

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
*UNIDAD IZTAPALAPA*



CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS A  
PARTIR DE *Lecanicillium lecanii*

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
LUZ MARÍA ZENIT TOVAR CASTRO

DR. ÁNGEL R. TRIGOS LANDA  
DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
DRA. KEIKO SHIRAI MATSUMOTO  
DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO  
DR. SAMUEL CRUZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS  
ASESOR  
ASESORA  
SINODAL  
SINODAL

JULIO DE 2004

---

El Postgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón de Postgrados de Excelencia de CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-0/Maestría en Biotecnología.

Trabajo financiado por el proyecto de CONACYT No. 35507-N titulado “Búsqueda de metabolitos con actividad antibiótica a partir de hongos microscópicos”.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

Luz María Zenit Tovar Castro

El día 26 de Julio de 2004

Comité tutorial:

Director: Dr. Ángel R. Trigos Landa  
Universidad Veracruzana-LÁTEX

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora: Dra. Keiko Shirai Matsumoto  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Sinodal: Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Sinodal: Dr. Samuel Cruz Sánchez  
Universidad Veracruzana-SARA

*Agradezco a Dios por permitir a mi padre seguir a mi lado y por la dicha de ver  
crecer cada día a mi familia.*

*A mis hermanos Lila, Niba, Dany y Soraya, porque son un motivo más para  
seguir adelante, gracias.*

*A la familia Martínez Ruíz por acogerme en su casa y en su vida y por la  
dicha de haberlos conocido, muchas gracias.*

*A mis amigos, por estar conmigo en todo momento, especialmente a Sixto,  
César, Carlos, a todos los que forman parte de mi vida, gracias.*

*A los amigos de la Planta Piloto 4 y de LÁTEX, a Ángeles, Alejandro y  
Carlos, gracias por las sonrisas en momentos difíciles.*

*A todas las personas involucradas en este proyecto, al Dr. Trigos, por todos  
esos momentos en que se me decía que no lo lograría y aquí estamos.*

*Al Dr. Saucedo, Dr. Jorge, Dr. Francisco José, Dra. Keiko, gracias por los  
consejos y por la paciencia otorgada a mi persona, gracias Jorge por tu  
empeño y tu dedicación.*

*Al Dr. Oscar, Dr. Samuel, Maestro Atilano, por el apoyo brindado en la  
RMN.*

*A mi parejita Oswaldo, por todos esos momentos difíciles que pasamos juntos,  
por las tristezas y las alegrías compartidas dentro y fuera del laboratorio.*

*A José Antonio por ser tan tenaz y no permitirme caer en los momentos  
difíciles, por estar aquí y por haber entrado a mi vida en medio de tanto  
vacío, gracias amor.*

*Especialmente a mis padres, por permitirme estar aquí, por ser lo que soy y por  
seguir adelante a pesar de tantos tropiezos, los amo.*

*Dedicada a mi madre, por su luz que me sigue y me ilumina en todo momento,  
por haber sido una mujer fuerte y perseverante, por sus enormes y sabias  
palabras que ahora entiendo, por el tiempo que estuvimos juntas y por la  
dicha de saber que sigues aquí, gracias Mamá...*

## CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE UNIDADES</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE COMPUESTOS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE ESPECTROS</b> .....	xi
<b>PRESENTACIÓN</b> .....	xii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Importancia de los hongos .....	3
2.2. Hongos entomopatógenos .....	4
2.3. Metabolismo primario y secundario .....	7
2.4. Hongos entomopatógenos productores de metabolitos biológicamente activos .....	9
2.5. Compuestos producidos por el género <i>Lecanicillium</i> .....	14
2.6. Compuestos producidos por la especie <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	17
<b>CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 4. OBJETIVOS</b> .....	24
4.1. Objetivo general .....	24
4.2. Objetivos particulares.....	24

