



TESIS DE DOCTORADO

***Búsqueda de metabolitos antimicrobianos
en la micoflora nativa***

Stephanie Barneche Lorier

MONTEVIDEO

2017



Búsqueda de metabolitos antimicrobianos en la micoflora nativa

Tesis presentada como parte de los requerimientos para la obtención del título
de Doctor en Química

Autora: Stephanie Barneche Lorier

Dirección Académica: Prof. MSc. María Pía Cerdeiras

Dirección de Tesis: Prof. Dr. Alvaro Vázquez

MONTEVIDEO

2017

Dedicado a papá, mamá y Miguel Ángel con todo mi amor.

*“Las ideas son como las estrellas, no llegarás a tocarlas con las manos,
pero como el marinero en el desierto de las aguas,
las eliges como guía y si las sigues alcanzarás tu destino”*

*Carl Schurz
(1829 – 1906)*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual participaron distintas personas aconsejando, corrigiendo, teniéndome (mucho) paciencia, apoyando, dando ánimo y acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad a quienes deseo agradecer en este apartado.

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino. Por haberme dado la fortaleza para seguir adelante en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo y el amor incondicional de mis padres, Humberto y Dinorah. Gracias por confiar en mí y apoyar mis decisiones, por recibirme de brazos abiertos cada vez que necesité un abrazo, por estar siempre a mi lado y por hacerme quien soy. Las palabras nunca serán suficientes para expresarles mi amor y agradecimiento.

A Miguel Ángel, mi compañero de camino, mi amigo, por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado siempre en las buenas y en las malas, sobre todo por su paciencia y amor incondicional. Gracias por hacerme feliz cada día.

A mis abuelos, Adolfo e Iris, ángeles que me protegen e iluminan mi camino. Espero haberles podido demostrar mi gratitud e inmenso amor.

A mi abuela Antonina y mis bisabuelas Micaela y Quintina, porque todas sus enseñanzas me llevaron a ser quien hoy soy.

A mis amigos por el ánimo y apoyo recibidos en esta y en otras etapas de la vida.

A mis incondicionales amigos de mucho pelo y varias patitas, Toto, Toby y Limón, leales, cariñosos, cómplices para las picardías y los mimos. Gracias por tanto amor verdadero y auténtico sin pedir nada a cambio.

A mi director de Tesis, el Prof. Alvaro Vázquez, por todo el apoyo brindado a lo largo de tantos años, por su tiempo, por su cariño, por su paciencia y motivación, por los conocimientos transmitidos y por los consejos brindados. Me has ayudado a crecer tanto profesional como personalmente, gracias también por los consejos de “padre”.

A mi directora académica de Tesis, la Prof. María Pía Cerdeiras, por sus valiosísimos aportes, por el ánimo, el apoyo y por el cariño brindados.

A la Prof. Silvana Alborés, Gabriela Jorcín y Alejandra Martínez Pachón, sin sus conocimientos, trabajo y apoyo esta Tesis no hubiera sido posible.

A mis compañeros presentes y pasados del grupo de investigación, Cristina Olivaro, Sara Andrada y Daniela Bandera por su contribución en este trabajo.

A los eternos de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Horacio, Eduardo, Alvaro, Verónica, Pilar y Carlos, porque todos han aportado su granito de arena a mi formación personal y profesional. A los jóvenes integrantes presentes y pasados con los que compartí incontables horas de trabajo, por los buenos momentos, las conversaciones científicas y las no tanto, gracias.

A la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química por permitirme hacer uso de sus instalaciones, especialmente a los integrantes del Laboratorio 14 por estar siempre dispuestos a ayudarme y responder mis dudas.

A mis compañeros del Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo, especialmente a los integrantes del Laboratorio Químico. A Nathalie De Nardo, Marian y Gabriela, gracias por su compañerismo, apoyo y amistad. A todas las autoridades presentes y pasadas del Laboratorio de Bromatología y del Laboratorio Químico, a Sonia y a Silvia por haberme ayudado y apoyado para que las infinitas licencias por congreso, pasantía y estudio fueran posibles.

A la Prof. Jacqueline Aparecida Takahashi por recibirme en el Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios perteneciente al Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas de la Universidade Federal de Minas Gerais. A Filipe Augusto Tironi Alves por acompañarme en los momentos de crisis y abrirme las puertas de su casa. Gracias por esta experiencia inolvidable.

A Horacio Pezzaroglo y al Prof. Guillermo Moyna por los análisis de RMN. A la Prof. Alejandra Rodríguez por los análisis de MS. A la Prof. Cristina Olivaro por los análisis de HPLC-MS y MS.

A las siguientes instituciones y programas que apoyaron financieramente este trabajo de Tesis:

- Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas – Área Química (PEDECIBA – Química).*
- Comisión Sectorial de Investigación Científica – Universidad de la República (CSIC – UdelAR).*
- Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM).*
- Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).*
- Facultad de Química – Universidad de la República.*

A todos, mi mayor reconocimiento y gratitud.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
ÍNDICE DE ESPECTROS	xix
GLOSARIO	xxi
RESUMEN	1

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	3
1.1. Necesidad de nuevos antimicrobianos.	5
1.1.1. Caso de los patógenos humanos: El problema de la resistencia.	5
<i>Resistencia versus desarrollo de antibacterianos.</i>	8
<i>Staphylococcus aureus.</i>	14
1.1.2. Caso de los fitopatógenos: El problema de la resistencia.	16
1.2. Estrategias para la búsqueda de antimicrobianos.	19
1.2.1. Modificación de fármacos establecidos.	20
1.2.2. Diseño racional de nuevos fármacos.	22
1.2.3. Rastreo de actividad de fuentes naturales.	23
1.2.4. Reversión de la resistencia.	23

1.3. Los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos.	24
1.3.1. Los productos naturales como fuente de antibacterianos y antifitopatogénicos.	30
<i>Antibacterianos naturales.</i>	30
<i>Antifitopatogénicos naturales.</i>	34
1.4. Los hongos y su relación con sustancias bioactivas.	38
1.4.1. Clasificación de los hongos.	38
1.4.2. La micoflora como fuente de antimicrobianos.	39
1.4.3. Abordaje “OSMAC” (One strain many active compounds).	40
1.4.4. <i>Gymnopilus junonius.</i>	47
1.5. Referencias bibliográficas.	50

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA	69
2.1. Hipótesis de este trabajo.	71
2.2. Estrategia de este trabajo.	73
<i>Objetivos generales.</i>	73
<i>Objetivos específicos.</i>	73
2.3. Referencias bibliográficas.	74

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
3.1. Screening químico y microbiológico de cultivos fúngicos de basidiomicetes.	77
<i>Screening químico.</i>	77
<i>Screening microbiológico.</i>	77
3.1.1. Puesta a punto de ensayo microbiológico para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos.	80
3.1.2. Screening microbiológico ampliado y derreplicación química.	81
<i>Derreplicación química.</i>	85
3.2. Cultivo a mayor escala y aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de cultivos fúngicos de basidiomicetes.	85
3.3. Estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para <i>L. sulphureus</i> .	87
3.4. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de <i>Gymnopilus junonius</i> .	95
3.5. Estudio de la influencia de agentes epigenéticos sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para <i>Gymnopilus junonius</i> CCMG SA1.	111

<i>Análisis UHPLC-MS.</i>	125
3.6. Sumario.	129
3.7. Referencias bibliográficas.	131

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS	133
4.1. Procedimientos generales.	135
4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).	135
<i>Preparación de reactivos reveladores.</i>	136
4.3. Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).	137
4.4. Espectrometría de Masas por infusión directa.	137
4.5. Espectrometría de Masas exacta (HRMS).	138
4.6. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	138
4.7. Cromatografía Líquida acoplada a Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).	138
4.8. Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (UHPLC-MS).	139
4.9. Mantenimiento y conservación de los microorganismos.	140
4.10. Material biológico en estudio.	140
4.11. Cultivo.	143
4.11.1. Cultivo a escala de <i>Laetiporus sulphureus</i> CCMG 247.	143

4.11.2. Cultivo a escala de <i>Ganoderma resinaceum</i> CCMG 7187.	143
4.11.3. Estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para <i>Laetiporus sulphureus</i> CCMG 247.	144
<i>Primer diseño experimental (Plackett-Burman).</i>	145
<i>Segundo diseño experimental (Factorial fraccionado).</i>	146
<i>Tercer diseño experimental (Factorial fraccionado).</i>	147
4.11.4. Estudio de la influencia de agentes epigenéticos sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para <i>Gymnopilus junonius</i> CCMG SA1.	148
<i>Primer diseño experimental.</i>	148
<i>Segundo diseño experimental.</i>	149
4.12. Extracción.	149
4.13. Determinación de espectro antimicrobiano.	150
<i>Determinación de actividad antimicrobiana de extractos de cultivos fúngicos.</i>	150
<i>Determinación de actividad antimicrobiana de extractos de cuerpos de fructificación de <i>Gymnopilus junonius</i> y aislamiento bioguiado de compuestos activos.</i>	150
4.13.1. Técnicas utilizadas.	151
<i>Bioautografía en capa de agar (Agar overlay).</i>	151
<i>Método de difusión (Discos).</i>	153

Puesta a punto.	153
Selección de técnica de siembra.	153
Selección del control positivo.	153
Selección del tamaño y tiempo de secado de los discos.	154
Técnica optimizada.	155
4.14. Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima.	156
4.15. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de <i>Laetiporus sulphureus</i> CCMG 247.	157
4.16. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de <i>Gymnopilus junonius</i> .	158
4.17. Referencias bibliográficas.	160

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES	163
5.1. Conclusiones.	165
5.2. Referencias bibliográficas.	166

ANEXOS

ANEXO I. Medios de cultivo.	167
ANEXO II. Espectros.	171

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Causas de muerte de niños menores de cinco años.	6
Figura 1.2. Línea del tiempo del descubrimiento de nuevas clases de antibacterianos y su introducción en la clínica.	9
Figura 1.3. Número total de agentes antibacterianos que alcanzan el mercado.	11
Figura 1.4. Comparación del aumento de cepas resistentes, nuevos antimicrobianos y compañías con investigación en antimicrobianos.	13
Figura 1.5. Modificaciones químicas sobre la molécula de carbapenem.	21
Figura 1.6. Modificación química sobre la glicilciclina.	21
Figura 1.7. Fuente de moléculas activas aprobadas (1981-2014).	25
Figura 1.8. Estructura química de algunas drogas derivadas de plantas superiores.	26
Figura 1.9. Estructura química de la lovastatina, reductor de colesterol ampliamente utilizado.	27
Figura 1.10. Fuente de moléculas antibacterianas aprobadas (1981-2014).	31
Figura 1.11. Algunos antibacterianos de origen natural.	32
Figura 1.12. Estructura de los stelletazoles.	33

Figura 1.13. Fuente de nuevos ingredientes activos para el control de fitopatógenos aprobados (1997-2010).	35
Figura 1.14. Algunos antifitopatogénicos de origen natural.	37
Figura 1.15. Esquema de la estrategia OSMAC.	42
Figura 1.16. Estructura química del antibiótico fumagilina.	43
Figura 1.17. Citocalasinas aisladas de cultivos del hongo <i>Spicaria elegans</i> .	44
Figura 1.18. Daldinona E, metabolito producido por la especie <i>Daldinia</i> sp. mediante la utilización de un inhibidor de histonas desacetilasas.	46
Figura 1.19. Imágenes de <i>Gymnopilus junonius</i> .	48
Figura 1.20. Algunos compuestos aislados de <i>Gymnopilus junonius</i> .	49
Figura 3.1. Ensayo de difusión de extractos del hongo <i>G. resinaceum</i> frente a <i>F. graminearum</i> .	82
Figura 3.2. Concentración inhibitoria mínima de extractos del hongo <i>L. sulphureus</i> frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28m.	84
Figura 3.3. Primera etapa de escalado del hongo <i>L. sulphureus</i> .	86
Figura 3.4. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del primer diseño (Plackett-Burman) frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28.	89
Figura 3.5. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del segundo diseño (Factorial fraccionado) frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28.	91

Figura 3.6. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del tercer diseño (Factorial fraccionado) frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28.	93
Figura 3.7. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del tercer diseño (Factorial fraccionado) frente a <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.	93
Figura 3.8. Ensayo de difusión de extractos del hongo <i>G. junonius</i> frente a <i>F. graminearum</i> .	97
Figura 3.9. Bioautografía de las fracciones reunidas de la cromatografía en columna frente a <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.	99
Figura 3.10. Esquema de aislamiento y purificación de Compuesto 1.	101
Figura 3.11. Esquema de aislamiento y purificación de Compuestos 2 y 3.	102
Figura 3.12. Estructura química compuesto 1.	104
Figura 3.13. Estructura química compuesto 2.	106
Figura 3.14. Estructura química compuesto 3.	107
Figura 3.15. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño a 210 nm.	114
Figura 3.16. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño a 244 nm.	114

Figura 3.17. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño a 280 nm.	115
Figura 3.18. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 360 nm.	116
Figura 3.19. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 366 nm.	117
Figura 3.20. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño a 210 nm.	119
Figura 3.21. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño a 244 nm.	120
Figura 3.22. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño a 280 nm.	121
Figura 3.23. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 360 nm.	123
Figura 3.24. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 366 nm.	124
Figura 3.25. Respuesta (Intensidad de ion) obtenida para las condiciones de los dos diseños experimentales.	128

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Cepas con actividad frente a <i>S. aureus</i> .	79
Tabla 3.2. Espectro antimicrobiano de extractos del hongo <i>G. resinaceum</i> .	82
Tabla 3.3. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extractos del hongo <i>G. resinaceum</i> .	83
Tabla 3.4. Espectro antimicrobiano de extractos del hongo <i>L. sulphureus</i> .	83
Tabla 3.5. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extractos del hongo <i>L. sulphureus</i> .	84
Tabla 3.6. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del primer diseño (Plackett-Burman) frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28m.	88
Tabla 3.7. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del segundo diseño (Factorial fraccionado) frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28m.	90
Tabla 3.8. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del tercer diseño (Factorial fraccionado) frente a <i>X. vesicatoria</i> CCMG 28m y <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.	92
Tabla 3.9. Espectro antimicrobiano de extracto acetónico del hongo <i>G. junonius</i> frente a los microorganismos ESKAPE.	96

Tabla 3.10. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extracto acetónico del hongo <i>G. junonius</i> frente a los microorganismos ESKAPE.	96
Tabla 3.11. Espectro antimicrobiano de extracto acetónico del hongo <i>G. junonius</i> frente a aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i> .	96
Tabla 3.12. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extracto acetónico del hongo <i>G. junonius</i> frente a aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i> .	97
Tabla 3.13. Espectro antimicrobiano de extracto acetónico del hongo <i>G. junonius</i> frente a microorganismos fitopatógenos.	97
Tabla 3.14. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extracto acetónico del hongo <i>G. junonius</i> frente a microorganismos fitopatógenos.	98
Tabla 3.15. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones correspondientes al aislamiento bioguiado de compuestos con actividad antimicrobiana del hongo <i>G. junonius</i> .	100
Tabla 3.16. Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para compuesto 1.	103
Tabla 3.17. Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para compuesto 2.	105
Tabla 3.18. Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para compuesto 3.	107
Tabla 3.19. Espectro antimicrobiano de los compuestos aislados.	108

Tabla 3.20. Concentración inhibitoria mínima (μgmL^{-1}) de los compuestos aislados.	109
Tabla 3.21. Concentración inhibitoria mínima (μgmL^{-1}) del compuesto aislado bisnoryangonina.	110
Tabla 3.22. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del primer diseño frente a <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.	113
Tabla 3.23. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del segundo diseño frente a <i>S. aureus</i> ATCC 6538p.	118
Tabla 3.24. Respuesta (Intensidad de ion) obtenida para las condiciones de los dos diseños experimentales.	126
Tabla 4.1. Sistemas de fase móvil y reactivo revelador utilizados en el screening químico.	136
Tabla 4.2. Cepas utilizadas para cultivos fúngicos.	142
Tabla 4.3. Primer diseño experimental (Plackett-Burman).	145
Tabla 4.4. Segundo diseño experimental (Factorial fraccionado).	146
Tabla 4.5. Tercer diseño experimental (Factorial fraccionado).	147
Tabla 4.6. Primer diseño experimental.	148
Tabla 4.7. Segundo diseño experimental.	149
Tabla 4.8. Fungicidas evaluados.	154

INDICE DE ESPECTROS

- A1. ^1H 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.
- A2. ^1H 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo
(ampliación).
- A3. ^{13}C 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.
- A4. ^{13}C 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo
(ampliación).
- A5. ^{13}C 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo
(PENDANT).
- A6. ^1H - ^1H COSY 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de
metilo.
- A7. ^1H - ^1H COSY 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de
metilo (ampliación).
- A8. ^1H - ^{13}C HSQC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de
metilo.
- A9. HMBC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.
- A10. HMBC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo
(ampliación).
- A11. HMBC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo
(ampliación).
- A12. ESI-HRMS 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de
metilo.

- A13. Correlaciones más importantes 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.
- A14. ^1H bisnoryangonina.
- A15. ^1H bisnoryangonina (ampliación).
- A16. ^{13}C bisnoryangonina.
- A17. ^{13}C bisnoryangonina (PENDANT).
- A18. ^1H - ^1H COSY bisnoryangonina.
- A19. ^1H - ^{13}C HSQC bisnoryangonina.
- A20. HMBC bisnoryangonina.
- A21. ESI-HRMS bisnoryangonina.
- A22. Correlaciones más importantes bisnoryangonina.
- A23. ^1H 4,6-decadien-1,3,8-triol.
- A24. ^1H 4,6-decadien-1,3,8-triol (ampliación).
- A25. ^1H 4,6-decadien-1,3,8-triol (ampliación).
- A26. ^{13}C 4,6-decadien-1,3,8-triol.
- A27. ^1H - ^1H COSY 4,6-decadien-1,3,8-triol.
- A28. ^1H - ^{13}C HSQC 4,6-decadien-1,3,8-triol.
- A29. HMBC 4,6-decadien-1,3,8-triol.
- A30. ESI-HRMS 4,6-decadien-1,3,8-triol.
- A31. Correlaciones más importantes 4,6-decadien-1,3,8-triol.

GLOSARIO

UV	Ultravioleta
TLC	Cromatografía en capa fina
VLC	Cromatografía líquida al vacío
GC-MS	Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas
SCAN	Modo Full scan
HRMS	Espectrometría de Masas exacta
MS	Espectroscopía de masas
ESI	Ionización por electroespray
RMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
H,H-COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HPLC-DAD	Cromatografía Líquida acoplada a Arreglo de Diodos
UHPLC-MS	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas
ITS	Espacios internos de transcripción
GenBank	Base de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ATCC	American Type Culture Collection
CCMG	Colección de la Cátedra de Microbiología General

CBS	Central Bureau of Fungal Cultures
NRRL	Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection
PCR	Polymerase Chain Reaction
ND	No determinado
Rf	Factor de retención
SPE	Extracción en fase sólida
CM	Caldo extracto de malta
YES	Extracto de levadura con suplemento

RESUMEN

A pesar de los grandes avances en la quimioterapia de las enfermedades infecciosas estas son aún una de las principales causas de muerte en el mundo. Aunque parece existir una gran gama de fármacos antibacterianos y antifúngicos de uso clínico, la aparición de microorganismos resistentes los hace a veces ineficaces. Entre los patógenos más problemáticos clínicamente relevantes en la actualidad el *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA) se ubica como una de las bacterias más difíciles de tratar.

La importancia de las enfermedades de plantas en la agricultura moderna es un hecho ampliamente documentado y reconocido. Las enfermedades tienen el potencial de destruir enteramente las cosechas o reducir en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligan a tomar medidas de combate que aumentan los costos de producción, y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados. Alrededor de dos tercios de las enfermedades de las plantas son causadas por hongos. La utilización intensiva de compuestos antimicrobianos en la agricultura industrial favorece la aparición de resistencias. Esto, unido a cambios frecuentes en los límites de aplicación, límites de residuos en el ambiente y en el producto, lleva a que este sea un sector altamente dinámico con una rápida rotación de los compuestos activos.

Los hongos comparten con las plantas y los animales ciertos agentes infecciosos tales como bacterias y hongos patógenos y por lo tanto tienen el potencial de producir metabolitos con actividad farmacológica de uso en humanos y cultivares. Los “microhongos” son una fuente ya establecida como importante de compuestos antimicrobianos. Sin embargo, para los “macrohongos” (aquellos cuyo cuerpo de fructificación es visible a simple vista, la gran mayoría perteneciente al filo Basidiomycota) sólo unos pocos compuestos aislados se encuentran en la etapa de ensayos clínicos y de campo.

El presente trabajo apuntó a la enorme diversidad metabólica de los microorganismos, utilizando basidiomicetes como fuente original. Para eso se abordaron dos estrategias diferentes, el trabajo con los micelios y caldos extracelulares de cultivos fúngicos y el trabajo con los cuerpos de fructificación. A partir de cultivos de diecinueve hongos basidiomicetes se prepararon cincuenta y tres extractos que posteriormente fueron sometidos a ensayos biológicos. Cuarenta por ciento de los extractos presentaron actividad frente a los patógenos humanos evaluados y diecisiete por ciento de los extractos presentaron actividad frente a los fitopatógenos evaluados. Para la cepa más prometedora, se estudió la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés para obtener cantidades de extracto suficientes para avanzar en el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana. Considerando que los resultados obtenidos no fueron los esperados se recorrió el camino inverso, aislando compuestos con actividad antimicrobiana a partir de cuerpos de fructificación de *Gymnopilus junonius* y posteriormente induciendo la producción de los mismos en cultivos fúngicos de dicho hongo. El agregado de agentes epigenéticos influyó positivamente en la riqueza química de los extractos, no incidiendo en la producción de bisnoryangonina, compuesto aislado con promisorio actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* meticilino resistente.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Necesidad de nuevos antimicrobianos.

1.1.1. Caso de los patógenos humanos: El problema de la resistencia.

A pesar de los grandes avances en la quimioterapia de las enfermedades infecciosas estas están lejos de ser controladas y más aún erradicadas, y son aún una de las principales causas de muerte en el mundo. En el año 2003 las enfermedades infecciosas y parasitarias causaron más de 11 millones de muertes sobre un total de 57 millones (OMS, 2003). Sin embargo, éstas no están igualmente distribuidas representando el 12% de ellas en el primer mundo, pero más del 40% en los países en desarrollo en el año 1997 (OMS, 2014_a).

Esto se debe, entre otros motivos, a la falta de una terapéutica adecuada, tanto sea por la falta de fármacos efectivos (para infecciones fúngicas o virales) como a la rápida aparición de resistencia que vuelve inefectivas las drogas existentes. Según un informe de la OMS, más del 33% de las causas de muerte de los niños de menos de cinco años se deben a enfermedades infecciosas (OMS, 2015) (Figura 1.1.).

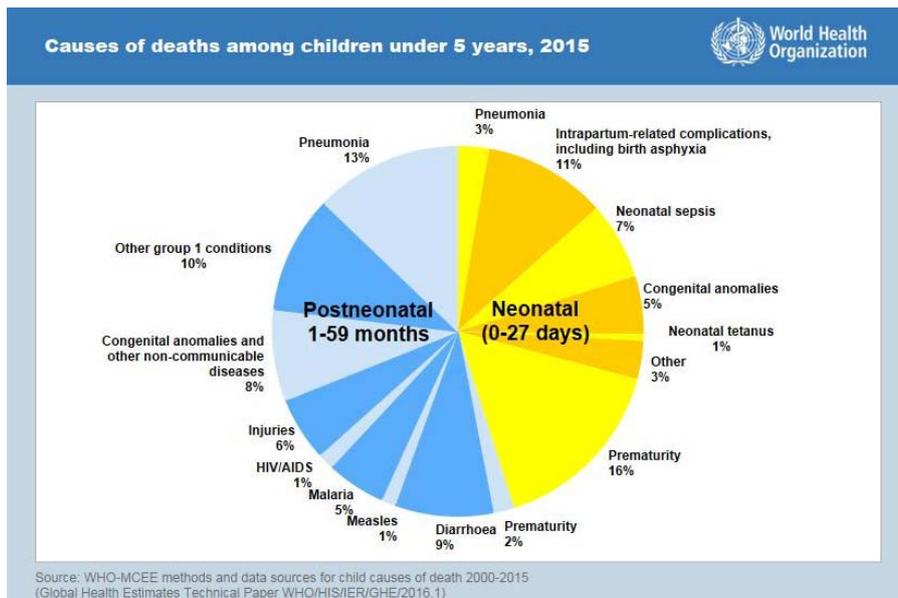


Figura 1.1. Causas de muerte de niños menores de cinco años (Tomado de OMS, 2015).

Los agentes infecciosos resistentes, o sea aquellos que no son destruidos o inhibidos por los compuestos antimicrobianos utilizados habitualmente en la práctica, son una creciente causa de preocupación en los organismos de salud pública. La tuberculosis, la gonorrea, la malaria y las otitis infecciosas en niños pequeños son sólo algunas de las enfermedades que se han convertido en difíciles de tratar debido a la aparición de cepas resistentes y multiresistentes (Fauci, 2014; NIAID, 1998).

Un análisis de los agentes antibacterianos actualmente en fase de desarrollo y un estudio de los patrones de resistencia y tendencias actuales, demuestran la urgencia de la discusión de incentivos para el desarrollo de nuevos tratamientos (Brown, 2013; EARSS, 2007; NIPHE, 2008). Por ejemplo, la iniciativa GAIN (Generating Antibiotic Incentives Now) fue promulgada en julio del 2012 por el gobierno de los Estados Unidos de América y en la Sección 806 indica la necesidad de regulación para “facilitar el desarrollo de fármacos antibacterianos” (GAIN, 2012).

Esto ha llevado a numerosas iniciativas para desarrollar programas colaborativos para enfrentar esta situación como el programa ESKAPE. Los microorganismos ESKAPE (Boucher, 2009; Pendleton, 2013) *Enterococcus*

faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y varias especies de *Enterobacter* son los patógenos que en la actualidad causan la mayoría de las infecciones hospitalarias de Estados Unidos y de manera efectiva "se escapan" de los efectos de los fármacos antibacterianos. Datos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) muestran un rápido aumento de las tasas de infección debido a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA), *E. faecium* resistente a la vancomicina (VRE) y *P. aeruginosa* resistentes a las fluoroquinolonas. Más personas mueren en la actualidad de la infección por MRSA en los hospitales de Estados Unidos que de VIH/SIDA y la tuberculosis juntos. Además, actualmente la frecuencia de aparición de infecciones provocadas por microorganismos multiresistentes está en franco aumento. Varias especies de patógenos como *Acinetobacter* altamente resistentes, *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (MDR), especies de *Klebsiella* y *Escherichia coli* resistentes al carbapenem y a cefalosporinas de tercera generación están emergiendo como patógenos importantes, tanto en los Estados Unidos como en otras partes del mundo (ECDC/EMA, 2009).

Las opciones terapéuticas para estos patógenos son extremadamente limitadas de forma que en la clínica obliga a utilizar los medicamentos más antiguos, que antes se descartaban, como la colistina, que están asociados con toxicidad importante y para los que existe una falta de datos sólidos para orientar la selección de régimen de dosificación o la duración de la terapia. Incluso con estas restricciones, ya apareció el primer caso en Estados Unidos de América de *Escherichia coli* resistente a la colistina (McGann, 2016).

El creciente número de pacientes de edad avanzada, los pacientes sometidos a cirugías, trasplantes y quimioterapia y los aumentos dramáticos en la población en unidades de cuidados intensivos neonatales producen un mayor número de individuos inmunocomprometidos con riesgo de estas infecciones (Boucher, 2009).

Resistencia versus desarrollo de antibacterianos.

La era de la quimioterapia antibacteriana comenzó con la aplicación terapéutica de las sulfonamidas en la década del 30 y las penicilinas en la década del 40, seguido por el descubrimiento de un número diverso de estructuras altamente efectivas, muchos de los cuales derivan de productos naturales, y su "época de oro" va aproximadamente desde el año 1945 al 1970. Sin embargo desde 1980 han entrado al mercado sólo cinco nuevas clases de antibacterianos: el antibiótico tópico mupirocina en 1985, el linezolid en 2000 (oxazolidinona), la daptomicina en 2003 (lipopéptido), la retapamulina en 2007 (pleuromutilina) y la fidaxomicina (macrolactona) en 2011. Cabe destacar que algunos de éstos últimos antibacterianos no son realmente nuevos: la daptomicina fue descubierta en Eli Lilly & Co. a principios de la década de 1980, el linezolid fue descubierto en 1979, las pleuromutilinas fueron descubiertas en 1952. En la Figura 1.2. se muestran las fechas del descubrimiento de las principales clases de antibacterianos, su introducción en la clínica y su origen.

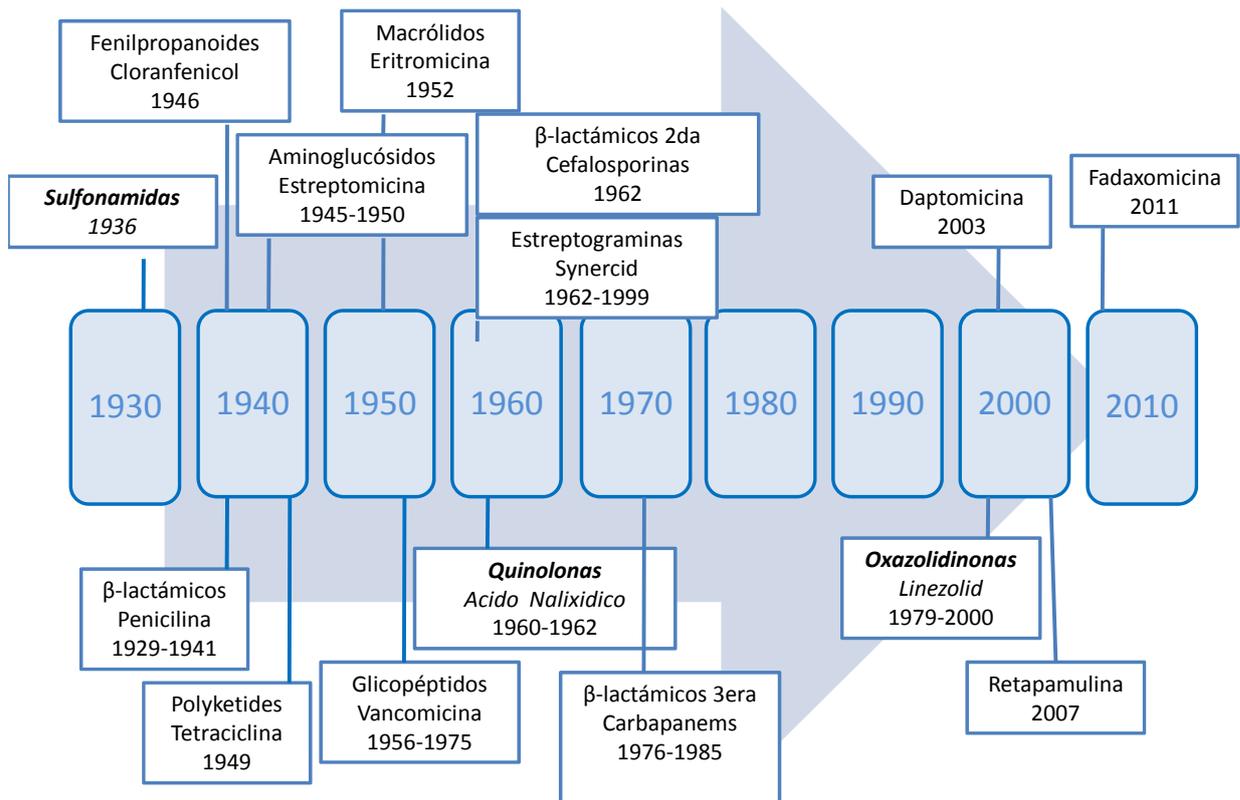


Figura 1.2. Línea del tiempo del descubrimiento de nuevas clases de antibacterianos y su introducción en la clínica. Compuestos escritos en fuente normal son derivados de productos naturales y los escritos en *itálica y negrita* son de origen sintético (Adaptado de Singh, 2006).

El mismo período caracterizado por una disminución de nuevos agentes ha sido acompañado por un alarmante incremento de la resistencia a los agentes existentes, resultando en un serio problema para la salud pública mundial. En el pasado fue posible contrarrestar la pérdida de eficacia de los antibacterianos debido a la aparición de cepas resistentes mediante la introducción en el mercado de nuevos agentes. Este equilibrio desafortunadamente se rompió. Los microorganismos se han convertido cada vez más resistentes a múltiples fármacos a tal punto que ya existen bacterias resistentes a todos los antibióticos disponibles y el desarrollo de nuevos antibacterianos no ha seguido el mismo ritmo. La creciente brecha entre la frecuencia de las infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples

fármacos y la investigación y el desarrollo de nuevos antibacterianos amenaza con llevarnos de vuelta a la era anterior a los antibióticos (Berkowits, 1995; Shlaes, 2013; Wright, 2014).

Existen tres razones significativas por las cuales es difícil el descubrimiento de nuevos antibacterianos: la normativa que regula la aprobación de medicamentos, las fuerzas del mercado que hacen retirarse a las compañías farmacéuticas del desarrollo de antibacterianos y los retos científicos que implica.

La agencia reguladora de Estados Unidos, Food and Drug Administration (FDA) introdujo cambios en el diseño de los ensayos clínicos y en las normas en las últimas dos décadas para la aprobación de medicamentos. Esto trajo como consecuencia ensayos muy difíciles de cumplir, largos y costosos, particularmente para aquellos antibacterianos efectivos contra patógenos resistentes, lo cual desestimula el desarrollo de los mismos en la industria (Shlaes, 2012, 2013). Así mientras entre los años 1983-1986, 16 nuevos antibacterianos recibieron aprobación por la FDA, entre los años 2008 y 2012, apenas dos (Fauci, 2014) (Figura 1.3.).

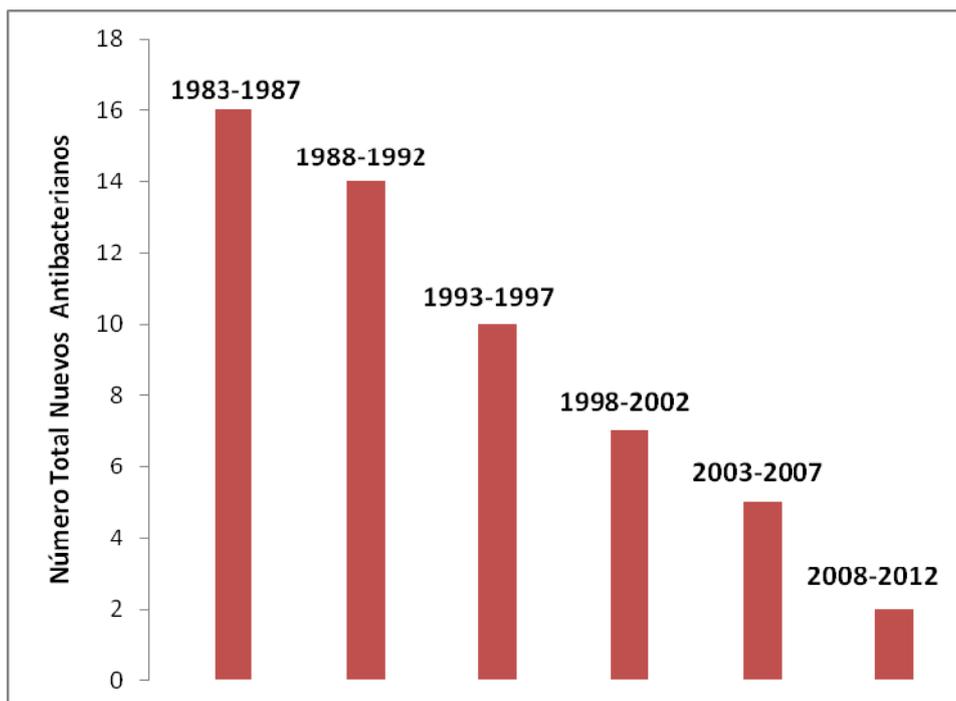


Figura 1.3. Número total de agentes antibacterianos que alcanzan el mercado. (aprobados por FDA).

Durante los últimos 15 años, las farmacéuticas se retiraron en masa del desarrollo de antibacterianos citando altos costos de investigación, retornos pobres y regulaciones onerosas. La estadounidense Pfizer Inc., una de las pioneras de la producción masiva de la penicilina, abandonó su investigación de antibióticos en 2011, al igual que su compatriota Johnson & Johnson. En 2002, Eli Lilly & Co., también de Estados Unidos de América, dejó el campo para enfocarse en enfermedades crónicas. La francesa Sanofi S.A. escindió en 2004 su división de antiinfectivos, que pasó a llamarse Novexel.

La economía del descubrimiento de nuevos antibacterianos también es un reto en comparación con otras áreas terapéuticas. Los antibacterianos, a diferencia de las drogas que tratan enfermedades crónicas como el asma, hipertensión, colesterol, etc., ejercen una actividad curativa sobre las enfermedades y se toman por lo tanto por un periodo de tiempo corto. En comparación, los medicamentos de enfermedades crónicas se pueden tomar por años y a menudo de por vida. También debe tomarse en cuenta la vida útil ya que a causa del desarrollo de la resistencia por los patógenos un

antibacteriano puede volverse rápidamente inefectivo, con lo cual la industria farmacéutica tiene un menor tiempo de retorno para recuperar la inversión. El retorno de la inversión para la industria farmacéutica, por lo tanto, se convierte en un reto para los antibacterianos, ya que los costos de los diferentes medicamentos en desarrollo varían sólo ligeramente. Una complicación adicional es que los antibacterianos están actualmente sin patentes y son suministrados por empresas que fabrican genéricos. El resultado, que es bueno para el público, que accede a drogas baratas y generalmente efectivas, tiene por desventaja que los usuarios esperan que todos los antibacterianos tengan un precio similar, incluso aquellos nuevos agentes efectivos contra patógenos multiresistentes (Cooper, 2011; Shlaes, 2010; Wright, 2014).

Por otro lado, la ciencia del descubrimiento de nuevos antibacterianos es cada vez más desafiante. La mayoría de las dianas específicas que permiten toxicidad selectiva han sido desarrolladas y todos los antibacterianos obvios parecerían haber sido ya descubiertos. En la década de 1990 la industria farmacéutica abandonó sus formas clásicas de búsqueda de antibacterianos y en su lugar adoptó una estrategia que combina la genómica con cribado de alto rendimiento de los compuestos existentes en bibliotecas. Se hizo demasiado hincapié en la identificación de blancos y moléculas que se unieran a ellos, y se puso poco énfasis en la capacidad de estas moléculas para permear bacterias, evadir bombas de eflujo (proteínas transportadoras involucradas en la extrusión de sustratos tóxicos) y evitar resistencia mutacional. El desafortunado resultado es que ningún antibiótico encontrado por esta estrategia ha entrado al mercado y muchas de las principales empresas farmacéuticas han abandonado el descubrimiento de antibióticos.

Estos motivos han llevado a una reducción continua del número de nuevas entidades químicas aprobadas para su uso humano (Figura 1.4.).

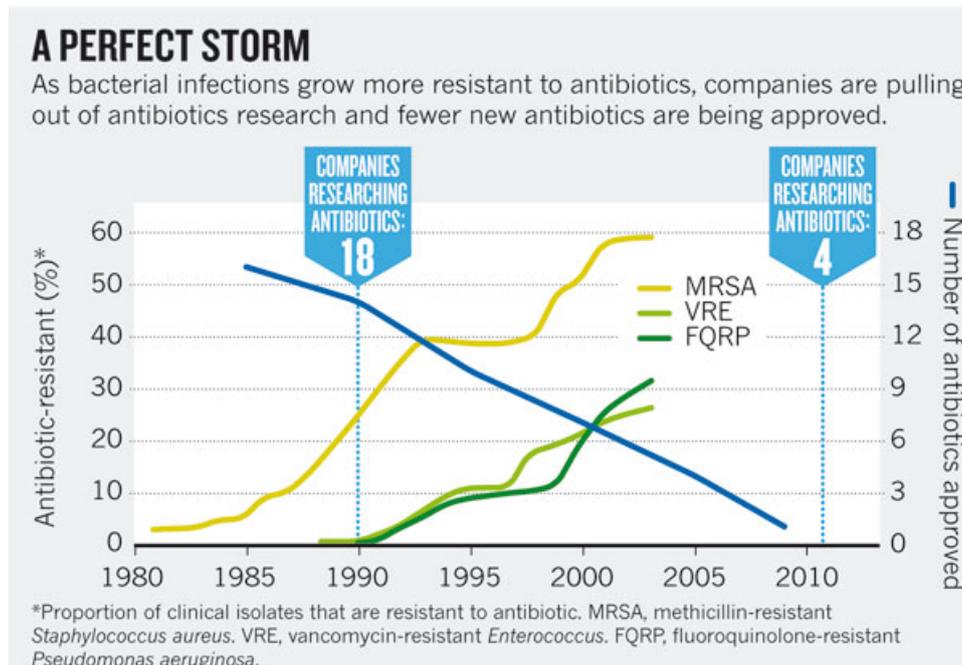


Figura 1.4. Comparación del aumento de cepas resistentes, nuevos antimicrobianos y compañías con investigación en antimicrobianos (Tomado de Cooper, 2011).

Las estrategias para frenar la propagación de bacterias resistentes a múltiples fármacos solo han tenido un éxito limitado. Mientras que la aplicación efectiva de estas estrategias puede reducir la tasa de aumento de las infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos, no es esperable una reducción a corto plazo de los problemas existentes. El desarrollo continuo de antibacterianos eficaces debe ser considerado como un "bien común". Tiene que haber un esfuerzo sostenido por parte de los gobiernos y las industrias para desarrollar nuevos fármacos rápidamente. De lo contrario, los cientos de miles de personas que mueren cada año por infecciones resistentes a los medicamentos pueden llegar a ser millones. La resistencia a los antibacterianos es una crisis de salud global. Se requiere una acción mundial ante uno de los descubrimientos más valiosos del siglo XX y que se está perdiendo en el siglo XXI (Cooper, 2011).

Un análisis de los agentes antibacterianos actualmente en fase de desarrollo y un estudio de los patrones de resistencia y tendencias actuales, demuestran la urgencia de la discusión de incentivos para el desarrollo de

nuevos tratamientos (Brown, 2013; EARSS, 2007; NIPHE, 2008; Payne, 2007). Un ejemplo es la iniciativa GAIN (Generating Antibiotic Incentives Now) que fue promulgada en julio del 2012 por el gobierno de los Estados Unidos para hacer frente a algunas de las barreras económicas y regulatorias y facilitar así el descubrimiento y desarrollo de fármacos antibacterianos (GAIN, 2012).

Staphylococcus aureus.

Staphylococcus aureus es un patógeno comunitario y nosocomial importante. Este organismo es causante de una considerable preocupación debido a su gran habilidad de adquirir resistencia hacia los nuevos antibacterianos que alcanzan el mercado. Esta bacteria gram positiva coloniza la piel en aproximadamente el 40 % de la población sana. En el presente uno de los patógenos clínicamente más problemático, es el *S. aureus* metilino resistente (MRSA). Es una de las bacterias más difíciles de tratar en pacientes y de erradicar del ambiente hospitalario.

Es particularmente preocupante la velocidad con que la bacteria genera nuevas resistencias según el siguiente esquema:

- **1942:** Se reportó resistencia a la penicilina en cepas de *S. aureus* luego de sólo meses de uso clínico.
- **1953:** 64-80% de los *S. aureus* aislados fueron resistentes a la penicilina, con desarrollo de resistencia a tetraciclina, eritromicina y otras clases de antibióticos emergentes.
- **1960:** Estuvo ampliamente distribuida la metilina, un antibiótico β -lactámico, efectivo contra cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina. Sin embargo, luego de un año de su introducción, aparecieron cepas resistentes a la metilina. Aquí nace el término *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA).

- **2002:** Apareció resistencia a la vancomicina en cepas MRSA, siendo la vancomicina la droga de último recurso para el tratamiento de infecciones por MRSA.

Se ha reportado últimamente resistencia a los nuevos agentes como el linezolid y la daptomicina.

La resistencia adquirida de aparición temprana del *S. aureus* a casi todas las clases de antibióticos es mediada casi exclusivamente por transferencia horizontal de ADN. La transferencia de material genético desde otro organismo permite la adquisición de "paquetes" que codifican resistencia a múltiples antibióticos. Este tipo de transferencia es la responsable de las resistencias más preocupantes en *S. aureus*: resistencia a meticilina y vancomicina. Adicionalmente, la resistencia que es mediada por mutaciones al azar y selección bajo presión del antibiótico, juegan un papel importante en el entorno clínico, produciendo la mayor ruta de resistencia a los antibióticos como fluoroquinolonas, vancomicina (para nivel intermedio de resistencia), daptomicina y linezolid (Pantosti, 2007).

En el Reino Unido el número de muertos a causa de MRSA fue de 398 en 1998 a 1168 en 2004 (Office for National Statistics, 2008).

Según datos de la OMS (2014_b) la proporción de MRSA en los aislados de *S. aureus* a nivel mundial excede en la mayoría de los casos el 20% y aún el 80% en algunas regiones. En el Uruguay según datos de CHLAEP (2013) entre 26 y 50% de los aislamientos de *S. aureus* intrahospitalarios son resistentes a la meticilina con un aumento lento pero progresivo de cepas resistentes circulantes.

Esto no representa ninguna novedad ya que Sir Alexander Fleming en 1945 en su discurso de aceptación del premio Nobel advertía:

“It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant” (Fleming, 1945).

1.1.2. Caso de los fitopatógenos: El problema de la resistencia.

La importancia de las enfermedades de plantas en la agricultura moderna es un hecho ampliamente documentado y reconocido. Las enfermedades no sólo tienen el potencial de destruir enteramente las cosechas; si no que aun en los casos en que no causan pérdidas totales reducen en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligando a tomar medidas de combate que aumentan los costos de producción, y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados. En general, las malezas producen la mayor pérdida potencial (34%), siendo los animales patógenos y los fitopatógenos menos importantes (pérdidas potenciales de 18 y 16% respectivamente).

Las enfermedades fúngicas son una causa frecuente de pérdidas importantes de cultivos. Especies de los más diversos géneros, entre ellos *Rhizoctonia*, *Alternaria* y *Fusarium*, afectan a los cultivos extensivos (trigo, cebada, soja y arroz) y forestales.

Alrededor de dos tercios de las enfermedades de las plantas son causadas por hongos. Se conocen cerca de 100.000 especies, de las cuales la mayoría son saprófitos obligados, pero alrededor de 8.000 son fitoparásitos (Agrios, 2005).

Aunque producen síntomas muy diversos en las diferentes plantas sus daños pueden ser severos y en algunos casos devastadores. La Fusariosis de la espiga (FHB) es la enfermedad fúngica más común en cultivos de trigo y cebada en todo el mundo. Esto se traduce en pérdidas económicas directas como la reducción del rendimiento de grano y calidad e indirectas ya que la contaminación causada por las micotoxinas conduce al rechazo de la semilla en el mercado (Parry, 1995). El arroz también sufre numerosas enfermedades fúngicas de importancia económica, especialmente causadas por *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae* y *Sclerotium oryzae* (INIA, 2002; Singh, 2016).

También en el caso de la soja las enfermedades fúngicas son causa frecuente de pérdidas importantes en el cultivo, especialmente las producidas por especies de *Alternaria*, *Fusarium* y *Phytophthora sojae* (Sinclair, 1989; Vallone, 1997).

Distintas especies de hongos son causantes de enfermedades en árboles utilizados en forestación. Entre ellas podríamos nombrar especies de *Micosphaerella*, *Botrytis*, *Ophiostoma*, *Botryosphaeria*, etc. Recientemente, se ha identificado en plantaciones de pino, al género *Fusarium* que, dependiendo de la especie presente, son capaces de producir desde un simple manchado de la madera, hasta la muerte del árbol por afectar el sistema radicular y la conducción. Por ejemplo *Fusarium circinatum* que causa el *pitch canker* en pinos (Alonso, 2009; Thwaites, 2005).

Muchos hongos son capaces de producir micotoxinas, por ejemplo, deoxinivalenol, nivalenol, y nivalenol moniliforme, todos ellos con toxicidad en animales sobre diversos sustratos. (Desjardin, 2006; Leslie, 2006; Rotter, 1996). *P. expansum* produce una micotoxina patulina, que produce toxicidad inmunológica, neurológica y gastrointestinal en animales (Pitt, 1997) además de las pérdidas post-cosecha causada sobre todo en frutas como manzanas, duraznos y cerezas.

Las enfermedades bacterianas son menos prevalentes, pero *Ralstonia solanacearum*, *Xillela fastidiosa* y numerosas especies de *Erwinia*, *Pseudomonas*, y *Xanthomonas* son patogénicas. El tratamiento para la prevención o cura de estas enfermedades con antimicrobianos (estreptomicina, oxitetraciclina) presenta las mismas restricciones encontradas en los compuestos antifúngicos (Vidaver, 2002, 2004).

Algunos de estos patógenos siguen siendo temibles en los cultivos actuales, aunque se han descubierto estrategias y manejos para reducir su intensidad (Arya, 2010; González, 1981).

La principal medida para evitar o mitigar estas pérdidas son los tratamientos con antimicrobianos y otros productos químicos. La producción agrícola ha aumentado en todo el mundo en los últimos años, lo que refleja la creciente demanda de alimento y la eficacia del uso de productos químicos en el control de estas enfermedades, pero hay algunos problemas importantes (Ding, 2010). Datos proporcionados por OCDE/FAO (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) predicen una disminución en la tasa de crecimiento anual, que fue de 2,1% para el período comprendido entre los años 2003 a 2012 a un 1,5% para la próxima década (OCDE/FAO, 2013). Esto se debe, entre otros factores, al alto costo de producción ya que menos del 0,1% de los plaguicidas aplicados por aspersión alcanzan su objetivo. La pérdida de eficacia en el control químico de enfermedades vegetales debido a la aparición de biotipos resistentes no tuvo lugar sino a partir del momento en que aparecieron en el mercado los antimicrobianos con modo de acción específico tales como los bencimidazoles. Al poco tiempo de su utilización comercial, se registraron los primeros casos de pérdida de efectividad debido al incremento en la frecuencia de los individuos resistentes. La aparición de nuevos casos de resistencia ha ido acompañando a la intensificación en el uso de este tipo de antimicrobianos.

En Uruguay se utilizan más de 50 compuestos antimicrobianos diferentes pertenecientes a una decena de clases químicas. En el año 2015 se importaron más de 24000 toneladas de formulados y 15000 toneladas de principios activos como materias primas para formulación nacional por un valor de más de 146 millones de dólares americanos (MGAP, 2015).

La utilización intensiva de estos compuestos en la agricultura industrial favorece la aparición de resistencias y la creación de ambientes peligrosos dada su naturaleza no biodegradable (Hayes, 1991). Además de los impactos negativos causados al ecosistema, como ser la acumulación de residuos químicos en las aguas subterráneas y el suelo (Elad, 2007; Knight, 1997; Silva, 2013), los plaguicidas representan un riesgo a la salud de los aplicadores y los

consumidores, pudiendo causar intoxicaciones, mutaciones genéticas y hasta la muerte (Porto, 2012).

Esto, unido a cambios frecuentes en los límites de aplicación, límites de residuos en el ambiente y en el producto, lleva a que este sea un sector altamente dinámico con una rápida rotación de los compuestos activos (Brent, 2007).

La búsqueda de antimicrobianos selectivos, eficaces y seguros desde el punto de vista toxicológico y medioambiental para el control de enfermedades de las plantas está ganando impulso en la actualidad (Jayaprakashvel, 2010).

1.2. Estrategias para la búsqueda de antimicrobianos.

La investigación sobre nuevas sustancias antimicrobianas debe por lo tanto proseguirse y todas las estrategias posibles deben ser exploradas. Además de los compuestos micromoleculares de síntesis, los productos naturales siguen siendo las principales fuentes de agentes terapéuticos innovadores para varias enfermedades, incluidas las enfermedades infecciosas (Clardy, 2004). Sólo una ínfima parte de la diversidad disponible entre los hongos, la fauna y flora marina, las bacterias y las plantas ha sido explorada, y amplias oportunidades se encuentran teóricamente por delante.

