016 Nov 8];75(8):2737–40. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo100183d>
194. Otrubova K, Lushington G, Vander Velde D, McGuire KL, McAlpine SR. Comprehensive Study of Sansalvamide A Derivatives and their Structure–Activity Relationships against Drug-Resistant Colon Cancer Cell Lines. *J Med Chem* [Internet]. American Chemical Society; 2008 Feb [cited 2016 Nov 23];51(3):530–44. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm070731a>
195. Hwang Y, Rowley D, Rhodes D, Gertsch J, Fenical W, Bushman F. Mechanism of inhibition of a poxvirus topoisomerase by the marine natural product sansalvamide A. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1999 Jun [cited 2016 Nov 23];55(6):1049–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347247>
196. Ikai K, Takesako K, Shiomi K, Moriguchi M, Umeda Y, Yamamoto J, et al. Structure of aureobasidin A. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 1991 Sep;44(9):925–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1938614>

-
197. Takesako K, Ikai K, Haruna F, Endo M, Shimanaka K, Sono E, et al. Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation, and properties. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 1991;44(9):919–24. Available from: <http://pubget.com/paper/1938613>
198. Awazu N, Ikai K, Yamamoto J, Nishimura K, Mizutani S, Takesako K, et al. Structures and Antifungal Activities of New Aureobasidins. *J Antibiot (Tokyo)*. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1995;48(6):525–7.
199. Hung K, Harris PWR, Brimble MA. Synthesis of the Peptaibol Framework of the Anticancer Agent Culicinin D: Stereochemical Assignment of the AHMOD Moiety. *Org Lett* [Internet]. American Chemical Society; 2012 Nov 16 [cited 2016 Nov 24];14(22):5784–7. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol302852q>
200. El Hadrami M, Lavergne J-P, Viallefont P, Itto MYA, Hasnaoui A. Synthesis of (2S,4S,6S)-2-amino-6-hydroxy-4-methyl-8 oxodecanoic acid and (4S,E)-4-methylhex-2-enoic acid constituents of leucinostatins. *Tetrahedron Lett*. 1991;32(32):3985–8.
201. Isogai A, Suzuki A, Higashikawa S, Kuyama S, Tamura S, Higashikawa S. Constituents of a Peptidal Antibiotic P168 Produced by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agric Biol Chem* [Internet]. 1980 [cited 2016 Nov 24];44(12):3029–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbbb19>
202. Fukushima K, Arai T, Mori Y, Tsuboi M, Suzuki M. Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. II. The structures of leucinostatins A and B. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1983 [cited 2016 Nov 24];36(12):1613–30. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/36.1613?from=CrossRef>
203. Vertuani G, Falcomer C, Boggian M, Pochetti G, Cerrini S, Ricci M, et al. Structural studies of leucinostatin A and its Boc-Aib-Leu-Leu-Aib-OMe tetrapeptide fragment. *Int J Pept Protein Res* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 1989 Jan 12 [cited 2016 Nov 23];33(3):162–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3011.1989.tb00205.x>
204. Kuwata S, Nakanishi A, Yamada T, Miyazawa T. Total synthesis of Leucinostatin D. *Tetrahedron Lett* [Internet]. 1992 Nov [cited 2016 Nov 23];33(46):6995–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900609152>

205. Cerrini S, Lamba D, Scatturin A, Rossi C, Ughetto G. The crystal and molecular structure of the α -helical nonapeptide antibiotic leucinostatin A. *Biopolymers* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1989 Jan [cited 2016 Nov 23];28(1):409–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.360280138>
206. Vertuani G, Boggian M, Scatturin A, Ricci M, Balbocchino BM, Tuttobello L, et al. Structure Activity Studies on Chemically Modified Homologues of the Antibiotic Phytotoxic Leucinostatin A. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. JAPAN ANTIBIOTICS RESEARCH ASSOCIATION; 1995 [cited 2016 Nov 24];48(3):254–60. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/48.254?from=CrossRef>