<b>CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. Microorganismos y medios de cultivo.....	25
5.1.1. Medios de cultivo .....	28
5.2. Condiciones de cultivo.....	28
5.2.1. Selección de la cepa bioactiva.....	28
5.2.2. Tratamiento de muestras.....	28
5.2.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	28
5.2.2.2. Concentración mínima bactericida o letal (CMB) .....	30
5.2.3. Producción de sustancias biológicamente activas de <i>Lecanicillium lecanii</i> en cultivos líquidos .....	31
5.2.3.1. Cultivo en caldo papa dextrosa (CPD) .....	31
5.2.3.2. Cultivo en medio complejo de fermentación (MCF).....	33
5.2.4. Tratamiento de muestras.....	35
5.2.4.1. Técnicas analíticas: pH, Biomasa, Azúcares totales, Concentración de esporas, Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida.....	35
5.3. Extracción.....	37
5.4. Purificación y obtención de compuestos.....	37
5.5. Caracterización estructural de compuestos.....	39
<b>CAPÍTULO 6. SELECCIÓN DE LA CEPA BIOACTIVA.....</b>	<b>40</b>
6.1. Actividad bacteriostática y bactericida.....	40
6.2. Selección de la cepa bioactiva.....	46
<b>CAPÍTULO 7. EVALUACIÓN ANTIBIÓTICA DE <i>Verticillium lecanii</i> EN CULTIVOS LÍQUIDOS.....</b>	<b>48</b>
7.1. Evaluación antibiótica del cultivo de <i>Lecanicillium lecanii</i> en CPD....	48
7.1.1. Cinética de biomasa, pH, concentración de esporas y azúcares totales.....	51
7.2. Evaluación antibiótica del cultivo de <i>Lecanicillium lecanii</i> en MCF...	53
7.2.1. Cinética de biomasa, pH, concentración de esporas y azúcares totales.....	56

7.3. Conclusiones.....	57
<b>CAPÍTULO 8. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS.....</b>	<b>58</b>
8.1. Extracción de compuestos.....	58
8.2. Purificación y obtención de compuestos.....	58
8.3. Caracterización estructural del compuesto 1.....	60
8.3.1. Espectros de resonancia magnética nuclear del compuesto 1.....	62
8.4. Caracterización estructural del compuesto 2.....	64
8.4.1. Espectros de resonancia magnética nuclear del compuesto 2.....	65
8.5. Actividad bacteriostática y bactericida de los compuestos 1 y 2.....	75
8.6. Conclusiones.....	78
<b>CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>
<b>A-1 Medios de cultivo.....</b>	<b>92</b>
<b>A-2 Resonancia magnética nuclear.....</b>	<b>94</b>

---



---

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b>	Ciclosporina producida por <i>Tolypocladium inflatum</i> .....	pág.9
<b>Figura 2.2.</b>	Destruxina A y Destruxina B, ciclodepsipéptidos producidos por <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	10
<b>Figura 2.3.</b>	Estructura de la beauvericina producida por <i>Beauveria bassiana</i> .....	11
<b>Figura 2.4.</b>	Compuestos producidos por <i>B. brongniartii</i> .....	12
<b>Figura 2.5.</b>	Acantomicina, antibiótico producido por <i>Akanthomyces gracilis</i> .....	13
<b>Figura 2.6.</b>	Compuestos producidos por <i>Lecanicillium lamellicola</i> .....	14
<b>Figura 2.7.</b>	Verticilina A, antibiótico producido por <i>Lecanicillium spp</i> .....	15
<b>Figura 2.8.</b>	Melinacidina IV, antibiótico producido por <i>Lecanicillium tererum</i>	16
<b>Figura 2.9.</b>	Afidicolina producida por <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	17
<b>Figura 2.10.</b>	Compuestos producidos por <i>L. lecanii</i> .....	18
<b>Figura 2.11.</b>	Bassianolide, insecticida producido por <i>L. lecanii</i> .....	19
<b>Figura 2.12.</b>	Antibiótico producido por <i>L. lecanii</i> .....	20
<b>Figura 2.13.</b>	Eniatina C, antibiótico producido por <i>L. lecanii</i> .....	21
<b>Figura 2.14.</b>	Cerevisterol, esteroles producido por <i>L. lecanii</i> .....	21