Para abordar este complejo problema existen varias estrategias posibles y todas ellas han sido recorridas en algún grado por los laboratorios de investigación universitarios, por los organismos de salud y las compañías farmacéuticas y de protección de cultivos. Estas estrategias se basan en la modificación semisintética de fármacos ya conocidos, el diseño racional de nuevos compuestos, el tamizaje de fuentes naturales y la reversión de los mecanismos de resistencia.

1.2.1. Modificación de fármacos establecidos.

Este es un abordaje atractivo para las compañías farmacéuticas dado que se trabaja sobre moléculas conocidas que ya han demostrado su actividad. Esto implica un gran conocimiento previo de las propiedades químicas, fisicoquímicas y farmacológicas de la molécula activa y por lo tanto una gran expectativa de suceso. Con este encare se logran mejoras en dichas moléculas tanto del punto de vista farmacocinético como farmacológico, se aumenta el espectro de acción o se trata de evadir la resistencia existente. Esto produjo el desarrollo de 5 generaciones de penicilinas (más de 15 compuestos), 5 generaciones de cefalosporinas (más de 30 compuestos) (Murray, 2009), 2 generaciones de carbapenems (más de 4 compuestos), aminoglucósidos (más de 12 compuestos), tetraciclinas (más de 8 compuestos), macrólidos (más de 5 compuestos), glicopéptidos (más 3 compuestos) y 4 generaciones de quinolonas y fluoroquinolonas (más de 10 compuestos) (Oliphant, 2002; Singh, 2006).

Ejemplo de este encare son las modificaciones realizadas sobre moléculas con el esqueleto del carbapenem: obteniéndose el derivado J-111225 con un espectro ampliado para incluir MRSA y *P. aeruginosa* y el L-084 prototipo de carbapenem activo por vía oral (Figura 1.5.).

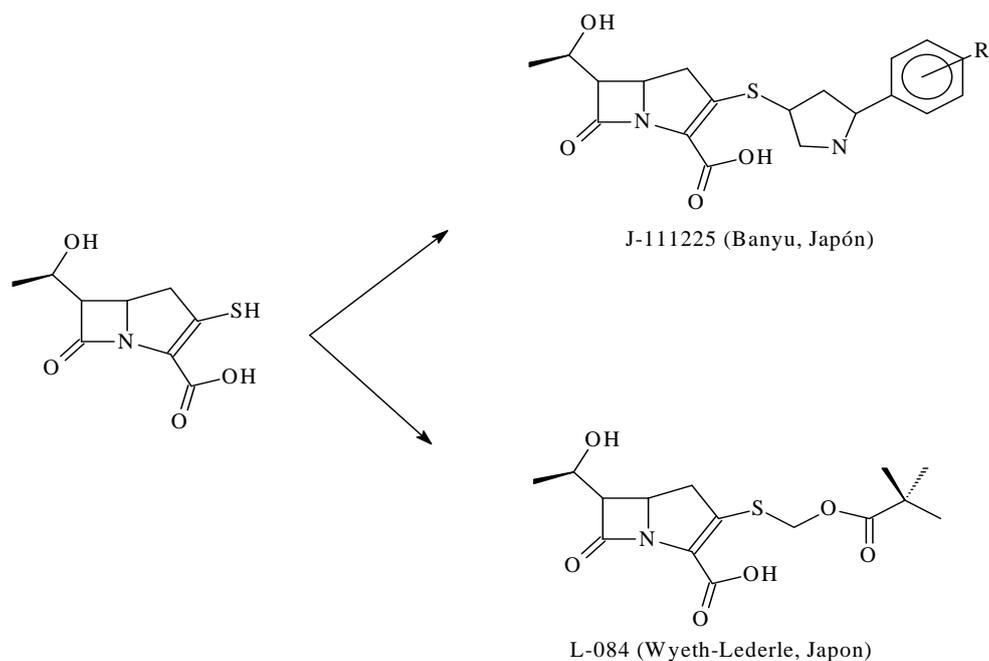
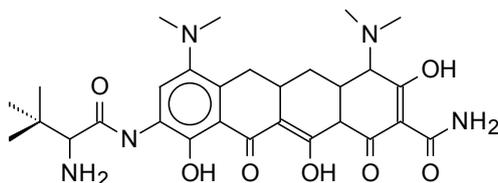


Figura 1.5. Modificaciones químicas sobre la molécula de carbapenem.

También es el caso de las glicilciclinas, derivados semisintéticos de la tetraciclina minociclina. La molécula GAR-936 (Figura 1.6.), actualmente comercializada bajo el nombre tigeciclina, ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de infecciones por MRSA, PRSA (*S. aureus* penicilina resistente) y VRE (*Enterococcus vancomicina* resistente) (Kitzis, 2004; Projan, 2000; Zhanel, 2004).

Sin embargo, no hay que perder de vista que, al trabajar sobre moléculas ya utilizadas, la probabilidad de la emergencia de resistencia es grande



GAR-936 (Wyeth-USA)

Figura 1.6. Modificación química sobre la glicilciclina.

1.2.2. Diseño racional de nuevos fármacos.

Es quizás la estrategia más moderna y se basa en el diseño de moléculas que actúan específicamente con blancos en el microorganismo. Pero este enfoque tiene como prerrequisito un conocimiento profundo de la biología del microorganismo, así como de las características fisicoquímicas del sitio de acción que incluyen habitualmente su conformación tridimensional.

Con el advenimiento de la biología molecular, la expresión y la producción a gran escala de enzimas y receptores, hicieron que fuera posible realizar screenings enzima-receptor in vitro, sin células. El enfoque consiste en secuenciar los genomas de múltiples patógenos, identificar los genes conservados que codifiquen blancos esenciales y que no tengan homólogos en células de mamíferos, expresar esos blancos y luego realizar screenings usando librerías de compuestos químicos existentes que se unan a ese blanco. La adopción de la industria farmacéutica de este enfoque en la década del 1980 tuvo un gran éxito en otras áreas terapéuticas, pero ha demostrado ser un fracaso para el caso de los antibióticos (Payne, 2007). De hecho, no ha llegado al mercado ningún antibiótico usando este enfoque.

El problema radica en parte en haber usado las bibliotecas químicas que posee la industria farmacéutica que no se encuentran optimizadas para la biología microbiana, estando sesgadas en compuestos que favorecen la bioactividad humana. Otro problema es que la búsqueda de un compuesto que se una a un blanco específico no equivale a encontrar un compuesto con actividad antibacteriana. Fármacos potencialmente activos pueden no penetrar las bacterias o pueden ser activamente removidos por las bombas de eflujo (Livermore, 2011; Wright, 2014).

1.2.3. Rastreo de actividad de fuentes naturales.

Ésta es la forma tradicional de trabajo en el área de antimicrobianos y se ha mostrado extraordinariamente exitosa llevando al desarrollo de la quimioterapia antiinfecciosa moderna. Utiliza técnicas sencillas, probadas y normalizadas a lo largo de los años en innumerables laboratorios, pero los nichos habituales, especialmente los microorganismos del suelo, parecen agotados. Si bien se producen aún numerosos nuevos antibióticos a partir de estos nichos, no hay una equivalencia en moléculas novedosas que constituyan a su vez cabezas de futuros desarrollos. Sin embargo, esta estrategia puede ser fácilmente adaptada para el tamizaje de actividad de nichos biológicos y vías metabólicas aún no explotados, incluyendo microorganismos marinos o extremófilos, organismos marinos (celenterados, esponjas) animales y vegetales superiores (Taylor, 2013). El nuevo antibiótico policetometilénico abyssomicin que bloquea la biosíntesis de folato fue descubierto mediante screening de las cepas aisladas de los sedimentos del océano profundo (Bister, 2004; Hughes, 2010).

Las desventajas de este método es que no permite conocer a priori el mecanismo de acción y no discrimina entre estructuras conocidas o nuevas por lo que la rápida dereplicación de los candidatos es otro desafío importante.

1.2.4. Reversión de la resistencia.

Es una estrategia alternativa para la búsqueda de nuevos antibacterianos y consiste en identificar y atacar los procesos bacterianos responsables de la resistencia. La inhibición de estos, podría ser capaz de potenciar la actividad de los antibacterianos existentes. En esta aproximación, el antibacteriano es coadministrado con el inhibidor que neutraliza la resistencia y, consecuentemente, el antibacteriano continúa siendo útil, aún en organismos resistentes. Hasta la fecha, la aplicación más exitosa de este concepto ha sido

el desarrollo de inhibidores de β -lactamasas, enzimas que inactivan a los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams) hidrolizando el anillo β -lactámico de la molécula. Las combinaciones del ácido clavulánico con penicilinas han sido exitosamente usadas en la clínica por más de 30 años (Drawz, 2010). Otro modo prometedor de revertir la resistencia es tomando como blanco las bombas de eflujo que producen resistencia en muchas especies de bacterias, incluyendo *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y muchos otros organismos.

1.3. Los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos.

Los productos naturales y sus derivados han sido y continúan siendo fuentes ricas para el descubrimiento de nuevos fármacos (Beutler, 2009; Cragg, 2013; Harvey, 2008; Molinari, 2009; Newman, 2012, 2016). El 65% de las nuevas moléculas activas aprobadas en el período 1981-2014, que incluyen todas las enfermedades, fuentes y países, derivaron de productos naturales (Figura 1.7.). Quedan excluidos los compuestos biológicos (péptidos con más de 45 residuos y proteínas) y las vacunas (Newman, 2016).

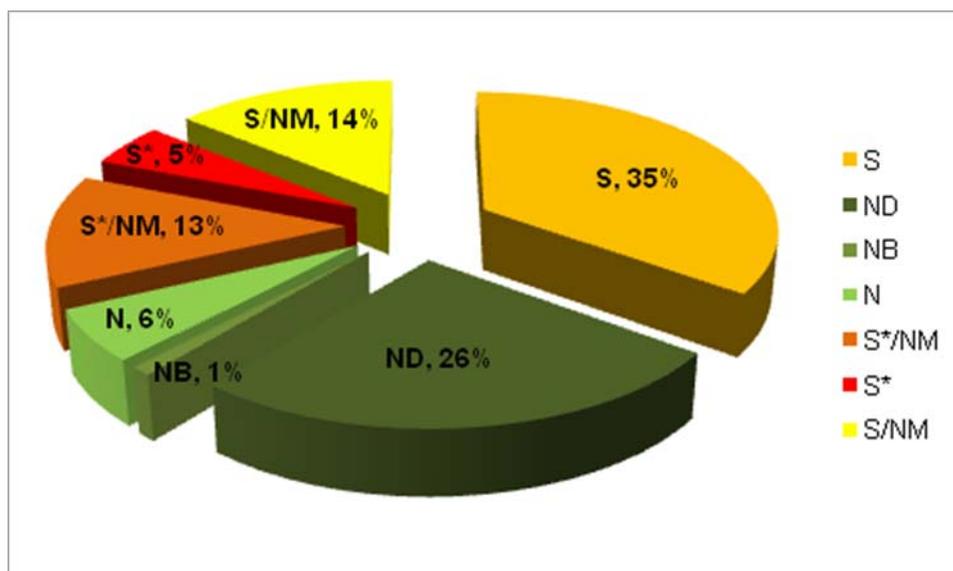


Figura 1.7. Fuente de moléculas activas aprobadas (1981-2014); n=1211. S: producto sintético, a menudo encontrado por screening al azar o por modificación de alguno existente; ND: derivado de producto natural; NB: producto natural botánico (mezcla definida); N: producto natural; S*/NM: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural/desplaza al sustrato natural en forma competitiva "natural product mimic"; S*: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural; S/NM: producto sintético/desplaza al sustrato natural en forma competitiva "natural product mimic".

Las plantas superiores han demostrado ser una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos, tanto por presentar actividad farmacológica per se, como por representar nuevos tipos moleculares para el desarrollo de drogas, incluyendo antihipertensivos, analgésicos, citotóxicos y antiinflamatorios. Esto incluye compuestos que son medicamentos de primera elección o incluso los únicos existentes para el tratamiento de estas afecciones. Ejemplos son la vincristina y vinblastina, alcaloides aislados de *Catharanthus roseus* utilizados clínicamente para el tratamiento de varios tipos de linfomas y leucemias, cáncer de vejiga y testículo, el taxol extraído de *Taxus brevifolia*, el etopósido desarrollado a partir de la podofilotoxina encontrada en *Podophyllum peltatum*, la prostratina, aislada de la planta medicinal de Samoa *Homalanthus nutans* y en estudio contra el HIV al igual que el alcaloide michellamina B aislado de una planta del Camerún (Clark, 1996; Potterat, 2008) (Figura 1.8.).

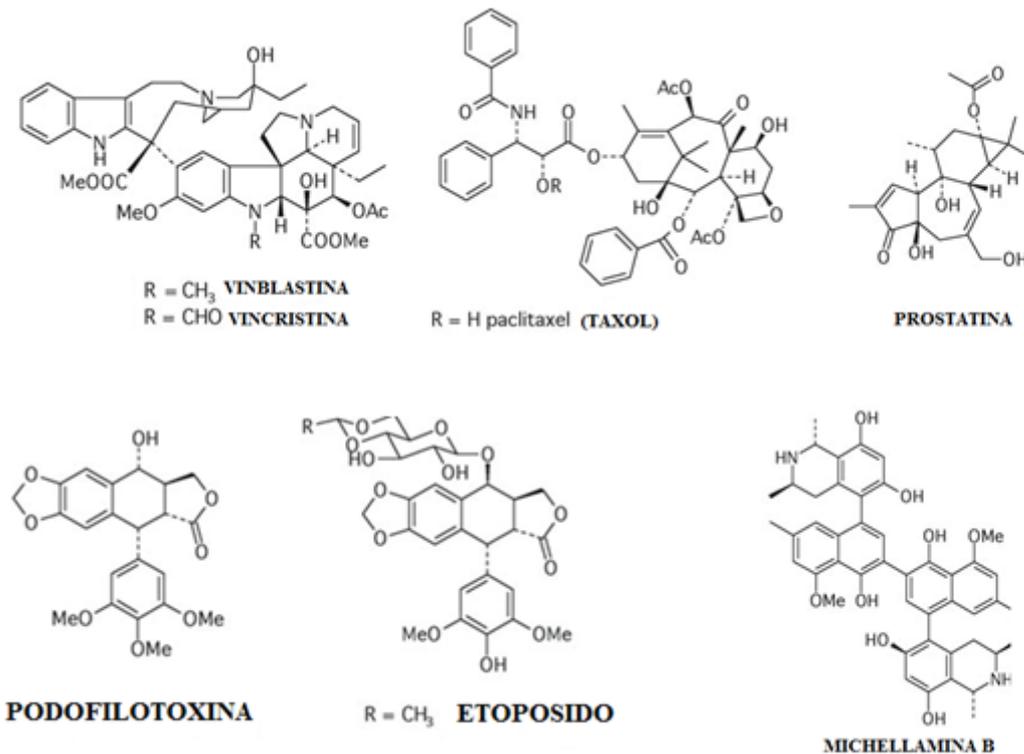


Figura 1.8. Estructura química de algunas drogas derivadas de plantas superiores.

Otra fuente ya establecida y extremadamente importante de moléculas bioactivas son los hongos. Una de las propiedades más importantes de los hongos, en particular aquellos pertenecientes al filo Ascomycota y Basidiomycota, se asocia con su capacidad metabólica de producir una amplia variedad de moléculas bioactivas, destacando varias clases de antibióticos, reductores de colesterol, antitumorales, antifúngicos, inmunosupresores, antiprotozoarios, antiinflamatorios y antivirales (Shu, 2007). Un gran número de enfermedades que en los años 80 y 90 eran tratadas únicamente por medicamentos de origen sintético, en este momento son tratadas por medicamentos de origen microbiano, destacándose los agentes antitumorales como el taxol que actualmente puede ser obtenido a partir de hongos (Demain, 2011). En las últimas décadas, más de 50 cepas de hongos productoras de taxol distribuidas en 36 géneros han sido descritas (Hao, 2013). *Alternaria alternate* var. *monosporus* obtenida de la corteza de *Taxus yunnanensis*, después de mutagénesis por ultravioleta y nitrosoguanidina, puede producir taxol en niveles interesantes (227 mgL⁻¹) para su uso en la industria

farmacéutica (Duan, 2008). Entre los fármacos con mayor impacto hoy en día, se destaca la lovastatina, un agente reductor del colesterol, con ventas en el mundo de alrededor de mil millones de dólares al año (Goswami, 2012). Otros metabolitos importantes producidos por hongos incluyen esteroides, fitohormonas, enzimas utilizadas en procesos biotecnológicos tales como la fabricación de jugos de frutas y sustancias insecticidas, que ayudan a controlar las plagas (Bayaram, 2012).

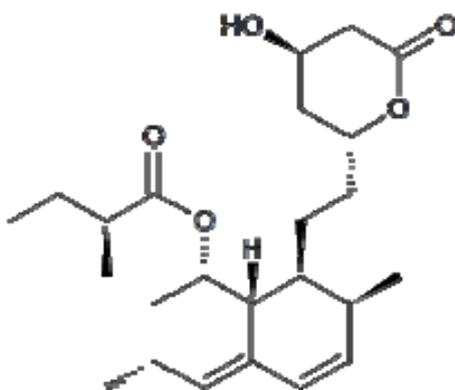


Figura 1.9. Estructura química de la lovastatina, reductor de colesterol ampliamente utilizado.

Más recientemente se han estudiado fuentes marinas que han proporcionado nueva química y biología (Blunt, 2006). Algunos pocos programas han utilizado los insectos como fuente de nuevas drogas, por ejemplo la colaboración entre el INBio y Merck en Costa Rica (Sittenfeld, 1999), y en el laboratorio de Eisner en la Universidad de Cornell (Schröder, 1998). También es notable el trabajo de Daly utilizando anfibios como una rica fuente de compuestos bioactivos (Daly, 2005).

Durante las últimas dos décadas, la investigación dirigida a la explotación de productos naturales como recurso ha disminuido seriamente. Esto es en parte debido al desarrollo de nuevas tecnologías como la química combinatoria, metagenómica y el cribado de alto rendimiento. Sin embargo, los nuevos enfoques de descubrimiento de fármacos no cumplen con las expectativas iniciales. Esto ha llevado a un renovado interés por los productos

naturales en compañías farmacéuticas como Bayer, Merck y Xenova, determinado por la necesidad urgente de nuevos medicamentos, en particular contra las infecciones causadas por patógenos multiresistentes (Beutler, 2009; Buss, 2004; David, 2014; Li, 2009; Molinari, 2009; Potterat, 2008).

¿Por qué siguen siendo atractivos los productos naturales para el desarrollo de fármacos?

1) *Gran biodiversidad.*

Sólo una muy pequeña fracción de todas las especies se han investigado químicamente y mucho menos si consideramos un amplio espectro de bioactividades. La naturaleza ha desarrollado una gran diversidad a lo largo de billones de años de evolución. Existen por lo menos 300.000 especies diferentes de plantas, más de 30 millardos de especies de insectos, 1,5 millardos de especies de hongos y un número similar de especies de algas y procariotas. Todas las especies coexisten en ecosistemas e interactúan entre ellas. Considerando el número de organismos y el número infinito de interacciones posibles, no es sorprendente la enorme variedad de productos secundarios formados (Cordell, 2000).

El programa de cribado de plantas más grande de la década de 1960 se llevó a cabo por Smith Kline & French: cerca de 19.000 especies se examinaban para ver el contenido de alcaloides utilizando una sencilla prueba de color (Raffauf, 1996). El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos ha recogido de forma activa plantas superiores para la detección de actividad anticancerígena por más de 20 años y en la actualidad cuenta con una colección que representa alrededor de 30.000 especies de plantas, o sea 10 por ciento de las especies conocidas.

No hay manera fácil de contar el número de muestras microbianas que se han prospectado para actividad biológica, ya que el protocolo típico en la detección microbiana es realizar una identificación mínima de las especies antes de comenzar las pruebas de actividad biológica; sin duda el número de muestras microbianas seleccionados ha sido enorme, pero la diversidad taxonómica de esas muestras estaba limitada por la predilección por los organismos de suelo

y la facilidad de cultivarlas. Los avances recientes en la microbiología han demostrado que existe una enorme microbiota no muestreada (Epstein, 2008).

2) *Los metabolitos secundarios han evolucionado para ser activos.*

La energía metabólica y el costo genético de hacer una pequeña molécula requiere que esta proporcione algún beneficio para el organismo, ya sea a través de la defensa contra depredadores, la comunicación dentro de su población, o interferir con organismos competidores. Aunque la mayoría de las funciones de los productos naturales en su organismo productor no son conocidas actualmente, la opinión ha cambiado notablemente desde los días en que los productos naturales se consideraban productos de desecho (Mothes, 1969). Sea cual sea el papel preciso, va quedando claro que muchos productos naturales son capaces de llegar a los sitios del receptor ya sea fuera o dentro de las células, tal como un fármaco debe hacer.

3) *Gran diversidad estructural.*

El valor más importante y visible de la química de los productos naturales es la introducción de nuevos esqueletos moleculares y funcionalidades que no han sido previamente concebidos por los seres humanos. Usando terminología post-moderna podemos decir que los productos sintéticos y los productos naturales ocupan diferentes espacios químicos. En general estos últimos presentan mayor complejidad estructural, mas funcionalización, mayor número de grupos oxigenados, centros estereogénicos y ciclos conjugados (Feher, 2003; Graboski, 2008; Gu, 2013; Rosén, 2009).

4) *Las reglas de cinco de Lipinski no se aplican a los productos naturales.*

Se desarrollaron estas reglas para conducir a los químicos sintéticos hacia compuestos que tengan mejores propiedades biofísicas y sean por lo tanto mejores candidatos para ser fármacos activos por vía oral. Por lo tanto, los compuestos deben tener pesos moleculares menores a 500 Da, deben poseer <5 donantes de enlaces de hidrógeno, <10 aceptores de enlace de hidrógeno, y tienen $\log P < 5$ (Lipinski, 1997). Estas reglas excluyen explícitamente los productos naturales, sobre todo por las razones expuestas

más arriba (metabolitos secundarios que han evolucionado para ser bioactivos), ya que a menudo utilizan los transportadores transmembrana en lugar de difusión pasiva para entrar células (Lipinski, 1997).

1.3.1. Los productos naturales como fuente de antibacterianos y antifitopatogénicos.

Antibacterianos naturales.

Los antibacterianos de origen natural desarrollados para uso clínico han sido, sin excepción, derivados de microorganismos, hongos y miembros de actinomicetes, en particular del género *Streptomyces* (Hopwood, 2007). Comenzando con el descubrimiento de la penicilina en 1929, los productos naturales han sido la principal fuente de nuevos antibacterianos y han revolucionado el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En los últimos 80 años se han descubierto numerosas clases de antibacterianos, entre ellas muchas de origen natural como: fenilpropanoides (cloranfenicol), poliquetidos (tetraciclina), aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina), macrólidos (eritromicina), glicopéptidos (vancomicina), estreptograminas (quinpristina y darfopristina), segunda generación de β -lactámicos (cefalosporinas), tercera generación de β -lactámicos (carbapenems, ej. imipenem), lipopéptidos (daptomicina), pleuromutilinas (retapamulina) y macrolactonas (fidaxomicina). Las clases de origen sintético son sólo tres: las sulfonamidas, las fluoroquinolonas (ácido nalixídico, ciprofloxacina) y las oxazolidinonas (linezolid) (Murray, 2009).

Los productos naturales y sus análogos siguen desempeñando un papel principal, representando el 74% de las nuevas moléculas antibacterianas aprobadas entre 1981-2014 (Butler, 2014; Newman, 2016) (Figura 1.10).

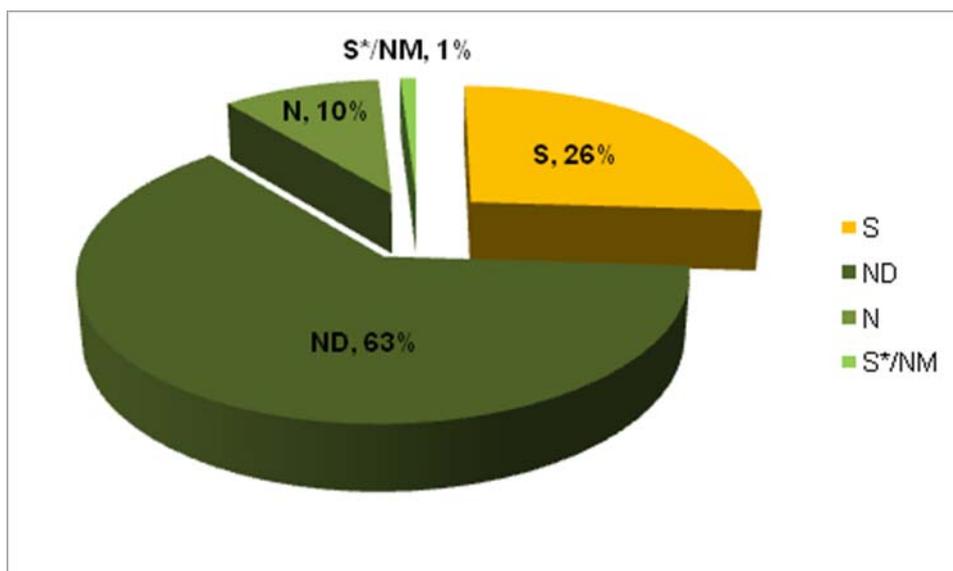


Figura 1.10. Fuente de moléculas antibacterianas aprobadas (1981-2014); n=112. Quedan excluidas las vacunas. S: producto sintético; ND: derivado de producto natural; N: producto natural; S*/NM: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural/desplaza al sustrato natural en forma competitiva "natural product mimic".

Los antibióticos de fuentes naturales oscilan entre compuestos de peso molecular pequeño (por ejemplo, penicilinas) a grandes péptidos (por ejemplo, teicoplanina). Poseen generalmente estructuras complejas con muchos centros quirales, alta diversidad química con varios grupos funcionales densamente desplegados, proporcionando el máximo número de interacciones con dianas moleculares, conduciendo a menudo a una altísima especificidad (Molinari, 2009; Singh, 2006) (Fig. 1.11.). La eficacia de los productos naturales como antibacterianos probablemente se deba a que han evolucionado para ser activos, dando a los organismos que los producen una ventaja selectiva en el ambiente (Bologa, 2013).

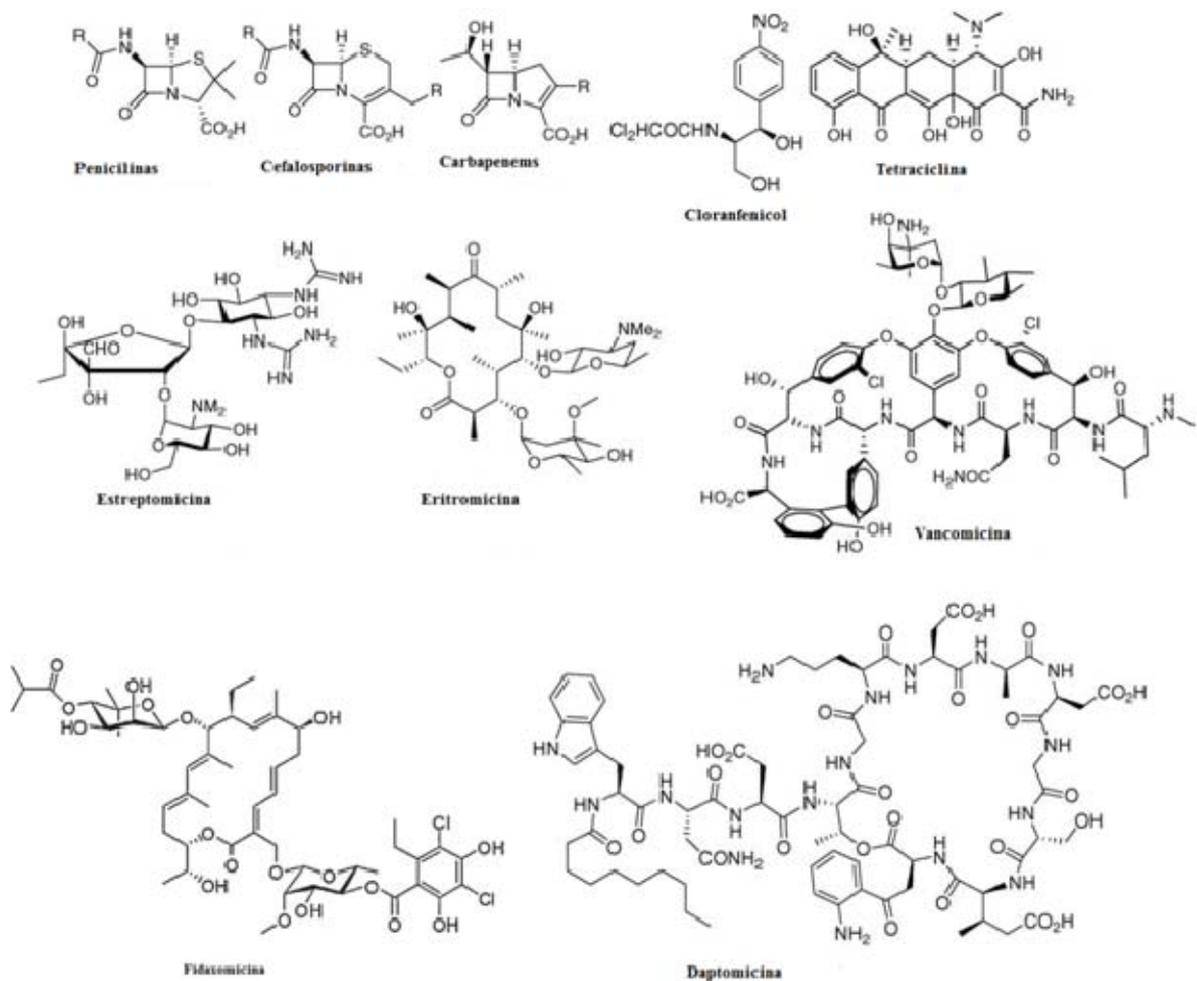
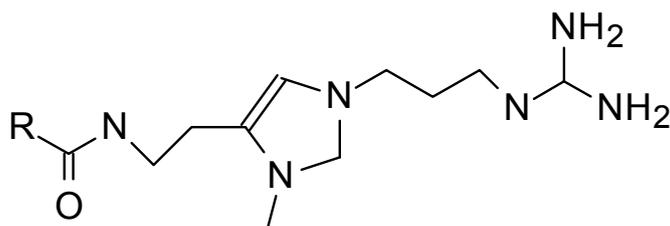


Figura 1.11. Algunos antibacterianos de origen natural.

Se ha estimado (Watve, 2001) que sólo el género bacteriano *Streptomyces* produce aproximadamente 100.000 metabolitos secundarios con al menos alguna actividad antimicrobiana, sugiriendo que si se continúa con el screening tradicional antibacteriano sería posible conseguir nuevas estructuras con mecanismos de acción diferentes a los actuales antibióticos. Sin embargo, los nichos habituales, especialmente los microorganismos del suelo, parecen agotados, si bien se producen aún numerosos nuevos antibióticos a partir de estos nichos, no hay una equivalencia en moléculas novedosas que constituyan a su vez cabezas de futuros desarrollos (Bologa, 2013; Saleem, 2010; Taylor, 2013).

Sin embargo, esta estrategia puede ser fácilmente adaptada para el tamizaje

de actividad de nichos biológicos aun no explotados, incluyendo microorganismos marinos o extremófilos, organismos marinos (celenterados, esponjas) animales y vegetales superiores. Ejemplos son la serie de péptidos de origen animal derivados de la magainina, que presentan gran potencial de uso y los stelletazoles (Figura 1.12) aislados de la esponja *Stelletta* sp (Kirst, 2013; Nicolaou, 2009; Roemer, 2011; Sheridan, 2006; Singh, 2014; Wong, 2012; Zhu, 2012).



Stelletazole (n)

Figura 1.12. Estructura de los stelletazoles.

Dado que los metabolitos conocidos a la fecha representan una pequeña fracción de la diversidad metabólica el estudio de organismos menos estudiados abre grandes posibilidades de encontrar nuevas moléculas de interés.

La búsqueda de compuestos con diferente espectro de actividad y/o estructuras químicas novedosas que sirvan de cabeza de serie para el desarrollo de fármacos es un área de activo interés en todo el mundo. Sin embargo, para ser exitoso, un programa de búsqueda de este tipo debe enfrentar algunos desafíos como la necesidad de desarrollar métodos de pre screening de alta eficiencia para la selección de muestras y evitar el redescubrimiento de compuestos conocidos (Baltz, 2006; Newman, 2003, 2005, 2007).

Antifitopatogénicos naturales.

El éxito de las prácticas agrícolas modernas es debido en parte al descubrimiento y la adopción de productos químicos para el control de plagas. De hecho, el enorme aumento en los rendimientos de los cultivos asociados con la revolución "verde" no habría sido posible sin la contribución de estos compuestos sintéticos. La abundancia de alimentos de alta calidad en los países desarrollados ha eliminado prácticamente la preocupación por el acceso a estos alimentos en dichos países (Dayan, 2009).

Sin embargo, la preocupación por el impacto potencial de los plaguicidas en el medio ambiente ha llevado a la aplicación de procedimientos de registro de plaguicidas más estrictos, como la Ley de Protección de la Calidad de Alimentos que fue promulgada en agosto de 1996 (FQPA, 1996) por el gobierno de los Estados Unidos de América. Como consecuencia de esto, el número de pesticidas sintéticos disponibles para su uso en la agricultura se ha visto disminuido.

Por lo tanto, el paradigma actual de depender casi exclusivamente de productos químicos para el control de plagas debe ser reconsiderado (Dayan, 1999). Nuevos plaguicidas, incluyendo aquellos a base de productos naturales están siendo descubiertos y desarrollados para reemplazar los compuestos perdidos debido a los nuevos requisitos de registro. Además, nuevos pesticidas son necesarios para combatir la evolución de la resistencia a los compuestos en uso (Copping, 2007).

Los productos naturales y sus análogos desempeñan un papel importante, representando más del 28% de los nuevos ingredientes activos para el control de fitopatógenos aprobados entre 1997-2010 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por su sigla en inglés) (Cantrell, 2012) (Figura 1.13).

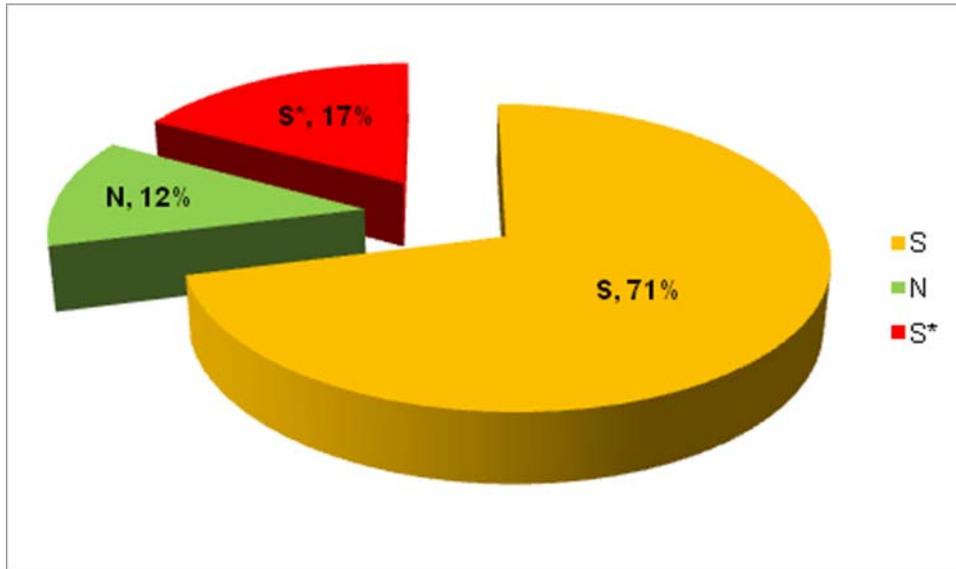


Figura 1.13. Fuente de nuevos ingredientes activos para el control de fitopatógenos aprobados (1997-2010); Quedan excluidos los agentes de control biológico, las plantas genéticamente modificadas que expresan proteínas con actividad frente a fitopatógenos y las proteínas. S: producto sintético; S*: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural; N: producto natural no modificado o preparación cruda.

Los aceites esenciales son los compuestos más importantes entre la amplia gama de productos naturales con propiedades antifitopatogénicas extraídos de plantas. Dichos aceites están conformados por metabolitos secundarios volátiles que son bioactivos en fase vapor, actuando directamente contra los fitopatógenos, y/o también mejorando los mecanismos de defensa de las plantas contra estos microorganismos (Bautista-Baños, 2003). Algunos de los componentes activos clave de los aceites esenciales, por ejemplo, cinamaldehído, citral, eugenol, limoneno o timol son seguros para el consumo humano y tienen estatus GRAS (sigla en inglés para generalmente reconocido como seguro) (de Aquino, 2015).

El extracto de hojas de *Macleaya cordata*, comercializado en la actualidad como fungicida, contiene los alcaloides sanguinarina, queleritrina, protopina y alocriptopina. De estos, los dos primeros son fungicidas y bactericidas bastante potentes in vitro (Liu, 2009) (Figura 1.14.).

A pesar de no existir reportes en la literatura que lo aleguen, el acibenzolar-S-metil es un derivado sintético del inductor vegetal ácido salicílico (Handiseni, 2010). Este compuesto es descrito claramente como un análogo estructural del ácido salicílico y es útil en el control del mildiu veloso en las verduras de hoja induciendo la resistencia de la planta huésped (Figura 1.14.).

Las estrobilurinas, familia de fungicidas perteneciente a los fungicidas clasificados como QoI (inhiben la transferencia de electrones en la respiración mitocondrial al unirse al sitio de ubiquinol (Qo) del citocromo b) fueron lanzadas por primera vez en 1996. La estrobilurina original, llamada estrobilurina A, es producida por el hongo basidiomicete degradador de madera *Strobilurus tenacellus*. La inestabilidad de la estrobilurina A en presencia de la luz impidió su uso comercial conllevando a la necesidad de realizar modificaciones químicas a la molécula para obtener estabilidad que incluyen actualmente al fungicida más vendido del mundo, la azoxistrobina (Bartlett, 2002) y a su análogo el kresoxim-metil (Figura 1.14.). Estos compuestos presentan un menor riesgo para la salud humana y/o el medio ambiente respecto a los plaguicidas alternativos disponibles en el mercado siendo esto avalado por la Agencia de Protección Ambiental al categorizarlos como pesticidas de bajo riesgo. (Vincelli, 2002).

La kasugamicina, aislado por primera vez del actinomicete *Streptomyces kasugaensis* es un fungicida sistémico que inhibe la síntesis proteica y puede ser utilizado en el tratamiento de plantas infectadas como en la prevención de infecciones (Tanaka, 1966; Umezaga, 1965) (Figura 1.14.).

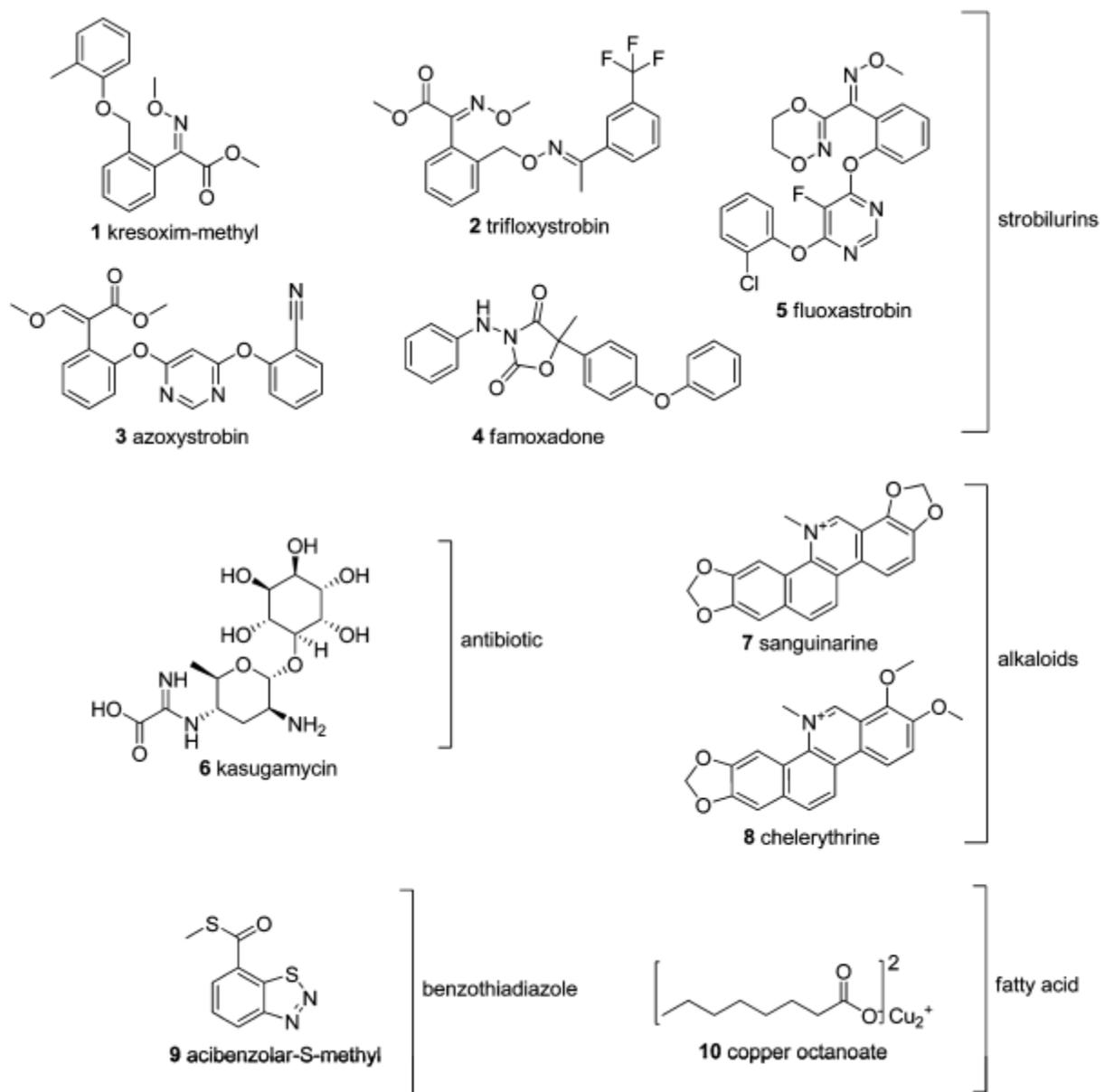


Figura 1.14. Algunos antifitopatogénicos de origen natural (Tomado de Cantrell, 2012).

1.4. Los hongos y su relación con sustancias bioactivas.

1.4.1. Clasificación de los hongos.

Los hongos, pertenecientes al Reino Fungi, tienen como principal característica la presencia de quitina en la pared celular y son clasificados en cinco filos distintos: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (Kirk, 2008; Rossman, 2006).

El filo Chytridiomycota está compuesto por organismos comunes en ambientes acuáticos, donde se nutren de materia orgánica en descomposición. Tales hongos también pueden existir como parásitos de insectos, nematodos, animales, plantas y otros hongos, o como endosimbiontes anaerobios obligatorios, presentes en el sistema digestivo de herbívoros (Kirk, 2008; Webster, 2007).

El filo Zygomycota está formado por un grupo heterogéneo de hongos, dentro de los cuales se destacan aquellos pertenecientes al subfilo Mucoromycotina (Hibbett, 2007). Ese subfilo está formado por géneros como *Rhizopus* y *Mucor*, comúnmente asociados a materia orgánica, frutos dañados y heces de animales. Los zigomicetos se encuentran comúnmente en el suelo (Domsch, 2007).

Los hongos que viven asociados a raíces de plantas y forman las llamadas micorrizas vesículo-arbusculares son actualmente clasificados en el filo Glomeromycota. Se estima que cerca de 90% de las plantas terrestres forman asociaciones mutualistas de tipo micorrizas con hongos de ese filo (Stajich, 2009). La colonización del sistema radicular por los hongos resulta en un aumento de la absorción de los nutrientes del suelo por las plantas. A cambio, los hongos se nutren de fotoasimilados producidos por sus hospedadoras (Alexopoulos, 1996; Rossman, 2006; Webster, 2007). Los hongos pertenecientes a los filos Chytridiomycota, Glomeromycota y Zygomycota corresponden a cerca del 2% del total de especies conocidas del Reino Fungi (Stajich, 2009).

El filo Ascomycota es el más grande en el Reino Fungi, conteniendo 64% de las especies conocidas (Stajich, 2009). Los ascomicetos incluyen levaduras y hongos filamentosos y se caracterizan por la formación de una estructura membranosa que contiene las esporas derivadas de la reproducción sexuada (meiosis) llamada “asco” (Carlile, 2001). Estos hongos están presentes en diversos hábitats terrestres y acuáticos, ocurriendo como saprobios o mutualistas, parásitos y patógenos de animales, plantas y otros hongos (Schoch, 2009). Muchas especies son importantes patógenos de plantas (Agrios, 2005) mientras que un número reducido de ascomicetos son patógenos para los seres humanos y otros animales (Alexopoulos, 1996).

El quinto filo perteneciente al Reino Fungi se conoce como Basidiomycota. Este grupo comprende a aquellos hongos que se caracterizan por la producción de esporas derivadas de la reproducción sexual, sobre una estructura denominada “basidio”. Los hongos que presentan cuerpos de fructificación visibles a simple vista, denominados usualmente “macroscópicos” son en su mayoría basidiomicetos, así como los que causan royas y carbón en plantas (Webster, 2007). Los basidiomicetos corresponden a cerca del 34% del total de especies conocidas del Reino Fungi (Stajich, 2009).

1.4.2. La micoflora como fuente de antimicrobianos.

Los hongos comparten con los animales ciertos agentes infecciosos tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Zjawiony, 2004) y por lo tanto tienen la potencialidad de producir metabolitos con actividad farmacológica de uso en humanos. Existen hipótesis de que el reino fungi incluye más de 1,5 millones de especies y se estima que solamente 13% de dichas especies han sido descritas (Hawksworth, 2001). De ellas, solo una ínfima parte han sido exploradas en cuanto a su capacidad de producir sustancias bioactivas pudiendo postularse que el porcentaje de metabolitos de origen fúngico con aplicación farmacológica descubiertos sea igualmente pequeño (Bass, 2011).

Los denominados “microhongos” son una fuente, ya establecida y extremadamente importante de compuestos antimicrobianos (penicilinas, amoxicilina, cefalosporinas, griseofulvina, etc. (Chen, 2013; Deacon, 2005).

Ha demostrado ser un recurso lejos de agotarse, sea tanto por la exploración de nichos ecológicos poco estudiados como organismos marinos, especies endofíticas o provenientes de ambientes extremos (Bentis, 2000; Cantrell, 2011; Holler, 2000) como por la expresión de nuevos compuestos en especies ya estudiadas a través de manipulación fisiológica o genética (Bills, 2008; Bode, 2002).

Otro tanto sucede con los “macrohongos” (aquellos cuyo cuerpo fructífero es visible a simple vista, la gran mayoría perteneciente al filo Basidiomycota) sólo unos pocos compuestos aislados se encuentran en la etapa de ensayos clínicos. Por ejemplo, un derivado de illudina S ha progresado a la fase II de ensayos clínicos en humanos.

La capacidad de hallar compuestos con actividad antimicrobiana en estos hongos ha demostrado ser viable. Suay y colaboradores (2000) cribaron 317 cepas, correspondientes a 204 especies contra un rango de patógenos humanos. Se observó que más del 40% del total de especies evaluadas exhibió actividad antimicrobiana y un 20% mostró actividad antifúngica., Rosa y colaboradores (2003) estudiaron 103 aislamientos y hallaron que más del 15 % presentaba actividad antimicrobiana. Beattie y colaboradores (2010) trabajando con 117 cepas de un solo género hallaron que alrededor del 50% presentó actividad antibacteriana.

1.4.3. Abordaje “OSMAC” (One strain many active compounds).

Los metabolitos secundarios (MS), definidos como "compuestos que generalmente no están incluidos en el esquema metabólico normal" (Davies, 1985), no son esenciales para el crecimiento, el desarrollo o la reproducción, sin embargo, aportan una ventaja adaptativa que favorece la supervivencia. La ausencia de estos metabolitos, contrariamente a lo que sucede con los

metabolitos primarios, generalmente no se traduce en fenotipos observables cuando el organismo es cultivado en condiciones de laboratorio. Son producidos tanto por plantas, bacterias y hongos y hasta el momento solo una ínfima parte de la diversidad química disponible ha sido explorada respecto a su potencial actividad antimicrobiana.

Las vías crípticas son grupos de genes que podrían codificar metabolitos que aumentan la competitividad del organismo en su medio ambiente natural y pueden permanecer silenciosas en el laboratorio. Son muchos los ejemplos en bacterias y hongos, de clusters de genes de vías biosintéticas de metabolitos secundarios que sobrepasan ampliamente en número a los productos naturales biosintetizados en condiciones de laboratorio. Estos grupos de genes silenciosos (crípticos) sin duda guardan una reserva enorme de nuevos compuestos bioactivos plausibles de servir para el desarrollo de medicamentos (Cimermancic, 2014). Se pueden explorar los productos de estas vías crípticas ya sea utilizando técnicas moleculares (Gross, 2009) o aproximaciones cultivo-dependientes (Bode, 2002; Ochi, 2013).

Es bien conocido que la composición del medio de cultivo tiene gran influencia sobre la producción de metabolitos. Altas concentraciones de glucosa, fosfato y/o amonio generalmente reprimen el metabolismo secundario. Otro ejemplo es el del agregado de aminoácidos para inducir ciertas vías del metabolismo secundario. En general, se puede decir que la variación de parámetros de cultivo para la inducción de la síntesis de nuevos metabolitos secundarios se parece, pero es aun más aleatoria que la modificación para la optimización de la producción de un determinado metabolito. En el 2008, Bills utilizó un encare sistemático de modificación de parámetros de cultivo (por ejemplo composición del medio, pH, temperatura, adición de inhibidores, forma del fermentador, etc.) para aumentar el número de metabolitos secundarios producidos por una misma cepa (Bills, 2008).

El número de investigadores que aplican esta técnica condiciones de cultivo dependientes, ha ido aumentando desde que este método, que ya tiene décadas, se formalizó (Bills, 2008; Bode, 2002; Davies, 2011).

Teóricamente, cada paso biosintético puede ser influenciado a nivel transcripcional, transduccional o a nivel enzimático pudiendo esto resultar en

un amplio número de permutaciones de productos naturales. A nivel del DNA, se podría trabajar utilizando mutagénesis o biosíntesis combinatoria produciendo nuevas actividades enzimáticas resultantes en productos modificados, o también biosíntesis y mutasíntesis utilizando precursores diferentes basados en la falta de especificidad de algunas enzimas para introducir precursores diferentes en la molécula diana. Finalmente, la biotransformación y derivatización modifican química o biológicamente ya sean los intermediarios o los productos finales de una ruta biosintética dada. Se puede aventurar que, en la naturaleza, donde cada ambiente diferente trae aparejado un transcriptoma, proteoma y finalmente metaboloma diferente para cada situación a la cual debe enfrentarse el microorganismo para sobrevivir, traería aparejado un alto número de metabolitos secundarios diferentes. Schiewe y Zeeck definieron dicha forma de trabajo, en la cual se vería una mayor cantidad de los metabolitos secundarios producidos por una cepa dada como OSMAC (One Strain Many Active Compounds), y surge de la experiencia de que pequeños cambios en las condiciones de cultivo trae aparejada cambios en la cantidad y tipo de compuestos biosintetizados (Bills, 2008; Bode, 2002; Davies, 2011; Gross, 2009; Petitt, 2011; Schiewe, 1999) (Figura 1.15.).