<b>Figura 5.1.</b>	Prueba de susceptibilidad por microdilución en caldo.....	30
<b>Figura 5.2.</b>	Sistema de cultivo en CPD de <i>Lecanicillium lecanii</i> H457.....	32
<b>Figura 5.3.</b>	Sistema de cultivo en MCF de <i>L. lecanii</i> EH457.....	34
<b>Figura 6.1.</b>	Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de <i>L. lecanii</i> incubado en agar papa dextrosa contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
<b>Figura 6.2.</b>	Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de <i>L. lecanii</i> incubado en agar papa dextrosa contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
<b>Figura 7.1.</b>	Evaluación de actividad bacteriostática de soluciones metanólicas de <i>Lecanicillium lecanii</i> incubado en CPD del día 6 (D6) al día 10 (D10) de cultivo contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	50
<b>Figura 7.2.</b>	Formación de biomasa y consumo de sustrato por <i>Lecanicillium lecanii</i> EH457 en el cultivo en CPD.....	51
<b>Figura 7.3.</b>	Determinación de esporas y pH en el cultivo en CPD de <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	52
<b>Figura 7.4.</b>	Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de <i>L. lecanii</i> en MCF del día 6 (D6) al día 10 (D10) de cultivo contra <i>Erwinia carotovora</i> .....	55
<b>Figura 7.5.</b>	Determinación de esporas y pH en el cultivo en MCF de <i>Lecanicillium lecanii</i> EH457.....	56
<b>Figura 8.1.</b>	Base estructural del compuesto 1.....	63
<b>Figura 8.2.</b>	Compuesto 2, nombrado lecanina.....	67
<b>Figura 8.3.</b>	Evaluación de actividad bacteriostática de los compuestos 1 y 2 obtenidos en este estudio contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 5.1</b>	Cepas de <i>Beauveria bassiana</i> empleadas.....	pág.25
<b>Tabla 5.2.</b>	Cepas de <i>Lecanicillium lecanii</i> empleadas.....	26
<b>Tabla 5.3.</b>	Bacterias de interés clínico empleadas en los bioensayos.....	26
<b>Tabla 5.4.</b>	Bacterias de importancia agrícola empleadas en los bioensayos	27
<b>Tabla 6.1.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de extractos metanólicos de <i>Beauveria bassiana</i> contra bacterias de interés clínico.....	41
<b>Tabla 6.2.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de los extractos metanólicos de <i>Beauveria bassiana</i> contra bacterias de importancia agrícola.....	42
<b>Tabla 6.3.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de los extractos metanólicos de <i>Lecanicillium lecanii</i> contra las bacterias patógenas de interés clínico.....	43
<b>Tabla 6.4.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de los extractos de <i>Lecanicillium lecanii</i> contra las bacterias de importancia agrícola.....	44
<b>Tabla 7.1.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad de cultivo en agar papa dextrosa y caldo papa dextrosa de <i>Lecanicillium lecanii</i> cepa EH457 contra las bacterias patógenas de interés clínico....	49
<b>Tabla 7.2.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad de cultivo en agar papa dextrosa y caldo papa dextrosa de <i>Lecanicillium lecanii</i> cepa EH457 contra las bacterias de importancia agrícola.....	49

---

<b>Tabla 7.3.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad en caldo papa dextrosa y medio complejo de fermentación de <i>Lecanicillium lecanii</i> cepa EH457 contra bacterias patógenas de interés clínico.....	53
<b>Tabla 7.4.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad en caldo papa dextrosa y medio complejo de fermentación de <i>Lecanicillium lecanii</i> cepa EH457 contra bacterias de importancia agrícola.....	54
<b>Tabla 8.1.</b>	Datos espectrales de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C del compuesto 2 (en CD <sub>3</sub> OD, δ ppm).....	74
<b>Tabla 8.2.</b>	Resultados de las pruebas de susceptibilidad de los compuestos obtenidos de <i>Lecanicillium lecanii</i> EH457 contra bacterias control.....	76
<b>Tabla 8.3</b>	Tabla comparativa de concentración mínima inhibitoria (CMI) de compuestos nuevos obtenidos reportados en la literatura y de los obtenidos de <i>Lecanicillium lecanii</i> EH457 en este estudio.....	77
<b>Tabla 8.4</b>	Tabla comparativa de concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos reportados en la literatura y de los obtenidos en este estudio.....	78