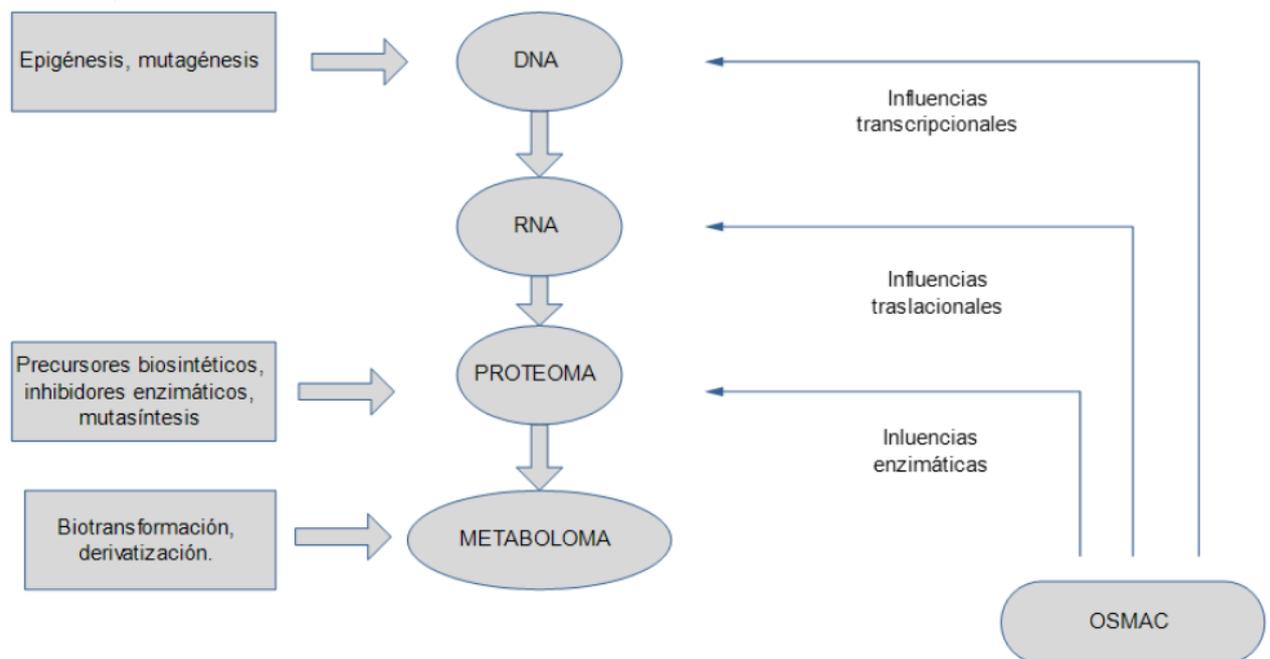


Figura 1.15. Esquema de la estrategia OSMAC.

Barbaráková y colaboradores (2012) cultivando el hongo *Penicillium scabrosum* en medios conteniendo diferentes concentraciones de glucosa potencializaron la producción de fumagilina, metabolito conocido por su alto potencial antibiótico.

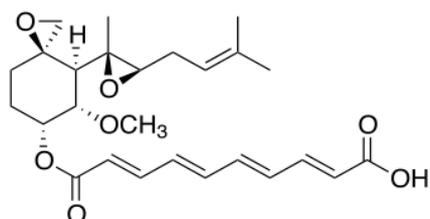


Figura 1.16. Estructura química del antibiótico fumagilina.

Wang y colaboradores (2011) aislaron tres nuevas citocalasinas (alcaloides fúngicos) y cinco nuevos análogos, las aspocalasinas, utilizando la técnica OSMAC en cultivos de *Spicaria elegans*. Estos productos fueron obtenidos a partir de la variación del medio de cultivo y la adición de aminoácidos precursores de esa molécula, pues el tipo de citocalasina obtenida depende del aminoácido incorporado a su estructura. La actividad citotóxica de las nuevas citocalasinas fue evaluada frente a linajes celulares. Dos de ellas presentaron una excelente actividad citotóxica frente al linaje A-549 con IC_{50} de 8,2 μ M y 20 μ M.

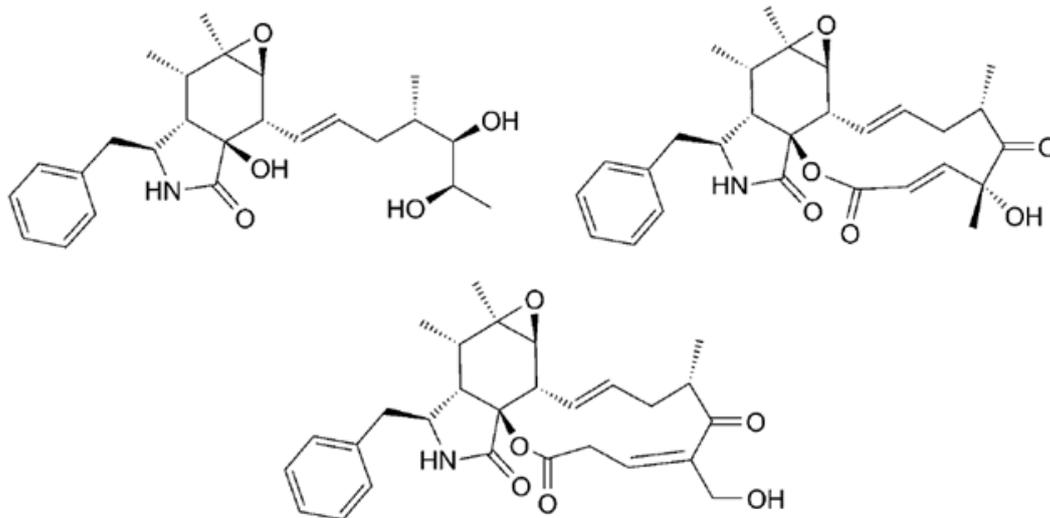


Figura 1.17. Citocalasinas aisladas de cultivos del hongo *Spicaria elegans* (Adaptado de Wang, 2011).

El ADN eucariota está empaquetado en los llamados nucleosomas, donde el ADN se enrolla alrededor de octámeros de histonas. A través de modificaciones bioquímicas (acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación), las histonas son capaces de coordinar el reclutamiento, estabilización o exclusión de los complejos regulatorios de la transcripción y demarcar regiones funcionales del genoma tales como promotores, secuencias codificantes y *enhancers* (Campos, 2009). Dicha organización de los nucleosomas, puede compactarse aún más para controlar la actividad de genes específicos. Regiones genómicas con cromatina más laxa o abierta están asociadas con la transcripción de los genes, mientras que cromatina más cerrada se asocia a represión de los mismos. El nivel de compactado es controlado principalmente por complejos remodeladores del nucleosoma (Clapier, 2009). A pesar de que aún no está completamente comprendido cómo las histonas modulan la dinámica de la cromatina, está claro que los efectos mediados por efectores tienen mucha influencia sobre la accesibilidad a ciertos genes. Cualquier residuo polar expuesto (y algunas prolinas) de las colas de

las histonas puede estar sujeta a alguna modificación post traduccional covalente (Clapier, 2009; Rialdi, 2016).

En los hongos, los compuestos antimicrobianos se producen principalmente durante el metabolismo secundario (MS). La secuenciación del genoma fúngico actualmente en curso, conduce a nuevos conocimientos sobre la cantidad de genes relacionados con el MS (Walsh, 2010; Winter, 2011). El número de genes implicados en el MS es mayor que el número de metabolitos secundarios fúngicos caracterizados, lo que indica un alto número de compuestos hasta ahora desconocidos (Keller, 2005; Winter, 2011). Dichos genes se organizan a menudo en grupos o clusters de genes, que cuando los hongos se cultivan en condiciones estándar de laboratorio, están en un estado transcripcional silenciado (vías crípticas) (Keller, 2005). Estos grupos de genes silenciados tienen el potencial de codificar para proteínas implicadas en la biosíntesis de nuevos compuestos antimicrobianos. Se han llevado a cabo varios enfoques para activar tales grupos de genes "crípticos", por ejemplo, por sobreexpresión del factor de transcripción presente en el cluster (Bergmann, 2010), mediante la supresión de las vías que consumen precursores (Chiang, 2013), por cocultivo con bacterias (Nützmann, 2011), y por acción sobre las vías de silenciamiento epigenético (Reyes-Dominguez, 2012). El silenciamiento o activación de clusters de genes se ha relacionado con los mecanismos epigenéticos que influyen en la formación de "heterocromatina facultativa" (Gacek, 2012).

Definiremos los cambios epigenéticos como aquellos cambios heredables en la función génica que ocurren sin un cambio en la secuencia del ADN nuclear (Bolden, 2006). Dos de las principales señales de la regulación de la cromatina por epigenéticos son la acetilación de las histonas, que se traduce principalmente en la activación de la transcripción, y la metilación de las histonas y el ADN, lo que está relacionado principalmente con el silenciamiento de la transcripción (Brosch, 2008). Estudios recientes en hongos, demostraron que diversos productos químicos de bajo peso molecular son capaces de inhibir las histonas desacetilasas (HDACs) y las ADN metiltransferasas (ADNMTs) influyendo así en el perfil de metabolitos secundarios (Cichewicz,

2010; Cole, 2008; Fisch, 2009; Zutz, 2013). Ejemplos de compuestos inhibidores de las HDACs son el ácido valproico (inhibe las HDACs clase I e induce la degradación de las HDACs clase II) (Krämer, 2003; Zutz, 2013), trichostatin A (inhibe HDACs clases I y II) (Smith, 2002), SAHA o vorinostat (inhibe HDACs clases I y II) (Robey, 2011) y butirato de sodio (Vrba, 2011). Efecto similar tiene la 5-azacitidina que es un inhibidor de la metilación del ADN (Fritz, 2010; Hagemann, 2011), y la N-acetilglucosamina que actuaría sobre la Topoisomerasa I que a su vez actúa como regulador positivo de la ARN polimerasa II (Rialdi, 2016).

Cichewicz y colaboradores (2010) aislaron dos oxipilinas al cultivar el hongo *Cladosporium cladosporioides* en presencia del modulador epigenético 5-azacitidina (inhibidor de las ADN metiltransferasas). Al cultivarlo en presencia del ácido hidroxámico suberoilánilida (inhibidor de histonas desacetilasas) se observó la producción de ocho perilenoquinonas. Sin embargo, cuando el hongo fue cultivado en ausencia de ambos, no se observó producción de ninguno de los metabolitos citados.

Du y colaboradores (2014) aislaron un nuevo policétido pentacíclico clorado, la daldinona E al cultivar el hongo *Daldinia* sp. en presencia del inhibidor de histonas desacetilasas, el ácido hidroxámico suberoilánilida.

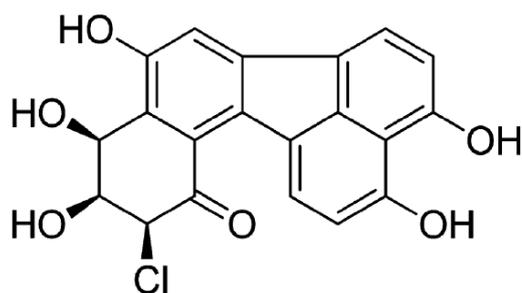


Figura 1.18. Daldinona E, metabolito producido por la especie *Daldinia* sp. mediante la utilización de un inhibidor de histonas desacetilasas.

1.4.4. *Gymnopilus junonius*.

Gymnopilus, es un género de hongos con himenio formado por laminillas perteneciente a la familia Strophariaceae (Agaricales) que contiene alrededor de 200 especies de hongos esporulados de coloración naranja-oxidado, anteriormente dividido entre los géneros *Pholiota* y *Flammula* (Kirk, 2008). El cuerpo fructífero es típicamente de color marrón rojizo a amarillo, pasando por el naranja-oxidado, de tamaño medio a grande y a menudo con un velo bien desarrollado.

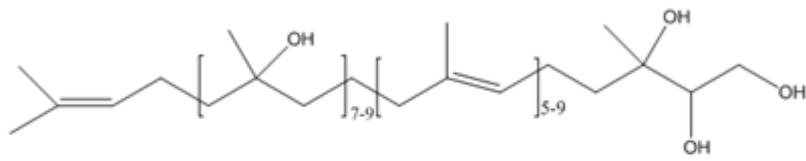
La mayoría de los miembros de *Gymnopilus* crecen en la madera, pero a veces pueden aparecer terrestres si la madera se entierra o se descompone. Los miembros de *Pholiota* y *Cortinarius* son fáciles de confundir con *Gymnopilus*.

El hongo *Gymnopilus junonius* (Fr.) P.D. (también conocido como *Gymnopilus spectabilis* (Weinm.) A.H. Sm) es ampliamente conocido como el "hongo de la risa" (Ohwaraitake en japonés) ya que puede causar risa excesiva en aquellos que lo consumen, debido a su contenido del alcaloide alucinógeno psilocibina (Hashimoto, 1989). Crece silvestre en Uruguay, especialmente en plantaciones de *Eucalyptus* spp. siendo conocido como "hongo del eucalipto". Se vende en los mercados de frutas y verduras, y se consume como escabeche.

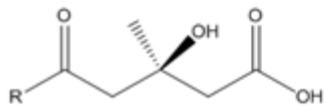


Figura 1.19. *Izquierda:* Ejemplares de *G. junonius* emergiendo en una corteza de eucalipto. Se puede observar en detalle el pie fuerte y fibroso, característico de esta especie / Los *Gymnopilus* crecen, con frecuencia, formando grandes racimos (cespitosos) *Derecha:* Cuerpo fructífero y su característica esporada color herrumbre / Anillo cubierto por esporas en el pie de un *Gymnopilus* / Las laminillas de *G. junonius* se vuelven ferrugíneas al madurar (Tomadas de Hongos del Uruguay (2011) – Exposición del Centro de Fotografía de Montevideo).

Aunque el hongo se ha estudiado principalmente por su contenido de alcaloides, se ha demostrado que es una fuente rica de metabolitos únicos. Los constituyentes químicos reportados para el hongo incluyen los compuestos amargos llamados gimnopilinas (Aoyagi, 1983), los gimnoprenoles que poseen la estructura de un nuevo tipo de polioli poliisopreno con 45-60 átomos de carbono (Nozoe, 1983), el ácido graso citotóxico ácido ostopánico (Hamburger, 1987) y estilpironas antioxidantes como bisnoryangonina e hispidina (Findlay, 1991). Alborés y colaboradores aislaron una lectina que mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger* (Alborés, 2014).

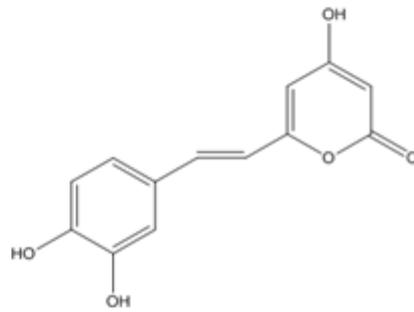


GIMNOPRENOLES

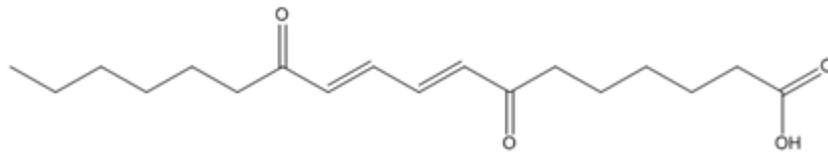


R = GIMNOPRENOL

GIMNOPILINAS



HISPIDINA



ÁCIDO OSTOPÁNICO

Figura 1.20. Algunos compuestos aislados de *Gymnopilus junonius*.

1.5. Referencias bibliográficas.

- Agrios, G.N. (2005) Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. London, United Kingdom, 952p.
- Alborés, S., Mora, P., Bustamante, M.J., Cerdeiras, M.P., Franco Fraguas, L. (2014) Purification and Applications of a Lectin from the Mushroom *Gymnopilus spectabilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172** (4), pp. 2081-2090.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996) Introductory Mycology. Fourth Edition. John Wiley & Sons. New York, USA, 869p.
- Alonso, R. y Bettucci, L. (2009) First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, **4**, pp. 91-92.
- Aoyagi, F., Maeno, S., Okuno, T., Matsumoto, H., Ikura, M., Hikichi K, Matsumoto, T. (1983) Gymnopilins, bitter principles of the big-laughter mushroom *Gymnopilus spectabilis*. *Tetrahedron Letters*, **24** (19), pp. 1991-1994.
- Arya, A. y Perelló, A.E. (Eds.) (2010) Management of Fungal Plant Pathogens. First Edition. CAB International. Wallingford, United Kingdom, 388p.
- Baltz, R.H. (2006) Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation, or lack of inspiration? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**, pp. 507-513.
- Barboráková, Z., Labuda, R., Häubl, G., Tančinová, D. (2012) Effect of glucose concentration and growth conditions on the fungal biomass, pH of media and production of fumagillin by a non-pathogenic strain *Penicillium scabrosum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **1** (4), pp. 466-477.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. (2002) The strobilurin fungicides *Pest Management Science*. **58** (7), pp. 649-662.
- Bass, D. y Richards, T.A. (2011) Three reasons to re-evaluate fungal diversity on earth and in the ocean. *Fungal Biology Reviews*, **25** (4), pp. 159-164.

- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bósquez-Molina, E., Wilson, C.L. (2003) Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*: anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, **22**, pp. 1087-1092.
- Bayaram, Z., Braus, G. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet Family of regulatory protein. *Federation of European Microbiological Societies Reviews*, **36**, pp. 1-24.
- Beattie, K.D., Rouf, R., Gander, L., May, T.W., Ratkowsky, D., Donner, C.D., Gill, M., Grice, I.D., Tiralongo, E. (2010) Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*. **71** (8-9), pp. 948-955.
- Bentis, C.J., Kaufman, L., Golubic, S. (2000) Endolithic fungi in reef-building corals (order Scleractinia) are common, cosmopolitan and potentially pathogenic. *The Biological Bulletin*, **198**, pp. 254–260.
- Bergmann, S., Funk, A.N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C. Brakhage, A.A. (2010) Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, **76** (24), pp. 8143–8149.
- Berkowitz, F. (1995) Antibiotic resistance to bacteria. *Southern Medical Journal*, **88**, pp. 797-804.
- Beutler, J.A. (2009) Natural products as a foundation for drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, pp. 9-11.
- Bills, G.F., Platas, G., Fillola, A., Jiménez, M.R., Collado, J., Vicente, F., Martín, J., González, A., Bur-Zimmermann, J., Tormo, J.R., Peláez, F. (2008) Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays *Journal of Applied Microbiology*, **104** (6), pp. 1644-1658.
- Bister, B., Bischoff, D., Stroebel, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., Suessmuth, R.D. (2004) Abyssomicin C-A Polycyclic Antibiotic from a Marine *Verrucospora* Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic

- Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, **43** (19), pp. 2574-2576.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.G.H., Northcote, P.T. Prinsep, M.R. (2006) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **23**, pp. 26-78.
- Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*, **3**, pp. 619-627.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**, pp. 769-784.
- Bologa, C.G., Ursu, O., Oprea, T.I., Melancon, C.E., Tegos, G.P. (2013) Emerging trends in the discovery of natural products antibacterials. *Current Opinion in Pharmacology*, **13**, pp. 678-687.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards Jr., J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009) Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, **48** (1), pp. 1-12.
- Brent, K.J. y Hollomon, D.W. (2007) Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph No. 1, FRAC, Brussels.
- Brosch, G., Loidl, P., Graessle, S. (2008) Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **32** (3), pp. 409–439.
- Brown, E.D. (2013) Is the GAIN Act a turning point in new antibiotic discovery? *Canadian Journal of Microbiology*, **59**, pp. 155-156.
- Buss, A. y Butler, M.S. (2004) A New Model for Utilising Chemical Diversity from Natural Sources. *Drug Development Research*, **62**, pp. 362-370.
- Butler, M.S., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A. (2014) Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural Products Reports*, **31** (11), pp. 1612-1661.

- Campos, E.I. y Reinberg, D. (2009) Histones: Annotating Chromatin. *Annual Review of Genetics*, **43**, pp. 559-599.
- Cantrell, S.A., Dianese, J.C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P. (2011) Unusual fungal niches. *Mycologia*, **103** (6), pp. 1161–1174.
- Cantrell, C.L., Dayan, F.E., Duke, S.O. (2012) Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*, **75**, pp. 1231-1242.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. (2001) *The Fungi*. Second Edition. Academic Press, London, United Kingdom, 578p.
- Chen, H-J., Awakawa, T., Sun, J-Y., Wakimoto, T., Abe, I. (2013) Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. *Natural Products and Bioprospecting*, **3**, pp. 20-23.
- Chiang, Y.M., Oakley, C.E., Ahuja, M., Entwistle, R., Schultz, A., Chang, S.L., Sung, C.T., Wang, C.C., Oakley, B.R. (2013) An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, **135** (20), pp. 7720–7731.
- CHLA-EP, Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (2013) Informe Epidemiológico Año 2013 <http://www.chlaep.org.uy/descargas/informe-epidemiologico-2013-cifras-provisorias.pdf>.
- Cichewicz, R.H. (2010) Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Natural Product Reports*, **27**, pp. 11–22.
- Cimermancic, P., Medema, M.H., Claesen, J., Kurita, K., Wieland Brown, L.C., Mavrommatis, K., Pati, A., Godfrey, P.A., Koehrsen, M., Clardy, J., Birren, B.W., Takano, E., Sali, A., Lington, R.G., Fischbach, M.A. (2014) Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters. *Cell*, **158** (2), pp. 412-421.
- Clapier, C.R. y Cairns, B.R. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes *Annual Review of Biochemistry*, **78**, pp. 273-304.
- Clardy, J. y Walsh, C. (2004) Lessons from natural molecules. *Nature*, **432**, pp. 829-837.

- Clark, A.M. (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*, **13** (8), pp. 1133-1141.
- Cole, P.A. (2008) Chemical probes for histone-modifying enzymes. *Nature Chemical Biology*, **4** (10), pp. 590–597.
- Cooper, M.A. y Shlaes, D. (2011) Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, **472**, 32.
- Copping, L.G. y Duke, S.O. (2007) Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, **63** (6), pp. 524-554.
- Cordell, G.A. (2000). Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, **55**, pp. 463-480.
- Cragg, G.M. y Newman, D.J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, pp. 3670-3695.
- Daly, J.W., Spande, T.F., Garraffo, H.M. (2005) Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *Journal of Natural Products*, **68**, pp. 1556-1575.
- David, B., Wolfender, J-L., Dias, D. A. (2014) The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, **14** (2), pp. 299-315.
- Davies, J.K., Jensen, E., Junttila, O., Rivier, L., Crozier, A. (1985) Identification of endogenous gibberellins from *Salix pentandra*. *Plant Physiology*, **78** (3), pp. 473-476.
- Davies, J. (2011) How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Current Opinion in Chemical Biology*, **15**, pp. 5–10.
- Dayan, F.E., Romagni, J.G., Tellez, M.R., Rimando, A.M., Duke, S.O. (1999) Managing weeds with natural products. *Pesticide Outlook*, **10**, pp. 185-188.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O. (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, pp. 4022-4034.
- de Aquino, A.B., Blank, A.F., de Aquino Santana, L.C.L. (2015) Impact of edible chitosan-cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer

- genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. *Food Chemistry*, **171**, pp. 108-116.
- Deacon, J.W. (2005) *Fungal Biology*. Fourth Edition. Wiley-Blackwell Publishing, London, United Kingdom, 384p.
- Demain, A.L. y Vaishnav, P. (2011) Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, **4** (6), pp. 687-689.
- Desjardin, A.E. (2006) *Fusarium Mycotoxins*. Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, Saint Paul, USA, 260p.
- Ding, T., Jiang, T., Zhou, J., Xu, L., Gao, Z.M. (2010) Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) *Genetics and Molecular Research*, **9** (4), pp. 2104-2112.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. (2007) *Compendium of soil fungi*. IHW Verlag, Eching, Germany, 672 p.
- Drawz, S.M. y Bonomo, R.A. (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, **23**, pp. 160-201.
- Du, L., King, J.B., Cichewicz, R.H. (2014) Chlorinated polyketide obtained from *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. *Journal of Natural Products*, **77**, pp. 2454-2458.
- Duan, L-L., Chen, H-R., Chen, J-P., Li, W-P., Hong, L. (2008) Screening the high-yield paclitaxel producing strain *Alternaria alternate* var *monosporus*. *Chinese Journal of Antibiotics*, **33**, pp. 650-652.
- EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2007) EARSS Annual Report 2007. Bilhoven, The Netherlands.
- ECDC/EMA, European Centre for Disease Prevention and Control & European Medicines Agency (2009) *The bacterial challenge: time to react*, Stockholm, Sweden.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqus, Y., Zuriel, S., Chet, I. (2007) Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, **42**, pp. 324-332.

- Epstein, S. y López-García, P. (2008) "Missing" protists: A molecular prospective. *Biodiversity and Conservation*, **17**, pp. 261-276.
- Fauci, A.S. y Marston, H.D. (2014) The perpetual challenge of antimicrobial resistance. *Journal of the American Medical Association*, **311**, pp. 1853-1854.
- Feher, M. y Schmidt, J.M. (2003) Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *Journal for Chemical Information and Computer Sciences*, **43**, pp. 218-227.
- Findlay, J.A. y He, Z.Q. (1991) Minor constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *Journal of Natural Products*, **54** (1), pp. 184-189.
- Fisch, K. M., Gillaspay, A. F., Gipson, M., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Jackson, L., Najjar, F.Z., Wägele, H., Cichewicz, R.H. (2009) Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36** (9), pp. 1199–1213.
- Fleming, A. (1945) Penicillin. Nobel Lecture. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf.
- FQPA, Food Quality Protection Act of 1996 (1996), Public Law 104-170, United States of America. <https://www.congress.gov/104/plaws/publ170/PLAW-104publ170.pdf>.
- Fritz, E.L. y Papavasiliou, F.N. (2010) Cytidine deaminases: AIDing DNA demethylation? *Genes & Development*, **24** (19), pp. 2107–2114.
- Gacek, A. y Strauss, J. (2012) The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **95** (6), pp. 1389–1404.
- GAIN, Generating Antibiotic Incentives Now (2012) <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-112publ144/pdf/PLAW-112publ144.pdf>.
- González, L.G. (1981) Introducción a la Fitopatología, IICA eds., San José, Costa Rica.

- Goswami, S., Vidyarthi, A.S., Bhunia, B., Mandal, T. (2012) A review on lovastatin and its production. *Journal of Biochemistry Technology*, **4** (1), pp. 581-587.
- Grabowski, K., Baringhaus, K.H., Schneider, G. (2008) Scaffold diversity of natural products: inspiration for Combinatorial library design. *Natural Product Reports*, **25**, pp. 892-904.
- Gross, H. (2009) Genomic mining – a concept for the discovery of new bioactive natural products. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **2**, pp. 207–219.
- Gu, J., Gui, Y., Chen, L., Yuan, G., Lu, H-Z., Xu, X. (2013) Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. *PLoS ONE*, **8**, e62839.
- Hagemann, S., Heil, O., Lyko, F., Brueckner, B. (2011) Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS ONE*, **6** (3): e17388.
- Hamburger, M., Handa, S.S., Cordell, G.A., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R. (1987) Plant anticancer agents, XLIII. (E,E)-7,12-dioxo-octadeca-8,10-dien-1-oic acid (ostopanic acid), a cytotoxic fatty acid from *Ostodespaniculata*. *Journal of Natural Products*, **50** (2), pp. 281-283.
- Handiseni, M. y Maphosa, D. (2010) Efficacy of Acibenzolar-S-Methyl Against Wildfire Blight (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* tox+) of Paprika (*Capsicum annum* L.) Seedlings. *Plant Pathology Journal*, **9**, pp. 135-139.
- Hao, X., Pan, J., Zhu, X. (2013) Taxol Producing Fungi. En: Ramawat, K.G. y Mérillon, J-M. (Eds.), *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Part X, pp. 2792-2812, Berlin, Springer Berlin Heidelberg.
- Harvey, A.L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **13** (19/20), pp. 894-901.
- Hashimoto, M., Yanagiya, M., Okuno, T., Shirahama, H. (1989) The Absolute Configuration of 4,6-Decadiyne-1,3,8-triol Isolated from *Gymnopilus*

spectabilis. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **62** (8), pp. 2751-2752.

Hawksworth, D.L. (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimated revisited. *Mycological Research*, **105** (12), pp. 1422-1432.

Hayes, W.J. y Laws, E.R. (1991). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 1. Academic Press, New York, USA, 496p.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.I., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J., Mozleystandridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schußler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, V., Zhang, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, **111**, pp. 509-547.

Holler, U., Wright, A.D., Matthee, G.F., König, G.M., Draeger, S., Aust, H.J., Schulz, B. (2000) Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, **104**, pp. 1354–1365.

Hopwood, D. A. (2007) *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press, New York, USA, 272p.

Hughes, C.C. y Fenical, W. (2010) Antibacterials from the sea. *Chemistry-A European Journal*, **16** (42), pp. 12512-12525.

- INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2002) Estudio de la población en el suelo de *Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia oryzae sativae*, patógenos del arroz (*Oryza sativa*). Programa Arroz. INIA, Treinta y Tres, Uruguay.
- Jayaprakashvel, M., Selvakumar, M., Srinivasan, K., Ramesh, S., Mathivanan, N. (2010) Control of sheath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichothecium roseum* MML003. *European Journal of Plant Pathology*, **126**, pp. 229-239.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. (2005) Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3** (12), pp. 937–947.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008) Dictionary of the fungi. Ten Edition. CABI Publishing. Wallingford, United Kingdom, 771p.
- Kirst, H.A. (2013) Developing new antibacterials through natural product research. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **8** (5), pp. 479-493.
- Kitzis, M.D., Ly, A., Goldstein, F.W. (2004) In vitro activities of tigecycline (GAR-936) against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48** (1), pp. 366-367.
- Knight, S.C., Anthony, V.M., Brady, A.M., Greenland, A.J., Heaney, S.P., Murray, D.C., Powell, K.A., Schulz, M.A., Spinks, C.A., Worthington, P.A., Youle, D. (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, pp. 349-372.
- Krämer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., Göttlicher, M. (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO Journal*, **22** (13), pp. 3411–3420.
- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. (2006) The Fusarium Laboratory Manual. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, USA, 388p.
- Li, J.W.H. y Vederas, J.C. (2009) Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *Science*, **325** (5937), pp. 161-165.

- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, pp. 3-25.
- Liu, H., Wang, J., Zhao, J., Lu, S., Wang, J., Jiang, W., Ma, Z., Zhou, L. (2009) Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Natural Product Communications*, **4**, pp. 1557–1560.
- Livermore, D.M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., White, T. (2011) Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkr262.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A.C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., Schaecher, K.E. (2016) *Escherichia coli* Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **60** (7), pp. 4420-4421.
- MGAP, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2015) Análisis de fitosanitarios importados según aptitud para el año 2015, Uruguay. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos>.
- Molinari, G. (2009) Natural products in drug discovery: present status and perspectives. En: Guzmán C.A. y Feuerstein G.Z. (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology*. Springer. New York, USA, 655p, pp. 13-27.
- Mothes, K. (1969) Die alkaloid im stoffwechsel der pflanze. *Experientia*, **25**, pp. 225-239.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2009) Capítulo 20: Antibióticos. En: Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (Eds.), *Microbiología Médica*. Sexta Edición. Elsevier-Mosby, España, 963p, pp. 199-208.
- Newman, D.J. y Cragg, G.M. (2003) Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. *Annals of Applied Biology*, **143** (2), pp. 127-133.

- Newman, D.J. y Cragg, G.M., (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, **100** (1-2), pp. 72-79.
- Newman, D.J. y Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**, pp. 461-477.
- Newman, D.J. y Cragg, G.M. (2012) Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, **75**, pp. 311-335.
- Newman, D.J. y Cragg, G.M. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, **79** (6), pp. 629-661.
- NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (1998) Fact Sheet, 3/98.
- Nicolaou, K.C., Chen, J.S., Edmonds, D.J., Estrada, A.A. (2009) Recent advances in the chemistry and biology of naturally occurring antibiotics. *Angewandte Chemie International Edition*, **48**, pp. 660-719.
- NIPHE, National Institute for Public Health and the Environment (2008) http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf.
- Nozoe, S., Koike, Y., Tsuji, E., Kusano, G., Seto, H. (1983) Isolation and structure of gymnoprenols, a novel type of polyisoprenepolyols from *Gymopilus spectabilis*. *Tetrahedron Letters*, **24** (16), pp. 1731-1734.
- Nützmann, H-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schümann, J., Hertweck, C., Strauss, J., Brakhage, A.A. (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (34), pp. 14282–14287.
- OCDE/FAO, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2013) OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022, Texcoco, Estado de México, Universidad Autónoma Chapingo.

- Ochi, K. y Hosaka, T. (2013) New strategies for drug discovery: Activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97** (1), pp. 87-98.
- Office for National Statistics (2008) Annual Report and Accounts 2007/2008 United Kingdom. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/250238/0678.pdf
- Oliphant, C.M. y Green, G.M. (2002) Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, **65** (3), pp. 455-465.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2003) Informe sobre la salud en el mundo 2003: Forjemos el futuro. http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_es.pdf.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2014_a) Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014: Una mina de información sobre salud pública mundial. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/es/.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2014_b) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2015) Global Health Observatory data: Causes of child mortality. http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/.
- Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, M. (2007) Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *Future Microbiology*, **2** (3), pp. 323-334.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995) Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology*, **44**, pp. 207-238.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., Pompliano, D.L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **6**, pp. 29-40.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **11** (3), pp. 297-308.

- Petitt, R.K. (2011) Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology*, **4** (4), pp. 471-478.
- Pitt, J.I. (1997) Toxigenic *Penicillium* species. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.B., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington, USA, 768p, pp. 411.
- Porto, M.F. y Soares, W.L. (2012) Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, **37**, pp. 17-50.
- Potterat, O. y Hamburger, M. (2008) Drug discovery and development with plant-derived compounds. En: Petersen F. y Amstutz R. (Eds.), *Progress in Drug Research*. Birkhäuser. Basel, Switzerland, 65, pp. 45-118.
- Projan, S.J. (2000) Preclinical pharmacology of GAR-936, a novel glycycline antibacterial agent. *Pharmacotherapy*, **20** (9 Pt 2), pp. 219S-223S.
- Raffauf, R.F. (1996) *Plant Alkaloids: A Guide to their Discovery and Distribution*. Food Products Press, Binghamton, USA, 298p.
- Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R., Strauss, J. (2012) Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, **49** (1), pp. 39–47.
- Rialdi, A., Campisi, L., Zhao, N., Lagda, A.C., Pietzsch, C., Sook, J., Ho, Y., Martinez-Gil, L., Fenouil, R., Chen, X., Edwards, M., Metreveli, G., Jordan, S., Peralta, Z., Munoz-Fontela, C., Bouvier, N., Merad, M., Jin, J., Weirauch, M., Heinz, S., Benner, C., van Bakel, H., Basler, C., García-Sastre, A., Bukreyev, A., Marazzi, I. (2016) Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. *Science*, 10.1126/science.aad7993.
- Robey, R.W., Chakraborty, A.R., Basseville, A., Luchenko, V., Bahr, J., Zhan, Z., Bates, S. (2011) Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Molecular Pharmaceutics*, **8**, pp. 2021–2031.
- Roemer, T., Xu, D., Singh, S.B., Parish, C.A., Harris, G., Wang, H. (2011) Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery. *Chemical Biology*, **18**, pp. 148-164.

- Rosa, L.H., Gomes Machado, K.M., Jacob, C.C., Capelari, M., Augusto Rosa, C., Leomar Zani, C. (2003) Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98** (7), pp. 967-974.
- Rosén, J., Gottfries, J., Muresan, S., Backlund, A., Oprea, T.I. (2009) Novel Chemical Space Exploration via Natural Products. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52** (7), pp. 1953-1962.
- Rossmann, A.Y. y Palm, M.E. (2006) Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true fungi? *Outlooks on Pest Management*, **17** (5), pp. 217 – 219.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Petstka, J.J. (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **48**, pp. 1-34.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N., Jabbar, A. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports*, **27** (2), pp. 238-254.
- Schiewe, H-J. y Zeeck, A. (1999) Cineromycins, γ -butyrolactones and ansamycins by analysis of the secondary metabolite pattern created by a single strain of streptomyces. *Journal of Antibiotics*, **52** (7), pp. 635-642.
- Schoch, C.L., Sung, G., Giráldez, F.L., Townsend, J.P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P.B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrieu, R.M., Trippe, K., Ciufetti, L.M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B.P., Bonito, G., Groenewald, J.Z., Arzanlou, M., De Hoog, G.S., Crous, P.W., Hewitt, D., Pfister, D.H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M.J., Aptroot, A., Suh, S., Blackwell, M., Hillis, D.M., Griffith, G.W., Castlebury, L.A., Rossmann, A.Y., Lumbsch, H.T., Lücking, R., Budel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D.M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmann-kohlmeyer, B., Mostert, L., O'donnell, K., Sipman, H., Rogers, J.D., Shoemaker, R.A., Sugiyama, J., Summerbell, R.C., Untereiner, W., Johnston, P.R., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P.S., Crittenden, P.D., Cole, M.S., Hansen, K., Trappe, J.M., Yahr, R., Lutzoni, F., Spatafora, J.W. (2009) The Ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin

- and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, **58** (2), pp. 224-239.
- Schröder, F.C., Farndon, J.R., Attygalle, A.B., Smedley, S.R., Eisner, T., Meinwald, J. (1998) Combinatorial chemistry in insects: A library of defensive macrocyclic polyamines. *Science*, **281**, pp. 428-431.
- Sheridan, C. (2006) Antibiotics au naturel. *Nature Biotechnology*, **24**, pp. 1494-1496.
- Shlaes, D.M. (2010) The Perfect Storm. En: *Antibiotics: The perfect storm*. Springer, 1-7.
- Shlaes, D.M. y Spellberg, B. (2012) Overcoming the challenges to developing new antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*, **12** (5), pp. 522-526.
- Shlaes, D.M., Sahm, D., Opiela, C., Spellberg, B. (2013) The FDA reboot of antibiotic development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57** (10), pp. 4605 - 4607.
- Shu, C.H. (2007) Fungal Fermentation for Medicinal Products. En: Yang, S.T. (Ed.), *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable*. First Edition, Elsevier's Science e Technology publishing, United States, 685 p.
- Silva, M.R., Campos, A.C.E., Bohm, F.Z. (2013) Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, **8**, pp. 46-58.
- Sinclair, J.B. y Backman, P.A. (Eds.) (1989) Compendium of Soybean Diseases, Third Edition. The American Phytopathological Society, Saint Paul, USA, 134p.
- Singh, S.B. y Barret, J.F. (2006) Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, **71**, pp. 1006-1015.
- Singh, S.B. (2014) Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, **24**, pp. 3683-3689.

- Singh, U.B., Malviya, D., Wasiullah, Singh, S., Pradhan, J.K., Singh, B.P., Roy, M., Imram, M., Pathak, N., Baisyal, B.M., Rai, J.P., Sarma, B.K., Singh, R.K., Sharma, P.K., Kaur, S.P., Manna, M.C., Sharma, S.K., Sharma, A.K. (2016) Bio-protective microbial agents from rhizosphere ecosystems trigger plant defense responses provide protection against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Microbiological Research*, **192**, pp. 300-312.
- Sittenfeld, A., Tamayo, G., Nielsen, V., Jiménez, A., Hurtado, P., Chinchilla, M., Guerrero, O., Mora, M.A., Rojas, M., Blanco, R., Alvarado, E., Gutiérrez, J.M., Janzen, D.H. (1999) Costa Rican International Cooperative Biodiversity Group: Using insects and other arthropods in biodiversity prospecting. *Pharmaceutical Biology*, **37**, pp. 55-68.
- Smith, W.L. y Edlind, T.D. (2002) Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** (11), pp. 3532–3539.
- Stajich, J.E., Berbee, M.L., Blackwell, M., Hibbett, D.S., James, T.Y., Spatafora, J.W., Taylor, J.W. (2009) The Fungi. *Current Biology*, **19** (18), pp. 840-845.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Díez, M.T., García, J.B., del Val, A.G., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Peláez, F., Vicente, M.F., (2000). Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antoine Van Leeuwenhoek*, **78** (2), pp. 129–139.
- Tanaka, N., Yamaguchi, H., Umezawa, H. (1966) Mechanism of kasugamycin action on polypeptide synthesis. *The Journal of Biochemistry*, **60**, pp. 429-434.
- Taylor, P.W. (2013) Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **42**, pp. 195-201.
- Thwaites, J., Farrell, R., Duncan, S., Reay, S., Blanchette, R., Hadar, E., Hadar, Y., Harrington, T., Mcnew, D. (2005) Survey of potential sapstain fungi on

- Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, **43**, pp. 653-663.
- Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Otake, N., (1965) A new antibiotic, kasugamycin. *The Journal of antibiotics Series A*, **18**, pp. 101-103.
- Vallone, S.D. y Giorda, L.M. (Eds.) (1997) Enfermedades de la soja en Argentina. INTA Centro Regional Córdoba. 72p.
- Vidaver, A.K. (2002) Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, **34** (Suppl 3): S107-S110.
- Vidaver, A.K. y Lambrecht, P.A. (2004) Bacteria as plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01.
- Vincelli, P. (2002) QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. *Advances in Plant Pathology*, 1-8.
- Vrba, J., Trtkova, K., Ulrichova, K. (2011) HDAC inhibitors sodium butyrate and sodium valproate do not affect human ncor1 and ncor2 gene expression in HL-60 cells. *Biomedical Papers*, **155** (3), pp. 259–262.
- Walsh, C. T. y Fischbach, M. A. (2010) Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **132** (8), pp. 2469–2493.
- Wang, F-Z., Wei, H-J., Zhu, T-J., Li, D-H., Lin, Z-J., Gu, Q-Q. (2011) Three new cytochalasins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans* KLA03 by supplementing the cultures with l- and d-tryptophan. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, pp. 887-894.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Archives of microbiology*, **176** (5), pp. 386-390.
- Webster, J. y Weber, R.W.S. (2007) Introduction to Fungi. Third Edition. Cambridge Univ. Press. Cambridge, United Kingdom, 841p.
- Winter, J.M., Behnken, S., Hertweck, C. (2011) Genomics-inspired discovery of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, **15** (1), pp. 22-31.

- Wong, W.R., Oliver, A.G., Linington, R.G. (2012) Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. *Chemical Biology*, **19**, pp. 1483-1489.
- Wright, G.D. (2014) Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, **60**, pp. 147-154.
- Zhanel, G.G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A., Vercaigne, L., Embil, J., Gin, A., Karlowsky, J.A., Hoban, D.J. (2004) The glycyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, **64** (1), pp. 63-88.
- Zhu, F., Ma, X.H., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z. (2012) Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. *PLoS One*, **7**, e39782.
- Zutz, C., Gacek, A., Sulyok, M., Wagner, M., Strauss, J., Rychli, K. (2013) Small chemical chromatin effectors alter secondary metabolite production in *Aspergillus clavatus*. *Toxins*, **5** (10), pp. 1723–1741.
- Zjawiony, J.K. (2004) Biologically active compounds from *Aphylophorales* (Polypore) fungi. *Journal of Natural Products*, **67**, pp. 300.

CAPÍTULO 2
HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y ESTRATEGIA

2.1. Hipótesis de este trabajo.

El aumento de la resistencia microbiana a los antibióticos en uso, el peligro de la expansión de cepas MDR (Multi Drug Resistant) y la aparición de cepas TDR (Total Drug Resistant) convierten a la búsqueda de nuevos antimicrobianos, en una tarea urgente (Butler, 2013). Los productos naturales han sido la principal fuente de medicamentos a lo largo de toda la historia humana. A lo largo de ella su importancia cambió de ser la única fuente de medicamentos disponible, a mantener una posición hegemónica frente a los productos puramente sintéticos hasta el siglo XX, para finalmente tener una participación menor en el desarrollo de nuevos fármacos, llegando incluso a cuestionarse su utilidad (Cragg, 2013).

Sin embargo, esta visión es engañosa y los productos naturales continúan siendo una fuente importante de nuevos productos activos y estructuras base para el desarrollo de nuevos medicamentos y productos de uso agrícola, particularmente en el campo de los antimicrobianos. Como reportan Butler y colaboradores en la edición de noviembre de 2014 de Natural Product Reports (Butler, 2014) existen a esta fecha más de 100 productos naturales y derivados en estudios clínicos avanzados, siendo un cuarto de ellos antimicrobianos. De hecho, en febrero de 2014 la FDA autorizó el uso del antibiótico oritavancina y a mediados del mismo año la dalbavancina, oligopéptidos semisintéticos derivados de *Amycolatopsis orientalis*, para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistentes a β -lactámicos, carbapenems y vancomicina siendo los primeros productos desarrollados dentro de la iniciativa GAIN (<http://www.orbactiv.com>, <https://www.dalvance.com>). Recientemente, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por su sigla en inglés) registró el nuevo

principio activo laminarina, polisacárido presente en todas las plantas comestibles (<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/biopesticide-active-ingredients>). La laminarina controla la botritis y el mildiu, dos de las principales enfermedades fúngicas, que generalmente requieren un tratamiento intensivo y repetido, sin dejar residuos. Además, es particularmente adecuado para cultivos en los que no se pueden usar fitosanitarios, tales como cultivos menores y orgánicos (EGTOP/EC, 2011; van Bruggen, 2016).

En este desafío, los productos naturales, particularmente los provenientes de microorganismos, pueden jugar un rol preponderante. Un largo camino ha sido recorrido a partir de la introducción de la blasticidina S, el primer fungicida microbiano disponible para la protección de cultivos. Numerosos fungicidas desarrollados a través de la modificación química de metabolitos microbianos han sido introducidos en el mercado en las últimas décadas, como ser las estrobilurinas, el fludioxonil y el fenpiclonil (Kim, 2007). Y, un análisis reciente de productos naturales bioactivos y medicamentos disponibles en la “pipeline” preclínica y clínica sugieren que entre el 67 a 80% de los fármacos terapéuticamente útiles han derivado de las familias de biota productoras de drogas en uso (Beattie, 2016; Zhu, 2011).

Por lo tanto, las hipótesis que se plantean en este trabajo son las siguientes:

- *Los basidiomicetes sintetizan moléculas novedosas y activas.*
- *Los microorganismos presentan un sinnúmero de vías crípticas y pueden sintetizar nuevas moléculas bioactivas. Estas vías crípticas pueden ser alteradas de forma de aumentar el tipo y/o la concentración de los compuestos con actividad antimicrobiana formados.*
- *La búsqueda dirigida usando el enfoque bioguiado es un método adecuado para encontrar dichas moléculas activas.*
- *Los compuestos formados pueden ser de interés en el tratamiento de infecciones humanas y/o de plantas.*

2.2. Estrategia de este trabajo.

La estrategia de este trabajo consistió en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana presentes en especies nativas de Basidiomycota. También se avanzó en el estudio de los parámetros que influyen la expresión de los metabolitos activos y la optimización de su producción. Los objetivos generales y específicos propuestos son los siguientes.

Objetivos generales

- Estudiar los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por cepas nativas de Basidiomycota.

Objetivos específicos

- Ratificar la aplicabilidad del enfoque bioguiado como herramienta para la búsqueda de moléculas con actividad biológica.
- Identificar y caracterizar compuestos con actividad antimicrobiana producidos por cepas fúngicas nativas.
- Optimizar las condiciones de cultivo para la obtención de los metabolitos secundarios bioactivos de interés.
- Evaluar la actividad de los compuestos aislados frente a microorganismos de referencia de patógenos humanos y fitopatógenos, así como cepas clínicas y patovares procedentes de aislamientos locales.

2.3. Referencias bibliográficas.

- Beattie, K.D., Ellwood, N., Kumar, R., Yang, X., Healy, P.C., Choomuenwai, V., Quinn, R.J., Elliott, A.G., Huang, J.X., Chitty, J.L., Fraser, J.A., Cooper, M.A., Davis, R.A. (2016) Antibacterial and antifungal screening of natural products sourced from Australian fungi and characterization of pestalactams D-F. *Phytochemistry*, **124**, pp. 79-85.
- Butler, M.S., Blaskovich, M.A., Cooper, M.A. (2013) Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *The Journal of Antibiotics*, **66**, pp. 571-591.
- Butler, M.S., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A. (2014) Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural Products Reports*, **31**, pp. 1612-1661.
- Cragg, G.M. y Newman, D.J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830** (6), pp. 3670-3695.
- EGTOP/EC, Expert Group for Technical Advice on Organic Production (2011) Final report on plant protection products EGTOP/3/2011, Directorate-General for Agriculture and Rural Development, European Commission, Brussels, Belgium.
- Kim, B.S. y Hwang, B.K. (2007) Microbial Fungicides in the Control of Plant Diseases. *Journal of Phytopathology*, **155**, pp. 641-653.
- van Bruggen, A.H.C. y Finckh, M.R. (2016) Plant Diseases and Management Approaches in Organic Farming Systems. *Annual Review of Phytopathology*, **54**, pp. 1-30.
- Zhu, F., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z., Ma, X., Jia, J., Tan, Y., Cui, C., Lin, J., Tan, C., Jiang, Y., Chen, Y. (2011) Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, pp. 12943-12948.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Screening químico y microbiológico de cultivos fúngicos de basidiomicetes.

Screening químico

Cincuenta y tres extractos fueron preparados a partir de cultivos de 19 hongos basidiomicetes y posteriormente sometidos a ensayos químicos y biológicos. Los grupos químicos estudiados fueron: triterpenos-esteroides, terpenos, alcaloides, polifenoles y cumarinas. Casi todos los extractos mostraron resultados positivos para esteroides y/o triterpenos, otros terpenos, polifenoles y cumarinas. Los alcaloides están presentes en los extractos de caldo extracelular de los hongos *Phlebiopsis gigantea* CCMG 223, *Stereum sanguinolentum* CCMG 236, *Trametes hirsuta* CCMG 356, *Ganoderma resinaceum* CCMG 7187 y *Trametes hirsuta* CCMG CMI2.

Screening microbiológico

Los extractos fueron sometidos a ensayos microbiológicos frente a los patógenos de humanos *Staphylococcus aureus* (cepas meticilino resistentes ATCC 43300 y ATCC 700699 y cepa meticilino sensible ATCC 6538p) y *Pseudomonas aeruginosa* CCMG 312 y los fitopatógenos *Xanthomonas vesicatoria* CCMG 28m, *Penicillium expansum* CCMG 14s, *Alternaria alternata* CBS 54027 y *Aspergillus oryzae* ATCC 10124.

En este estudio, tres extractos de caldo extracelular correspondientes a los hongos *Laetiporus sulphureus* CCMG 247, *Bjerkandera adusta* CCMG 3146 y *G. resinaceum* presentaron actividad frente al patógeno del tomate *X. vesicatoria*. Tan solo dos extractos de micelio presentaron actividad frente al mencionado patógeno (*L. sulphureus* y *Dictyopanus pusillus* CCMG 333).

Respecto a los hongos ensayados en esta oportunidad, los extractos de caldo extracelular acidificado y micelio del hongo *G. resinaceum* y el extracto de micelio del hongo *L. sulphureus* presentaron actividad frente al patógeno *A. oryzae*. El extracto de caldo extracelular del hongo *G. resinaceum* fue el único que presentó actividad frente al patógeno *P. expansum*.

Diecinueve extractos tuvieron actividad contra alguna cepa de *S. aureus* (Tabla 3.1.).

Hongo	Extracto	<i>Staphylococcus aureus</i>		
		ATCC 6538p	ATCC 43300	ATCC 700699
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCMG 210	2	-	-	+
<i>Inocutis jamaicensis</i> CCMG 219	1	+	-	-
<i>Phlebiopsis gigantea</i> CCMG 223	1	+	+	-
	2	-	-	+
<i>Stereum sanguinolentum</i> CCMG 236	1	+	-	-
	2	-	+	+
<i>Laetiporus sulphureus</i> CCMG 247	1	+	-	-
Basidiomycota CCMG 301	2	+	-	-
<i>Peniophora</i> sp. CCMG 303	1	+	-	-
	2	+	-	+
<i>Trametes hirsuta</i> CCMG 356	1	+	-	-
<i>Phlebiopsis gigantea</i> CCMG 362	1	+	ND	ND
<i>Bjerkandera adusta</i> CCMG 3146	1	+	-	-
<i>Inocutis jamaicensis</i> CCMG 5091	2	+	-	-
<i>Ganoderma resinaceum</i> CCMG 7187	1	+	-	-
<i>Trametes hirsuta</i> CCMG CMI2	1	+	-	-
<i>Punctularia atropurpurens</i> CCMG Pu	1	+	-	-
	2	+	-	-
<i>Gymnopilus junonius</i> CCMG SA1	2	+	-	-

Tabla 3.1. Cepas con actividad frente a *S. aureus* (Extracto 1: Caldo extracelular, Extracto 2: Caldo extracelular acidificado) ND: No determinado (falta de extracto).

Respecto al patógeno *P. aeruginosa*, solo los extractos de caldo extracelular de los hongos *Peniophora* CCMG 303, *Trametes hirsuta* CCMG 356 y *B. adusta* presentaron actividad leve.

Se observaron serias dificultades a la hora de determinar la actividad antimicrobiana frente a los microorganismos fitopatógenos *X. vesicatoria* y *A. oryzae* dada la inhibición del crecimiento microbiano por parte de los soportes. Se evaluaron dos tratamientos del soporte usualmente utilizado (sílica gel lavada con metanol o acetona) y tres soportes diferentes (alúmina, celulosa y poliamida) sin observarse ninguna mejoría. Para estudios posteriores se realizó la puesta a punto de una técnica para determinar la actividad mediante discos de papel como reservorio y utilizando siembra en superficie del microorganismo en estudio.

3.1.1 Puesta a punto de ensayo microbiológico para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos.

En una primera instancia se evaluó la posibilidad de utilizar la bioautografía como método para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana frente a los hongos *Alternaria alternata* CBS 54027, *Botrytis cinerea* CCMG 14g, *Fusarium graminearum* NRRL 31084 y *Rhizopus stolonifer* (+) ATCC 6227b considerando que estos hongos no fueron evaluados en la etapa de screening y se desconocía su comportamiento. Utilizando sílica gel lavada con metanol como soporte se observó ausencia de crecimiento microbiano para *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. graminearum* mientras que el crecimiento de *R. stolonifer* (+) no se ve afectado por el soporte. Considerando que la bioautografía es efectiva únicamente para uno de los microorganismos fitopatógenos blanco se observó la necesidad de poner a punto un ensayo más robusto como la determinación mediante discos de papel.

Se evaluaron dos técnicas de siembra, demostrando la siembra en superficie ser la adecuada para la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante discos. El crecimiento uniforme observado para esta técnica contrasta con la ausencia de crecimiento que presentó la siembra incorporada.

Respecto a los controles positivos de inhibición la gentamicina $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue el único antibiótico que inhibió tanto a *Xanthomonas vesicatoria* CCMG 10 como a *X. vesicatoria* CCMG 28m. Mientras que la anfotericina B $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibió únicamente a *B. cinerea* y propiconazol $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibió a *A. alternata*, *B. cinerea* y *R. stolonifer* (+) el propiconazol $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibió a todos los hongos evaluados. Se decidió utilizar gentamicina $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ y propiconazol $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ como control positivo para bacterias y hongos respectivamente. Se evaluaron dos tamaños de diámetro de disco, 5 mm y 12,7 mm siendo necesario 20 μL y 100 μL de solución respectivamente para embeberlos. Considerando el escaso rendimiento de los extractos se decidió utilizar los discos de diámetro menor para disminuir la cantidad de extracto utilizada por análisis.

Los solventes usualmente utilizados para la preparación de extractos presentaron una cierta inhibición del crecimiento de los microorganismos fitopatógenos blanco. Es por ello que se evaluó el tiempo necesario para eliminar los solventes utilizados por evaporación (corriente de aire). El crecimiento de *P. expansum* se vio inhibido al utilizar discos secados durante 2 horas no observándose dicho inconveniente para los otros microorganismos evaluados. Los ensayos fueron llevados a cabo con discos secados durante 24 horas para *P. expansum* y con discos secados durante 2 horas para el resto de los microorganismos.

3.1.2. Screening microbiológico ampliado y derreplicación química.

A partir de los resultados obtenidos en el screening microbiológico primario se seleccionaron aquellos hongos que presentaron actividad frente a fitopatógenos para realizar un screening microbiológico frente a un panel ampliado de especies fitopatógenas. Los hongos seleccionados fueron *B. adusta*, *D. pusillus*, *G. resinaceum* y *L. sulphureus*.

En una primera etapa los extractos fueron ensayados mediante la técnica de discos para obtener el espectro antimicrobiano. Posteriormente, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para aquellos extractos que

presentaron resultados positivos en la determinación del espectro antimicrobiano. Los resultados se presentan en las tablas a continuación.

Hongo	Extracto	Fitopatógenos							
		<i>X. vesicatoria</i> CCMG 10	<i>X. vesicatoria</i> CCMG 28m	<i>B. cinerea</i>	<i>A. alternata</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>P. expansum</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>R. stolonifer</i> (+)
<i>G. resinaceum</i>	1	+	-	-	-	-	ND	-	-
	2	+	-	ND	-	-	-	ND	-
	3	+	+	-	-	-	-	+	-

Tabla 3.2. Espectro antimicrobiano de extractos del hongo *G. resinaceum* (Extracto 1: Caldo extracelular, Extracto 2: Caldo extracelular acidificado, Extracto 3: Micelio) ND: No determinado (falta de extracto).



Figura 3.1. Ensayo de difusión de extractos del hongo *G. resinaceum* frente a *F. graminearum*.

Hongo	Extracto	Fitopatógenos							
		X. <i>vesicatoria</i> CCMG 10	X. <i>vesicatoria</i> CCMG 28m	B. <i>cinerea</i>	A. <i>alternata</i>	F. <i>graminearum</i>	P. <i>expansum</i>	A. <i>oryzae</i>	R. <i>stolonifer</i> (+)
<i>G. resinaceum</i>	1	313	-	-	-	-	ND	-	-
	2	313	-	ND	-	-	-	ND	-
	3	313	313	-	-	-	-	78	-

Tabla 3.3. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extractos del hongo *G. resinaceum* (Extracto 1: Caldo extracelular, Extracto 2: Caldo extracelular acidificado, Extracto 3: Micelio) ND: No determinado (falta de extracto).

Hongo	Extracto	Fitopatógenos							
		X. <i>vesicatoria</i> CCMG 10	X. <i>vesicatoria</i> CCMG 28m	B. <i>cinerea</i>	A. <i>alternata</i>	F. <i>graminearum</i>	P. <i>expansum</i>	A. <i>oryzae</i>	R. <i>stolonifer</i> (+)
<i>L. sulphureus</i>	1	-	+	-	-	-	-	-	+
	2	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	+	-

Tabla 3.4. Espectro antimicrobiano de extractos del hongo *L. sulphureus* (Extracto 1: Caldo extracelular, Extracto 2: Caldo extracelular acidificado, Extracto 3: Micelio).

Hongo	Extracto	Fitopatógenos							
		X. <i>vesicatoria</i> CCMG 10	X. <i>vesicatoria</i> CCMG 28m	B. <i>cinerea</i>	A. <i>alternata</i>	F. <i>graminearum</i>	P. <i>expansum</i>	A. <i>oryzae</i>	R. <i>stolonifer</i> (+)
<i>L. sulphureus</i>	1	-	156	-	-	-	-	-	313
	2	313	19,5	-	-	-	-	-	-
	3	313	313	-	-	-	-	156	-

Tabla 3.5. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extractos del hongo *L. sulphureus* (Extracto 1: Caldo extracelular, Extracto 2: Caldo extracelular acidificado, Extracto 3: Micelio).

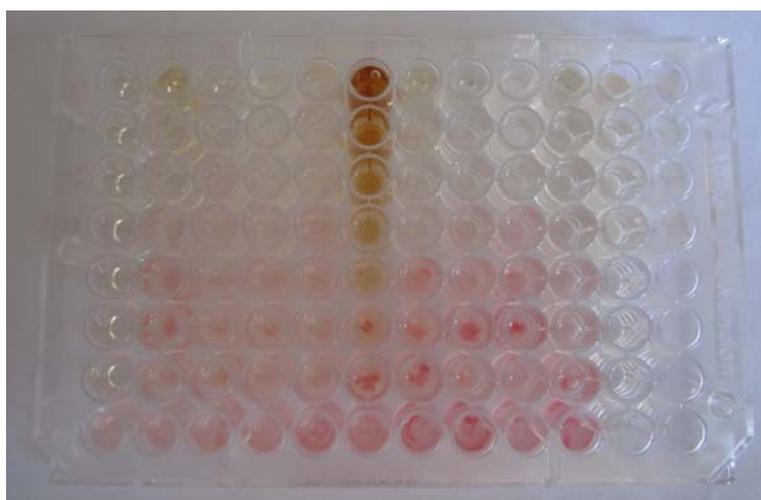


Figura 3.2. Concentración inhibitoria mínima de extractos del hongo *L. sulphureus* frente a *X. vesicatoria* CCMG 28m.

Los extractos de *B. adusta* y *D. pusillus* no presentaron resultados positivos al ser evaluados con los fitopatógenos blanco del panel. La ausencia de resultados positivos pudo deberse a la menor sensibilidad de la técnica microbiológica utilizada en esta oportunidad frente a la técnica bioautográfica utilizada anteriormente.

Derreplicación química

Todos los extractos presentaron resultados positivos para triterpenos y esteroides y terpenos. Los polifenoles y las cumarinas se encuentran presentes en los extractos de caldo extracelular y micelio de *G. resinaceum* y *L. sulphureus* mientras que para *B. adusta* se encuentran presentes en los extractos de caldo extracelular y caldo extracelular acidificado. Únicamente el extracto de caldo extracelular de *G. resinaceum* presentó resultados positivos para alcaloides.

De los resultados obtenidos resultó muy interesante la actividad antimicrobiana producida por *L. sulphureus* y *G. resinaceum* frente a *X. vesicatoria*, patógeno de tomate y *S. sanguinolentum* y *G. junonius* CCMG SA1 frente a cepas sensibles y meticilino resistentes de *S. aureus*.

Esto resulta muy promisorio para un posterior estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC).

3.2. Cultivo a mayor escala y aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de cultivos fúngicos de basidiomicetes.

Considerando los promisorios resultados microbiológicos obtenidos tanto a nivel de patógenos de humanos como microorganismos fitopatógenos en el screening realizado de especies nativas de basidiomicetes se seleccionaron dos especies para avanzar en la búsqueda de compuestos antimicrobianos. Se seleccionaron los hongos *L. sulphureus* y *G. resinaceum* ya que los extractos obtenidos a partir de dichos hongos presentaron una especialmente importante actividad microbiológica frente a microorganismos fitopatógenos. En una primera etapa se aumentó la escala mediante la preparación de cultivos de mayor volumen respecto a los cultivos utilizados en el screening (1000 mL frente 200 mL de caldo extracto de malta). Se observaron diferencias

significativas en los perfiles químicos de los extractos pudiendo esto deberse a diferencias en la disponibilidad de oxígeno del cultivo.



Figura 3.3. Primera etapa de escalado del hongo *L. sulphureus*.

Posteriormente, se aumentó la escala mediante repeticiones de los cultivos utilizados en el screening (200 mL de caldo de extracto de malta). Para el hongo *G. resinaceum* se realizó un ciclo de fermentación de once cultivos y posteriormente se evaluó el perfil químico de los extractos obtenidos. Dado que los componentes principales presentes en los extractos correspondían al grupo de terpenos y esteroides se decidió no continuar trabajando con dicho hongo. Los terpenos y los esteroides se encuentran ampliamente reportados para dicho género, viéndose así francamente disminuída la posibilidad de aislar metabolitos secundarios biológicamente activos de estructura novedosa (Baby, 2015; Hsu, 2014; Paterson, 2006).

Para el hongo *L. sulphureus*, dos ciclos de fermentación de once cultivos fueron necesarios para obtener cantidades de extracto suficientes (54 mg) como para avanzar en el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana. Mediante una extracción en fase sólida y una cromatografía en capa fina preparativa fue posible aislar el compuesto mayoritario del extracto de caldo extracelular acidificado. Considerando que el comportamiento del compuesto correspondería a un terpenoide y la ínfima cantidad que fue posible aislar se realizó un análisis por GC-MS. La comparación del espectro de masas obtenido con la biblioteca disponible arrojó

un bajo porcentaje de similitud por lo que no pudieron obtenerse datos respecto a la estructura del compuesto.

Dada la necesidad de obtener cantidades de extracto suficientes para avanzar en el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, se comenzó con el estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para dicho hongo.

3.3. Estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para *L. sulphureus*.

En una primera etapa los factores a evaluar fueron incluidos en un diseño Plackett-Burman que permite evaluar un gran número de factores y seleccionar cuales son aquellos que influyen en la respuesta.

Los parámetros que se variaron fueron presencia/ausencia de fuentes de carbono (glucosa) y nitrógeno (tartrato de amonio) adicional, con agitación/estático, temperatura, medio de cultivo, pH y tiempo de incubación.

En base a estos resultados preliminares se determinaron las condiciones de los siguientes diseños (factorial fraccionado con menor número de factores).

La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos en todas las condiciones se evaluó mediante determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28m y *S. aureus* ATCC 6538p.

Los resultados obtenidos de CIM para cada extracto se ingresaron al programa informático Design Expert versión 7.0.0 junto con las condiciones de cultivo correspondientes, para evaluar cuáles condiciones resultaban ser variables significativas del modelo.

La siguiente tabla muestra los resultados de las CIMs obtenidas en las distintas condiciones del primer diseño (Plackett-Burman) para los tres extractos fúngicos:

Experimento	Glucosa (gL ⁻¹)	Agitación	Temperatura (°C)	Tartrato de amonio (gL ⁻¹)	Medio	pH	Tiempo (d)	CIM ₁	CIM ₂	CIM ₃
1	0	1	28	0	YES	7	40	625	313	313
2	0	0	20	0	CM	5	20	313	313	313
3	0	0	28	0	YES	7	20	ND	ND	ND
4	20	0	20	0	YES	5	40	625	313	156
5	0	0	20	2	CM	7	40	ND	ND	ND
6	20	1	28	0	CM	5	40	39	1250	313
7	20	1	20	0	CM	7	20	625	313	625
8	20	0	28	2	YES	5	20	625	625	313
9	0	1	20	2	YES	5	40	625	625	156
10	0	1	28	2	CM	5	20	625	625	78
11	20	1	20	2	YES	7	20	ND	ND	ND
12	20	0	28	2	CM	7	40	625	625	313

Medio de cultivo: Caldo extracto de malta (CM).

Extracto de levadura con suplemento (YES).

CIM₁, CIM₂ y CIM₃ son las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (µg mL⁻¹) de los extractos de caldo extracelular, caldo extracelular acidificado y micelio respectivamente.

ND: No determinado (ausencia de crecimiento).

Tabla 3.6. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del primer diseño (Plackett-Burman) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28m.

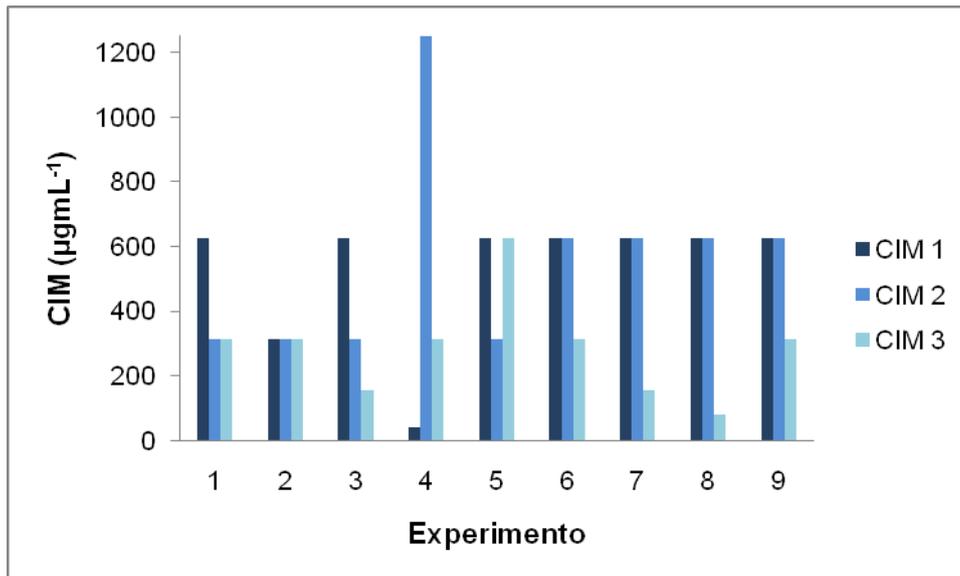


Figura 3.4. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del primer diseño (Plackett-Burman) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28m.

Si bien el modelo no fue significativo y algunas condiciones no pudieron evaluarse, se observaron algunas tendencias en el diseño Plackett-Burman, por ejemplo, la adición de glucosa no fue un factor significativo en ninguno de los extractos para la respuesta (CIM).

Considerando los resultados preliminares del diseño Plackett-Burman se realizó un segundo diseño, factorial fraccionado. Teniendo en cuenta las dificultades en la obtención de los extractos de micelio las condiciones del siguiente diseño se evaluaron solo para los extractos de caldo extracelular. Los resultados de CIM obtenidos se muestran en la tabla a continuación.

Experimento	Temperatura (°C)	Tartrato de amonio (g ^L ⁻¹)	Medio	pH	Tiempo (d)	CIM ₁	CIM ₂
1	20	0	YES	7	20	313	313
2	20	2	YES	5	20	78	78
3	28	0	CM	5	20	313	156
4	20	0	CM	7	40	156	156
5	24	1	YES	6	30	ND	ND
6	20	2	CM	5	40	313	156
7	24	1	YES	6	30	ND	ND
8	28	2	YES	7	40	ND	ND
9	24	1	CM	6	30	ND	ND
10	28	2	CM	7	20	313	625
11	28	0	YES	5	40	1250	78
12	24	1	CM	6	30	156	156
13	24	1	YES	6	30	313	156
14	24	1	CM	6	30	156	78

Fuente de Carbono: No.

Agitación: No.

CIM₁ y CIM₂ son las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (µg^{mL}⁻¹) de los extractos de caldo extracelular y caldo extracelular acidificado respectivamente.

ND: No determinado (cultivos contaminados).

Tabla 3.7. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del segundo diseño (Factorial fraccionado) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28m.

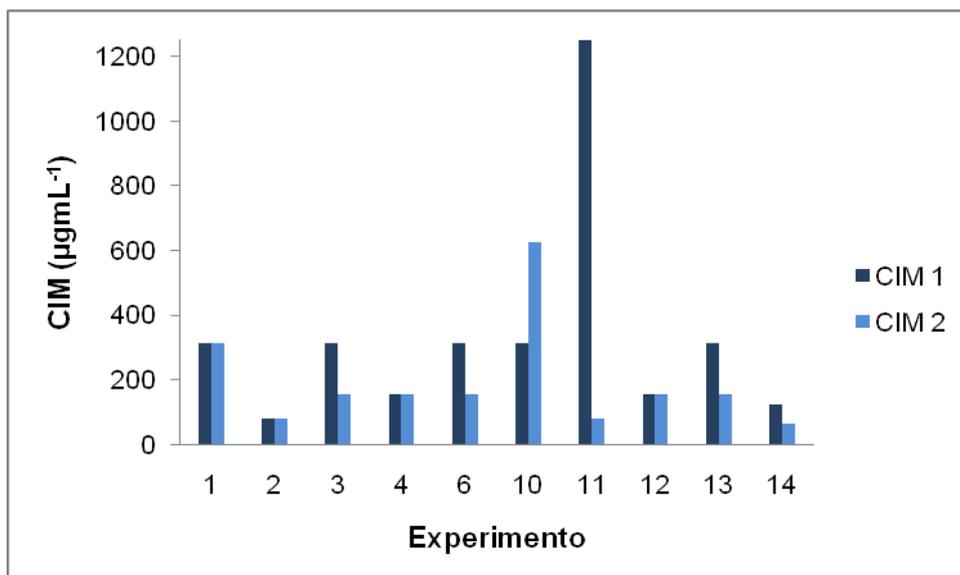


Figura 3.5. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del segundo diseño (Factorial fraccionado) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28m.

Nuevamente no se pudo determinar CIM de cuatro cultivos por problemas experimentales; se observó que no había diferencias significativas utilizando CM o YES, ni con la adición de tartrato de amonio por lo cual se optó por realizar un nuevo diseño factorial fraccionado con menor número de factores y con mayor número de repeticiones. Los cultivos se realizaron en medio CM (menos costoso que YES), a dos temperaturas (las disponibles en el laboratorio 20 °C y 28 °C), variando el pH y la agitación.

Asimismo, se realizó el ensayo para determinar la CIM de los extractos del tercer diseño frente a *S. aureus* ATCC 6538p ya que según ensayos preliminares el crecimiento de la bacteria había sido inhibido por extractos procedentes de *L. sulphureus*. Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Experimento	Agitación	Temperatura (°C)	pH	CIM ₁	CIM ₂	CIM ₃	CIM ₄
1	1	28	7	156	39	156	313
2	0	20	6	39	ND	156	ND
3	1	20	7	78	19	156	313
4	0	28	6	39	156	156	625
5	0	28	5	39	39	156	313
6	1	20	6	78	78	156	313
7	0	20	6	78	78	78	625
8	0	28	7	78	156	78	625
9	0	20	7	313	156	313	625
10	0	20	6	156	78	78	313
11	1	28	5	313	39	78	313
12	1	20	5	39	78	39	313
13	1	28	6	313	19	313	1250
14	0	28	6	156	156	156	625
15	1	20	6	313	78	156	313
16	1	20	6	313	78	156	313
17	0	20	5	39	78	78	313
18	1	28	6	313	156	39	313
19	0	28	6	156	156	78	625
20	1	28	6	313	313	313	313

Fuente de Carbono: No.

Fuente de Nitrógeno: No.

Medio de cultivo: CM.

Tiempo de incubación: 20 días.

CIM₁ y CIM₂ son las Concentraciones Inhibitorias Mínimas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de los extractos de caldo extracelular y caldo extracelular acidificado frente a *X. vesicatoria* CCMG 28.

CIM₃ y CIM₄ son las Concentraciones Inhibitorias Mínimas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de los extractos de caldo extracelular y caldo extracelular acidificado frente a *S. aureus* ATCC 6538p.

ND: No determinado (cantidad insuficiente de extracto).

Tabla 3.8. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del tercer diseño (Factorial fraccionado) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28 y *S. aureus* ATCC 6538p.

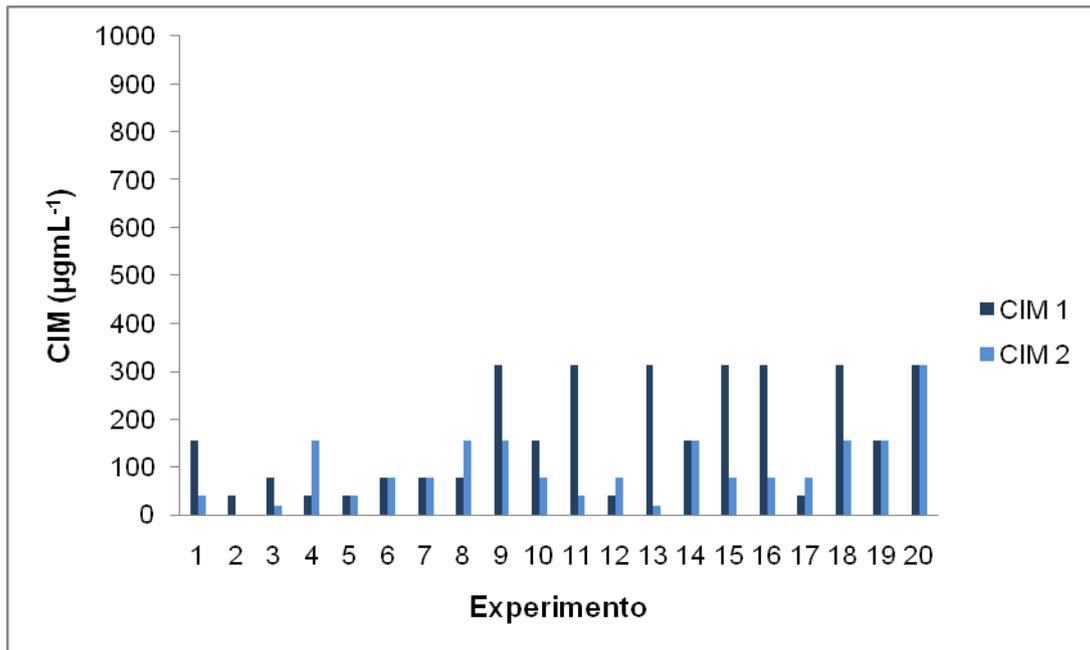


Figura 3.6. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del tercer diseño (Factorial fraccionado) frente a *X. vesicatoria* CCMG 28.

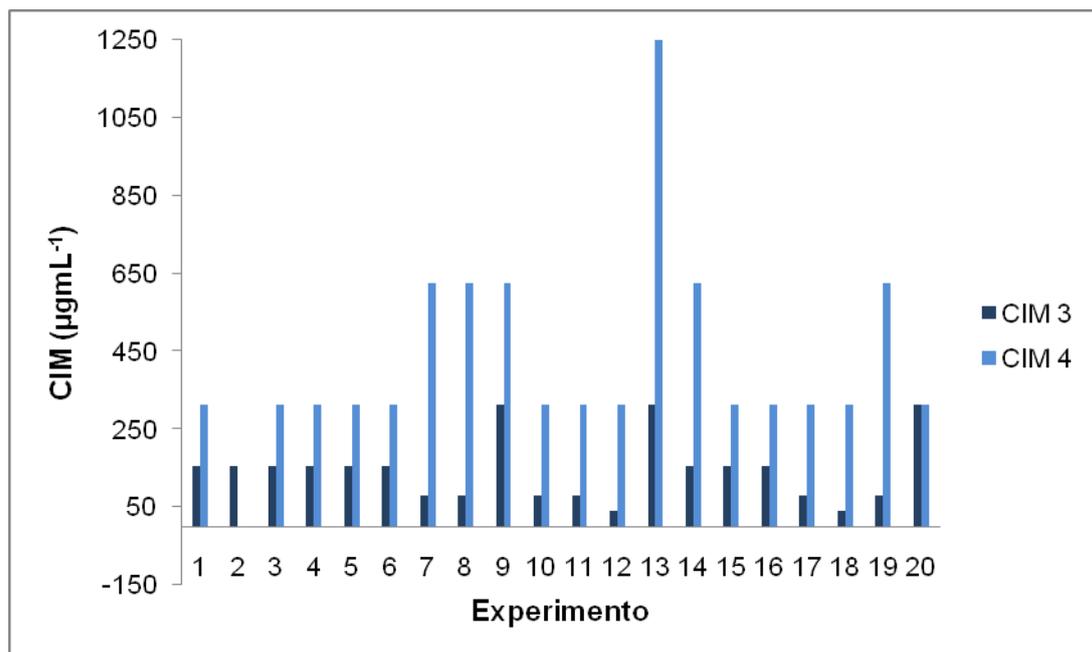


Figura 3.7. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del tercer diseño (Factorial fraccionado) frente a *S. aureus* ATCC 6538p.

Se determinaron las CIMs de extractos provenientes de diferentes condiciones de cultivo, demostrando potencial antimicrobiano contra ambos microorganismos.

Luego de realizar el análisis de los diseños se observa que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en la respuesta con ninguno de los factores evaluados frente a *X. vesicatoria* y *S. aureus*, para ninguno de los dos extractos. A pesar de lo anteriormente expuesto, los resultados muestran algunas tendencias, por ejemplo, en la mayoría de los casos CIMs provenientes de cultivos a pH 5 son menores que a pH 6 o pH 7, y diez valores de CIM obtenidos a pH 5 están por debajo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Además, extractos de cultivos a pH 5 muestran mayor prevalencia de valores de CIM debajo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuando provienen de cultivos a 20°C que a 28°C .

De acuerdo a los resultados de los diseños la condición óptima de crecimiento para el hongo *L. sulphureus* es en caldo extracto de malta a 20°C y pH 5, sin agitación durante 20 días.

A pesar de la optimización de las condiciones de cultivo, no se obtuvieron resultados favorables en cuanto a rendimiento de extracto. Se plantea un escenario desfavorable para la obtención de metabolitos antimicrobianos a partir de cultivos fúngicos ya que serían necesarios varios ciclos de fermentación con un número importante de réplicas para obtener una masa crítica de extracto crudo. Se planteó recorrer el camino inverso, aislar en una primera instancia compuestos con actividad antimicrobiana a partir de cuerpos de fructificación de hongos basidiomicetes nativos y posteriormente inducir la producción de los mismos en cultivos fúngicos de dicho hongo. *Gymnopilus junonius*, hongo que crece silvestre en Uruguay, especialmente en plantaciones de *Eucalyptus* spp., y se vende en los mercados de frutas y verduras surgió como la opción más adecuada. La gran disponibilidad de este hongo en el otoño aseguró cantidad suficiente de extracto con el cual continuar trabajando.

3.4. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de *Gymnopilus junonius*.

Los cuerpos de fructificación de *G. junonius* fueron extraídos por maceración con acetona. Una pequeña porción del extracto acetónico fue evaporada a sequedad y sometida a ensayos microbiológicos.

La actividad contra patógenos humanos fue determinada de acuerdo a la técnica de agar overlay frente al grupo de microorganismos denominados ESKAPE (*Enterococcus faecalis* CCMG 632, *S. aureus* (cepas meticilino resistentes ATCC 43300 y ATCC 700699 y cepa meticilino sensible ATCC 6538p), *Klebsiella pneumoniae* CCMG 12716, *Acinetobacter baumannii* CCMG 232, *Pseudomonas aeruginosa* CCMG 312 y *Enterobacter cloacae* CCMG 133). Otras cuatro cepas de *S. aureus*, aislados clínicos de daño tisular, uno sin aumento de la resistencia a los antibióticos en uso (FQ 4) y tres meticilino resistentes (MRSA), con susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina, eritromicina y oxacilina (FQ 380), oxacilina y eritromicina (FQ 341) y oxacilina (FQ 317) se utilizaron en los ensayos.

La actividad contra bacterias y hongos fitopatógenos fue determinada mediante discos frente a las especies fitopatógenas *X. vesicatoria* CCMG 10 y CCMG 28m, *B. cinerea* CCMG 14g, *A. alternata* CBS 54027, *F. graminearum* NRRL 31084, *P. expansum* CCMG 14s, *A. oryzae* ATCC 10124 y *R. stolonifer* (+) ATCC 6227b.

Posteriormente, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para aquellos extractos que presentaron resultados positivos en la determinación del espectro antimicrobiano. Los resultados se presentan en las tablas a continuación.

Hongo	Extracto	Patógenos humanos							
		E. faecalis	S. <i>aureus</i> ATCC 6538p	S. <i>aureus</i> ATCC 43300	S. <i>aureus</i> ATCC 700699	K. <i>pneumoniae</i>	A. <i>baumanii</i>	P. <i>aeruginosa</i>	E. <i>cloacae</i>
<i>G. junonius</i>	Acetona	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 3.9. Espectro antimicrobiano de extracto acetónico del hongo *G. junonius* frente a los microorganismos ESKAPE.

Hongo	Extracto	Patógenos humanos							
		E. faecalis	S. <i>aureus</i> ATCC 6538p	S. <i>aureus</i> ATCC 43300	S. <i>aureus</i> ATCC 700699	K. <i>pneumoniae</i>	A. <i>baumanii</i>	P. <i>aeruginosa</i>	E. <i>cloacae</i>
<i>G. junonius</i>	Acetona	125	125	250	250	>500	250	250	250

Tabla 3.10. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extracto acetónico del hongo *G. junonius* frente a los microorganismos ESKAPE.

Hongo	Extracto	Aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i>			
		FQ 4	FQ 317	FQ 341	FQ 380
<i>G. junonius</i>	Acetona	+	+	+	+

Tabla 3.11. Espectro antimicrobiano de extracto acetónico del hongo *G. junonius* frente a aislamientos clínicos de *S. aureus*.

Hongo	Extracto	Aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i>			
		FQ 4	FQ 317	FQ 341	FQ 380
<i>G. junonius</i>	Acetona	125	250	250	250

Tabla 3.12. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extracto acetónico del hongo *G. junonius* frente a aislamientos clínicos de *S. aureus*.

Hongo	Extracto	Fitopatógenos							
		X. <i>vesicatoria</i> CCMG 10	X. <i>vesicatoria</i> CCMG 28m	B. <i>cinerea</i>	A. <i>alternata</i>	F. <i>graminearum</i>	P. <i>expansum</i>	A. <i>oryzae</i>	R. <i>stolonifer</i> (+)
<i>G. junonius</i>	Acetona	-	+	-	-	+	-	-	+

Tabla 3.13. Espectro antimicrobiano de extracto acetónico del hongo *G. junonius* frente a microorganismos fitopatógenos.



Figura 3.8. Ensayo de difusión de extractos del hongo *G. junonius* frente a *F. graminearum*.

Hongo	Extracto	Fitopatógenos							
		X. <i>vesicatoria</i> CCMG 10	X. <i>vesicatoria</i> CCMG 28m	B. <i>cinerea</i>	A. <i>alternata</i>	F. <i>graminearum</i>	P. <i>expansum</i>	A. <i>oryzae</i>	R. <i>stolonifer</i> (+)
G. <i>junonius</i>	Acetona	-	156	-	-	2500	-	-	625

Tabla 3.14. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extracto acetónico del hongo *G. junonius* frente a microorganismos fitopatógenos.

Los promisorios resultados obtenidos para el extracto acetónico frente a los microorganismos ESKAPE y los aislamientos clínicos de *S. aureus* nos alentaron a continuar con el fraccionamiento y posterior aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de dicho extracto.

Debido a la interesante actividad obtenida para *S. aureus* ATCC 6538p, este se utilizará como microorganismo blanco en las etapas de aislamiento bioguiado de los compuestos bioactivos.

El extracto acetónico remanente fue evaporado y se realizó una partición con AcOEt del extracto acuoso obtenido luego de la evaporación del solvente. Luego de la evaporación de la fase orgánica, el residuo fue sometido a una cromatografía líquida al vacío (VLC) usando elución en gradiente con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ para dar 8 fracciones que fueron analizadas mediante TLC y bioautografía. Las fracciones más activas fueron reunidas y el extracto resultante fue sometido a cromatografía líquida al vacío (VLC) usando elución en gradiente con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ para dar 15 fracciones. Dichas fracciones fueron analizadas mediante TLC y bioautografía. El extracto resultante de las fracciones más activas fue sometido a cromatografía en columna usando elución en gradiente con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ para dar 106 fracciones que fueron analizadas mediante TLC y bioautografía. Según su perfil químico las fracciones fueron reunidas en 6 fracciones presentando las

fracciones 6 a 16 y 17 a 42 un perfil químico y una actividad antimicrobiana destacables.

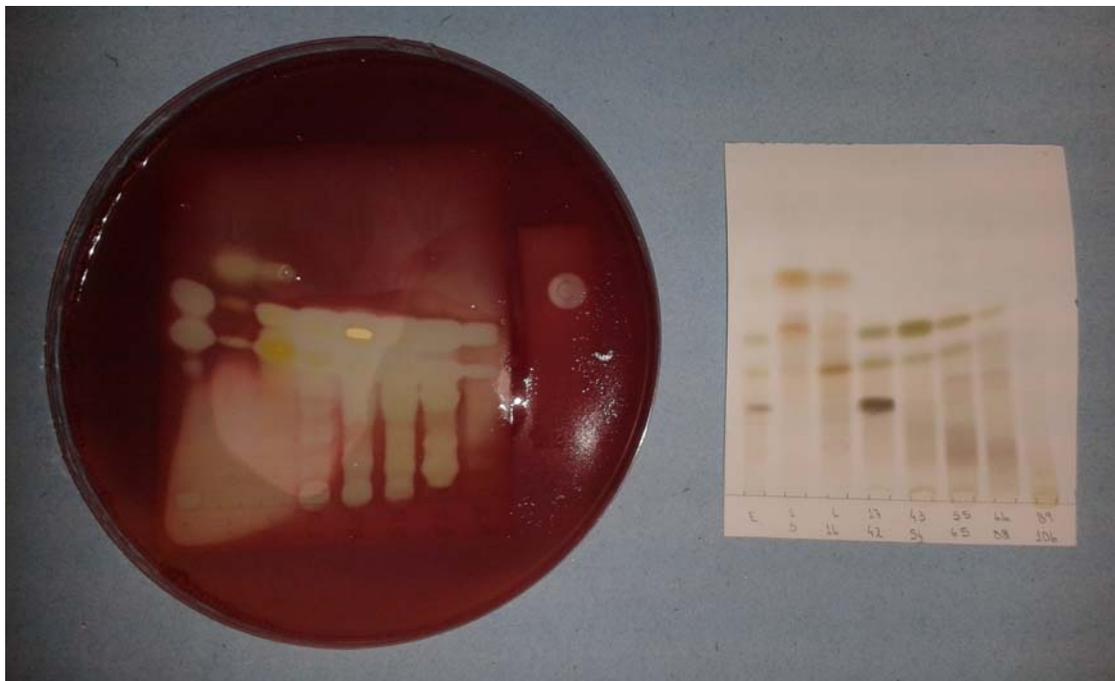


Figura 3.9. Bioautografía de las fracciones reunidas de la cromatografía en columna frente a *S. aureus* ATCC 6538p.

La actividad antimicrobiana de las etapas de fraccionamiento se evaluó mediante determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a *S. aureus* ATCC 6538p, ATCC 43300 y ATCC 700699. Los resultados se presentan en la tabla a continuación.

Extracto/Fracción	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	ATCC 6538p	ATCC 43300	ATCC 700699
Extracto acetónico	125	250	250
Extracto AcOEt	250	125	125
Fracciones CH ₂ Cl ₂ /MeOH 90:10 a 85:15	62,5	62,5	125
Fracciones CH ₂ Cl ₂ /MeOH 85:15 a 80:20	31,3	31,3	62,5
Fracciones 6 a 16	250	62,5	125
Fracciones 17 a 42	31,3	31,3	62,5
Sulfato de gentamicina	4	15	236
Oxacilina sódica	0,2	45	185

Tabla 3.15. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de las fracciones correspondientes al aislamiento bioguiado de compuestos con actividad antimicrobiana del hongo *G. junonius*.

Las fracciones más purificadas mostraron una actividad biológica remarcable frente a los microorganismos ensayados, siendo comparable (ATCC 43300) o mucho mejor que los antibióticos evaluados (ATCC 700699). Los MRSA seleccionados no sólo son resistentes a la metilina, sino también a la oxacilina (ATCC 43300) y a la vancomicina (ATCC 700699).

Tomando en cuenta los resultados microbiológicos obtenidos se decidió trabajar en el aislamiento de el/los compuesto/s activo/s a partir de dichas fracciones.

Finalmente, el extracto resultante de las fracciones 6 a 16 fue sometido a cromatografía en capa fina preparativa en una placa de TLC de silica gel desarrollada con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10 para aislar el compuesto con $R_f = 0,57$ (compuesto 1).

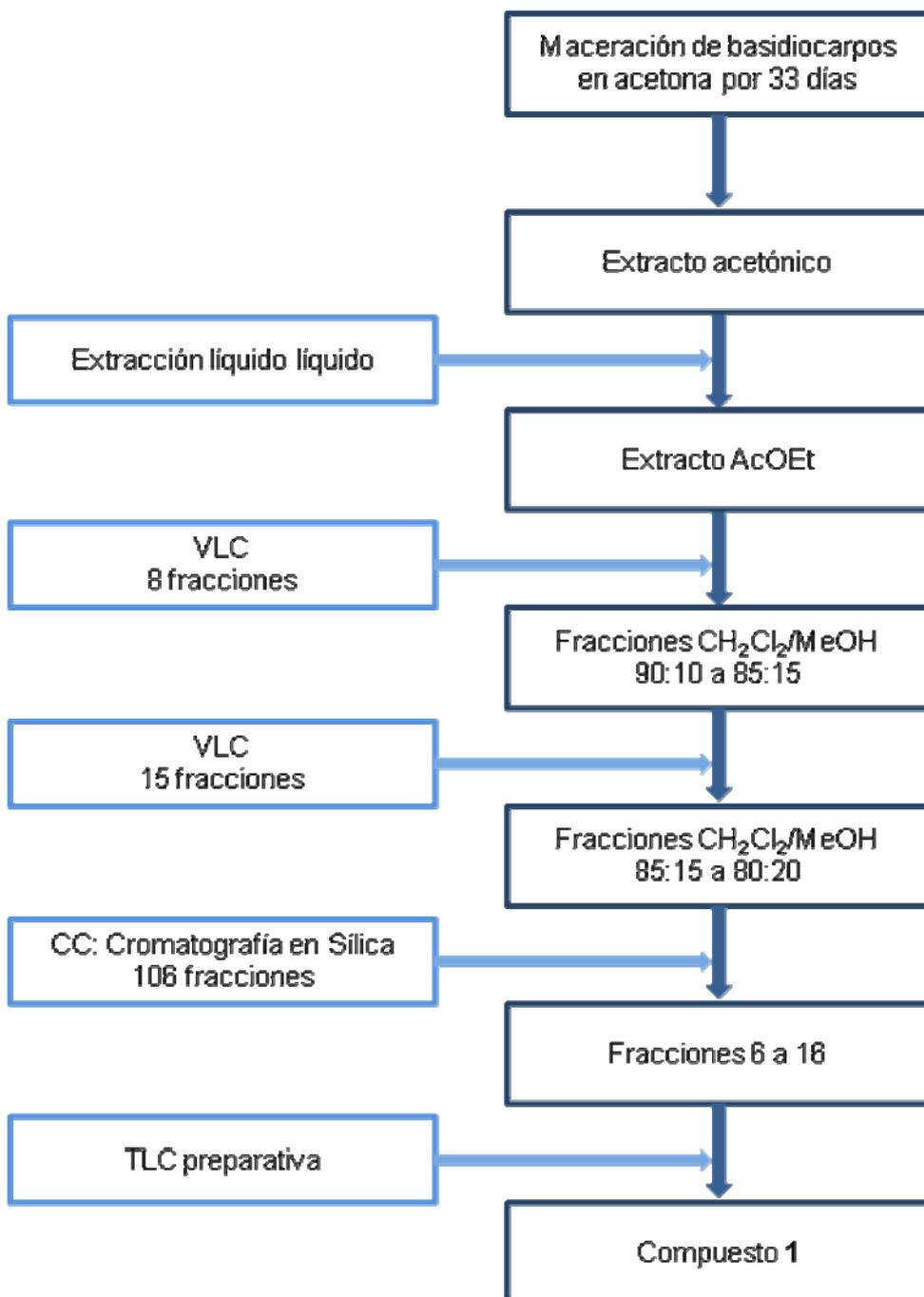


Figura 3.10. Esquema de aislamiento y purificación de Compuesto 1.

El extracto resultante de las fracciones 17 a 42 fue sometido a cromatografía en capa fina preparativa en una placa de TLC de silica gel desarrollada con CH₂Cl₂/MeOH 90:10 para aislar los compuestos con R_f = 0,33 (compuesto 2) y R_f = 0,26 (compuesto 3).

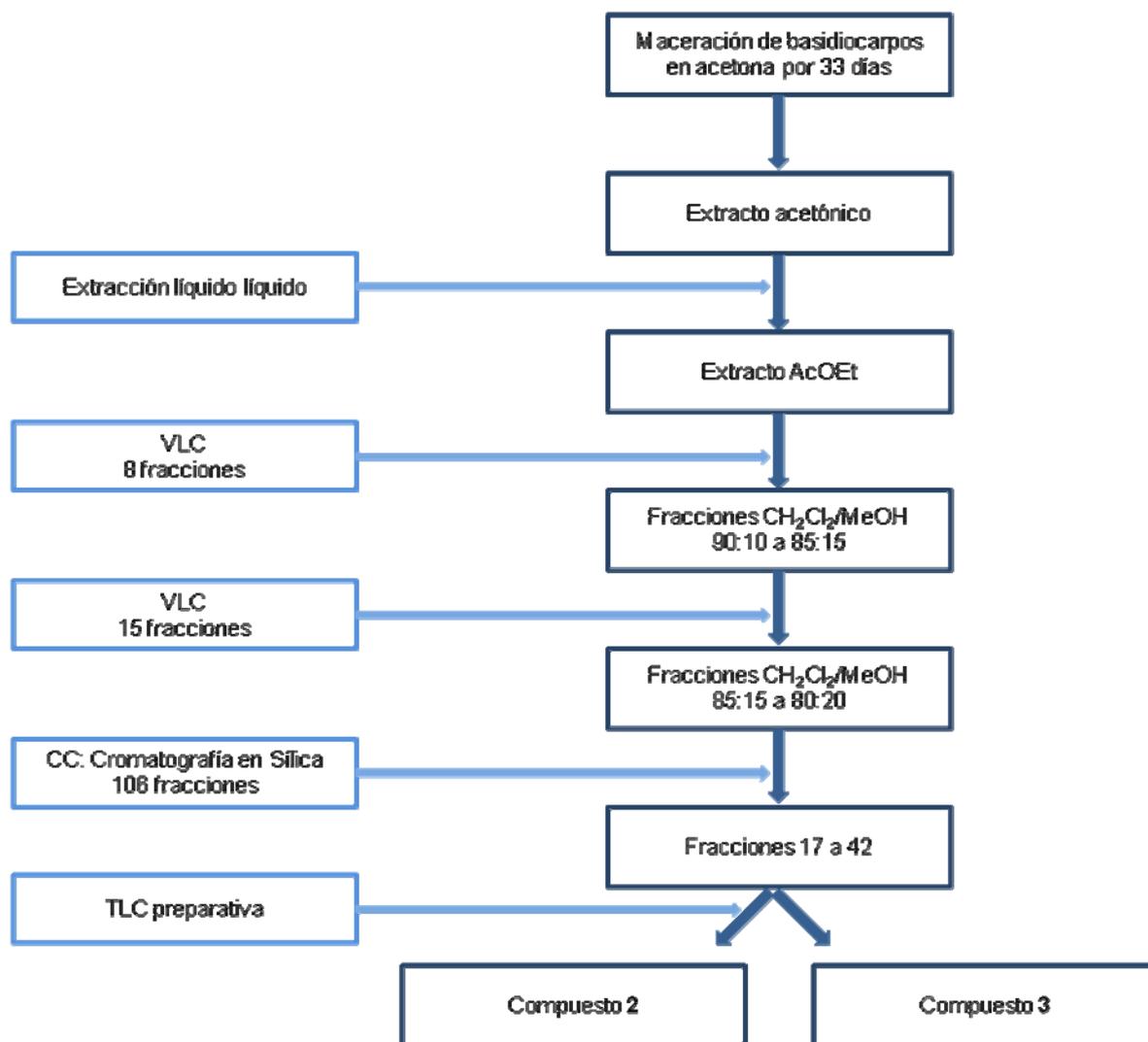


Figura 3.11. Esquema de aislamiento y purificación de Compuestos 2 y 3.

El Compuesto 1 se obtuvo como un sólido amorfo amarillento y mostró un máximo de absorción al UV en MeOH a $\lambda = 366$ nm. El espectro HRMS mostró un ion cuasi molecular $[M+Na]^+$ a m/z 285,0609 Da sugiriendo la fórmula molecular C₁₄H₁₄O₅. Especialmente útil para la elucidación fue la señal

de carbono en el RMN a una frecuencia inusualmente alta (δ_C 177,3) que se correlaciona con protones a δ_H 7,59 y 6,51 y un singulete (3H) a δ_H/δ_C 3,74/51,2 que correlaciona a través de HMBC con una señal de carbono a 169,3 ppm determinando el resto éster de la molécula.

A través de diferentes experimentos de RMN 1D y 2D (PENDANT, COSY, HSQC y HMBC) se asignaron todas las señales del compuesto **1**. Los resultados se presentan en la tabla a continuación:

Nº Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (multiplicidad; J en Hz)
1	169,3	-
2	-	-
3	192,3	-
4	99,9	5,82
5	177,3	-
6	118,4	6,51 (1H; d; 15,0)
7	140,6	7,59 (1H; d; 15,0)
8	129,8	-
9	129,5	7,49 (1H; dd; 8,0; 2,1)
10	115,1	6,82 (1H; dd; 8,0; 2,1)
11	159,9	-
12	115,1	6,82 (1H; dd; 8,0; 2,1)
13	129,5	7,49 (1H; dd; 8,0; 2,1)
OCH ₃	51,2	3,74 (3H; s)

Tabla 3.16. Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para compuesto **1**.

En base a los diferentes experimentos de RMN 1D y 2D (PENDANT, COSY, HSQC y HMBC), los datos cromatográficos y espectroscópicos y la comparación con datos bibliográficos el compuesto **1** fue identificado como **5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo** (Findlay, 1991; Lee, 2011; Wangun, 2006).

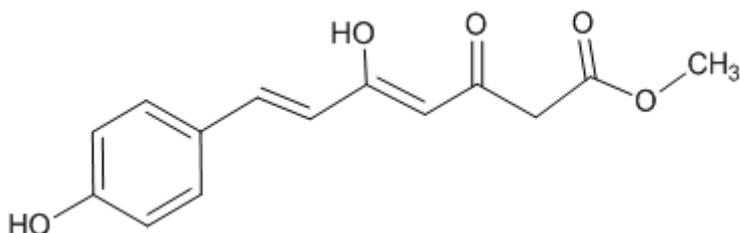


Figura 3.12. Estructura química compuesto 1.

El Compuesto **2** se obtuvo como un sólido amorfo amarillento y mostró un máximo de absorción al UV en MeOH a $\lambda = 366$ nm. El espectro HRMS mostró un ion cuasi molecular $[M+Na]^+$ a m/z 253,0466 Da sugiriendo la fórmula molecular $C_{13}H_{10}O_4$. En el espectro COSY, la correlación entre las señales de protón a 7,47 (2H; dd; $J=7,5$; 1,5 Hz) y 6,81 (2H; dd; $J=7,5$; 1,5 Hz) determinó el patrón de sustitución *para* del anillo fenólico. La correlación de los protones olefínicos a 7,39 y 6,68 ppm con una constante de acoplamiento de 13,1 Hz indicó la configuración *trans* del doble enlace.

A través de diferentes experimentos de RMN 1D y 2D (PENDANT, COSY, HSQC y HMBC) se asignaron todas las señales del compuesto **2**. Los resultados se presentan en la tabla a continuación:

Nº Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (multiplicidad; J en Hz)
1	172,2	-
2	101,3	6,13 (1H; s)
3	160,6	-
4	117,5	6,02 (1H; s)
5	166,3	-
6	115,6	6,68 (1H; d; 13,1)
7	135,5	7,39 (1H; d; 13,1)
8	126,8	-
9	129,0	7,47 (2H; dd; 7,5; 1,5)
10	115,3	6,81 (2H; dd; 7,5; 1,5)
11	158,8	-
12	115,3	6,81 (2H; dd; 7,5; 1,5)
13	129,0	7,47 (2H; dd; 7,5; 1,5)

Tabla 3.17. Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para compuesto **2**.

En base a los diferentes experimentos de RMN 1D y 2D (PENDANT, COSY, HSQC y HMBC), los datos cromatográficos y espectroscópicos y la comparación con datos bibliográficos el compuesto **2** fue identificado como **bisnoryangonina** (Findlay, 1991; Hammerschmidt, 2012).

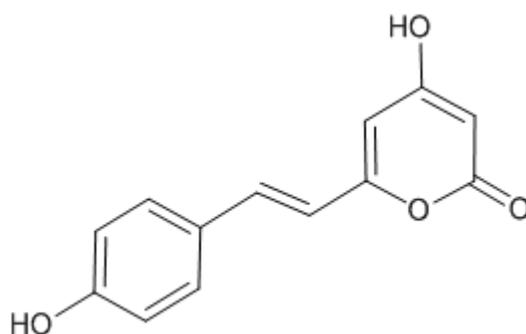


Figura 3.13. Estructura química compuesto **2**.

El Compuesto **3** se obtuvo como un aceite amarillo pálido y mostró en el espectro HRMS un ion cuasi molecular $[M-H]^-$ a m/z 180,66 Da sugiriendo la fórmula molecular $C_{10}H_{14}O_3$. El compuesto presentó en el espectro ^{13}C RMN señales a 70-80 ppm características de carbonos acetilénicos sustituidos y varios protones OCH a 3,5-4,6 ppm.