## ÍNDICE DE UNIDADES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

L	.....	Litros
mL	.....	Mililitros
mg/mL	.....	Miligramos por mililitro
g/L	.....	Gramos por litro
Esp/mL	.....	Esporas por mililitro
g	.....	Gramos
mg	.....	Miligramos
µg	.....	Microgramos
ppm	.....	Partes por millón
nm	.....	Nanómetros
h	.....	Horas
%	.....	Por ciento
v/v	.....	Volumen/volumen
λ	.....	Lambda
BT	.....	Bacteriostático
BC	.....	Bactericida
APD	.....	Agar papa dextrosa
CPD	.....	Caldo papa dextrosa
MCI	.....	Medio complejo de inóculo
MCF	.....	Medio complejo de fermentación
AMH	.....	Agar Müeller-Hinton
CMH	.....	Caldo Müeller-Hinton
NP	.....	No presentó
UV	.....	Ultravioleta

RMN	.....	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	.....	Resonancia magnética nuclear de Protón
RMN <sup>13</sup> C	.....	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
HPLC	.....	High Pressure Liquid Chromatography
COSY	.....	Correlation Spectroscopy
DEPT	.....	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
NOESY	.....	Nuclear Overhauser Effect and Exchange Spectroscopy
HETCOR	.....	Heteronuclear Correlation
HMBC	.....	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	.....	Heteronuclear Single Quantum Correlation
MS	.....	Espectrómetro de Masas
Hz	.....	Hertz
MHz	.....	Megahertz
CD <sub>3</sub> OD	.....	Metanol deuterado
δ	.....	Delta
J	.....	Constante de acoplamiento
s	.....	Señal simple
d	.....	Señal doble
t	.....	Señal triple
dd	.....	Doble de dobles
c	.....	Compleja

---



---

## ÍNDICE DE COMPUESTOS

	Pág.
1. Ciclosporina A.....	9
2. Destrujina A.....	10
3. Destrujina B.....	10
4. Beauvericina.....	11
5. Oosporeína.....	12
6. Bassianina.....	12
7. Tenelina.....	12
8. Acantomicina.....	13
9. MSD-A43F .....	14
10. Verlamelina.....	14
11. Verticilina A.....	15
12. Melinacidina IV.....	16
13. Afidicolina.....	17
14. Vertilecanina A.....	18
15. Vertilecanina B.....	18
16. Vertilecanina C.....	18
17. Bassianolido.....	19
18. 3-hidroxi-4, 4, 14-trimetil-7, 9 (11)-preg-nadien-20-ácido carboxílico.....	20
19. Eniatina C.....	21
20. Cerevisterol.....	21
21. Compuesto 1.....	63
22. Compuesto 2.....	67

---

---

## ÍNDICE DE ESPECTROS

	Pág.
<b>Espectro 8.1.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 1.....	61
<b>Espectro 8.2.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 1.....	62
<b>Espectro 8.3.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	65
<b>Espectro 8.4.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	66
<b>Espectro 8.5.</b> Experimento COSY en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	68
<b>Espectro 8.6.</b> Ampliación del experimento COSY en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	69
<b>Espectro 8.7.</b> Experimento HMBC en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	70
<b>Espectro 8.8.</b> Ampliación del experimento HMBC en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	71
<b>Espectro 8.9.</b> Ampliación del experimento HMBC en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	72
<b>Espectro 8.10.</b> Experimento HSQC en $\text{CD}_3\text{OD}$ del compuesto 2.....	73

## PRESENTACIÓN

El presente trabajo está dividido en 9 capítulos y uno más de anexos. Inicialmente se presenta una introducción donde se da información sobre la importancia y el impacto que representan los hongos entomopatógenos, en general, en la industria agrícola y la capacidad que tienen para producir compuestos con actividades biológicas importantes (la actividad antibiótica, por ejemplo la ciclosporina y la afidicolina).

En la revisión bibliográfica se presentan datos que evidencian la capacidad de estos organismos de producir compuestos, principalmente de interés agrícola y en menor medida compuestos antimicrobianos. Esto es un antecedente importante para nuestro estudio, justificando de esta manera la posibilidad de obtener compuestos de este tipo a partir de algunos hongos entomopatógenos y aprovechando la gran biodiversidad existente en nuestro país.

Asimismo, se plantea un objetivo general y tres particulares que engloban el trabajo realizado. Para cumplir con los mismos se presenta el material y metodología empleada en este estudio.