A través de diferentes experimentos de RMN 1D y 2D (PENDANT, COSY, HSQC y HMBC) se asignaron todas las señales del compuesto **3**. Los resultados se presentan en la tabla a continuación:

Nº Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (multiplicidad; J en Hz)
1	58,8	4,58 (2H; t; 12,0)
2	40,1	1,89 (2H; m)
3	57,5	3,71 (1H; m)
4	79,8	-
5	67,5	-
6	67,7	-
7	80,2	-
8	62,8	4,32 (1H; t; 11,5)
9	28,9	1,68 (2H; m)
10	8,4	1,01 (3H; t; 8,0)

Tabla 3.18. Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para compuesto **3**.

En base a los diferentes experimentos de RMN 1D y 2D (PENDANT, COSY, HSQC y HMBC), los datos cromatográficos y espectroscópicos y la comparación con datos bibliográficos el compuesto **3** fue identificado como **4,6-decadien-1,3,8-triol** (Kusano, 1986; Lee, 2008).



Figura 3.14. Estructura química compuesto **3**.

La actividad de los compuestos puros fue determinada de acuerdo a la técnica de agar overlay frente a siete cepas diferentes de *S. aureus*, tres de ellas de la American Type Culture Collection una cepa tipo salvaje (ATCC 6538p) y dos MRSA con ausencia del gen *pvl* confirmada por PCR. La cepa MRSA ATCC 700699 presenta resistencia a la gentamicina y la oxacilina y susceptibilidad reducida a la vancomicina y la cepa ATCC 43300 resistencia a la oxacilina. Las otras cuatro son aislados clínicos de daño tisular, uno sin aumento de la resistencia a los antibióticos en uso (FQ 4) y tres MRSA, con susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina, eritromicina y oxacilina (FQ 380), oxacilina y eritromicina (FQ 341) y oxacilina (FQ 317) se utilizaron en los ensayos.

Posteriormente, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para aquellos compuestos que presentaron resultados positivos en la determinación del espectro antimicrobiano. Los resultados se presentan en las tablas a continuación.

Compuesto	<i>S. aureus</i>						
	ATCC 6538p	ATCC 43300	ATCC 700699	FQ 4	FQ 317	FQ 341	FQ 380
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+

Compuesto **1**: 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

Compuesto **2**: bisnoryangonina.

Compuesto **3**: 4,6-decadien-1,3,8-triol.

Tabla 3.19. Espectro antimicrobiano de los compuestos aislados.

Compuesto	<i>S. aureus</i>						
	ATCC 6538p	ATCC 43300	ATCC 700699	FQ 4	FQ 317	FQ 341	FQ 380
1	100	50	25	100	100	50	50
2	3,1	6,3	50	25	25	12,5	25
3	100	100	100	100	100	100	100
Sulfato de gentamicina	4	15	236	0,8	0,8	0,8	0,8
Oxacilina sódica	0,2	45	185	0,5	64	≥256	256
Vancomicina	-	-	-	2	2	2	2
Eritromicina	-	-	-	0,5	0,5	≥32	≥32
Ciprofloxacina	-	-	-	1	2	≥8	128

Compuesto 1: 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

Compuesto 2: bisnoryangonina.

Compuesto 3: 4,6-decadien-1,3,8-triol.

Tabla 3.20. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de los compuestos aislados.

Entre los compuestos puros, la bisnoryangonina mostró los valores de MIC más bajos frente a seis de las siete cepas de *S. aureus* evaluadas. Considerando lo promisorio de dicho resultado se determinó la CIM de la bisnoryangonina frente a los microorganismos ESKAPE (*E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. cloacae*) obteniéndose resultados aceptables frente a *E. faecalis* (Tabla 3.21.).

Compuesto	Patógenos humanos				
	E. faecali s	K. pneum oniae	A. baum anii	P. aerugi nosa	E. cloac ae
2	12,5	100	100	100	100
Norfloxacin	1,6	3,1	>6,3	3,1	>6,3

Compuesto 2: bisnoryangonina.

Tabla 3.21. Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) del compuesto aislado bisnoryangonina.

Algunos de los compuestos aislados de *G. junonius* derivan de una estructura química en común, el sistema de anillo 2-piranona. Compuestos con el sistema anular 2-piranona han sido encontrados en plantas, animales, organismos marinos, bacterias e insectos y su implicación en diferentes procesos biológicos tales como defensa contra otros organismos o como intermediarios biosintéticos han hecho de este esqueleto una entidad química importante (Das, 2009; McCracken, 2012; McGlacken, 2005). Las 2-piranonas derivadas de microorganismos u obtenidas de hongos basidiomicetes de varios géneros muestran una amplia gama de propiedades citotóxicas, neurotóxicas y fitotóxicas (Goel, 2009; Lee, 2011).

A su vez se han aislado varias 6-estiril-2-piranonas de origen natural de diversas plantas de los géneros *Piper*, *Aniba*, *Alpinia*, *Milium* y *Ranunculus* siendo las más conocidas las kavalactonas, lactonas presentes en la planta kava-kava, ampliamente utilizada por los polinesios como sedante (Bittencourt, 1971; Dharmaratne, 2002; Kamperdick, 2002; Singh, 1992). Se ha realizado un estudio sistemático de la distribución de estos compuestos y sus derivados en la familia *Strophariaceae* y géneros relacionados (Goel, 2009; Lee, 2011).

La presencia de gimnopilinas y ácido ostopanico, compuestos con efecto citotóxico, ha sido descrita en los extractos de *G. junonius* (Hamburger, 1987;

Tanaka, 1993) Los mismos fueron dereplicados junto con ácido oxálico, compuesto con actividad antimicrobiana ampliamente conocida.

En este trabajo, tres compuestos previamente descritos fueron aislados: 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (Findlay, 1991), bisnoryangonina (Brady, 1972; Findlay, 1991; Hatfield, 1969; Lee, 2008) y 4,6-decadien-1,3,8-triol (Kusano, 1986) destacándose la bisnoryangonina por su promisorio actividad antistafilocócica. Dado que dicho compuesto presentó una CIM baja frente a los *S. aureus* MRSA evaluados, se plantea estudiar a futuro el modo de acción del mismo.

3.5. Estudio de la influencia de agentes epigenéticos sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para *Gymnopilus junonius* CCMG SA1.

Según se describió en el punto anterior, tres compuestos con actividad antimicrobiana fueron aislados a partir de los cuerpos de fructificación de *G. junonius*. Mediante diversas técnicas cromatográficas se evaluó la presencia de dichos compuestos en extractos de caldo extracelular de un cultivo de *G. junonius*. En caso afirmativo, los compuestos 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo, 4,6-decadien-1,3,8-triol y bisnoryangonina serían utilizados como estándares para evaluar las diferencias en los extractos obtenidos al variar las condiciones de cultivo.

Siendo que la aproximación cultivo-dependiente de la estrategia OSMAC que involucró la variación de parámetros de cultivo (medio de cultivo, agitación, días) no arrojó resultados promisorios para el hongo *L. sulphureus* se decidió evaluar una estrategia más novedosa como son los cambios en la función génica a partir del uso de agentes epigenéticos.

Tres agentes epigenéticos fueron evaluados: N-acetilglucosamina, inhibidor de la metilación del ADN y ácido butírico y divalproato de sodio, ambos inhibidores de las histonas desacetilasas (HDACs).

Inicialmente se evaluaron los tres agentes individualmente y la combinación de N-acetilglucosamina con ácido butírico y divalproato de sodio respectivamente. En todos los casos la concentración utilizada para los agentes fue de 15 μ M. En base a estos resultados preliminares se determinaron las condiciones del siguiente diseño donde se evaluó la N-acetilglucosamina a una concentración mayor (100 μ M) y la combinación de N-acetilglucosamina con ácido butírico y divalproato de sodio a diversos niveles de concentración (15 μ M y 100 μ M).

La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos en todas las condiciones se evaluó mediante determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a *S. aureus* ATCC 6538p.

Los perfiles químicos de los extractos obtenidos en todas las condiciones fueron evaluados mediante TLC, HPLC/DAD y UHPLC-MS. En los análisis por cromatografía líquida acoplada a arreglo de diodos se utilizaron las longitudes de onda 210, 244 y 280 nm para obtener un perfil general de los extractos y 360 y 366 nm para la detección de los compuestos 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo y bisnoryangonina. Se realizaron los blancos correspondientes a cada uno de los agentes epigenéticos agregados tomando en cuenta los factores de concentración correspondientes al método.

La siguiente tabla muestra los resultados de las CIM obtenidas en las distintas condiciones del primer diseño para el extracto de caldo extracelular:

Experimento	N-acetilglucosamina (μM)	Divalproato de sodio (μM)	Ácido butírico (μM)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	0	0	0	500
2	15	0	0	500
3	0	15	0	500
4	0	0	15	500
5	15	15	0	500
6	15	0	15	>500

Medio de cultivo: CM.

Tabla 3.22. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del primer diseño frente a *S. aureus* ATCC 6538p.

Se observó que no había diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de los extractos al agregar agentes epigenéticos al medio de cultivo. Posteriormente se evaluaron los perfiles químicos de los extractos de caldo extracelular obtenidos en las distintas condiciones (Figuras 3.15., 3.16. y 3.17.).

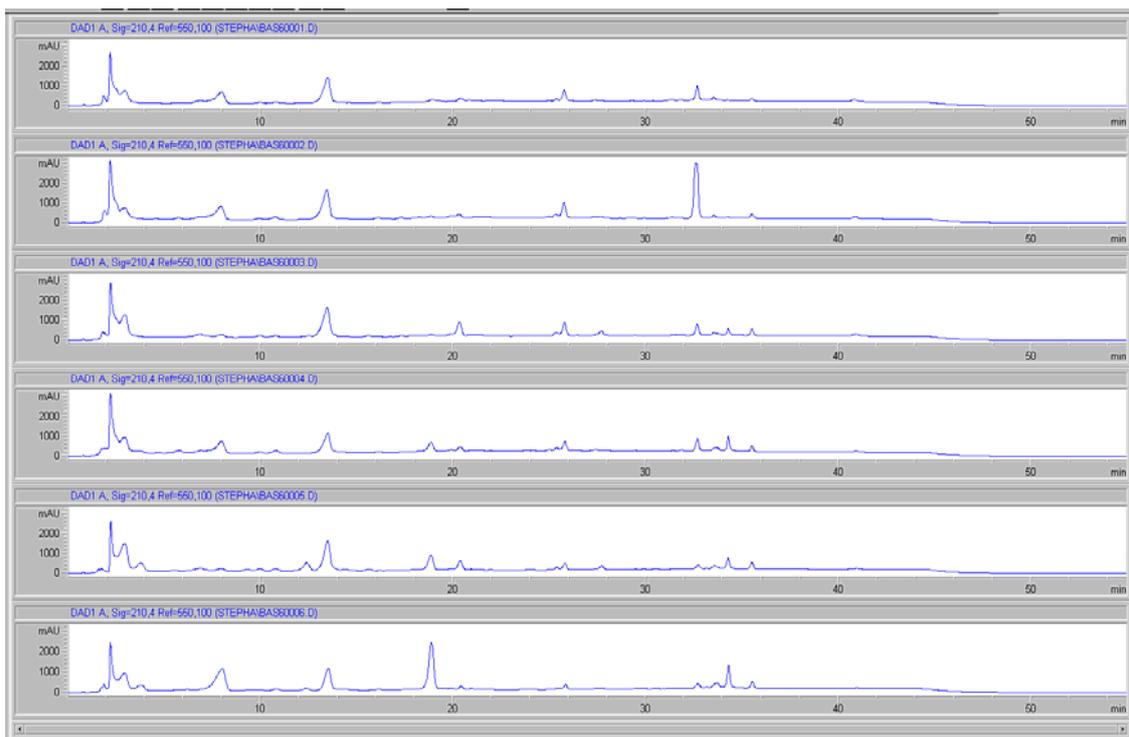


Figura 3.15. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño a 210 nm.

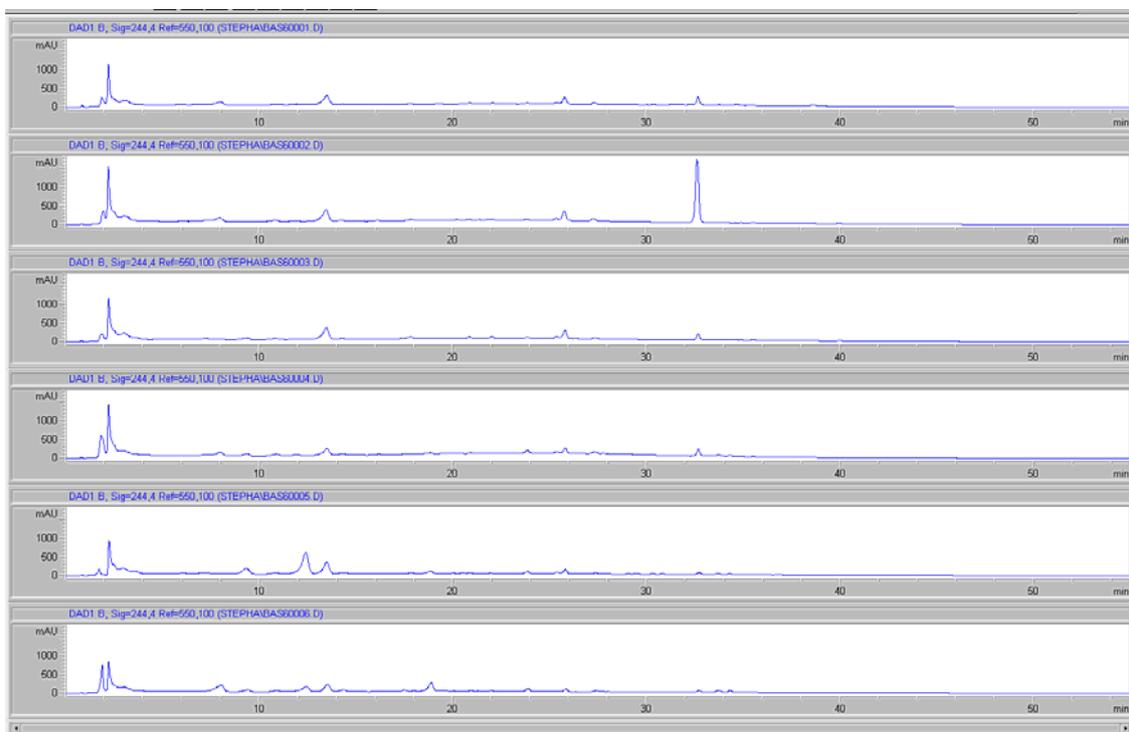


Figura 3.16. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño a 244 nm.

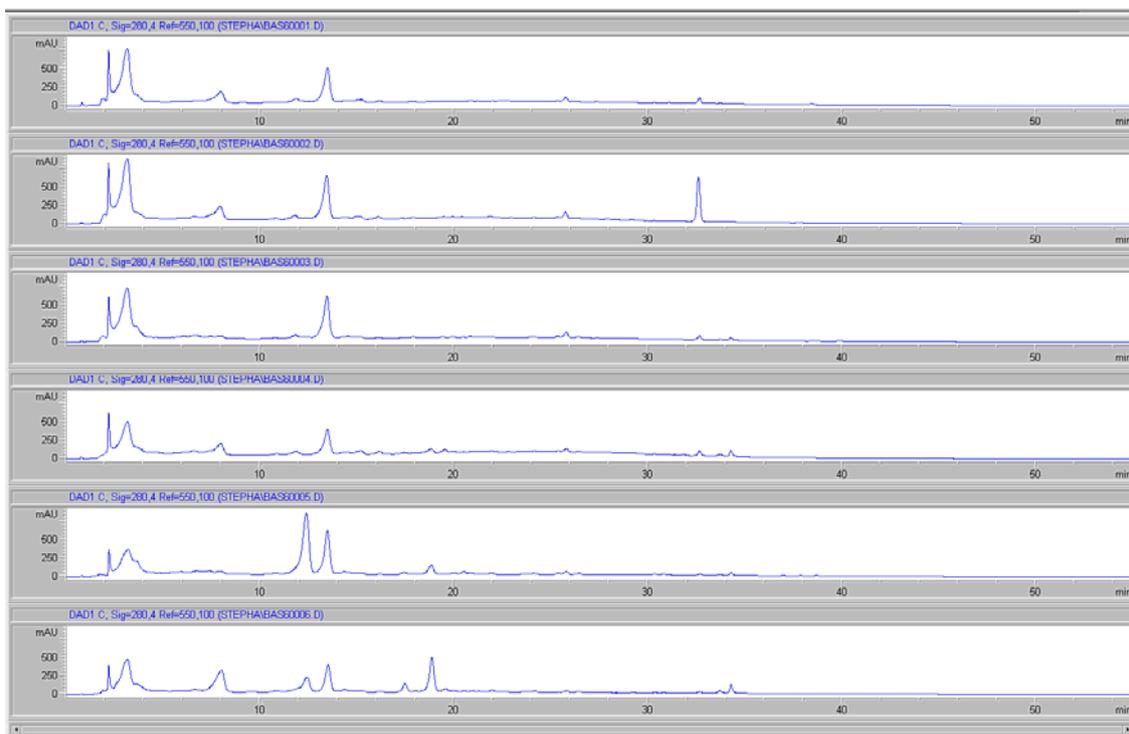


Figura 3.17. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño a 280 nm.

Se observaron diferencias en los perfiles químicos de los extractos obtenidos, principalmente en las intensidades de algunas señales. Además, extractos provenientes de cultivos con agregado de N-acetilglucosamina y sus combinaciones con ácido butírico y divalproato de sodio presentan algunos metabolitos diferentes.

A pesar de contener la misma información genética, no se debe inferir que aquellos compuestos presentes en los cuerpos de fructificación y aislados en etapas previas (5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo, 4,6-decadien-1,3,8-triol y bisnoryangonina) sean producidos por *G. junonius* en cultivo.

Se realizó una cromatografía en capa fina para evaluar la presencia de 4,6-decadien-1,3,8-triol en un extracto de caldo extracelular de *G. junonius* observándose que dicho compuesto es producido en muy pequeñas cantidades.

Respecto a los compuestos 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo y bisnoryangonina se evaluó mediante HPLC su presencia en el extracto de caldo extracelular mediante comparación directa de los cromatogramas. Dado que los resultados no fueron concluyentes, el extracto de caldo extracelular fue fortificado con dichos compuestos a los efectos de observar diferencias en las áreas de las señales que correspondían a los mismos. Se observó que los dos compuestos fueron producidos en muy pequeñas cantidades. Considerando las dificultades en la detección de 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo debido a las impurezas del estándar para etapas posteriores se utilizó únicamente la bisnoryangonina.

Finalmente, para evaluar cambios en la producción de bisnoryangonina en los extractos de caldo extracelular obtenidos en las distintas condiciones se obtuvieron los cromatogramas a 360 y 366 nm. El último cromatograma de cada figura corresponde a la bisnoryangonina (Figuras 3.18. y 3.19.).

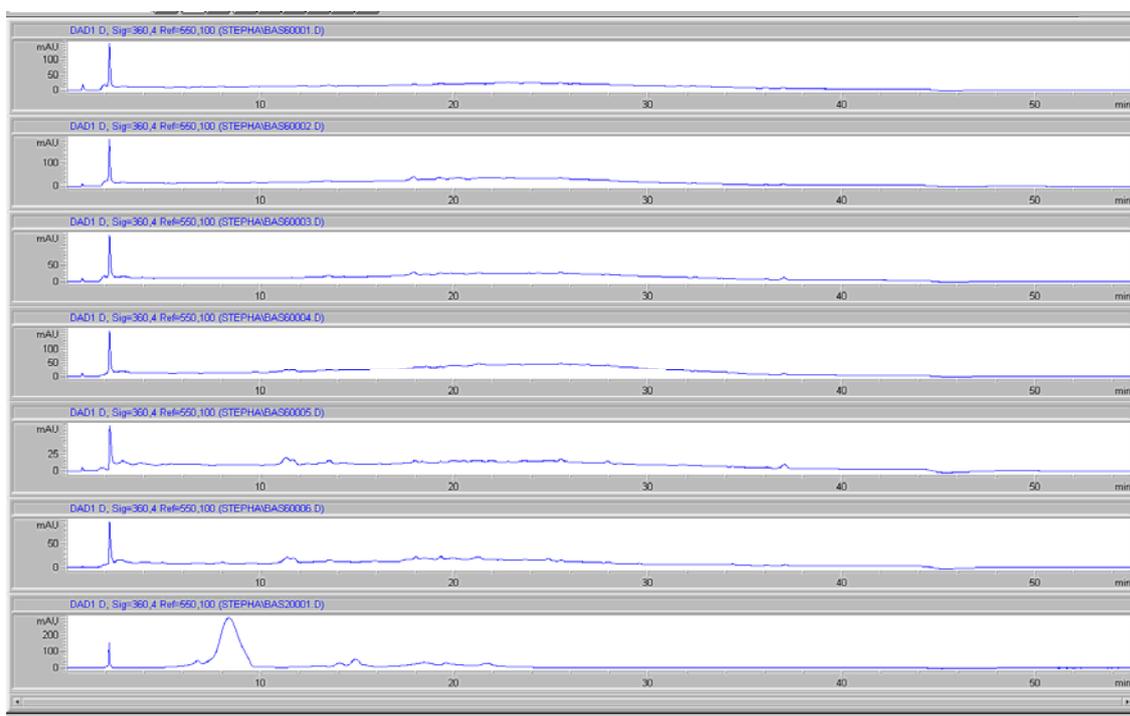


Figura 3.18. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 360 nm.

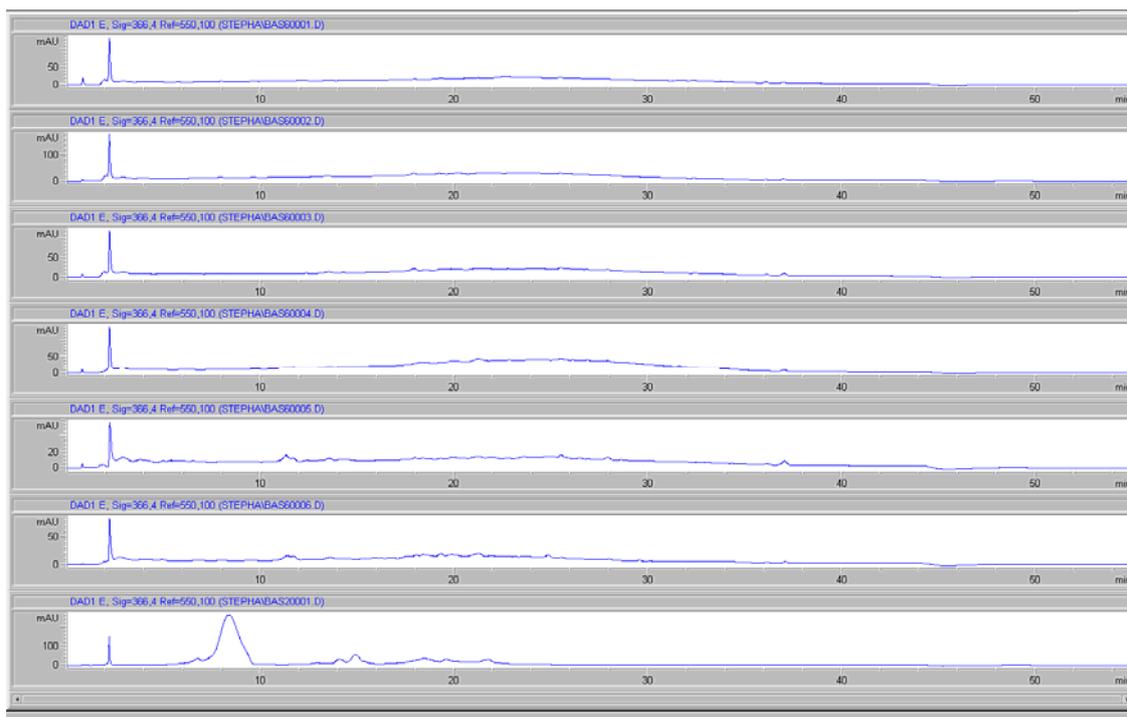


Figura 3.19. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del primer diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 366 nm.

Se observó que no había diferencias significativas en la producción de bisnoryangonina de los extractos al agregar agentes epigenéticos al medio de cultivo. Respecto al compuesto 4,6-decadien-1,3,8-triol, no se observó diferencia en la producción del mismo por cromatografía en capa fina.

Considerando la ausencia de incrementos en la actividad antimicrobiana y la producción de compuestos y los cambios en los perfiles químicos para cultivos con agregado de N-acetilglucosamina y sus combinaciones con ácido butírico y divalproato de sodio se determinaron las variables del siguiente diseño.

En el mismo se evaluó el efecto de la N-acetilglucosamina a una concentración mayor (100 μM) y la combinación de N-acetilglucosamina con ácido butírico y divalproato de sodio a diversos niveles de concentración (15 μM y 100 μM).

La siguiente tabla muestra los resultados de las CIM obtenidas en las distintas condiciones del segundo diseño para el extracto de caldo extracelular:

Experimento	N-acetilglucosamina (μM)	Divalproato de sodio (μM)	Ácido butírico (μM)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	100	0	0	500
2	100	15	0	>500
3	100	100	0	500
4	15	100	0	>500
5	100	0	15	>500
6	100	0	100	500
7	15	0	100	>500

Medio de cultivo: CM.

Tabla 3.23. Respuesta (CIM) obtenida para las condiciones del segundo diseño frente a *S. aureus* ATCC 6538p.

Se observó que no había diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de los extractos al agregar una concentración mayor de agentes epigenéticos al medio de cultivo. Posteriormente se evaluaron los perfiles químicos de los extractos de caldo extracelular obtenidos en las distintas condiciones. El primer cromatograma de cada figura corresponde al extracto del cultivo de *G. junonius* sin agregado de agentes epigenéticos (Figuras 3.20., 3.21. y 3.22.).

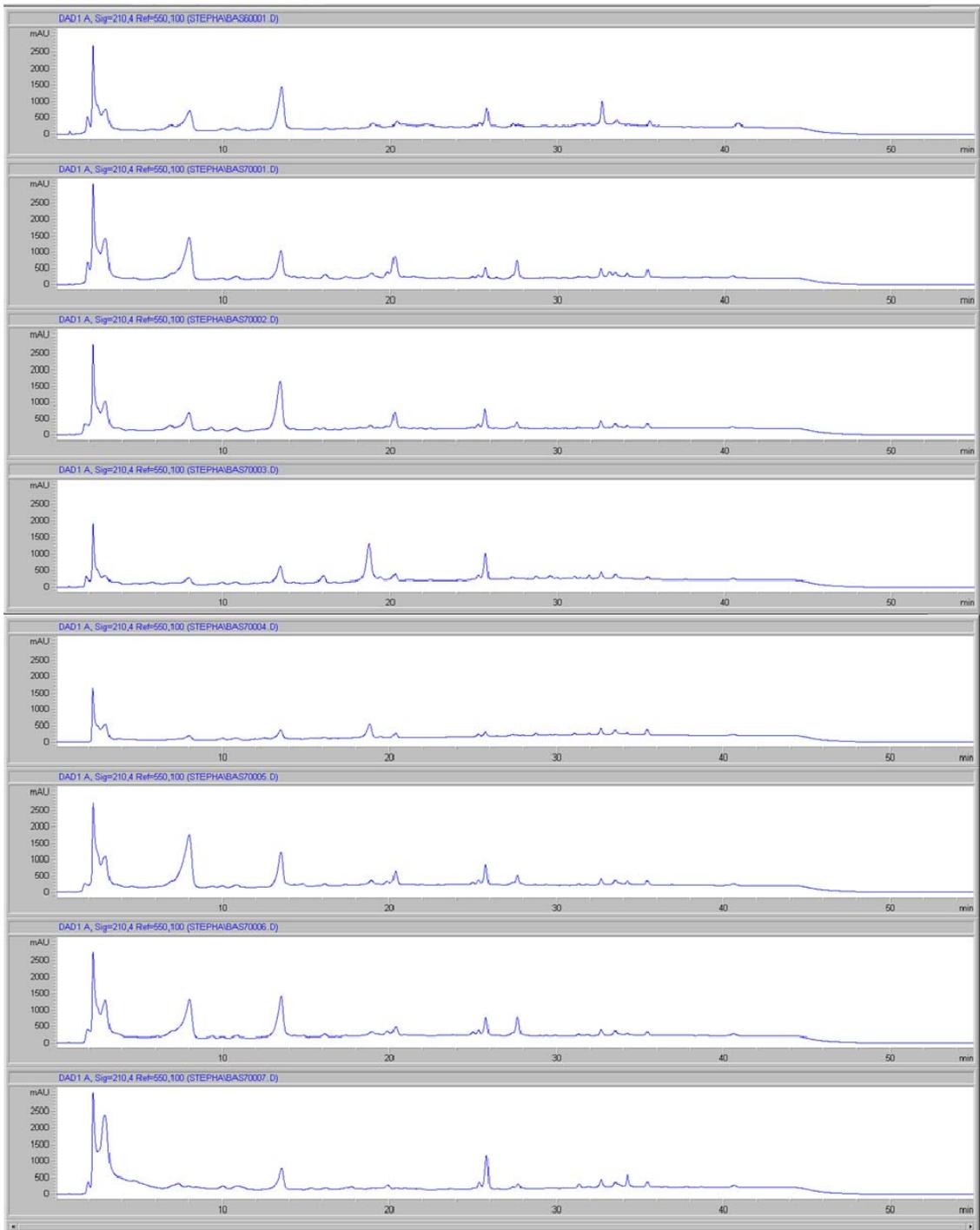


Figura 3.20. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño a 210 nm.

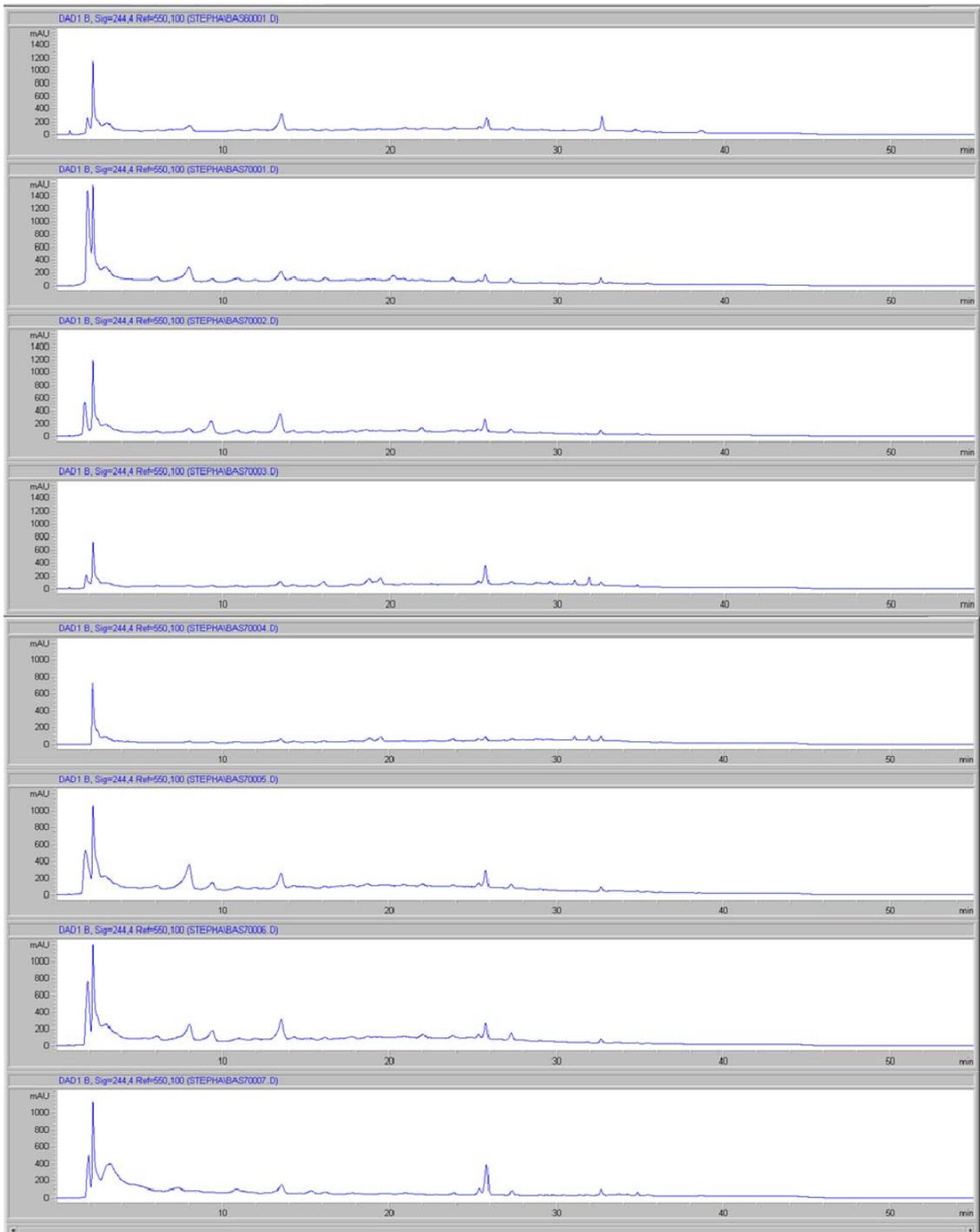


Figura 3.21. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño a 244 nm.

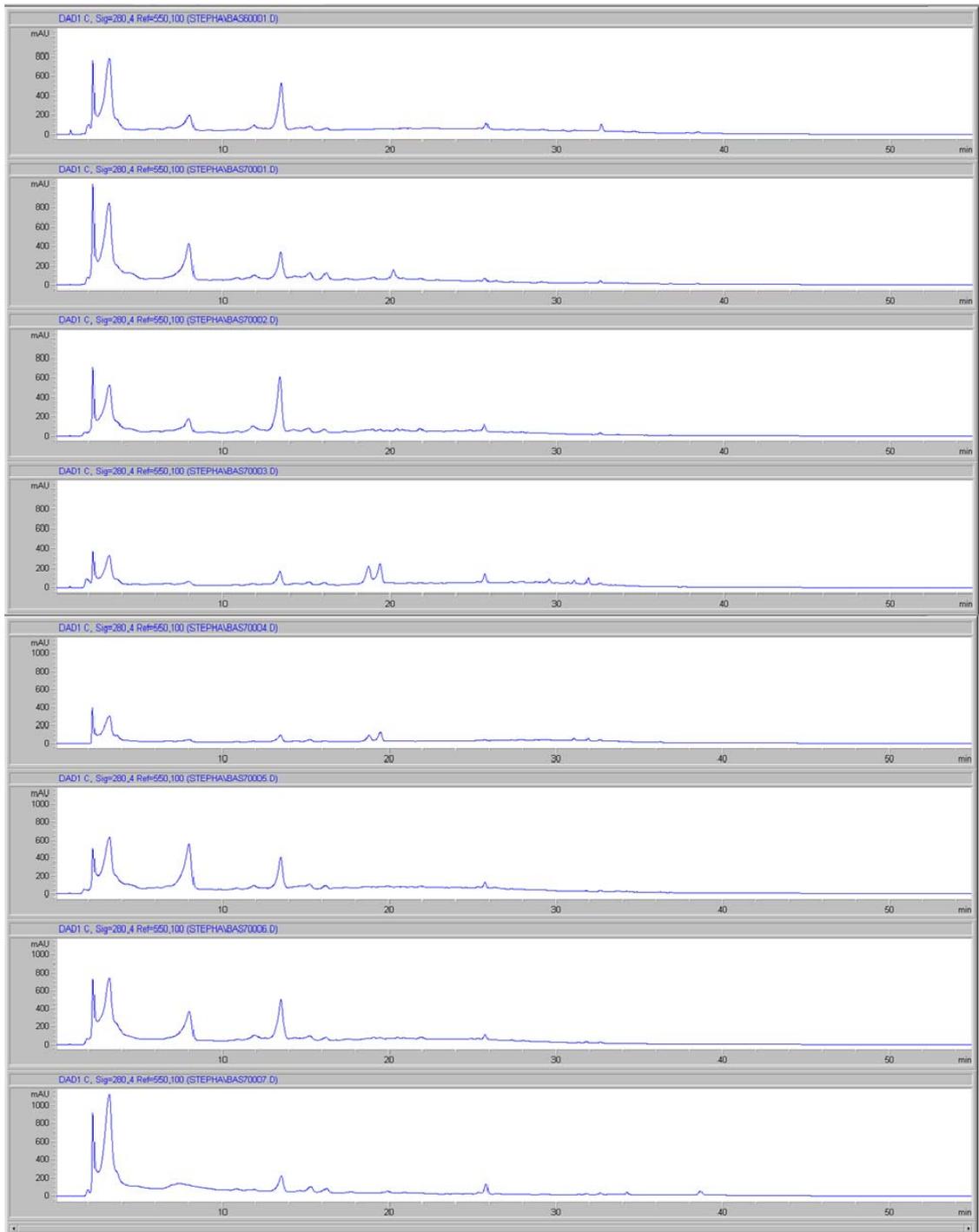


Figura 3.22. Perfiles químicos obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño a 280 nm.

Se observaron diferencias en los perfiles químicos de los extractos obtenidos, principalmente en las intensidades de las señales. Extractos provenientes de cultivos con agregado de N-acetilglucosamina en su nivel de concentración más alto (100 μ M) presentan el mayor aumento de intensidad en las señales. Además, extractos provenientes de cultivos con agregado de N-acetilglucosamina en su nivel de concentración más alto y su combinación con divalproato de sodio presentan algunos metabolitos diferentes.

Finalmente, para evaluar cambios en la producción de bisnoryangonina en los extractos de caldo extracelular obtenidos en las distintas condiciones se estudiaron los cromatogramas a 360 y 366 nm. El primer y el último cromatograma de cada figura corresponden al extracto del cultivo de *G. junonius* sin agregado de agentes epigenéticos y la bisnoryangonina respectivamente (Figuras 3.23. y 3.24.).

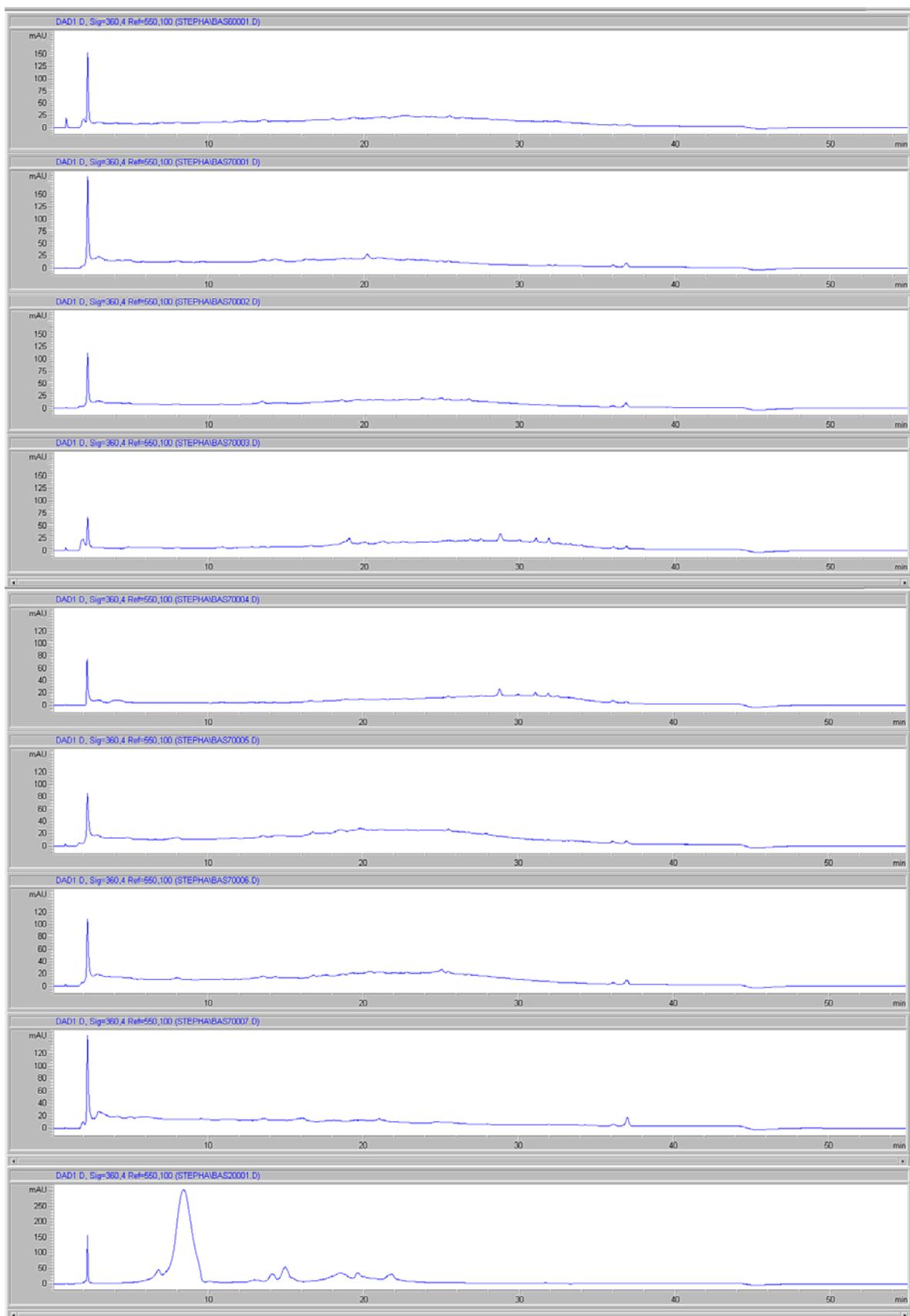


Figura 3.23. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 360 nm.

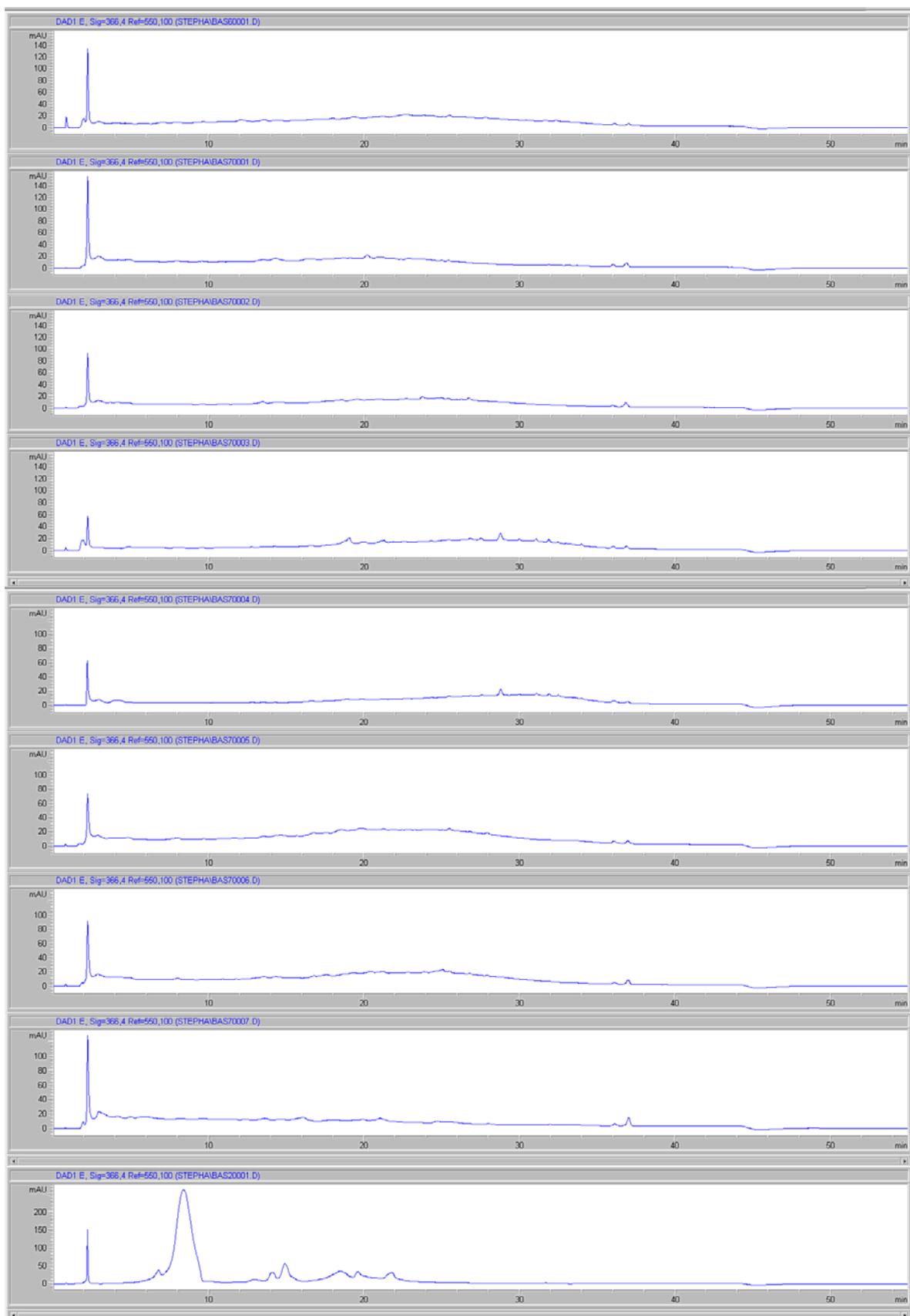


Figura 3.24. Cromatogramas obtenidos por HPLC para las condiciones del segundo diseño y para el compuesto bisnoryangonina a 366 nm.

Nuevamente se observó que no había diferencias significativas en la producción de bisnoryangonina y 4,6-decadien-1,3,8-triol al agregar agentes epigenéticos al medio de cultivo.

Análisis UHPLC-MS

Trece extractos de caldo extracelular obtenidos a partir de las diferentes condiciones de cultivo de los dos diseños fueron evaluados mediante UHPLC-MS. En una primera instancia se seleccionaron los iones con mayor abundancia de cada extracto. Posteriormente se determinó la intensidad de cada ion mayoritario en todos los extractos analizados (Tabla 3.24.).

Número de ion	t _R (min)	m/z	Intensidad (x 10 ⁴) (cps)													
			Primer diseño experimental						Segundo diseño experimental							
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
1	10,73/15,50	124,89	6,48	6,87	7,01	5,39	7,86	5,69	7,50	7,50	6,22	5,97	7,18	7,70	7,38	
2	1,34	164,94	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41,20	ND	
3	2,78	173,00	ND	ND	1,04	ND	1,70	ND	ND	13,00	ND	2,35	ND	ND	ND	
4	0,92	180,98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,15	ND	
5	1,48	214,94	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,21	2,78	ND	ND	ND	ND	
6	3,98	237,96	1,49	2,78	1,38	1,49	5,66	2,48	9,83	6,90	ND	ND	13,60	5,03	11,30	
7	10,94	265,14	5,94	14,80	5,87	3,07	7,56	3,08	12,60	11,30	8,56	6,98	13,90	37,20	16,00	
8	6,96	293,13	ND	7,85	6,20	2,43	6,62	3,31	11,20	10,60	5,40	9,67	12,20	8,62	13,70	
9	10,20	355,29	ND	3,35	2,99	ND	2,71	ND	6,05	3,86	6,21	5,57	6,41	7,25	ND	
10	14,70	473,46	5,59	10,50	6,00	3,57	10,90	4,18	15,40	6,03	4,68	8,88	16,70	12,50	11,10	
11	16,35	501,37	15,60	42,50	19,10	3,29	12,00	5,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

ND: No detectado.

Primer diseño experimental: 1 Cultivo control, sin agregado de agentes epigenéticos / 2 N-acetilglucosamina 15 µM / 3 Divalproato de sodio 15 µM / 4 Ácido butírico 15 µM / 5 N-acetilglucosamina 15 µM + Divalproato de sodio 15 µM / 6 N-acetilglucosamina 15 µM + Ácido butírico 15 µM.

Segundo diseño experimental: 1 N-acetilglucosamina 100 µM / 2 N-acetilglucosamina 100 µM + Divalproato de sodio 15 µM / 3 N-acetilglucosamina 100 µM + Divalproato de sodio 100 µM / 4 N-acetilglucosamina 15 µM + Divalproato de sodio 100 µM / 5 N-acetilglucosamina 100 µM + Ácido butírico 15 µM / 6 N-acetilglucosamina 15 µM + Ácido butírico 100 µM / 7 N-acetilglucosamina 100 µM + Ácido butírico 100 µM.

Tabla 3.24. Respuesta (Intensidad de ion) obtenida para las condiciones de los dos diseños experimentales.

Los cromatogramas de los diferentes extractos presentaron perfiles similares con intensidades de iones similares, aunque no existe una relación directa entre la abundancia de los iones (o intensidad) y la concentración de los mismos en la mezcla.

Se pudieron observar algunas diferencias en el perfil de los cromatogramas en aquellos extractos provenientes de cultivo con agregado de agentes epigenéticos. La presencia de divalproato de sodio en el medio de cultivo conllevó a la aparición de los iones a m/z 173,00 y 214,94 que no se encuentran presentes en el extracto del cultivo control. El ion a m/z 355,29 desaparece en tres de cinco experimentos con agregado de ácido butírico (Experimentos 4 y 6 del Primer diseño y 7 del Segundo diseño). Mientras que, los iones a m/z 164,94 y 180,98 m/z aparecen únicamente en el experimento 6 del Segundo diseño. El ion a m/z 501,37 desaparece al agregar agentes epigenéticos en altas concentraciones (100 μM) al medio de cultivo (todos los experimentos del Segundo diseño) (Figura 3.25).

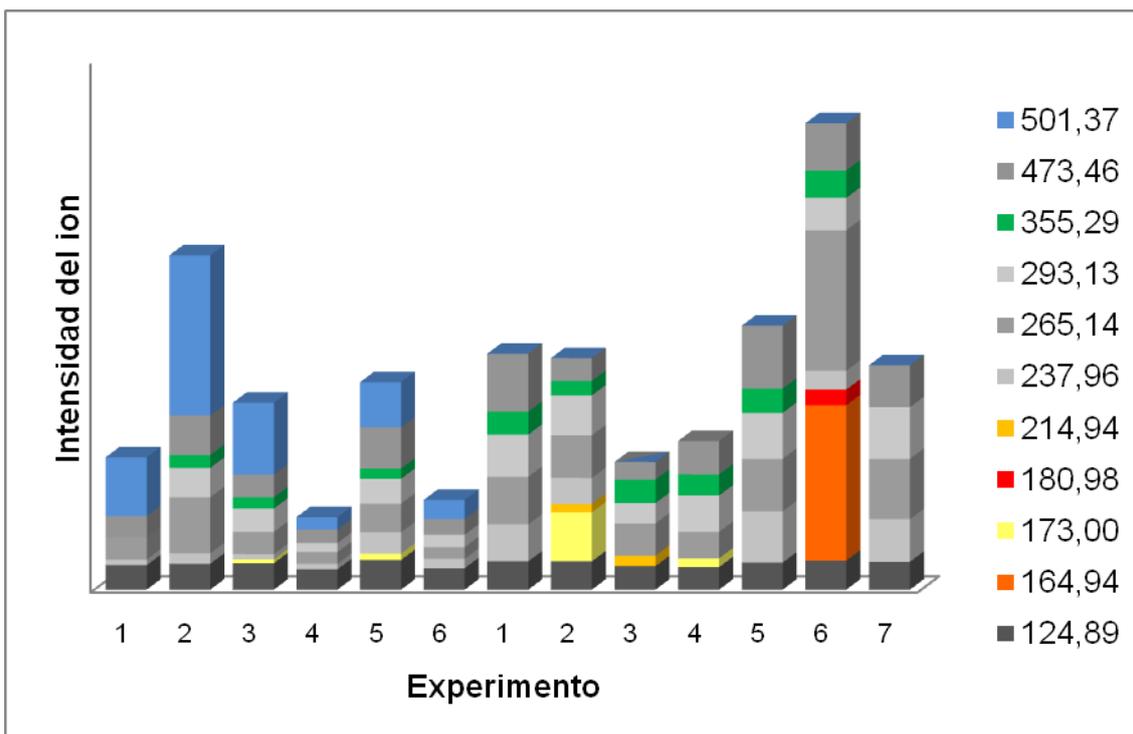


Figura 3.25. Respuesta (Intensidad de ion) obtenida para las condiciones de los dos diseños experimentales. En colores se observan los iones que presentaron alguna diferencia.

Los resultados obtenidos a la fecha por este método no permiten concluir que el agregado de agentes epigenéticos afectó el metabolismo del hongo siendo necesario realizar estudios a nivel estructural para determinar el origen de los iones diferentes.

La optimización de las condiciones de cultivo mediante la utilización de agentes epigenéticos demostró ser eficiente para la obtención de extractos metabólicamente más ricos con una actividad antimicrobiana similar. Dado que estos agentes interactúan de manera inespecífica en el ADN del microorganismo no se logró incrementar el rendimiento en los compuestos activos aislados. El agregado de precursores biosintéticos o de agentes que interactuaran específicamente en las rutas metabólicas de producción de dichos metabolitos podría producir un potencial aumento en el rendimiento de los mismos.

3.6. Sumario.

A partir de cultivos de 19 hongos basidiomicetes se prepararon cincuenta y tres extractos que posteriormente fueron sometidos a ensayos químicos y biológicos. Cuarenta por ciento de los extractos presentaron actividad frente a los patógenos humanos evaluados. De ellos, el 34% presentó actividad frente a alguna cepa de *S. aureus* (25% frente a la cepa metilino sensible ATCC 6538p y 9% frente a alguna de las cepas metilino resistentes evaluadas). Diecisiete por ciento de los extractos presentaron actividad frente a los fitopatógenos evaluados (9% con actividad antibacteriana y 8% con actividad antifúngica). A partir de los resultados obtenidos frente a fitopatógenos se seleccionaron cuatro hongos (*B. adusta*, *D. pusillus*, *G. resinaceum* y *L. sulphureus*) y se determinó el comportamiento de los extractos frente a un panel ampliado de especies fitopatógenicas. De los resultados obtenidos resultó muy interesante la actividad antimicrobiana producida por *L. sulphureus* y *G. resinaceum* frente a *X. vesicatoria*, patógeno de tomate y *S. sanguinolentum* y *G. junonius* frente a cepas sensibles y metilino resistentes de *S. aureus*.

Considerando los promisorios resultados microbiológicos obtenidos se seleccionó el hongo *L. sulphureus* para avanzar en la búsqueda de compuestos antimicrobianos. Tres ciclos de fermentación totalizando 24 réplicas de cultivo fueron necesarios para obtener una cantidad de extracto mínima para continuar con los estudios. Un compuesto fue aislado en muy pequeñas cantidades no pudiendo ser identificado.

Dada la necesidad de obtener cantidades de extracto suficientes para avanzar en el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, se estudió la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (aproximación cultivo-dependiente de la estrategia OSMAC). Tres diseños experimentales totalizando 46 condiciones de cultivo y 87 extractos fueron necesarios para obtener la condición óptima de crecimiento.

La optimización de las condiciones de cultivo no arrojó resultados favorables en cuanto a aumento en el rendimiento de extracto planteándose un

escenario desfavorable para la obtención de metabolitos antimicrobianos a partir de cultivos fúngicos. Varios ciclos de fermentación con un número importante de réplicas serían necesarios para obtener una masa crítica de extracto crudo. Se planteó recorrer el camino inverso, aislar compuestos con actividad antimicrobiana a partir de cuerpos de fructificación de hongos basidiomicetes nativos y posteriormente inducir la producción de los mismos en cultivos fúngicos de dicho hongo.

Gymnopilus junonius, hongo que crece silvestre en Uruguay, presentó promisorios resultados frente a los microorganismos ESKAPE y aislamientos clínicos de *S. aureus* surgiendo como la opción más adecuada. El fraccionamiento bioguiado del extracto acetónico de cuerpos de fructificación de *G. junonius* produjo después de una separación líquido-líquido, varias etapas de cromatografía en columna y una etapa final de TLC preparativa tres compuestos puros. A pesar de que los compuestos aislados, 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo, bisnoryangonina y 4,6-decadien-1,3,8-triol fueron anteriormente descritos se demostró la promisoría actividad antistafilococcica de la bisnoryangonina.

Finalmente se recorrieron las primeras etapas en la inducción de la producción de los compuestos aislados en cultivos de dicho *G. junonius*. Se estudió la influencia del agregado de agentes epigenéticos sobre la riqueza química de los extractos y la producción de bisnoryangonina (aproximación epigenética de la estrategia OSMAC). Dos diseños experimentales totalizando 13 condiciones de cultivo fueron realizados no obteniéndose resultados favorables en cuanto a aumento en la producción de bisnoryangonina. Sin embargo, la optimización de las condiciones de cultivo mediante la utilización de agentes epigenéticos demostró ser eficiente para la obtención de extractos metabólicamente más ricos con una actividad antimicrobiana similar. Dado que estos agentes interactúan de manera inespecífica en el ADN del microorganismo no se logró incrementar el rendimiento en los compuestos activos aislados. El agregado de precursores biosintéticos o de agentes que interactuaran específicamente en las rutas metabólicas de producción de

dichos metabolitos podría producir un potencial aumento en el rendimiento de los mismos.

3.7. Referencias bibliográficas.

- Baby, S., Johnson, A.J., Govindan, B. (2015) Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, **114**, pp. 66-101.
- Bittencourt, A.M., Gottlieb, O.R., Mors, W.B., Magalhães, M.T., Mageswaran, S., Ollis, W.D., Sutherland, I.O. (1971) The natural occurrence of 6-styryl-2-pyrones and their synthesis. *Tetrahedron*, **27**, pp. 1043-1048.
- Brady, L.R. y Benedict, R.G. (1972) Ocurrence of Bisnoryangonin in *Pholiota squarrosa-adiposa*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **61** (2), pp. 318.
- Das, B., Laxminarayana, K., Krishnaiah, M., Kumar, D.N. (2009) Stereoselective total synthesis of a potent natural antifungal compound (6S)-5,6-dihydro-6-[(2R)-2-hydroxy-6-phenyl hexyl]-2H-pyran-2-one. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**, pp. 6396-6398.
- Dharmaratne, R.W., Nanayakkara, N.P.D., Khan, I.A. (2002) Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry*, **59**, pp. 429-433.
- Findlay, J.A. y He, Z.Q. (1991) Minor constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *Journal of Natural Products*, **54** (1), pp. 184-189.
- Goel, A. y Ram, V.J. (2009) Natural and synthetic 2H-pyran-2-ones and their versatility in organic synthesis. *Tetrahedron*, **65** (38), pp. 7865-7913.
- Hamburger, M., Handa, S.S., Cordell, G.A., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R. (1987) Plant anticancer agents, XLIII. (E,E)-7,12-dioxo-octadeca-8,10-dien-1-oic acid (ostopanic acid), a cytotoxic fatty acid from *Ostodespaniculata*. *Journal of Natural Products*, **50** (2), pp. 281-283.
- Hammerschmidt, L., Wray, V., Lin, W., Kamilova, E., Proksch, P., Aly, A.H. (2012) New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*. *Phytochemistry Letters*, **5**, pp. 600-603.
- Hatfield, G.M. y Brady, L.R. (1969) Ocurrence of Bis-Noryangonin in *Gymnopilus spectabilis*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **58** (10), pp. 1298-1299.

- Hsu, C-L. y Yen, G-C. (2014) Ganoderic Acid and Lucidenic Acid (Triterpenoid). *The Enzymes*, **36**, pp. 33-56.
- Kamperdick, C., Van, N.H., Sung, T.V. (2002) Constituents from *Milusa balansae* (Annonaceae). *Phytochemistry*, **61**, pp. 991-994.
- Kusano, G., Koike, Y., Inoue, H. (1986) The Constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **34** (8), pp. 3465-3470.
- Lee, I-K., Cho, S-M., Seok, S-J., Yun, B-S. (2008) Chemical Constituents of *Gymnopilus spectabilis* and Their Antioxidant Activity. *Mycobiology*, **36** (1), pp. 55-59.
- Lee, I-K. y Yun, B-S (2011) Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. *The Journal of Antibiotics*, **64**, pp. 349-359.
- McCracken, S.T., Kaiser, M., Boshoff, H.I., Boyd, P.D.W., Copp, B.R. (2012) Synthesis and antimalarial and antituberculosis activities of a series of natural and unnatural 4-methoxy-6-styryl-pyran-2-ones, dihydro analogues and photo-dimers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, pp. 1482-1493.
- McGlacken, G.P. y Fairlamb, I.J.S. (2005) 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterization and biological activity. *Natural Product Reports*, **22**, pp. 369-385.
- Paterson, R.R.M. (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactor. *Phytochemistry*, **67**, pp. 1985-2001.
- Singh, Y.N. (1992) Kava: an overview. *Journal of Ethnopharmacology*, **37** (1), pp. 13-45.
- Tanaka, M., Hashimoto, K., Okuno, T., Shirahama, H. (1993) Neurotoxic oligoisoprenoids of the hallucinogenic mushroom, *Gymnopilus spectabilis*. *Phytochemistry*, **34** (3), pp. 661-664.
- Wangun, H.V.K., Härtl, A., Kiet, T.T., Hertweck, C. (2006) Inotilone and related phenylpropanoid polyketides from *Inonotus* sp. and their identification as potent COX and XO inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **4**, pp. 2545-2548.

CAPÍTULO 4
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Procedimientos generales.

Los extractos fueron obtenidos mediante extracción líquido-líquido o maceración según corresponda y posteriormente evaporados a presión reducida a temperatura menor de 40 °C. Los solventes utilizados fueron puros para análisis o destilados sobre vidrio, para aquellas técnicas que lo requirieran fueron utilizados solventes de calidad superior.

Todos los procedimientos microbiológicos fueron realizados en condiciones asépticas. Los materiales y reactivos utilizados fueron previamente esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).

Los extractos fueron estudiados por cromatografía en capa fina para tener un perfil de metabolitos secundarios que permita descartar extractos con compuestos conocidos y seleccionar entre extractos con perfiles similares (Andersen, 2008; Bradshaw, 2001; Cardellina, 1993; Frisvad, 2007; Larsen, 2005; Mitova, 2008).

Las cromatografías en capa fina se desarrollaron en placas de TLC de silica gel Polygram® SIL G/UV₂₅₄, 0,20 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Para la realización de screening químico se utilizaron diversos sistemas de fase móvil y reactivo revelador (Tabla 4.1.).

Grupo de compuestos	Fase móvil	Revelador
Alcaloides	CH ₂ Cl ₂ /MeOH/NH ₄ OH 90:10:1	Draggendorf
Cumarinas y polifenoles	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5	UV (366 nm)
Polifenoles	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 85:15	Fast blue seguido de NH ₄ OH (v)
Terpenoides	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5	Vainillina/H ₂ SO ₄ seguido de calentamiento
Triterpenos y esteroides	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5	CuSO ₄ /H ₃ PO ₄ seguido de calentamiento

Tabla 4.1. Sistemas de fase móvil y reactivo revelador utilizados en el screening químico.

En etapas posteriores, las cromatografías en capa fina fueron realizadas usando como fase móvil CH₂Cl₂/MeOH 90:10 y como reactivo revelador CuSO₄/H₃PO₄ seguido de calentamiento.

Preparación de reactivos reveladores.

Draggendorf: Para preparar la solución A fueron disueltos 1,7 g de nitrato de bismuto (III) y 20 g de ácido tartárico en 80 mL de agua destilada. Para preparar la solución B fueron disueltos 16 g de ioduro de potasio en 40 mL de agua destilada. La solución stock fue obtenida a partir de la mezcla de partes iguales de las soluciones A y B. Para preparar el reactivo revelador fueron disueltos 10 g de ácido tartárico en 50 mL de agua destilada y se adicionaron posteriormente 10 mL de la solución stock (Merck, 1974).

Fast blue: Fueron disueltos 0,5 g de cloruro de 3,3'-dimetoxibifenil-4,4'-bis-diazonio (Fast Blue Salt B) en 100 mL de agua destilada (Wagner, 1996).

Vainillina/H₂SO₄: Fueron disueltos 1 g de vainillina en 100 mL de ácido sulfúrico al 97% (Merck, 1974).

CuSO₄/H₃PO₄: Fueron disueltos 50 g de sulfato de cobre (II) y 50 g de ácido fosfórico en 500 mL de agua.

4.3. Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Los análisis por GC-MS fueron realizados utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu QP 2010 Ultra, con columna capilar HP 5MS (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) y utilizando ionización por impacto electrónico, con una aceleración de 70 eV. Las condiciones utilizadas fueron: temperatura inyector: 280 °C, temperatura fuente de ionización y temperatura interface: 300 °C, gas portador y flujo: Helio a 1,0 mLmin⁻¹, modo split (radio de split 1:10), volumen de inyección: 1 µL, programa de temperatura: 3 minutos a 150 °C, de 150 °C a 300 °C a 10 °Cmin⁻¹ y finalmente 5 minutos a 300 °C, modo de adquisición: SCAN, rango de masas: m/z 35,0 a 500,0. Los espectros fueron analizados con el software GC-MS Solution utilizando la biblioteca de referencia NIST08.

4.4. Espectrometría de Masas por infusión directa.

Los análisis de espectroscopía de masas (MS) fueron realizados en un espectrómetro de masas con trampa iónica lineal LTQ XL (Thermo Scientific, San José, EE. UU.) con fuente ESI en el modo negativo. Las condiciones utilizadas fueron: voltaje del spray: 3,5 kV, voltaje del capilar: -34 V, desplazamiento de las lentes del tubo: -78 V, gas nebulizador y flujo: Nitrógeno a 8 u.a. (unidades arbitrarias), gas auxiliar y flujo: Nitrógeno a 0 u.a., temperatura capilar: 300 °C, modo de adquisición: SCAN, rango de masas: m/z 50 a 800. La muestra se infundió en la fuente ESI usando una bomba de jeringa a un flujo de 5 µlmin⁻¹. El control del instrumento y la recopilación de datos se realizaron con el software Xcalibur (v3.0.63).

4.5. Espectrometría de Masas exacta (HRMS).

Los análisis de espectroscopía de masas (MS) fueron realizados en un equipo Bruker micrOTOF-Q-TOF (Bruker BioSpin, Billerica, EE. UU.) con fuente ESI en el modo positivo.

4.6. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los experimentos de RMN fueron realizados en espectrómetros Bruker Avance DPX 400, Avance III 400 o Avance III 500 (Bruker BioSpin, Billerica, EE. UU.) operando a una frecuencia de ^1H de 400,13 y 500,13 MHz y de ^{13}C de 100,62 y 125,76 MHz respectivamente utilizando como solvente CD_3OD . Los resultados son expresados en ppm relativos a TMS (δ_{H} 0,00) y acetona-*d*6 (δ_{C} 31,00).

Los espectros bidimensionales (H,H-COSY, HSQC y HMBC) fueron realizados utilizando el software Bruker con las secuencias de pulsos estándar proporcionadas por los instrumentos.

El análisis de multipletes y constantes de acoplamiento fue realizado utilizando las rutinas disponibles en MNova 10.0 (Mestrelab Research, S.L., Santiago de Compostela, España).

4.7. Cromatografía Líquida acoplada a Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).

Los análisis por HPLC-DAD fueron realizados utilizando un cromatógrafo líquido Hewlett Packard Series 1050, con columna Nucleosil® 100-5 C18 (125 mm x 4 mm x 5 μm) (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y utilizando detector de arreglo de diodos. Las condiciones utilizadas fueron: temperatura: temperatura ambiente, fase móvil y flujo: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ a 1,0 mLmin^{-1} , volumen de inyección: 20 μL , programa de elución: de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 70:30 a $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 0:100 en 30 min, 10 min en $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 0:100, de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 0:100 a $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 70:30 en 5 min y finalmente 10 min en $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 70:30, longitudes de onda evaluadas: 210 nm, 244 nm, 280 nm, 360 nm y 366 nm.

Los cromatogramas fueron analizados con el software HP ChemStation for LC 3D.

Los blancos correspondientes a cada uno de los agentes epigenéticos agregados fueron realizados tomando en cuenta los factores de concentración correspondientes al método. Para el cálculo de los factores de concentración se consideró un consumo o transformación nula del agente por parte del microorganismo, una recuperación completa del mismo en la extracción y un bajo rendimiento de extracto.

4.8. Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (UHPLC-MS).

Los análisis por UHPLC-MS fueron realizados en un cromatógrafo líquido Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) Systems (Dionex, Germering, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica lineal LTQ XL (Thermo Scientific, San José, EEUU) con interface ESI. La separación cromatográfica fue realizada en una columna Hypersil Gold RP C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,9 μm) (Thermo Scientific, San José, EEUU). Las condiciones utilizadas fueron: temperatura: 35 °C, fase móvil y flujo: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH a $0,3 \text{ mLmin}^{-1}$, volumen de inyección: 20 μL , programa de elución: de $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH 70:30 a $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH 0:100 en 15 min, 5 min en $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH 0:100, de $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH 0:100 a $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH 70:30 en 5 min y finalmente 5 min en $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ ácido fórmico/MeOH 70:30. El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo utilizando las siguientes condiciones para la interface ESI: voltaje del spray: 3,5 kV, voltaje del capilar: -34 V, desplazamiento de las lentes del tubo: -78 V, gas nebulizador y flujo: Nitrógeno a 20 u.a. (unidades arbitrarias), gas auxiliar y flujo: Nitrógeno a 20 u.a., temperatura capilar: 300 °C, modo de adquisición: SCAN, rango de masas: m/z 50 a 800. El control del instrumento y la recopilación de datos se realizaron con el software Xcalibur (v3.0.63).

4.9. Mantenimiento y conservación de los microorganismos.

Los microorganismos utilizados pertenecen a las Colecciones de Cepas de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales y la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad de la República. Las bacterias se encuentran almacenadas en la forma de suspensión de células en glicerol 12% a -86 °C. Los hongos se encuentran preservados en agar extracto de malta (BD, Sparks, EE. UU.) al 2% a temperatura ambiente bajo aceite mineral.

Para la utilización diaria, los microorganismos se encontraban almacenados a 8 °C en placas de Petri conteniendo agar Mueller Hinton II (BBL, Sparks, EE. UU.), agar tripticasa de soja (Bacto, Detroit, EE. UU.) o agar nutriente (BD, Sparks, EE. UU.) para bacterias y agar extracto de malta o agar papa dextrosa (Merck, Darmstadt, Alemania) para hongos.

4.10. Material biológico en estudio.

Las cepas utilizadas para cultivos fúngicos son hongos filamentosos pertenecientes al grupo de los Basidiomicetes que se encuentran depositadas en la Colección de Cepas de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad de la República (Tabla 4.2.). Dicha colección consta de más de 120 aislamientos de cepas presentes en montes comerciales de *Eucalyptus globulus* obtenidos en el transcurso del proyecto INIA-LIA 056. Para su identificación los cuerpos de fructificación colectados fueron sometidos a estudios macro y micromorfológicos y comparados con descripciones en la literatura y con material de referencia de herbario. Cultivos puros obtenidos a partir de los cuerpos de fructificación fueron depositados y preservados en agar extracto de malta al 2% a temperatura ambiente bajo aceite mineral en la Colección de Cepas de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad de la República. Discos de micelio del borde de la colonia fueron inoculados en el centro de una placa de Petri conteniendo agar extracto de malta al 1,5%. Las colonias fueron descritas por la metodología propuesta por Nakasone (Nakasone, 1990). Del mismo modo, la presencia de enzimas

oxidativas extracelulares fue realizada utilizando los sustratos propuestos por Stalpers (Stalpers, 1978). Los espacios internos de transcripción (ITS, por sus siglas en inglés) del genoma fueron amplificados con los primers ITS1F e ITS4B. Su secuencia fue comparada con la base de datos de GenBank mediante BLAST.

Los cuerpos de fructificación de *Gymnopilus junonius* utilizados para el aislamiento de compuestos bioactivos fueron comprados en el Mercado Agrícola de Montevideo (Montevideo, Montevideo) e identificados como se describió anteriormente.

<i>Abortiporus biennis</i> CCMG 106
<i>Panus tigrinus</i> CCMG 207
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCMG 210
<i>Inocutis jamaicensis</i> CCMG 219
<i>Phlebiopsis gigantea</i> CCMG 223
<i>Stereum sanguinolentum</i> CCMG 236
<i>Laetiporus sulphureus</i> CCMG 247
Basidiomycota CCMG 301
<i>Peniophora</i> sp. CCMG 303
Basidiomycota CCMG 323
<i>Dictyopanus pusillus</i> CCMG 333
<i>Trametes hirsuta</i> CCMG 356
<i>Phlebiopsis gigantea</i> CCMG 362
<i>Bjerkandera adusta</i> CCMG 3146
<i>Inocutis jamaicensis</i> CCMG 5091
<i>Ganoderma resinaceum</i> CCMG 7187
<i>Trametes hirsuta</i> CCMG CMI2
<i>Punctularia atropurpurens</i> CCMG Pu
<i>Gymnopilus junonius</i> CCMG SA1

Tabla 4.2. Cepas utilizadas para cultivos fúngicos.

4.11. Cultivo.

Los micelios de hongo fueron cultivados en placas de Petri con agar extracto de malta a 28 °C y tres discos de 0,9 cm de diámetro se transfirieron a frascos de 660 mL que contiene 200 mL de caldo extracto de malta. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo durante 24 días a 28 °C.

4.11.1. Cultivo a escala de *Laetiporus sulphureus* CCMG 247.

El primer ciclo de fermentación constó de dos frascos de 660 mL y 2 erlenmeyers de 2000 mL que contienen 1000 mL de caldo extracto de malta inoculados con quince discos de 0,9 cm de diámetro. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo durante 24 días a 28 °C.

El segundo y tercer ciclo de fermentación constaron de once frascos de 660 mL cuyas fermentaciones fueron llevadas a cabo en las condiciones descriptas inicialmente.

4.11.2. Cultivo a escala de *Ganoderma resinaceum* CCMG 7187.

El primer ciclo de fermentación constó de dos frascos de 660 mL y 2 erlenmeyers de 2000 mL que contienen 1000 mL de caldo extracto de malta inoculados con quince discos de 0,9 cm de diámetro. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo durante 24 días a 28 °C.

El segundo ciclo de fermentación constó de once frascos de 660 mL cuyas fermentaciones fueron llevadas a cabo en las condiciones descriptas inicialmente.

4.11.3. Estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para *Laetiporus sulphureus* CCMG 247.

El diseño experimental Plackett-Burman es utilizado para identificar los factores más importantes a principios de la fase de experimentación. Desarrollado en 1946 por los estadísticos Robin L. Plackett y J.P. Burman (Plackett, 1946), es un método eficiente de cribado para identificar los factores principales usando el menor número posible de experimentos. Sirve para estudiar $k = n-1$ variables en n experimentos donde n es un múltiplo de 4. En los diseños Plackett-Burman los efectos principales tienen una complicada relación de confusión con las interacciones de dos factores. Por lo tanto, estos diseños se deben utilizar para estudiar los efectos principales cuando se puede asumir que las interacciones de dos vías son insignificantes.

Para el estudio de la influencia de variables en las condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos de interés se utilizó un diseño Plackett-Burman para identificar los factores más importantes y dos diseños factoriales fraccionados para estudiarlos más a fondo. En un diseño factorial fraccionado un subconjunto seleccionado de los experimentos correspondientes a un diseño factorial completo, donde se miden las respuestas con todas las combinaciones de los niveles de los factores, es realizado. Estos diseños son útiles para obtener información sobre los efectos principales y las interacciones de dos factores, presuponiendo que los efectos de orden superior son insignificantes.

Los parámetros evaluados fueron los siguientes: Presencia/ausencia de fuentes de carbono y nitrógeno adicional, agitación/estático, temperatura, medio de cultivo (caldo extracto de malta o extracto de levadura con suplemento (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra)), pH y tiempo de incubación.

Las fuentes de carbono y nitrógeno adicional utilizadas fueron glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania) y tartrato de amonio (Sigma, Saint Louis, EE. UU.).

Primer diseño experimental (Plackett-Burman)

Experimento	Glucosa (gL ⁻¹)	Agitación	Temperatura (°C)	Tartrato de amonio (gL ⁻¹)	Medio	pH	Tiempo (d)
1	0	1	28	0	YES	7	40
2	0	0	20	0	CM	5	20
3	0	0	28	0	YES	7	20
4	20	0	20	0	YES	5	40
5	0	0	20	2	CM	7	40
6	20	1	28	0	CM	5	40
7	20	1	20	0	CM	7	20
8	20	0	28	2	YES	5	20
9	0	1	20	2	YES	5	40
10	0	1	28	2	CM	5	20
11	20	1	20	2	YES	7	20
12	20	0	28	2	CM	7	40

Medio de cultivo: Caldo extracto de malta (CM).

Extracto de levadura con suplemento (YES).

Tabla 4.3. Primer diseño experimental (Plackett-Burman).

Segundo diseño experimental (Factorial fraccionado)

Experimento	Temperatura (°C)	Tartrato de amonio (gL ⁻¹)	Medio	pH	Tiempo (d)
1	20	0	YES	7	20
2	20	2	YES	5	20
3	28	0	CM	5	20
4	20	0	CM	7	40
5	24	1	YES	6	30
6	20	2	CM	5	40
7	24	1	YES	6	30
8	28	2	YES	7	40
9	24	1	CM	6	30
10	28	2	CM	7	20
11	28	0	YES	5	40
12	24	1	CM	6	30
13	24	1	YES	6	30
14	24	1	CM	6	30

Fuente de Carbono: No.

Agitación: No.

Tabla 4.4. Segundo diseño experimental (Factorial fraccionado).

Tercer diseño experimental (Factorial fraccionado)

Experimento	Agitación	Temperatura (°C)	pH
1	1	28	7
2	0	20	6
3	1	20	7
4	0	28	6
5	0	28	5
6	1	20	6
7	0	20	6
8	0	28	7
9	0	20	7
10	0	20	6
11	1	28	5
12	1	20	5
13	1	28	6
14	0	28	6
15	1	20	6
16	1	20	6
17	0	20	5
18	1	28	6
19	0	28	6
20	1	28	6

Fuente de Carbono: No.

Fuente de Nitrógeno: No.

Medio de cultivo: CM.

Tiempo de incubación: 20 días.

Tabla 4.5. Tercer diseño experimental (Factorial fraccionado).

4.11.4. Estudio de la influencia de agentes epigenéticos sobre la producción de metabolitos de interés (estrategia OSMAC) para *Gymnopilus junonius* CCMG SA1.

Los agentes epigenéticos evaluados fueron N-acetilglucosamina (Sigma, Saint Louis, EE. UU.), ácido butírico (Sigma, Saint Louis, EE. UU.) y divalproato de sodio (Roemmers, Montevideo, Uruguay). Cada experimento fue realizado por triplicado y las fermentaciones fueron llevadas a cabo en las condiciones descriptas inicialmente.

Primer diseño experimental

Experimento	N-acetilglucosamina (μM)	Divalproato de sodio (μM)	Ácido butírico (μM)
1	0	0	0
2	15	0	0
3	0	15	0
4	0	0	15
5	15	15	0
6	15	0	15

Medio de cultivo: CM.

Tabla 4.6. Primer diseño experimental.

Segundo diseño experimental

Experimento	N-acetilglucosamina (μM)	Divalproato de sodio (μM)	Ácido butírico (μM)
1	100	0	0
2	100	15	0
3	100	100	0
4	15	100	0
5	100	0	15
6	100	0	100
7	15	0	100

Medio de cultivo: CM.

Tabla 4.7. Segundo diseño experimental.

4.12. Extracción.

Para ensayar los compuestos producidos durante el crecimiento activo y la fase de depleción de nutrientes, los cultivos fueron filtrados y el caldo sobrenadante fue extraído con acetato de etilo, acidificado y re-extraído con acetato de etilo. El pellet de células obtenido en la filtración fue extraído con metanol. Los extractos fueron evaporados y retomados en los solventes apropiados para obtener soluciones de $2,5 \text{ mgmL}^{-1}$.

4.13. Determinación de espectro antimicrobiano.

Determinación de actividad antimicrobiana de extractos de cultivos fúngicos.

En la etapa de screening, la actividad contra bacterias y hongos fue determinada de acuerdo a la técnica de agar overlay de Rhalison y colaboradores (1991). Los patógenos humanos utilizados en los ensayos biológicos fueron *Staphylococcus aureus* (cepas meticilino resistentes ATCC 43300 y ATCC 700699 y cepa meticilino sensible ATCC 6538p) y *Pseudomonas aeruginosa* CCMG 312. Los microorganismos fitopatógenos utilizados fueron: *Xanthomonas vesicatoria* CCMG 28m, *Penicillium expansum* CCMG 14s, *Alternaria alternata* CBS 54027 y *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. Para estudios posteriores, la actividad contra bacterias y hongos fue determinada mediante discos. Los microorganismos fitopatógenos utilizados fueron: *Xanthomonas vesicatoria* CCMG 10 y CCMG 28m, *Botrytis cinerea* CCMG 14g, *Alternaria alternata* CBS 54027, *Fusarium graminearum* NRRL 31084 (Colección USDA), *Penicillium expansum* CCMG 14s, *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 y *Rhizopus stolonifer* (+) ATCC 6227b.

*Determinación de actividad antimicrobiana de extractos de cuerpos de fructificación de *Gymnopilus junonius* y aislamiento bioquímico de compuestos activos.*

La actividad contra patógenos humanos fue determinada de acuerdo a la técnica de agar overlay de Rhalison y colaboradores (1991), mientras que la actividad contra bacterias y hongos fitopatógenos fue determinada mediante discos de papel como reservorio.

En la etapa de screening, los patógenos humanos utilizados en los ensayos biológicos fueron los microorganismos pertenecientes al grupo denominado ESKAPE (Boucher, 2009; Pendleton, 2013) *Enterococcus faecalis* CCMG 632, *Staphylococcus aureus* (cepas meticilino resistentes ATCC 43300 y ATCC 700699 y cepa meticilino sensible ATCC 6538p), *Klebsiella pneumoniae* CCMG 150

12716, *Acinetobacter baumannii* CCMG 232, *Pseudomonas aeruginosa* CCMG 312 y *Enterobacter cloacae* CCMG 133. Otras cuatro cepas de *S. aureus*, aislados clínicos de daño tisular, uno sin aumento de la resistencia a los antibióticos en uso (FQ 4) y tres meticilino resistentes (MRSA), con susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina, eritromicina y oxacilina (FQ 380), oxacilina y eritromicina (FQ 341) y oxacilina (FQ 317) se utilizaron en los ensayos.

Los microorganismos fitopatógenos utilizados fueron: *Xanthomonas vesicatoria* CCMG 10 y CCMG 28m, *Botrytis cinerea* CCMG 14g, *Alternaria alternata* CBS 54027, *Fusarium graminearum* NRRL 31084 (Colección USDA), *Penicillium expansum* CCMG 14s, *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 y *Rhizopus stolonifer* (+) ATCC 6227b.

Para el seguimiento del aislamiento de compuestos activos se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.

4.13.1. Técnicas utilizadas.

Bioautografía en capa de agar (Agar overlay)

Un medio de cultivo elegido adecuadamente y fundido es inoculado con la bacteria o el hongo de interés, y luego cuidadosamente distribuido sobre una placa cromatográfica sembrada con los extractos de manera que forme una capa delgada al solidificar. Una vez incubado en las condiciones requeridas, si no es posible la detección directa, se tiñe con reactivos reveladores de actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se observan halos de inhibición no cuantitativos.

- Sembrar los extractos en placas de TLC. Para el seguimiento del aislamiento de compuestos activos desarrollar dos cromatogramas en forma simultánea y en uno de ellos eliminar los solventes utilizados como fase móvil por evaporación (corriente de aire). Incluir controles negativos (solventes) y positivo (gentamicina 5 mgmL⁻¹ para bacterias y propiconazol 5 mgmL⁻¹ para hongos).

- Preparar un inóculo de 10^8 ufc mL^{-1} para bacterias o de 10^7 esporas mL^{-1} para hongos filamentosos en suero fisiológico (NaCl 0,9%) o Tween (Tween 80 0,1%) respectivamente.
- Fundir 50 mL de medio de cultivo (agar Mueller Hinton II o agar tripticasa de soja para *S. aureus*, agar nutriente para *X. vesicatoria* y agar extracto de malta para hongos) y mantenerlo termostatizado a 42-45 °C.
- Inocular el medio de cultivo fundido y termostatizado y agitar hasta lograr perfecta homogeneidad.
- Introducir la placa de TLC o el cromatograma en una placa de Petri y volcar el medio de cultivo inoculado sobre su superficie utilizando una pipeta Pasteur de forma tal que quede un delgado film sobre el cromatograma.
- Incubar hasta observar desarrollo (35 ± 2 °C, 24 hs. para *S. aureus*, 48 hs. para *X. vesicatoria* y 28 ± 2 °C, 48 hs. para hongos).
- En caso de utilizar bacterias como microorganismo blanco, para mejorar la observación y reducir el tiempo de espera puede teñirse la placa con reveladores de actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se preparan soluciones en agua de concentración aproximada 1-2 mg mL^{-1} de cualquiera de las sales de tetrazolio (violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT) o cloruro de 2,3,5-difeniltetrazolio (TTZ)). Puede ser necesario colocar nuevamente la placa en estufa un corto tiempo después de la tinción. En caso de estar realizando el seguimiento del aislamiento de compuestos activos revelar el cromatograma testigo con un revelador adecuado y comparar.

Método de difusión (Discos)

Puesta a punto

Los microorganismos fitopatógenos utilizados para la puesta a punto fueron: *X. vesicatoria* CCMG 10 y CCMG 28m, *B. cinerea*, *A. alternata*, *F. graminearum*, *P. expansum*, *A. oryzae* y *R. stolonifer*.

- Selección de técnica de siembra.

Se evaluaron siembras en superficie e incorporada de un inóculo de 10^8 ufc mL^{-1} para bacterias y de 10^7 esporas mL^{-1} para hongos filamentosos en suero fisiológico o Tween respectivamente. Se utilizó agar nutriente para bacterias y agar extracto de malta para hongos como medios de cultivo.

- Selección del control positivo.

Para las cepas de *X. vesicatoria* se evaluaron cinco antibióticos (amoxicilina, ampicilina, gentamicina, norfloxacin y oxacilina) a una concentración de $20 \mu g mL^{-1}$. Para los hongos se evaluaron seis fungicidas (anfotericina B, ketoconazol, kresoxim metil, lufenuron, nistatina y propiconazol) en diversas concentraciones (Tabla 4.8.).

Las concentraciones más altas de kresoxim metil, lufenuron y propiconazol (200 , 100 y $125 \mu g mL^{-1}$ respectivamente) corresponden a las concentraciones de uso en la agricultura de dichos fungicidas.

En los ensayos se utilizaron discos de $12,7$ mm de diámetro y un volumen de siembra de $100 \mu L$. Se realizó siembra en superficie de un inóculo de 10^8 ufc mL^{-1} para bacterias y de 10^7 esporas mL^{-1} para hongos filamentosos en suero fisiológico o Tween respectivamente. Se utilizó agar nutriente para bacterias y agar extracto de malta para hongos como medios de cultivo.

Fungicida	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Anfotericina B	20
Ketoconazol	20
Kresoxim metil	200
	20
Lufenuron	100
	20
Nistatina	20
Propiconazol	125
	20

Tabla 4.8. Fungicidas evaluados.

- Selección del tamaño y tiempo de secado de los discos

Se evaluó la cantidad de acetato de etilo mínima necesaria para embeber discos de 5 y 12,7 mm de diámetro.

Para evaluar el tiempo de secado se utilizaron discos de 5 mm de diámetro embebidos en 20 μL de MeOH y AcOEt. Los solventes utilizados fueron evaporados (corriente de aire) durante 2 y 24 horas. Se realizó siembra en superficie de un inóculo de 10^8 ufc mL^{-1} para bacterias y de 10^7 esporasm L^{-1} para hongos filamentosos en suero fisiológico o Tween respectivamente. Se utilizó agar nutriente para bacterias y agar extracto de malta para hongos como medios de cultivo.

Técnica optimizada

Un medio de cultivo elegido adecuadamente y fundido es inoculado con la bacteria o el hongo de interés, y luego se coloca sobre su superficie discos embebidos con los extractos. Una vez incubado en las condiciones requeridas, si no es posible la detección directa, se tiñe con reactivos reveladores de actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se observan halos de inhibición no cuantitativos.

- Embeber los extractos en discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro. Eliminar los solventes utilizados por evaporación (corriente de aire) durante dos horas. En caso de utilizar *P. expansum* como microorganismo blanco el tiempo de secado es de 24 horas. Incluir controles negativos (solventes) y positivo (gentamicina 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bacterias y propiconazol 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para hongos).
- Preparar un inóculo de 10^8 ufc mL^{-1} para bacterias o de 10^7 esporas mL^{-1} para hongos filamentosos en suero fisiológico o Tween respectivamente.
- Fundir 50 mL de medio de cultivo (agar nutriente para bacterias y agar extracto de malta para hongos) y volcar una porción en una placa de Petri.
- Inocular en superficie el microorganismo de interés en el medio de cultivo.
- Colocar los discos en la superficie del medio inoculado.
- Incubar hasta observar desarrollo (35 ± 2 °C, 48 hs. para bacterias y 28 ± 2 °C, 48 hs. para hongos).

- En caso de utilizar *X. vesicatoria* como microorganismo blanco, para mejorar la observación y reducir el tiempo de espera puede teñirse la placa con reveladores de actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se preparan soluciones en agua estéril de concentración aproximada 1-2 mg mL^{-1} de cualquiera de las sales de tetrazolio (violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT) o cloruro de 2,3,5-difeniltetrazolio (TTZ)). Puede ser necesario colocar nuevamente la placa en estufa un corto tiempo después de la tinción.

4.14. Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima.

La concentración inhibitoria mínima (MIC) fue determinada por diluciones seriadas de los extractos y compuestos activos según el micrométodo de Eloff (1998) de acuerdo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

- Preparar un inóculo de 10^8 ufc/mL⁻¹ para bacterias o de 10^7 esporas/mL⁻¹ para hongos filamentosos en suero fisiológico (NaCl 0,9%) o Tween (Tween 80 0,1%) respectivamente.
- Disolver los extractos en DMSO para obtener una concentración final de 50 mg/mL⁻¹ o 10 mg/mL⁻¹ según corresponda, para compuestos puros la concentración final deberá ser de 2 mg/mL⁻¹ (solución stock).
- Dispensar 20 µL de la solución stock y 180 µL de caldo Mueller Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) en el primer pocillo de una microplaca. Ensayar todas las muestras por duplicado.
- Dispensar 100 µL de de caldo Mueller Hinton en los siguientes siete pocillos.
- Dispensar 100 µL del primer pocillo en el segundo pocillo y así sucesivamente hasta el noveno pocillo.
- Dispensar 80 µL de de caldo Mueller Hinton y 20 µL de inóculo en los nueve pocillos.
- Cada siguiente pocillo contiene 100 µL de la dilución del pocillo anterior, 80 µL de caldo Mueller Hinton y 20 µL de inóculo. Las concentraciones de los extractos en los pocillos van desde 2500,0 µg/mL⁻¹ a 9,8 µg/mL⁻¹ o 500,0 µg/mL⁻¹ a 1,9 µg/mL⁻¹ según corresponda. Para compuestos puros, las concentraciones en los pocillos van desde 100,0 µg/mL⁻¹ a 0,4 µg/mL⁻¹.
- Ensayar una solución de DMSO (0,05 %, v/v) en caldo Mueller Hinton como control de esterilidad y una solución de DMSO (0,05 %, v/v) en caldo Mueller Hinton inoculada con 20 µL de inóculo como control positivo.
- Ensayar una solución de DMSO (0,05 %, v/v) en caldo Mueller Hinton con 60 µL de antibiótico (gentamicina 500 µg/mL⁻¹ para bacterias y propiconazol 250 µg/mL⁻¹ para hongos) inoculada con 20 µL de inóculo como primer control negativo.

- Ensayar una solución de DMSO (0,05 %, v/v) en caldo Mueller Hinton con 80 μL de antibiótico (gentamicina $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para bacterias y propiconazol $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para hongos) inoculada con 20 μL de inóculo como primer control negativo.
- Incubar la microplaca a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 hs. para bacterias (48 hs. para *X. vesicatoria*) y a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 hs. para hongos.
- Observar desarrollo mediante inspección visual. En caso de utilizar bacterias como microorganismo blanco, agregar 40 μL de una solución de violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT) al 0.1 % en cada pocillo e incubar durante 1-2 hs..
- Previo a la lectura de los resultados deben observarse los Controles: ausencia de desarrollo en control de esterilidad y controles negativos, presencia de desarrollo en control positivo.
- Determinar la Concentración inhibitoria mínima como la mínima concentración en la que no se observa color rojo y/o desarrollo.

4.15. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de *Laetiporus sulphureus* CCMG 247.

53,9 mg de extracto de caldo de cultivo acidificado fueron separados en dos fracciones y cada fracción fue sometida a extracción en fase sólida (SPE) en un cartucho de 1000 mg de sílica modificada con grupo octadecilo como adsorbente Bakerbond™ SPE Octadecyl (C18) (Mallinckrodt Backer, Phillipsburg, EE. UU.). El cartucho fue acondicionado con 3 volúmenes de MeOH previo a la carga del extracto en MeOH. Posteriormente se lava el cartucho con 2 volúmenes de MeOH y se eluye con dos volúmenes de acetona y dos volúmenes de AcOEt. Las fracciones fueron posteriormente analizadas mediante TLC y bioautografía.

Las fracciones metanólicas fueron reunidas y el extracto resultante fue sometido a cromatografía en capa fina preparativa en una placa de TLC de sílica gel Polygram® SIL G/UV₂₅₄, 0,20 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y desarrollada con CH₂Cl₂/MeOH 95:5. La región de retención cromatográfica

correspondiente a $R_f = 0,40$ fue eluída con MeOH obteniéndose el compuesto **0**.

4.16. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de *Gymnopilus junonius*.

Cinco kilogramos de cuerpos de fructificación frescos de *Gymnopilus junonius* fueron extraídos por maceración con 12 L de acetona durante 33 días en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de la evaporación a presión reducida del solvente, se realizó la partición del extracto acuoso resultante con AcOEt (600 mL x 3). La capa orgánica fue separada y evaporada a presión reducida para dar un residuo marrón (8,6 g).

El extracto fue sometido a cromatografía líquida al vacío (VLC) en una columna de 120 g de Silica gel 60 (230-400 mesh ASTM, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) usando elución en gradiente con CH₂Cl₂/MeOH para dar 8 fracciones (A, CH₂Cl₂, 116 mg; B, CH₂Cl₂/MeOH 90:10, ND; C, CH₂Cl₂/MeOH 90:10, 126 mg; D, CH₂Cl₂/MeOH 85:15, 583 mg; E, CH₂Cl₂/MeOH 85:15, 510 mg; F, CH₂Cl₂/MeOH 80:20, 99 mg; G, CH₂Cl₂/MeOH 80:20, 145 mg; H, MeOH, 495 mg). Las fracciones fueron posteriormente analizadas mediante TLC y bioautografía.

Las fracciones más activas (C, D y E) fueron reunidas y el extracto resultante fue sometido a cromatografía líquida al vacío (VLC) en una columna de 120 g de Silica gel 60 (230-400 mesh ASTM, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) usando elución en gradiente con CH₂Cl₂/MeOH para dar 15 fracciones (I, CH₂Cl₂/MeOH 95:5, 6 mg; J, CH₂Cl₂/MeOH 95:5, 11 mg; K, CH₂Cl₂/MeOH 95:5, 13 mg; L, CH₂Cl₂/MeOH 92,5:7,5, 158 mg; M, CH₂Cl₂/MeOH 92,5:7,5, 146 mg; N, CH₂Cl₂/MeOH 90:10, 127 mg; O, CH₂Cl₂/MeOH 90:10, 150 mg; P, CH₂Cl₂/MeOH 85:15, 85 mg; Q, CH₂Cl₂/MeOH 85:15, 111 mg; R, CH₂Cl₂/MeOH 80:20, 29 mg; S, CH₂Cl₂/MeOH 80:20, 16 mg; T, CH₂Cl₂/MeOH 70:30, 25 mg; U, CH₂Cl₂/MeOH 70:30, 16 mg; V, CH₂Cl₂/MeOH 50:50, 13 mg; W, CH₂Cl₂/MeOH 50:50, 10 mg). Las fracciones fueron posteriormente analizadas mediante TLC y bioautografía.

Las fracciones más activas (P, Q y R) fueron reunidas y el extracto resultante fue sometido a cromatografía en columna en una columna de 17 g de Silica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck, Darmstadt, Alemania) usando elución en gradiente con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ para dar 106 fracciones. Las fracciones fueron posteriormente analizadas mediante TLC y bioautografía.

Las fracciones 6 a 16 fueron reunidas y el extracto resultante fue sometido a cromatografía en capa fina preparativa en una placa de TLC de silica gel Polygram® SIL G/UV₂₅₄, 0,20 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y desarrollada con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10. La región de retención cromatográfica correspondiente a $R_f = 0,57$ fue eluída con MeOH obteniéndose el compuesto **1**.

Las fracciones 17 a 42 fueron reunidas y el extracto resultante fue sometido a cromatografía en capa fina preparativa en una placa de TLC de silica gel Polygram® SIL G/UV₂₅₄, 0,20 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y desarrollada con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10. Las regiones de retención cromatográfica correspondientes a $R_f = 0,33$ y $R_f = 0,26$ fueron eluídas con MeOH obteniéndose los compuestos **2** y **3** respectivamente.

4.17. Referencias bibliográficas.

- Andersen, B., Dongo, A., Pryor, B.M. (2008) Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani* and *A. tomatophila*. *Mycological Research* **112**, pp. 241–250.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards Jr., J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009) Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, **48** (1), pp. 1-12.
- Bradshaw, J., Butina, D., Dunn, A.J., Green, R.H., Hajek, M., Jones, M.M., Lindon, J.C., Sidebottom, P.J. (2001) A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. *Journal of Natural Products*, **64** (12), pp. 1541-1544.
- Cardellina II, J.H., Munro, M.H.G., Fuller, R.W., Manfredi, K.P., McKee, T.C., Tischler, M., Bokesch, H.R., Gustafson, K.R., Beutler, J.A., Boyd, M.R. (1993) A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. *Journal of Natural Products*, **56** (7), pp. 1123-1129.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, United States of America.
- Eloff, J.N. (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, **64**, pp. 711-713.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F.J., Ehrlich, K., Samson, R.A. (2007) Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, **59**, pp. 31-37.

- Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F., Hansen, M.E., Frisvad, J.C. (2005) Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*, **22** (6), pp. 672-695.
- Merck, E. (1974) Reagents MERCK Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography. Darmstadt, Germany, pp. 41, 102.
- Mitova, M.I., Murphy, A.C., Lang, G., Blunt, J.W., Cole, A.L.J., Ellis, G., Munro, M.H.G. (2008) Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. *Journal of Natural Products*, **71** (9), pp. 1600-1603.
- Nakasone, K.K. (1990) Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected hymenomycetes from North America. *Mycologia Memoirs*, **15**, pp. 1–412.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **11** (3), pp. 297-308.
- Plackett, R.L. y Burman, J.P. (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, **33** (4), pp. 305-325.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E. (1991) A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, **2**, pp. 199–203.
- Stalpers, J.A. (1978) Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology*, pp. 1–248.
- Wagner, H. y Blatt, S. (1996) Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition. Springer-Verlag. Berlin, Germany, pp. 361.

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones.

Durante el transcurso de este trabajo de investigación se ha ratificado que los hongos, al igual que las plantas, tienen un gran potencial para la producción de metabolitos bioactivos útiles y son un recurso prolífico para la obtención de nuevos antimicrobianos. En el caso de los basidiomicetes nativos esta afirmación se ve sustentada por los resultados obtenidos ya que extractos pertenecientes a diecisiete de las diecinueve cepas fúngicas estudiadas presentaron actividad frente a alguno de los patógenos evaluados.

El espectro de las actividades farmacológicas detectadas de los hongos es muy amplio. Dependiendo del conocimiento cada vez mayor sobre la química, la biotecnología y la biología molecular de los hongos, así como una mejora de los métodos de cribado (cribado de alto rendimiento, genómica y proteómica), se puede esperar un rápido aumento en la aplicación de hongos con fines medicinales (Lindequist, 2005). En el presente trabajo se evaluó la actividad de extractos obtenidos a partir de cultivos y cuerpos de fructificación fúngicos frente a microorganismos usuales en los programas de screening de patógenos humanos así como microorganismos fitopatógenos presentes en los cultivos más importantes del país obteniéndose resultados promisorios.

Uno de los tantos prerequisites para el uso de un extracto o compuesto como droga, nutraceutico u otro propósito es la producción continua de hongos (cultivos fúngicos o cuerpos de fructificación) en cantidades altas y en una calidad estandarizada. Las cepas fúngicas evaluadas presentaron un ínfimo rendimiento a nivel de extracto a pesar de haberse optimizado mediante la aproximación cultivo-dependiente de la estrategia OSMAC las condiciones de cultivo para la cepa más prometedora.

Considerando que el camino inicialmente trazado, del cultivo fúngico al compuesto bioactivo, no dio los resultados esperados se continuó trabajando en el camino inverso.

Tres compuestos aislados a partir de cuerpos de fructificación de *Gymnopilus junionus*, cuya estructura química se elucidó y con actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos y vegetales, fueron utilizados como punto de partida. A través de la aproximación epigenética de la estrategia OSMAC se logró modificar las vías crípticas del microorganismo viéndose esto reflejado en el aumento del tipo de compuestos formados.

5.2. Referencias bibliográficas.

Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W-D. (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2** (3), pp. 285-299.