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos, en donde se seleccionó una cepa de *Lecanicillium lecanii* (antes *Verticillium lecanii*) de entre 10 cepas estudiadas, empleando la técnica de microdilución en caldo y siguiendo el criterio de mayor actividad bacteriostática y bactericida contra cultivos bacterianos de importancia en salud humana y en agricultura.

La cepa seleccionada se cultivó en un fermentador de 7 L, en un medio reportado para producir antibióticos. Después de realizar diferentes etapas de extracción y purificación, obtención y caracterización estructural, se aislaron dos sustancias con actividad antibiótica contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Erwinia*

*carotovora*. El compuesto 1 fue el más bioactivo contra estas bacterias, con una concentración mínima inhibitoria y bactericida de 53 µg/mL, encontrándose en estudio para su elucidación completa. El segundo compuesto, denominado por nosotros LECANINA, resultó ser un derivado del ácido cinámico.

---

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad producir y caracterizar sustancias biológicamente activas a partir del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* cepa EH457, determinando su actividad bacteriostática y bactericida en contra de algunas bacterias empleando los métodos de susceptibilidad por microdilución en caldo y la técnica de dilución en agar.

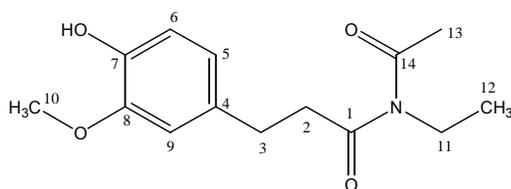
Se estudiaron cinco cepas de *Beauveria bassiana* (Bb.PM1, Bb.APH2, Bb.GC35, Bb.D4 y Bb.PCH) y cinco de *Lecanicillium lecanii* (EH348, EH457, EH458, EH460 y EH2460). Las diez cepas se cultivaron por separado en medio sólido y posteriormente se les realizaron extracciones acuosas y metanólicas, las cuales se probaron contra 3 bacterias de interés clínico (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) y 4 de importancia agrícola (*Erwinia carotovora*, *Erwinia carotovora* vs. *atroseptica*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Xhantomonas campestris* vs. *vescicatoria*), para seleccionar la cepa más bioactiva. La cepa EH457 de *Lecanicillium lecanii* presentó mayor actividad que las otras cepas de hongos probadas, tanto en el caso de bacterias de interés clínico (principalmente contra *Pseudomonas aeruginosa*) como para las de interés agrícola y fue la empleada para estudios posteriores en cultivo líquido.

Se llevó a cabo el cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii* cepa EH457 en Caldo Papa Dextrosa (CPD) y en medio complejo de fermentación (MCF), ambos en fermentador, y se determinó actividad bacteriostática y bactericida a lo largo del cultivo. Con el medio de cultivo CPD se tuvo una menor actividad biológica (sólo contra *E. coli* y *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*), en comparación con el cultivo en MCF, en el cual *Lecanicillium lecanii* EH457 presentó actividad biológica a partir del 6° y 7° día de cultivo para la mayoría de las bacterias (excepto para *E. coli*). La actividad biológica

de *L. lecanii* EH457 cultivado en MCF fue más evidente contra las bacterias fitopatógenas empleadas, en comparación con el cultivo en CPD. Los resultados obtenidos mostraron que la bioactividad es dependiente del tipo de cultivo empleado, ya sea agar o caldo.

Una vez terminado el cultivo líquido en MCF y realizado las pruebas de susceptibilidad para determinar la actividad bacteriostática y bactericida de la cepa en estudio, se procedió a la extracción, purificación y caracterización estructural de los compuestos involucrados en dicha actividad. Se obtuvieron dos compuestos, nombrados como compuesto 1 y compuesto 2, de los cuales se obtuvieron 24.7 mg y 25 mg, respectivamente y se sometieron a resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas para su elucidación estructural. Una vez caracterizados se llevaron a cabo nuevamente las pruebas de susceptibilidad corroborando su actividad bacteriostática y bactericida.