ANEXO I
MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton II

Agar Mueller Hinton II (BBL)	38 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Agar tripticasa de soja

Agar tripticasa de soja (Bacto)	40 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Agar Extracto de Malta

Extracto de malta (BD)	1,25 g
Agar (BD)	2,00 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Agar Papa Dextrosa (PDA) (Merck)	39 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Agar Nutriente

Agar nutriente (BD)	23 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Caldo Mueller Hinton

Caldo Mueller Hinton (Oxoid)	21 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

Caldo Extracto de Malta (CM)

Extracto de malta (BD)	1,25 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

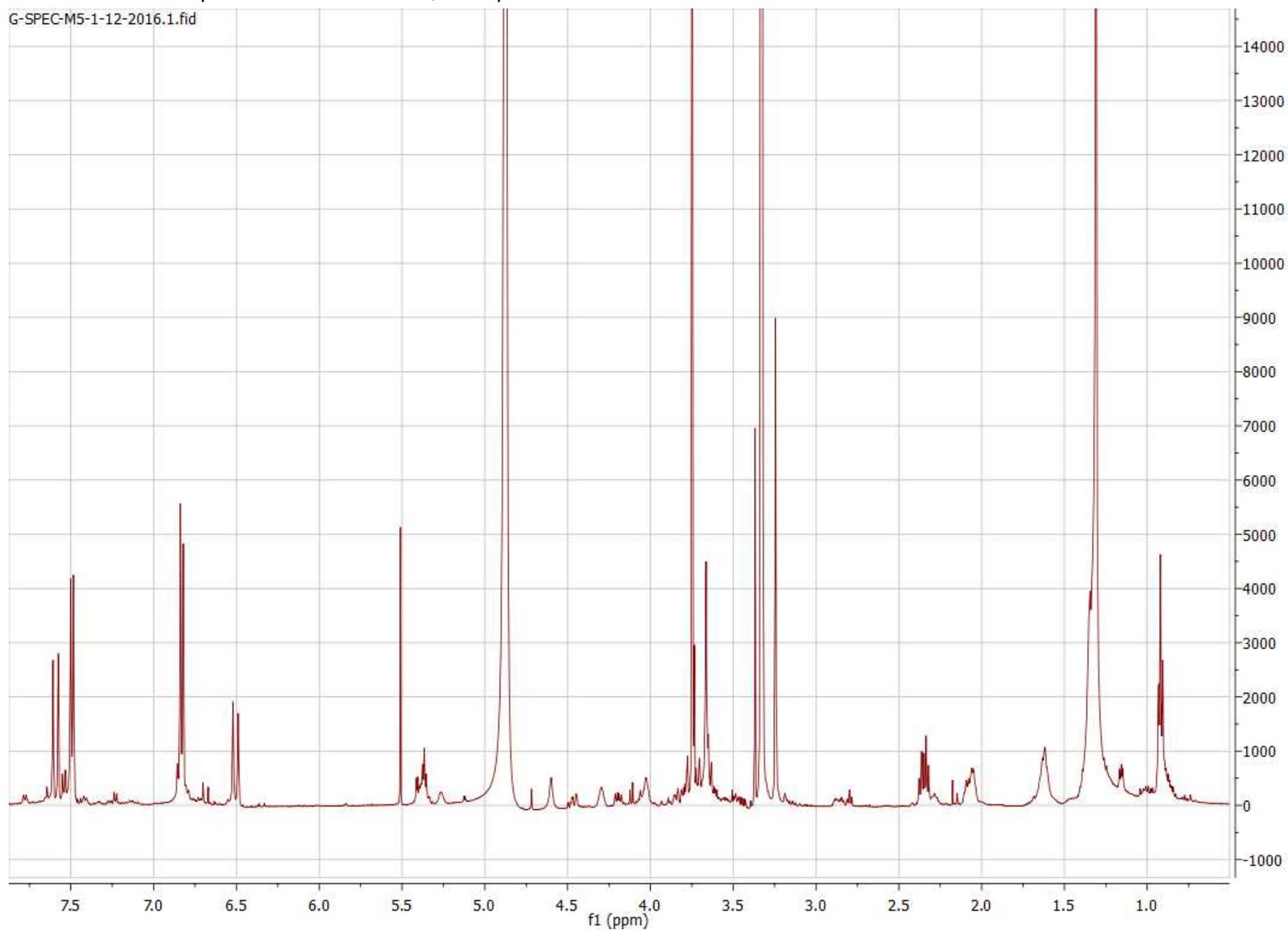
Extracto de levadura con suplemento (YES)

Extracto de levadura (Oxoid)	2 g
Sacarosa (BD)	15 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

ANEXO II
ESPECTROS

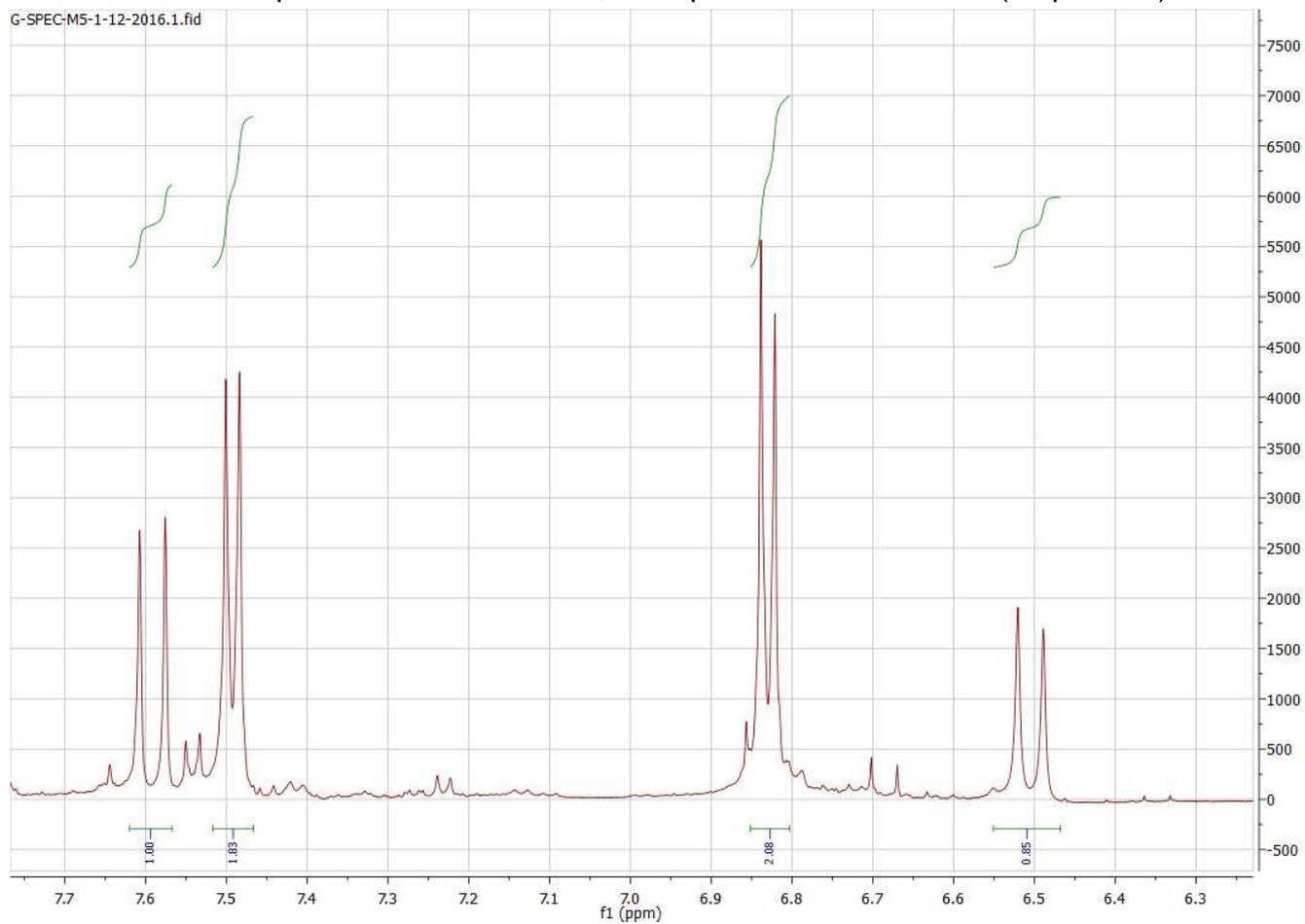
A1. ¹H 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

G-SPEC-M5-1-12-2016.1.fid



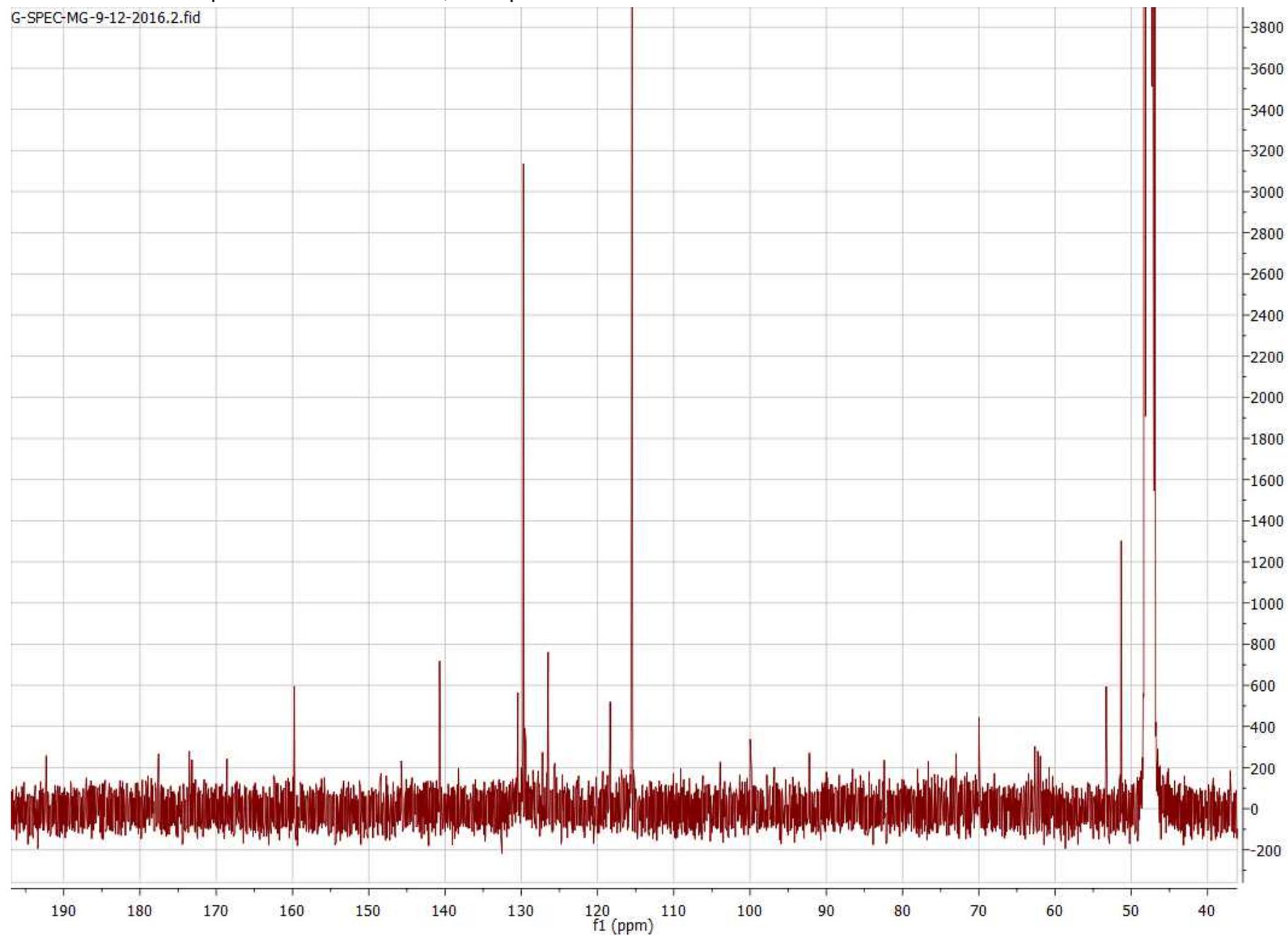
A2. ^1H 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (ampliación).

G-SPEC-M5-1-12-2016.1.fid

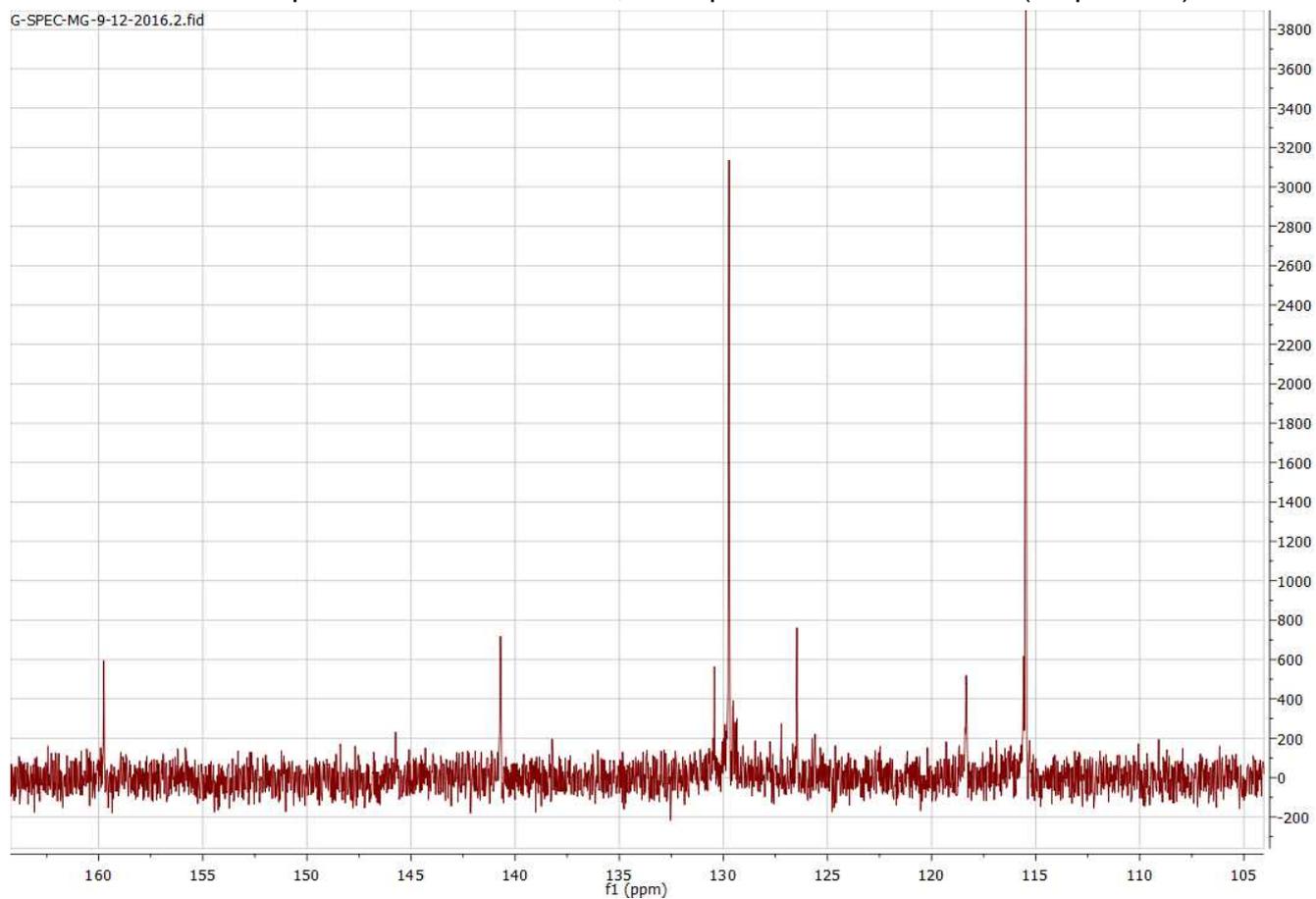


A3. ^{13}C 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

G-SPEC-MG-9-12-2016.2.fid

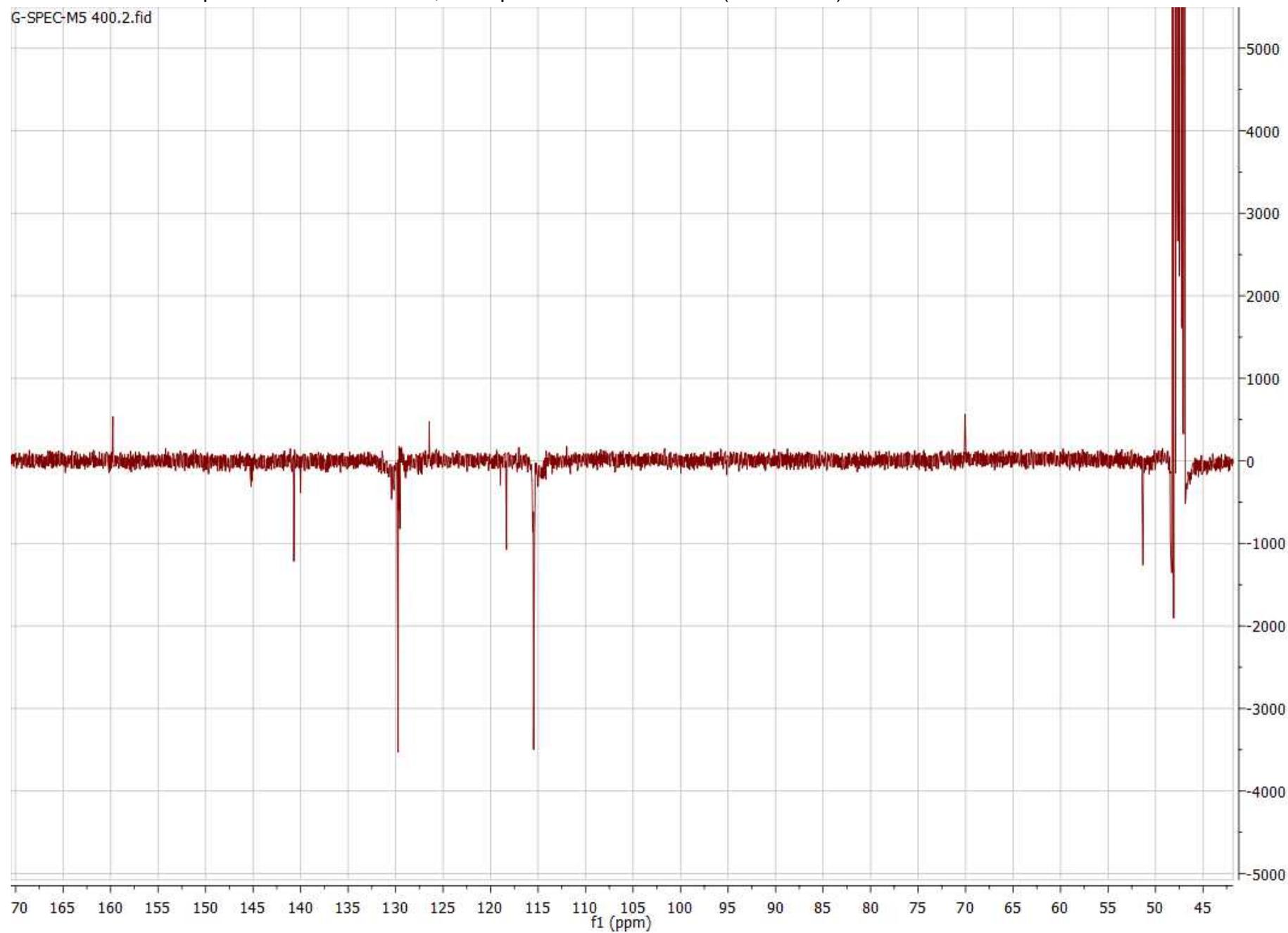


A4. ^{13}C 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (ampliación).

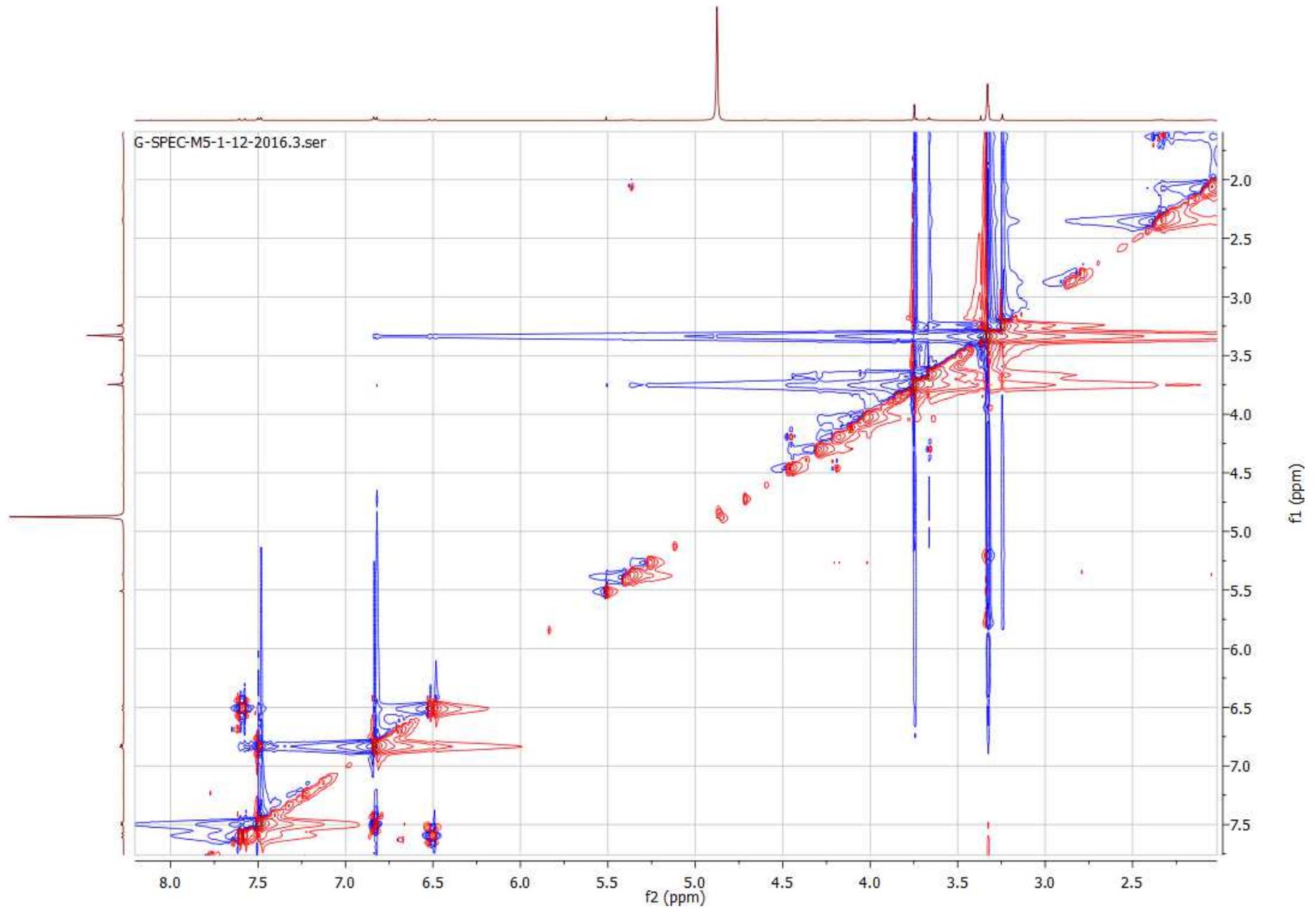


A5. ^{13}C 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (PENDANT).

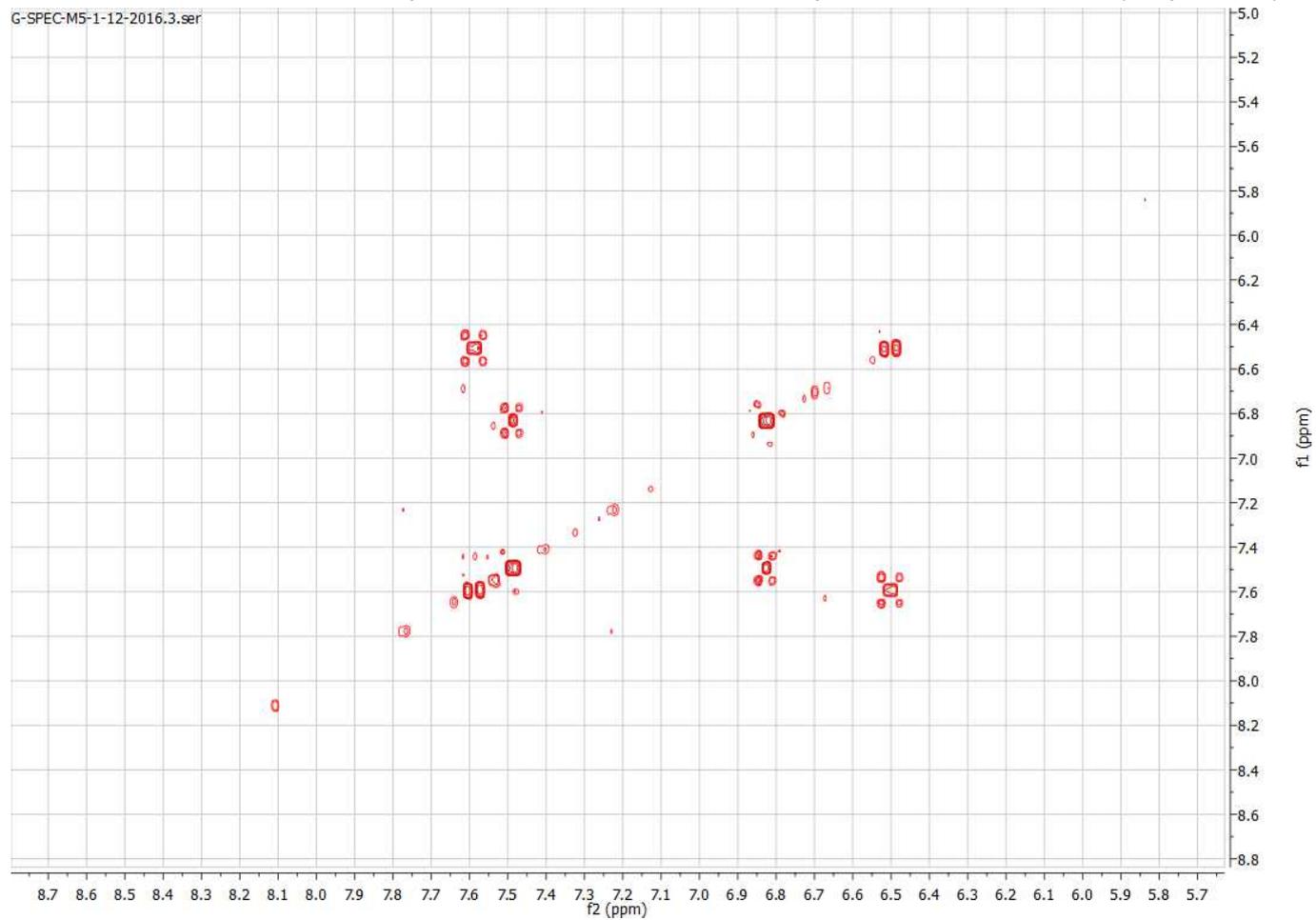
G-SPEC-M5 400.2.fid



A6. ^1H - ^1H COSY 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

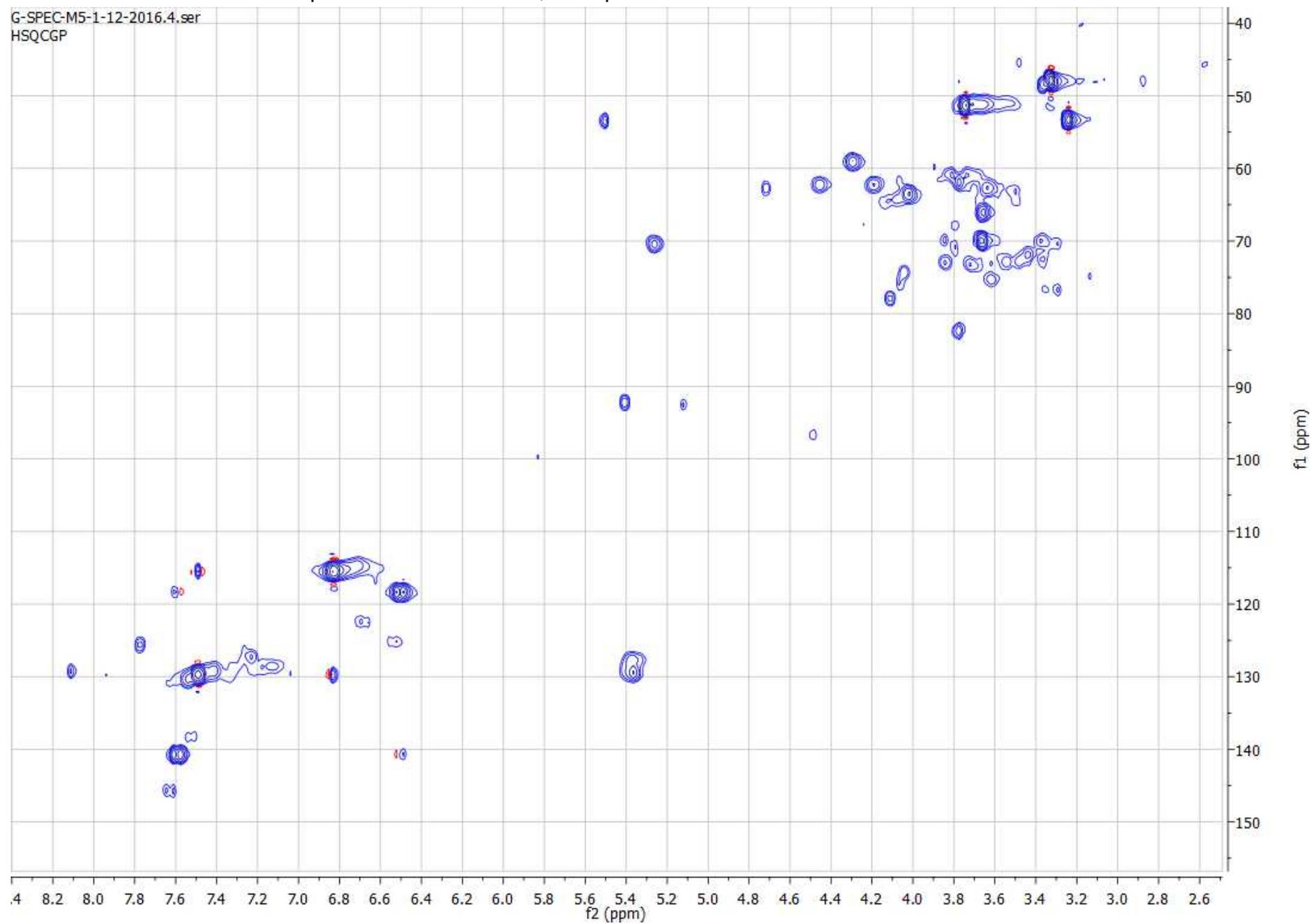


A7. ^1H - ^1H COSY 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (ampliación).



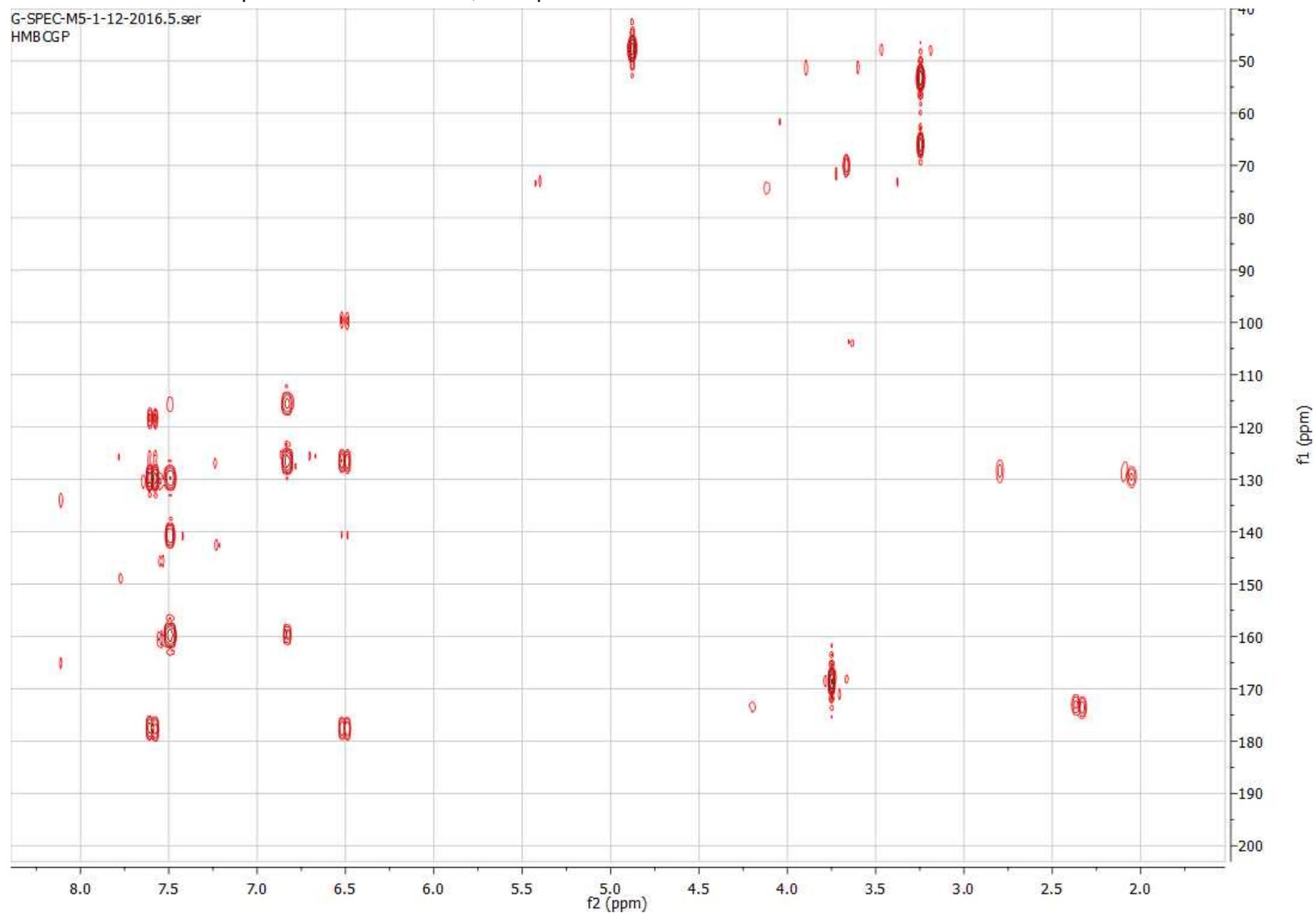
A8. ^1H - ^{13}C HSQC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

G-SPEC-M5-1-12-2016.4.ser
HSQCGP

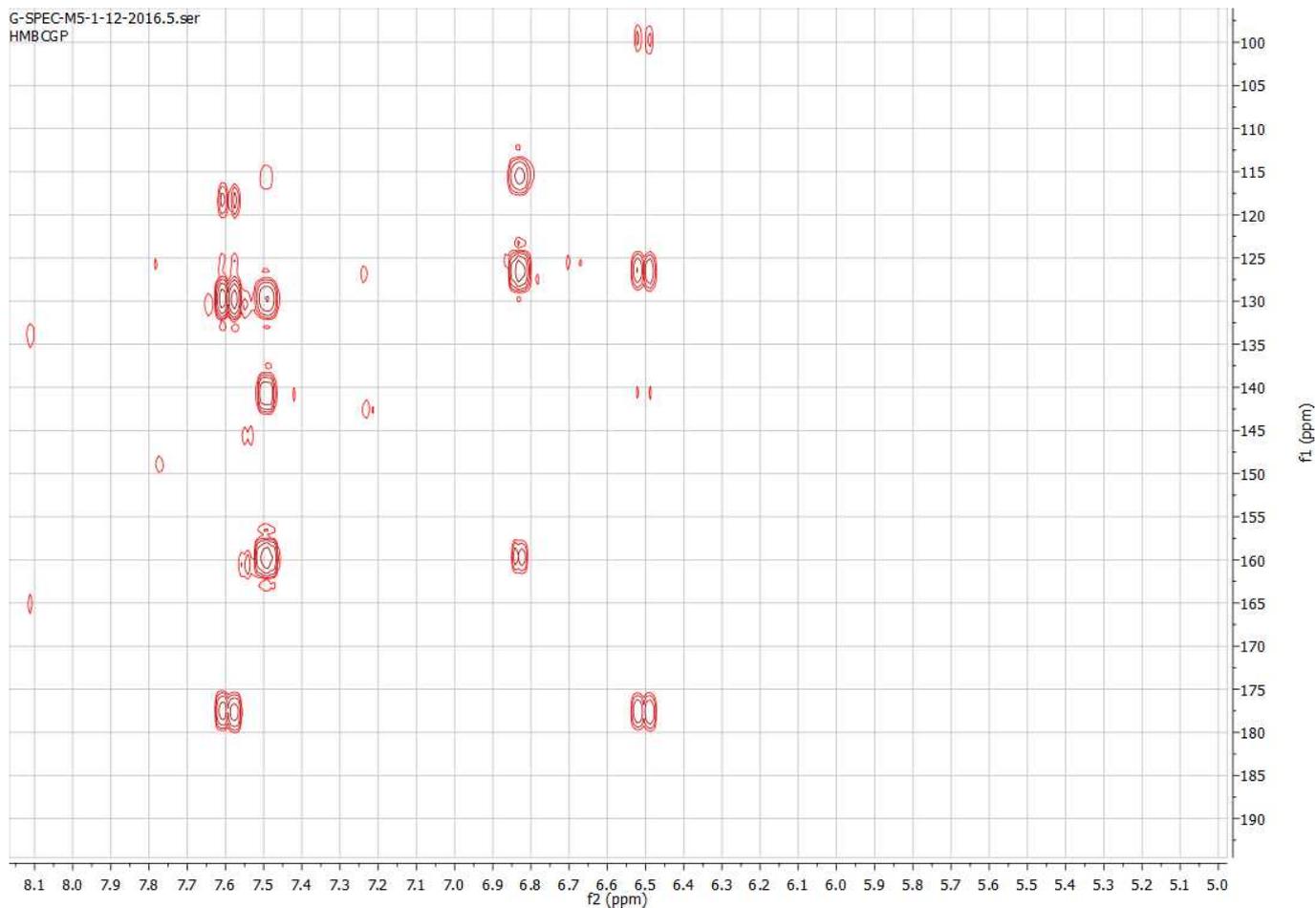


A9. HMBC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.

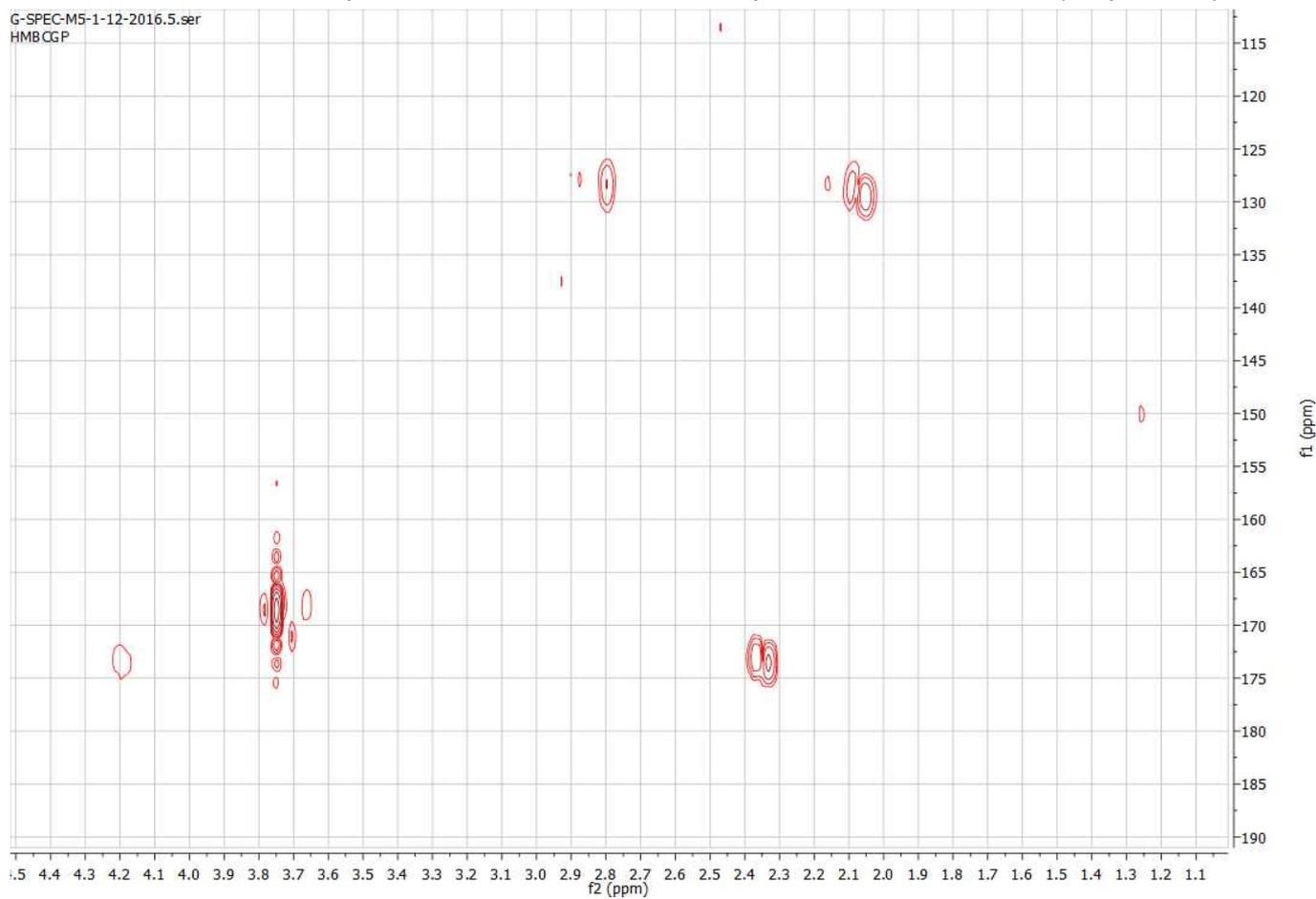
G-SPEC-M5-1-12-2016.5.ser
HMBQGP



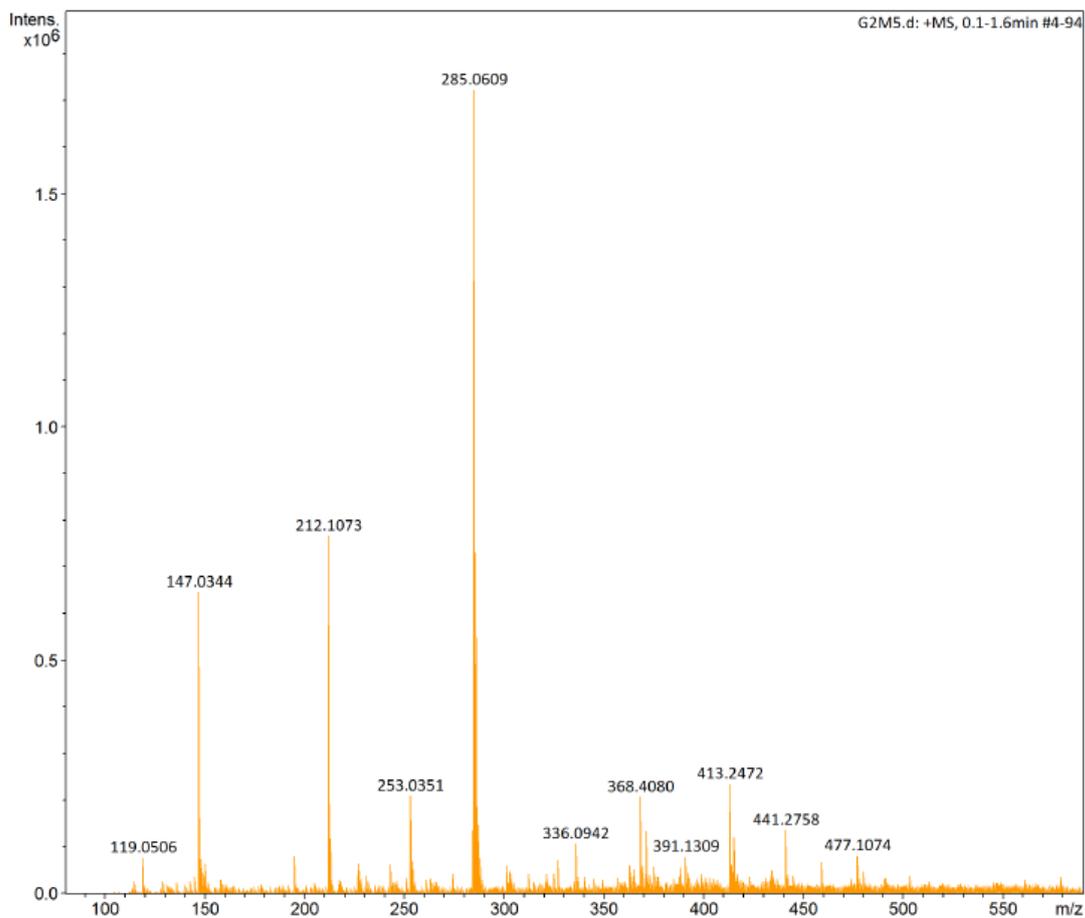
A10. HMBC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (ampliación).



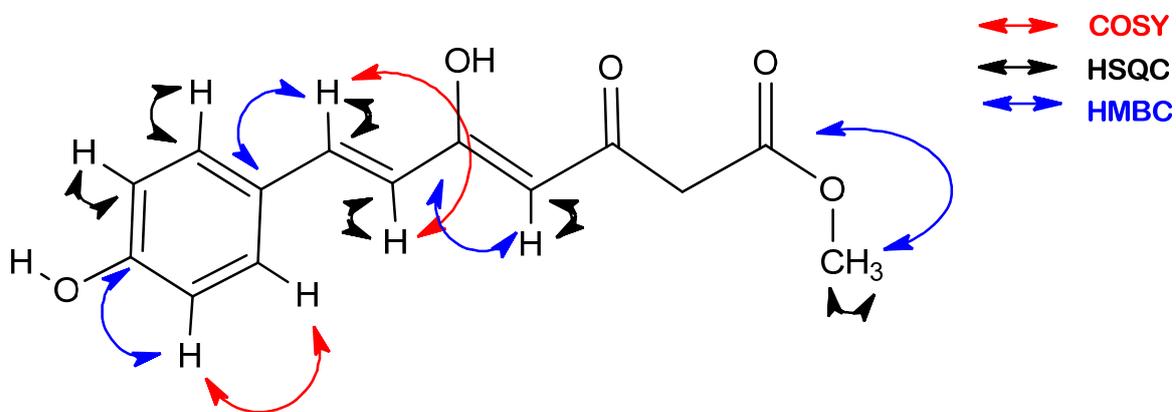
A11. HMBC 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo (ampliación).



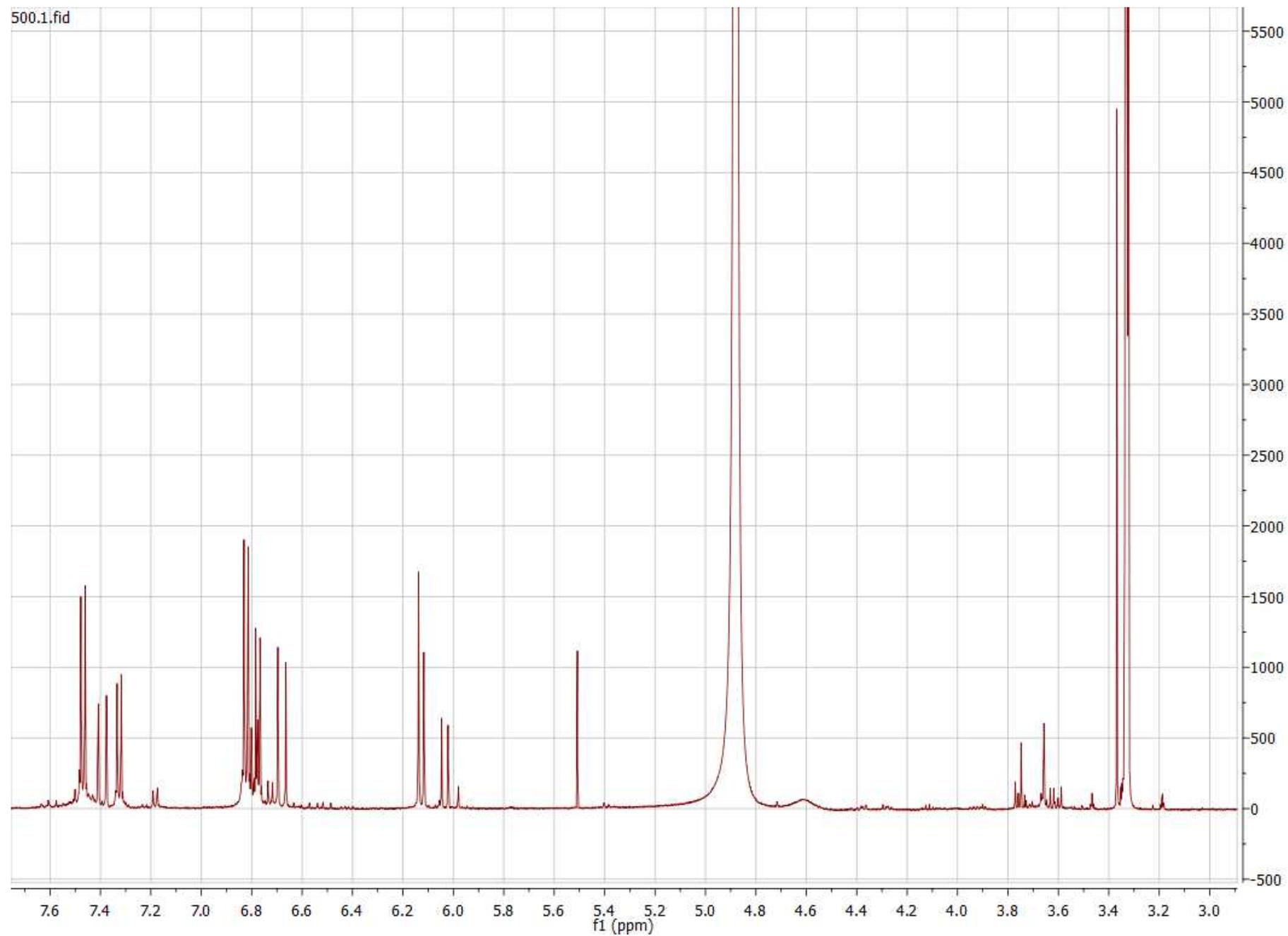
A12. ESI-HRMS 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.



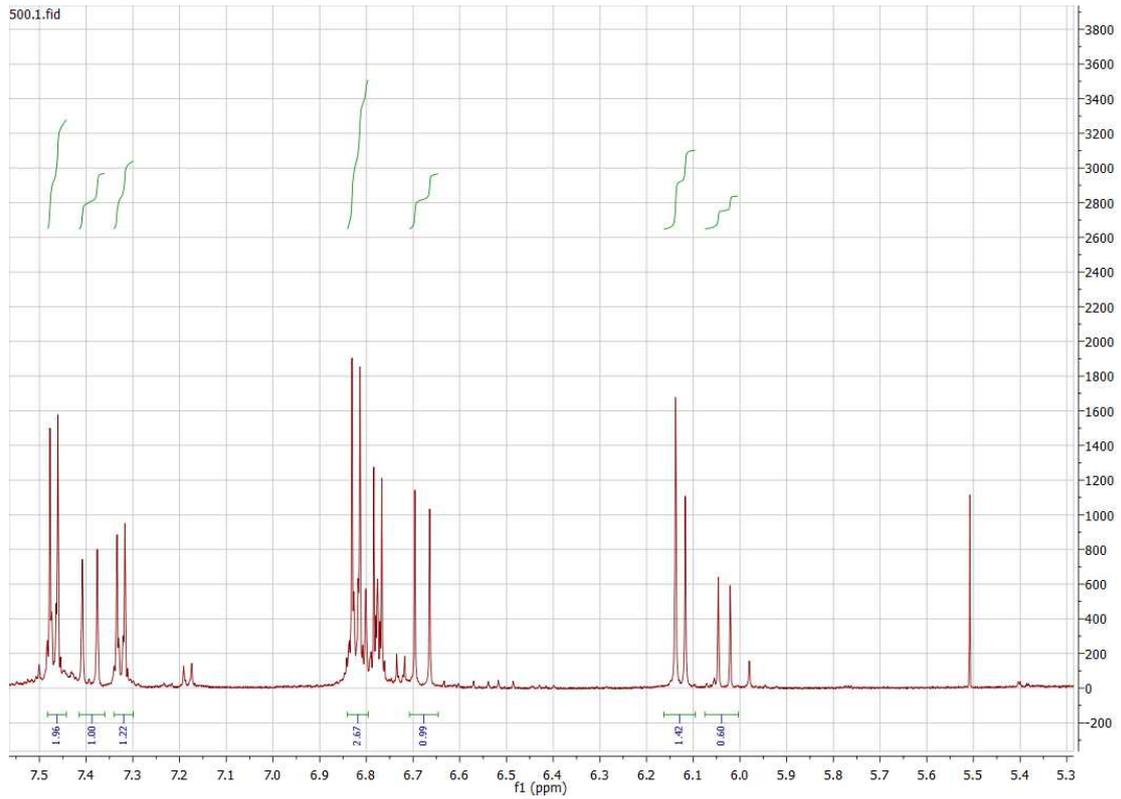
A13. Correlaciones más importantes 5-hidroxi-7-p-hidroxifenil-3-ceto-4Z,6E-heptadienoato de metilo.



A14. ^1H bisnoryangonina.

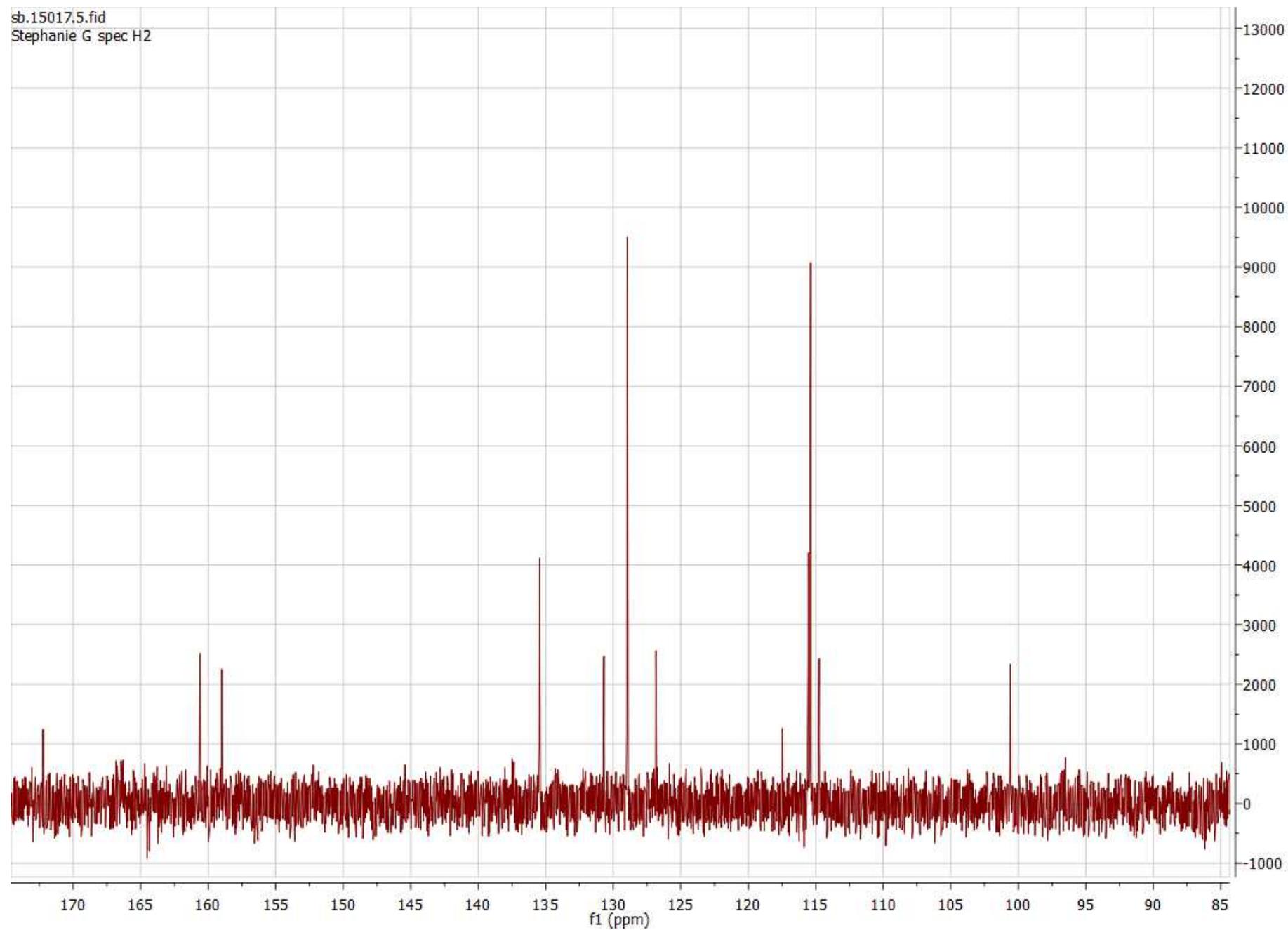


A15. ¹H bisnoryangonina (ampliación).

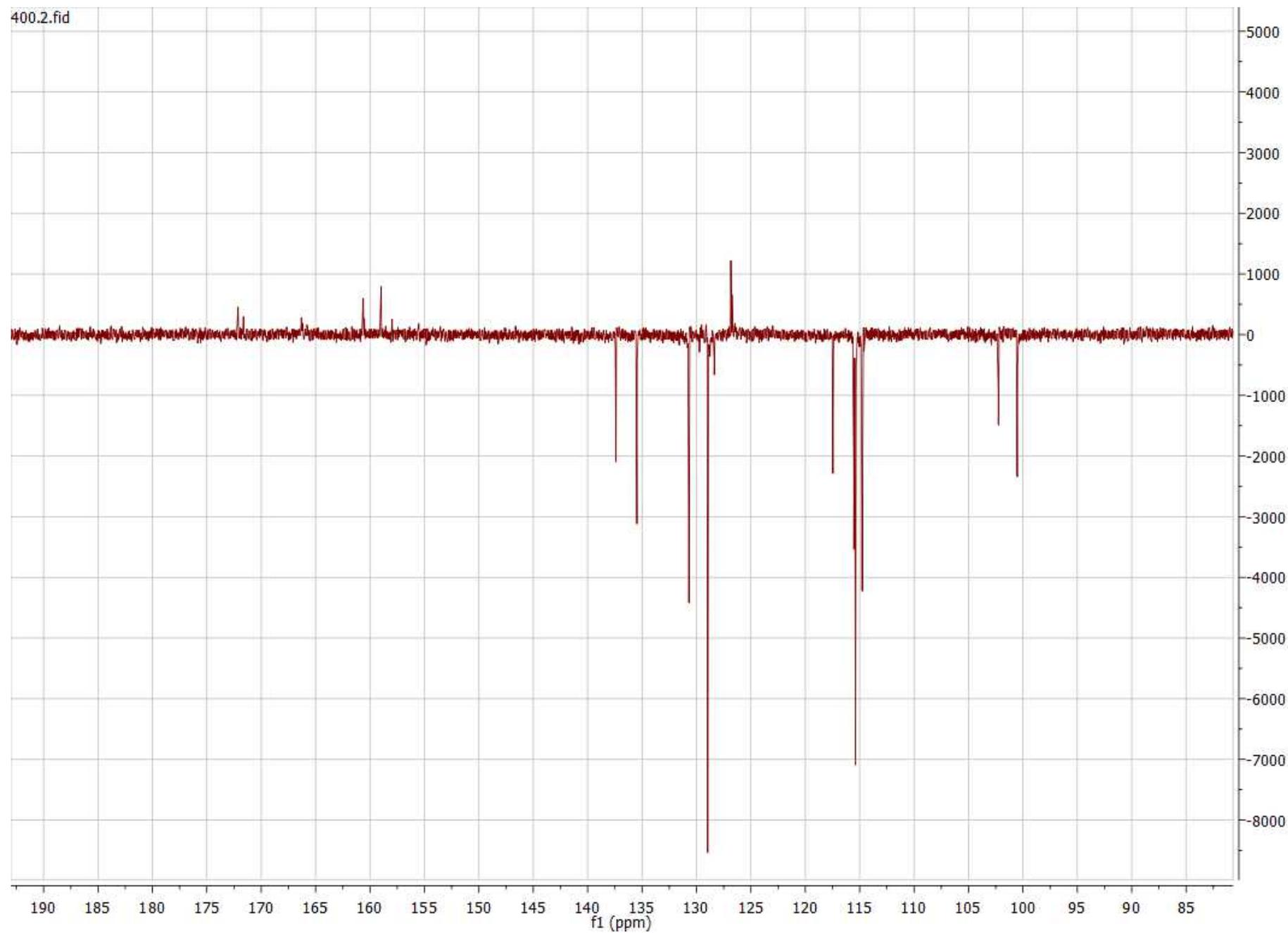


A16. ^{13}C bisnoryangonina.

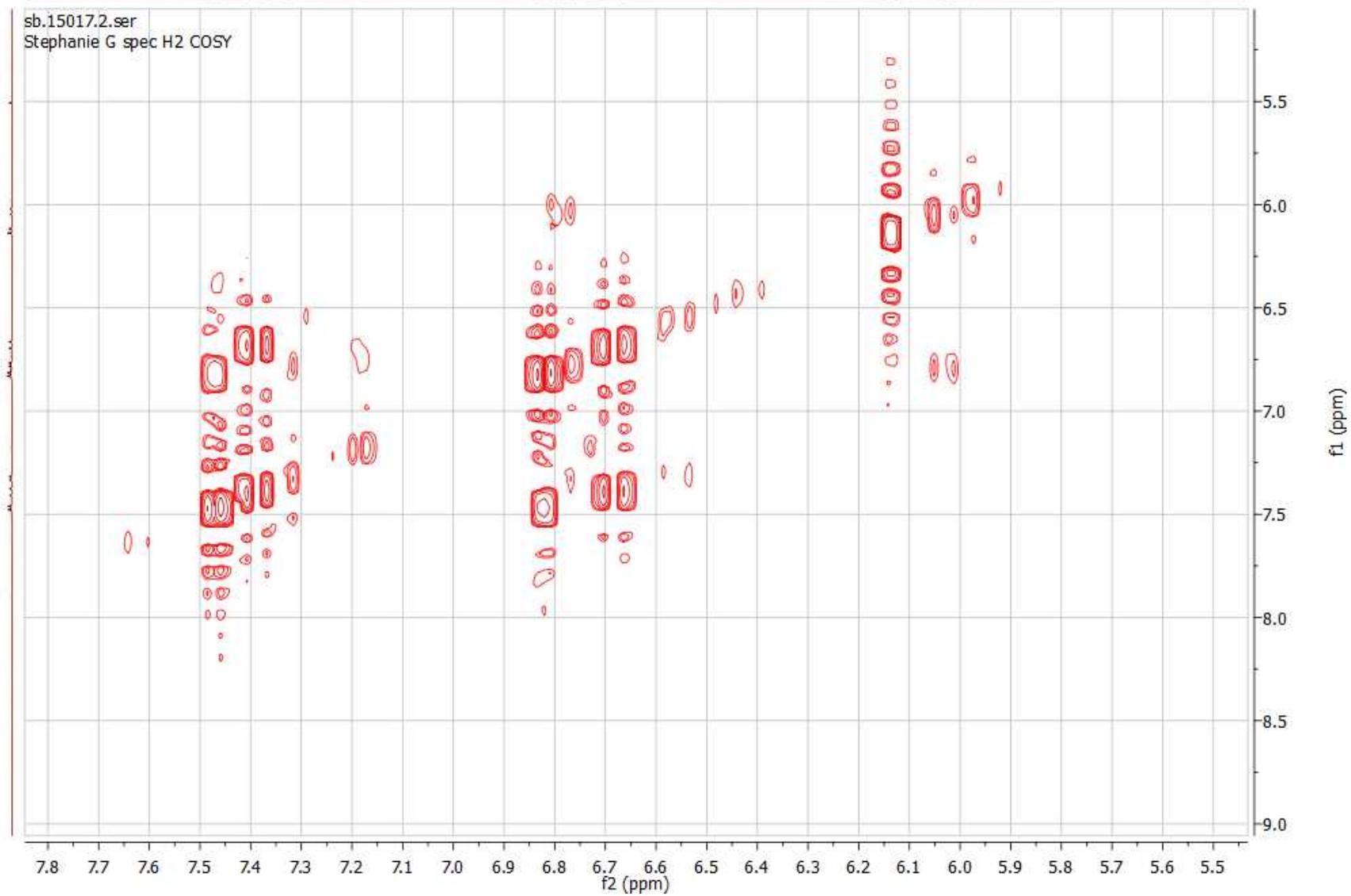
sb.15017.5.fid
Stephanie G spec H2



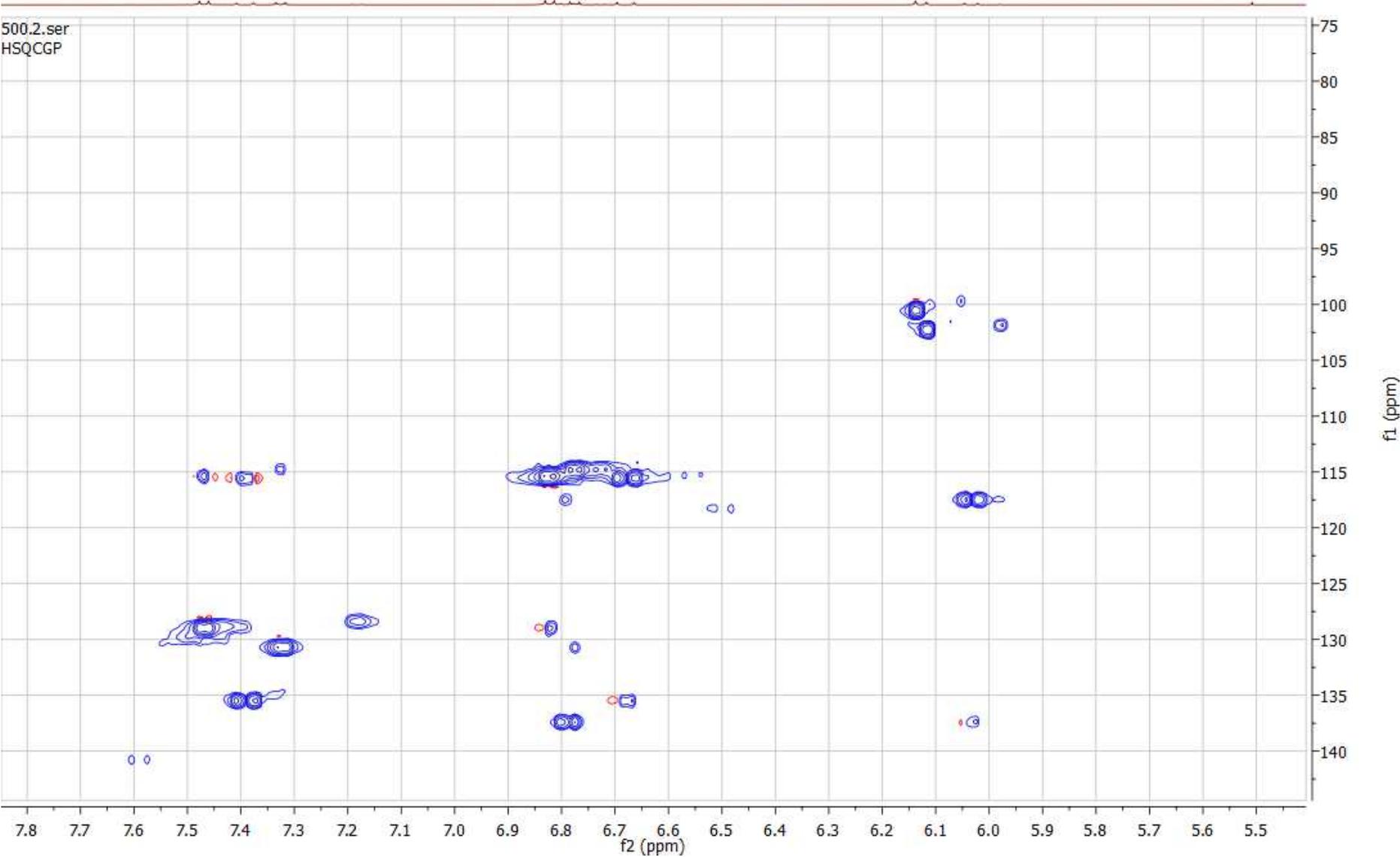
A17. ¹³C bisnoryangonina (PENDANT).



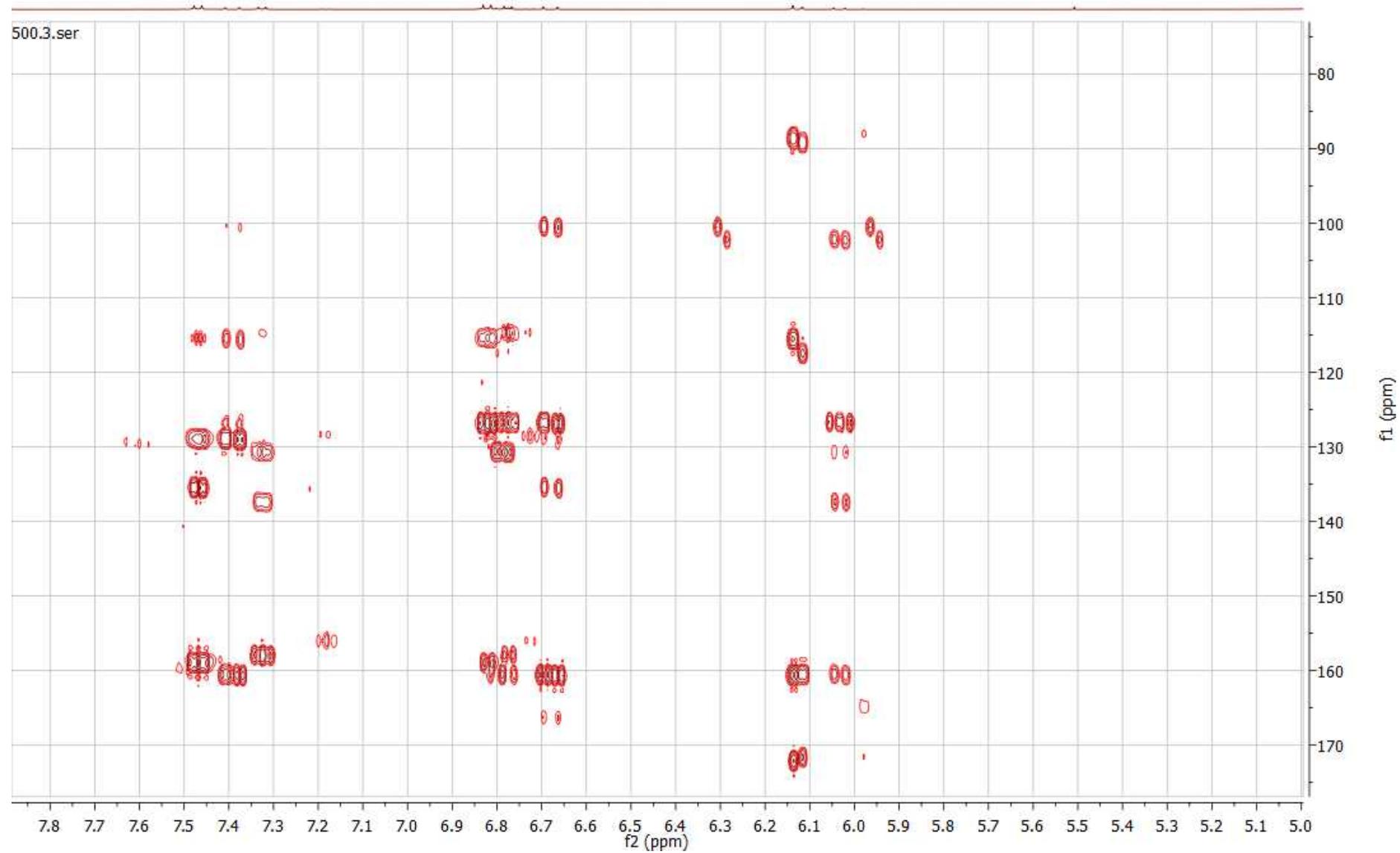
A18. ^1H - ^1H COSY bisnoryangonina.



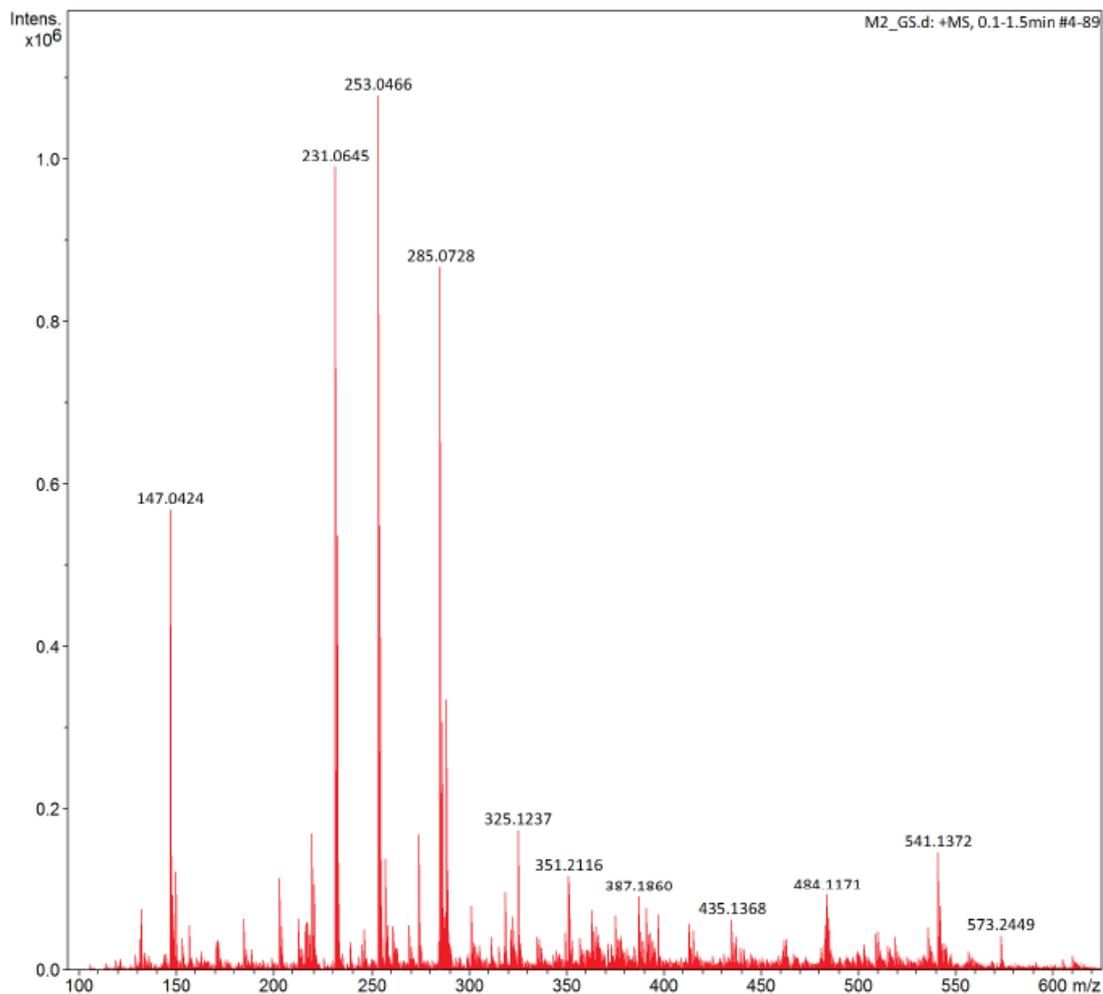
A19. ^1H - ^{13}C HSQC bisnoryangonina.



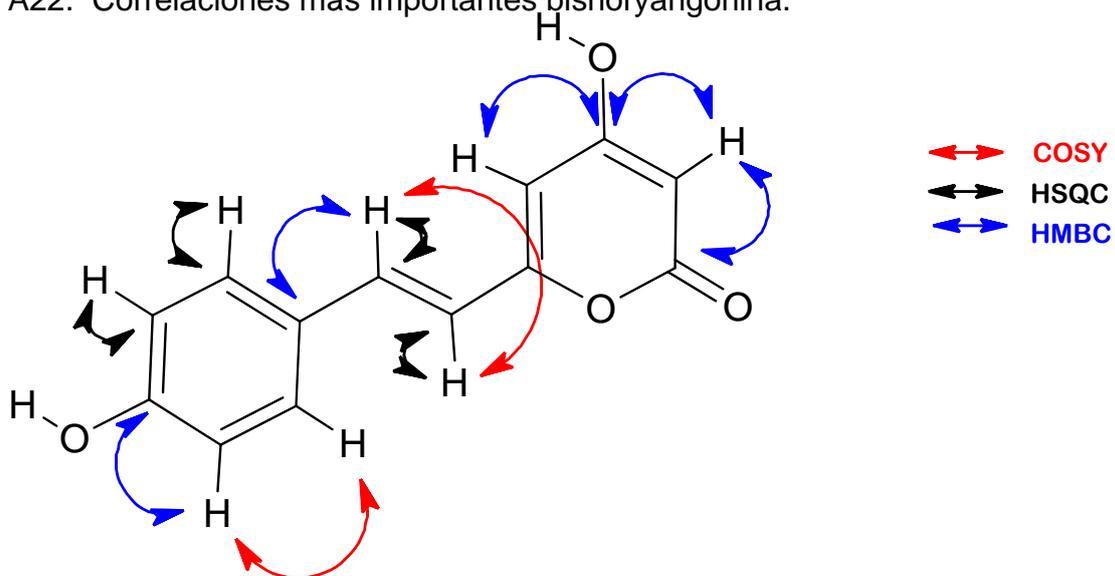
A20. HMBC bisnoryangonina.



A21. ESI-HRMS bisnoryangonina.

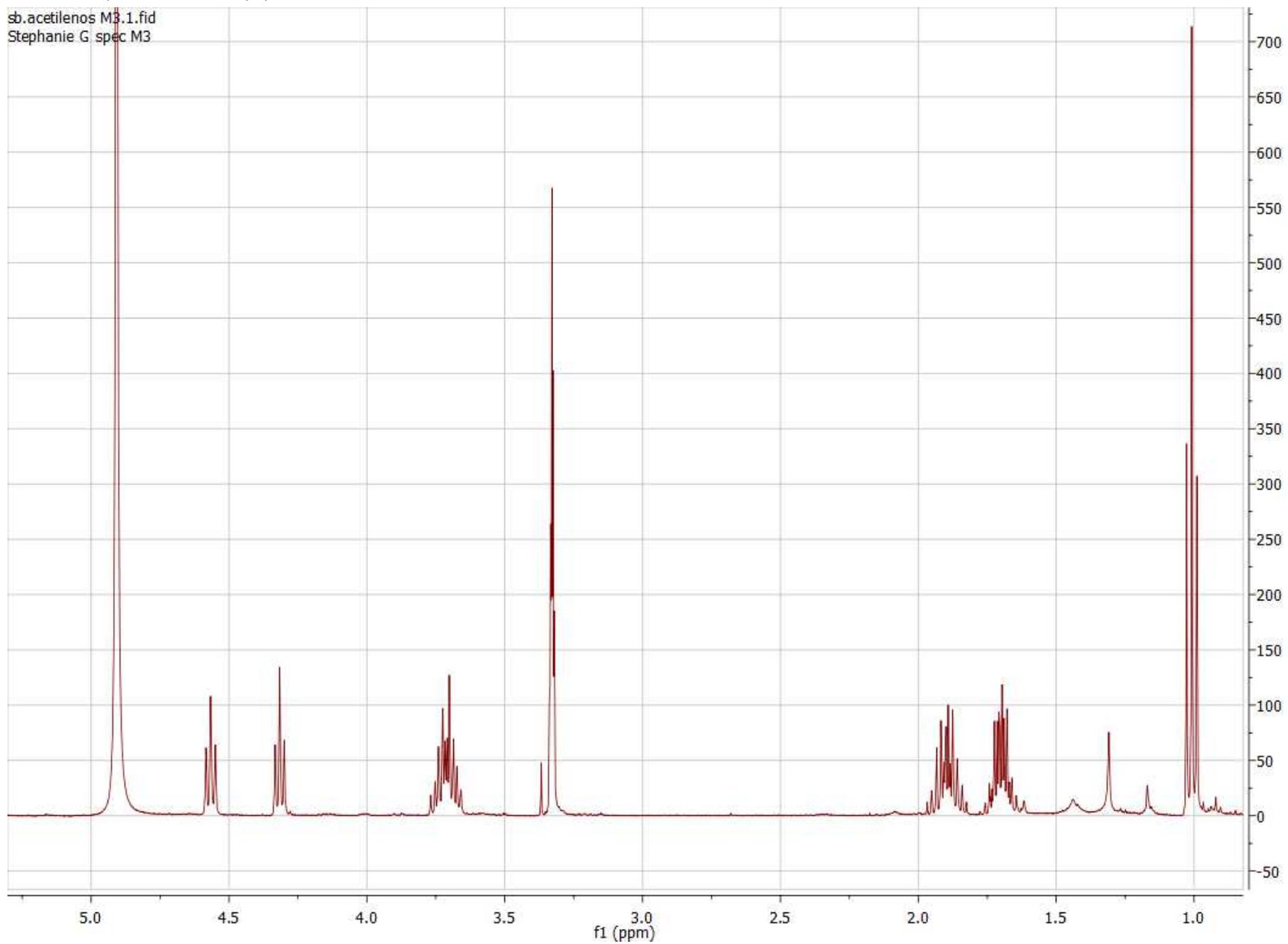


A22. Correlaciones más importantes bisnoryangonina.

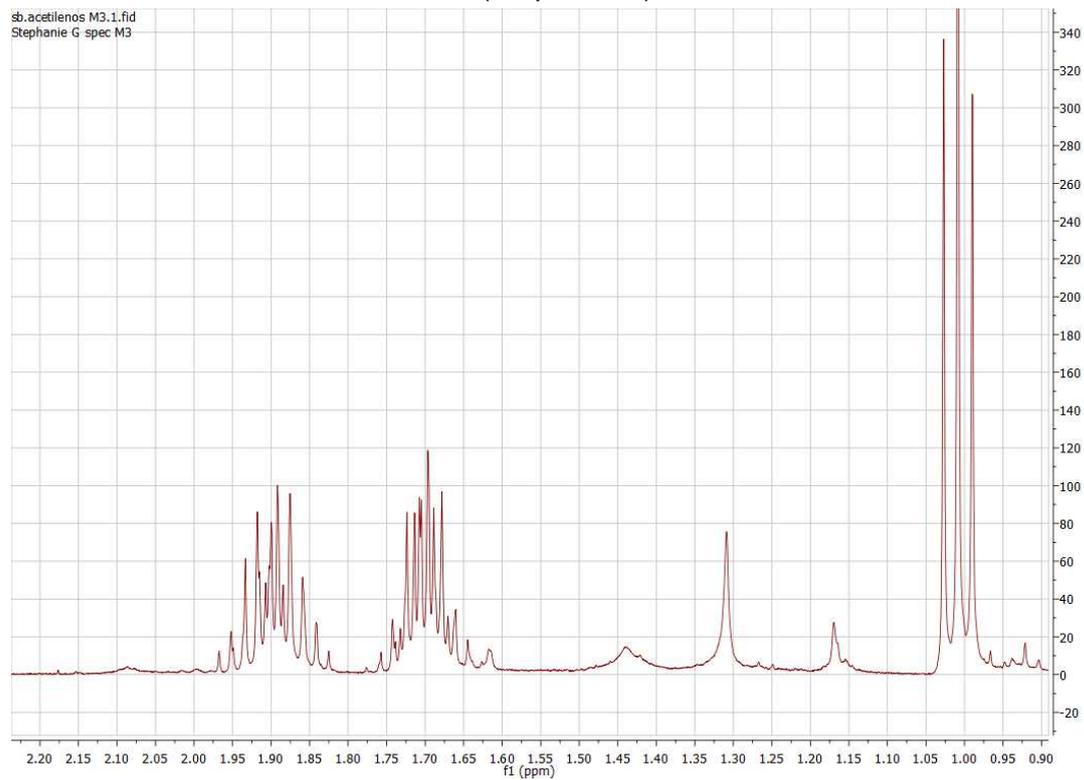


A23. ^1H 4,6-decadien-1,3,8-triol.

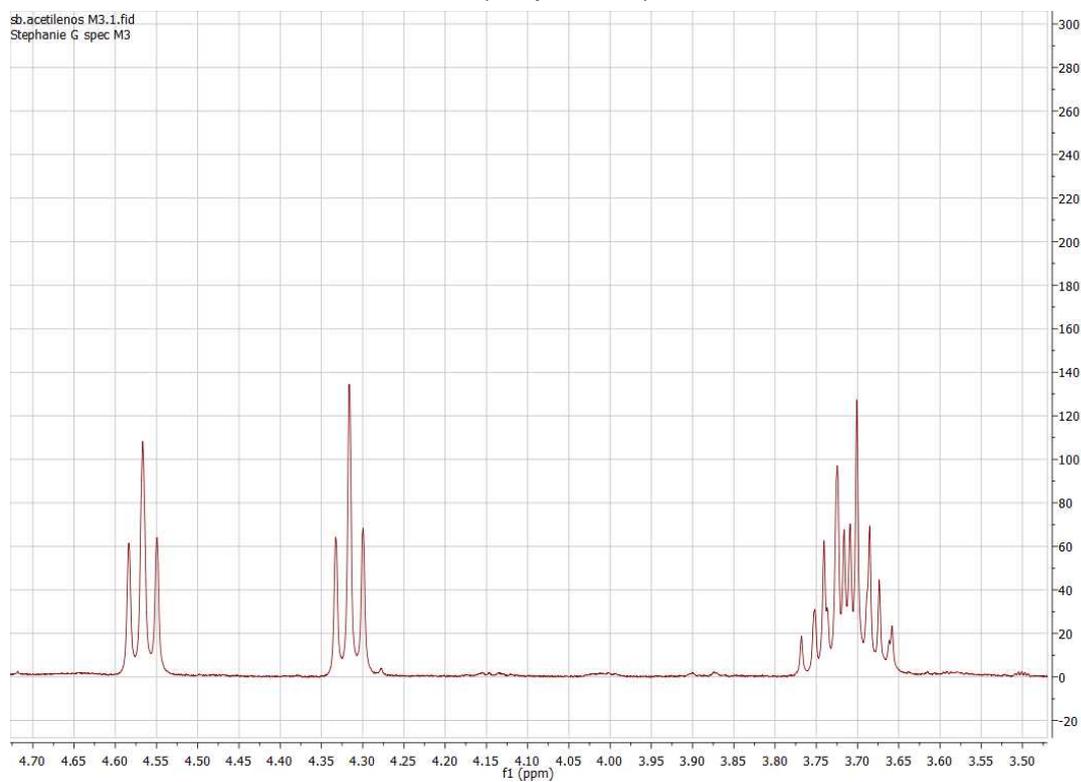
sb.acetilenos M3.1.fid
Stephanie G spec M3



A24. ^1H 4,6-decadien-1,3,8-triol (ampliación).

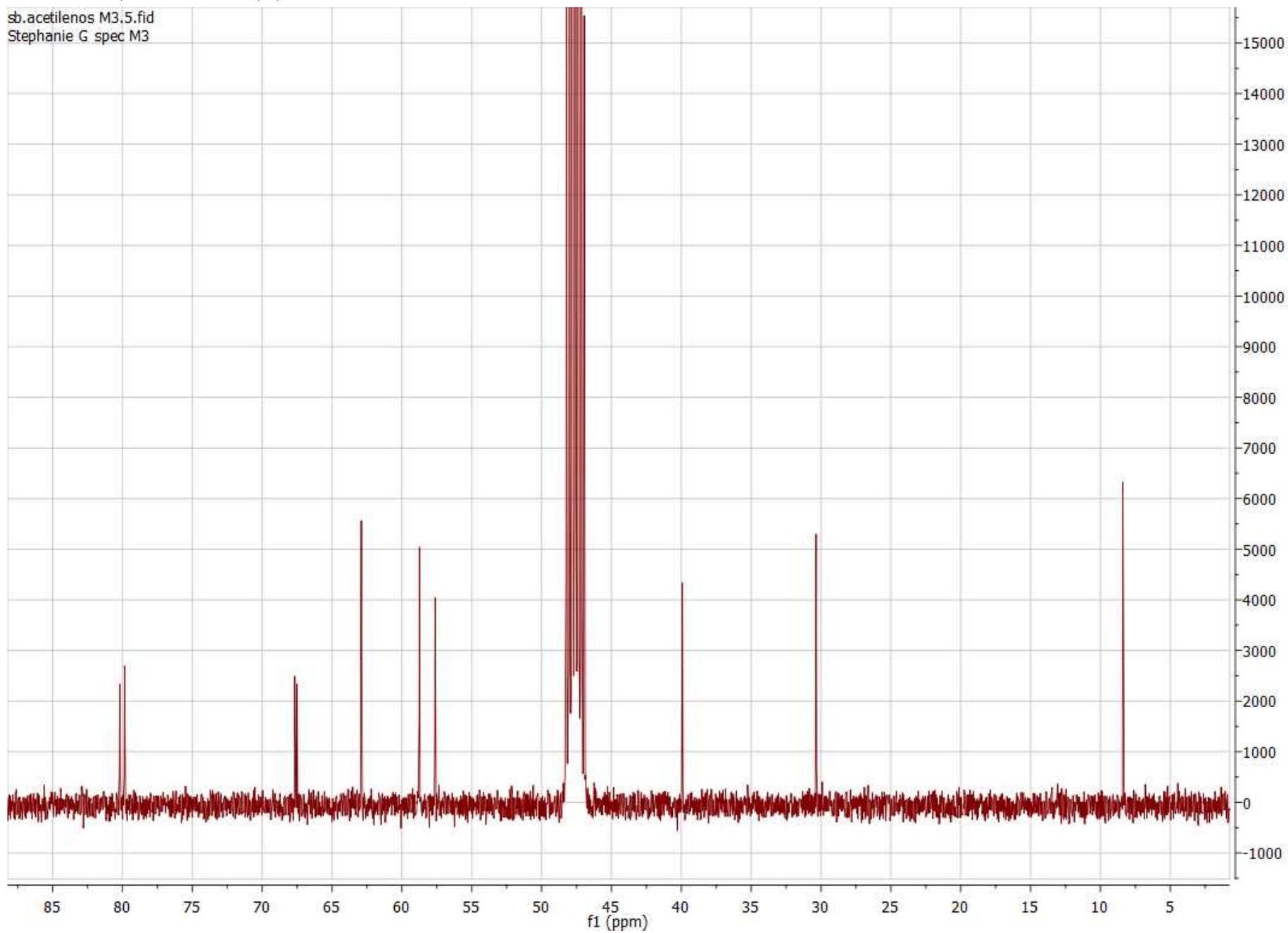


A25. ^1H 4,6-decadien-1,3,8-triol (ampliación).

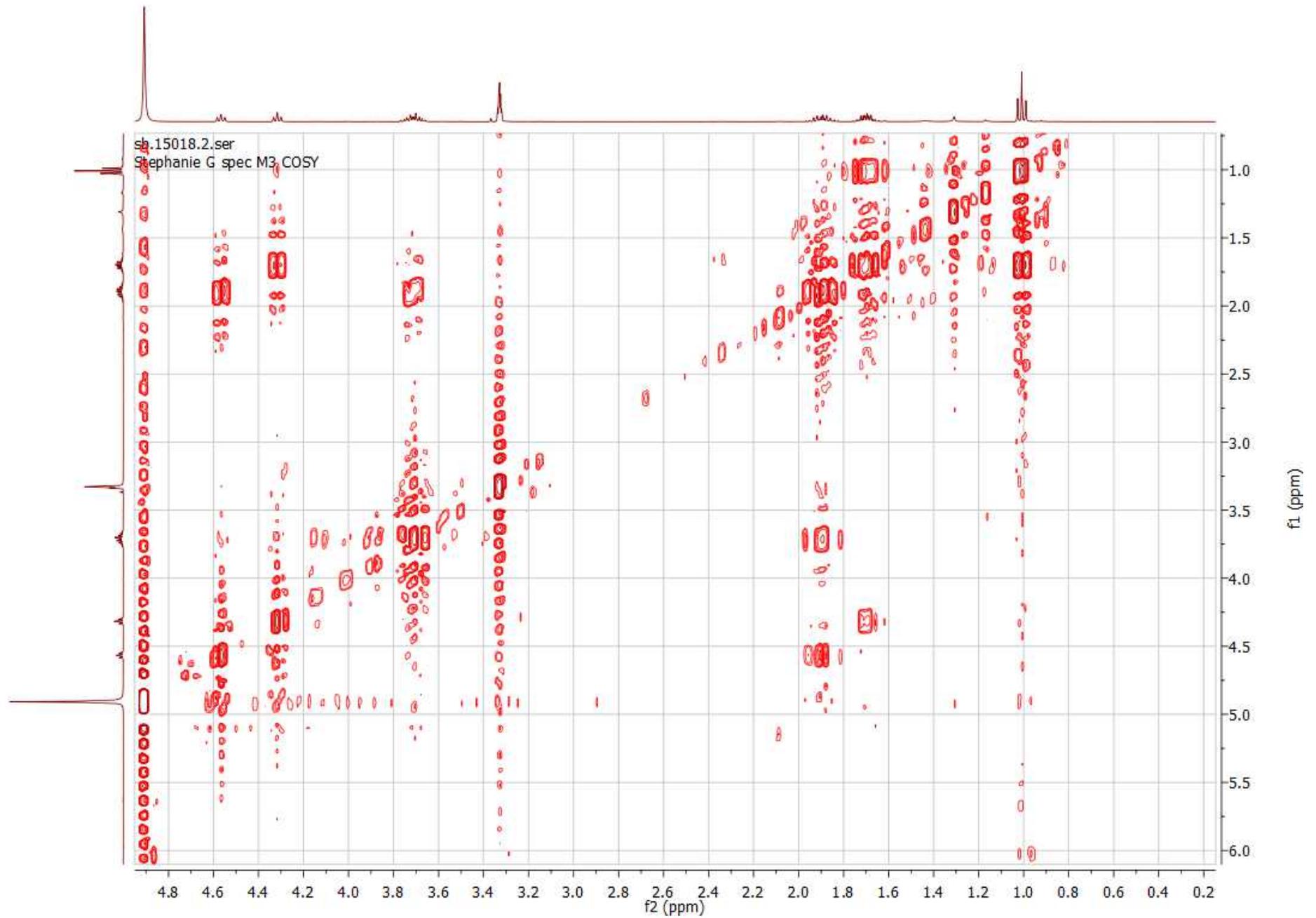


A26. ^{13}C 4,6-decadien-1,3,8-triol.

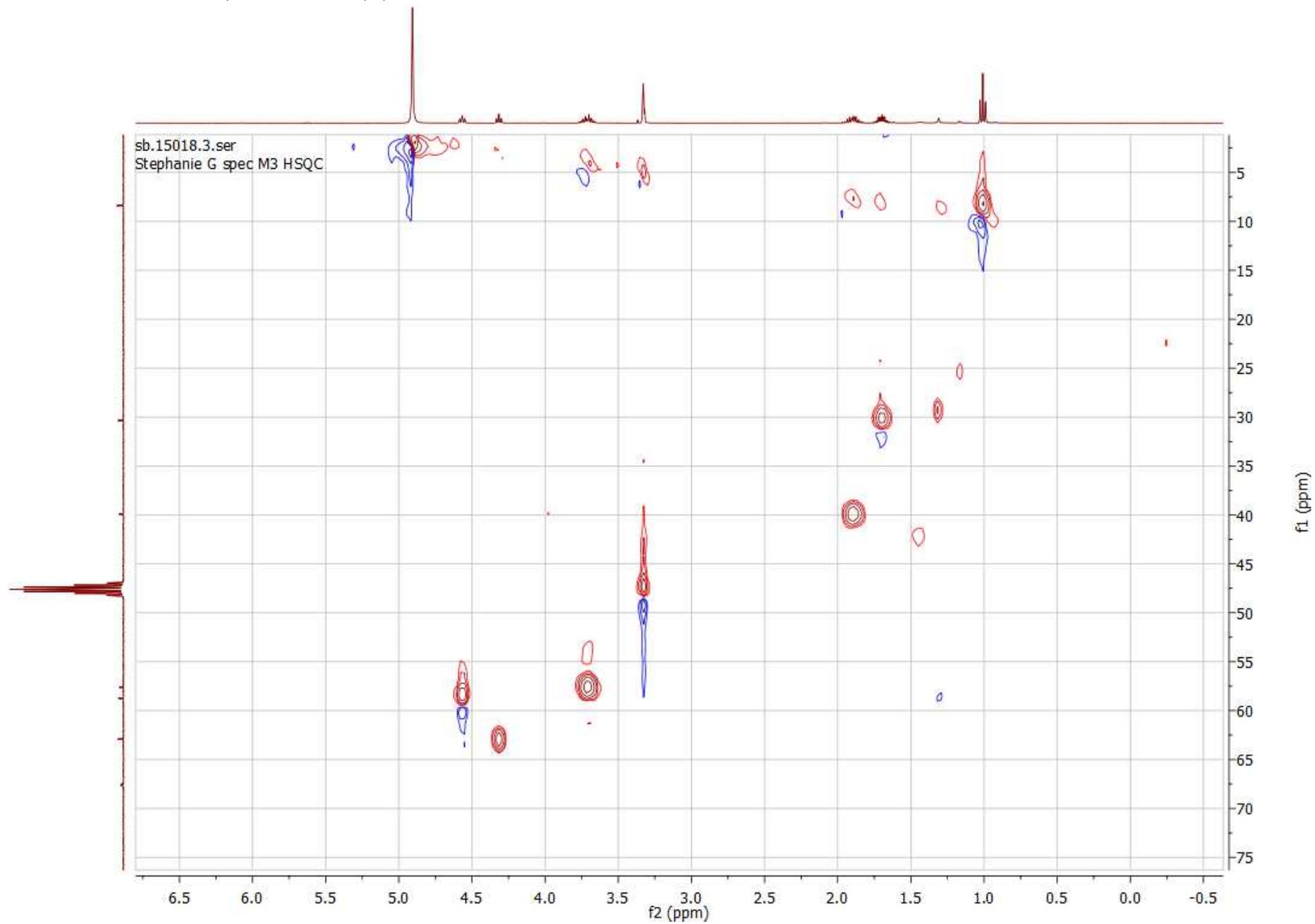
sb.acetilenos M3.5.fid
Stephanie G spec M3



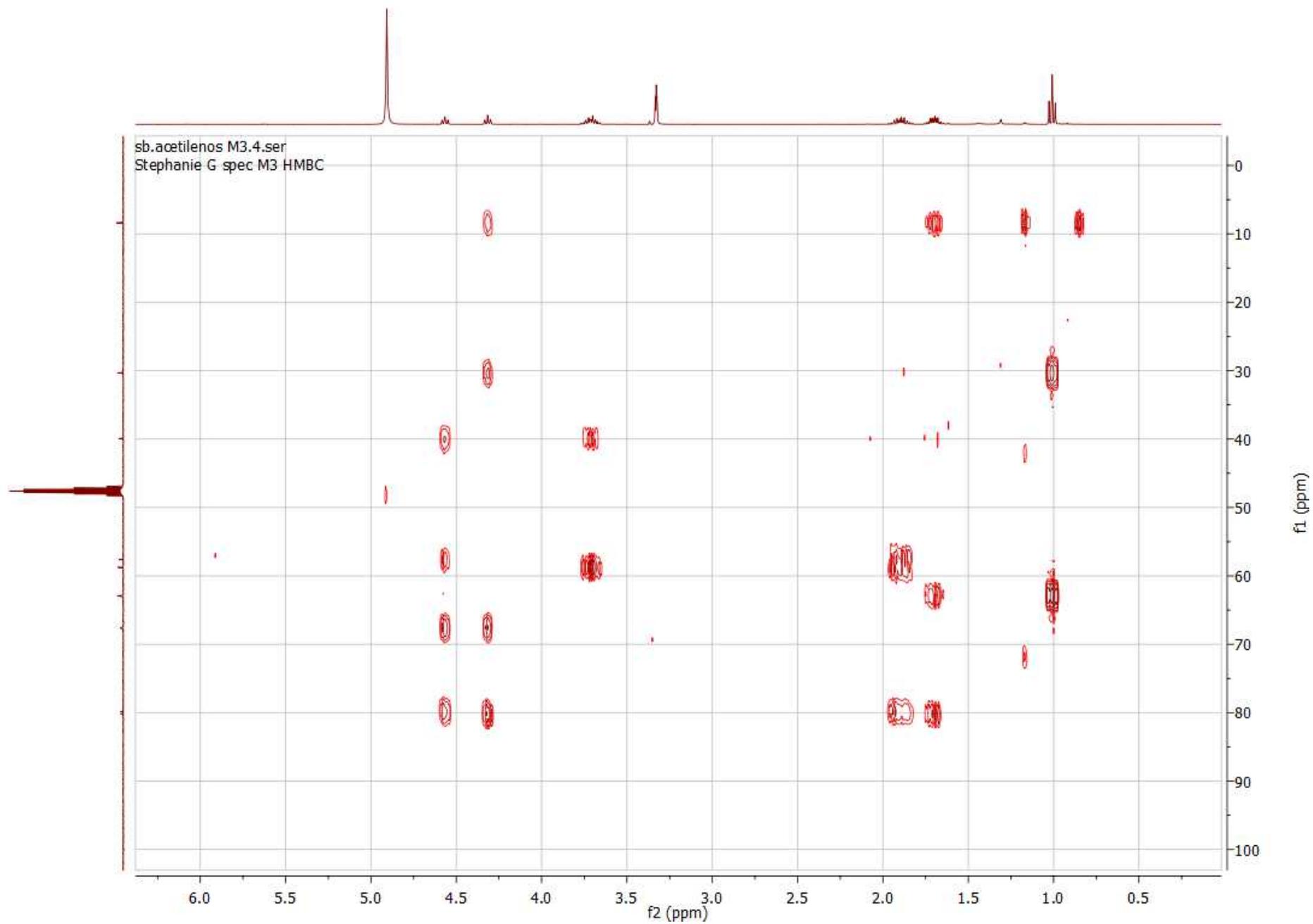
A27. ^1H - ^1H COSY 4,6-decadien-1,3,8-triol.



A28. ^1H - ^{13}C HSQC 4,6-decadien-1,3,8-triol.

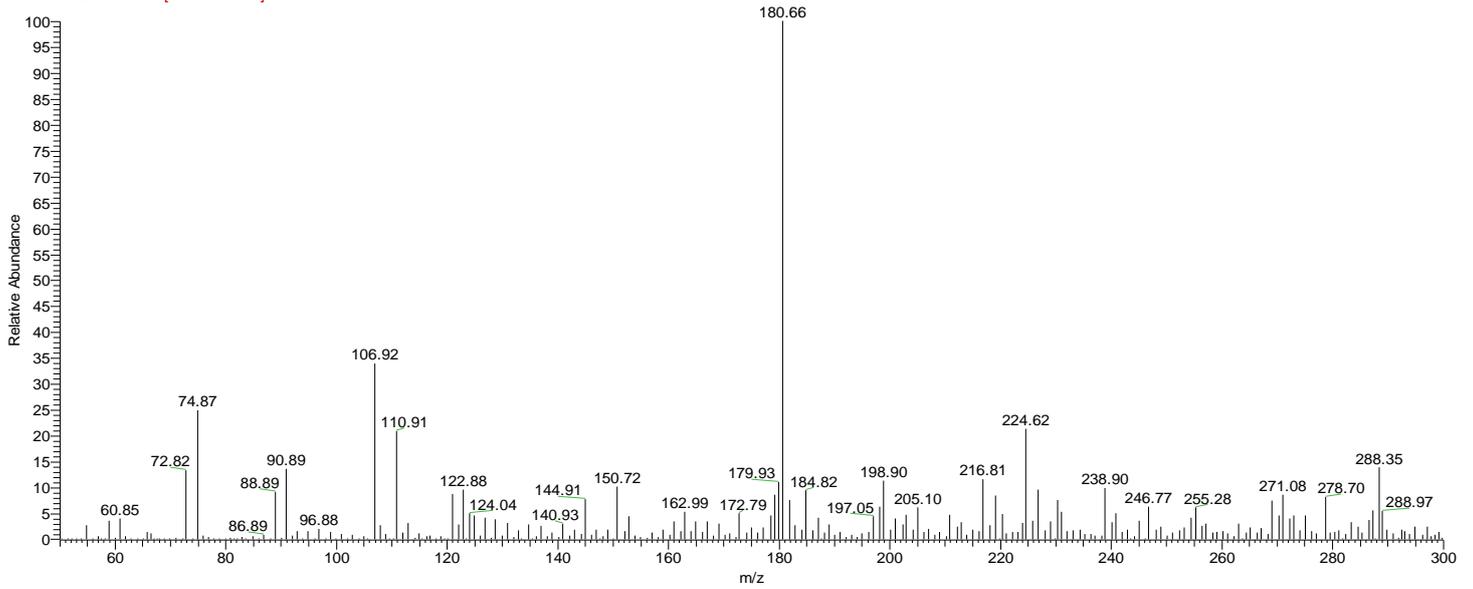


A29. HMBC 4,6-decadien-1,3,8-triol.



A30. ESI-HRMS 4,6-decadien-1,3,8-triol.

compuesto 3_1 #3046-3491 RT: 9.37-9.87 AV: 338 NL: 9.54E6
F: ITMS - c ESI Full ms [50.00-300.00]



A31. Correlaciones más importantes 4,6-decadien-1,3,8-triol.