*Lecanicillium lecanii* cepa EH457 fue capaz de producir dos compuestos nuevos, los cuales presentaron actividad antibiótica contra *E. coli*, *S. aureus* y *E. carotovora*. El compuesto 1 inhibió el crecimiento de éstas bacterias a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 53 µg/mL, comparable con el antibiótico amoxicilina, el cual presenta una CMI de 32 µg/mL, mientras que los resultados obtenidos en este estudio contra *Staphylococcus aureus* con el compuesto 1 se pueden comparar con los reportados para el antibiótico Penicilina G el cual presenta una CMI de 50 µg/mL para esta bacteria. Este compuesto posee mayor bioactividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Erwinia carotovora* que el segundo compuesto y su estructura completa se encuentra en estudio. En cuanto al segundo compuesto, denominado por nosotros como lecanina, se llevó a cabo su elucidación estructural mediante técnicas de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC, HSQC) arrojando la siguiente estructura química:



Al parecer los compuestos obtenidos provienen de la ruta del ácido shikímico. El compuesto 2 es un probable antibiótico nuevo, aislado a partir del cultivo líquido en MCF de *Lecanicillium lecanii* cepa EH457.

# 1. INTRODUCCIÓN

La industria de los bioinsecticidas incluye organismos entomopatógenos y entomófagos, además de compuestos con actividad insecticida derivados de plantas, actinomicetos y organismos y plantas transgénicas (Baum *et al.*, 1999).

En lo que se refiere a comercialización de productos entomopatógenos, el mayor mercado mundial lo ocupan los elaborados a partir de bacterias (principalmente *Bacillus thuringiensis*, Bt), hongos (*Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*) y virus, principalmente baculovirus (Tamez *et al.*, 2001).

En la actualidad, la industria de biopesticidas representa una fracción muy pequeña del mercado mundial de pesticidas, presentándose en el mercado nacional un incremento de los mismos lento pero continuo (Baum *et al.*, 1999), aunque inferior al mercado de la agrobiotecnología. Con respecto a hongos entomopatógenos, la producción de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium lecanii* (antes *Verticillium lecanii*) se viene realizando en los estados de Colima, Guanajuato, Oaxaca y Sinaloa, para el control de plagas en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas (Rodríguez y Arredondo, 1999).

Algunos de estos microorganismos, además de poseer actividades como las referidas, tienen la capacidad de producir otros tipos de compuestos, como los antibióticos. No obstante, se tienen pocos estudios enfocados a la producción y obtención de dichos compuestos por microorganismos entomopatógenos.

La producción de antibióticos es una de las actividades industriales más relevantes a nivel mundial y en ella se desarrollan muchos principios activos de los cultivos microbianos. De los productos de origen microbiano que se fabrican comercialmente, probablemente los antibióticos son los más importantes. Son sustancias químicas

producidas por estos, que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Madigan *et al.*, 2004).

Los antibióticos son metabolitos secundarios que incluyen una gran cantidad de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas y son producidos en la mayoría de los casos después de la fase de crecimiento rápido (<http://www.science.oas.org>).

Los microorganismos responsables de la fermentación en la industria de los antibióticos pertenecen a tres grupos taxonómicos: los mohos, las bacterias no filamentosas y los actinomicetos o bacterias filamentosas. Así, seis géneros de hongos producen casi 1000 antibióticos: entre estos, se pueden destacar algunas especies de *Penicillium*, productoras de penicilinas y griseofulvinas, y de *Cephalosporium* (*Emericellopsis*, en su fase sexual), que sintetizan cefalosporinas. Sin embargo, el mayor número de sustancias antibióticas tiene su fuente en los actinomicetos donde tres géneros, principalmente *Streptomyces*, elaboran hasta 3000 antibióticos diferentes (Herrera y Ulloa, 1990).

Debido a la gran cantidad de investigación desarrollada sobre microorganismos convencionales productores de antibióticos, y tomando en cuenta la gran biodiversidad existente en nuestro país, resulta interesante la búsqueda y obtención de metabolitos nuevos con actividad antimicrobiana (de forma que se abra el espectro en cuanto a producción y obtención de los mismos), enfocándonos también en microorganismos nuevos como los hongos entomopatógenos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

Los hongos son productores de metabolitos secundarios estructuralmente diferentes y biológicamente activos (Wagenaar *et al.*, 2002). Presentan una significativa contribución a la quimioterapia antimicrobiana, siendo una fuente muy importante en el aislamiento de antibióticos. Se han descubierto un gran número de sustancias de estructuras complejas simplemente probando extractos crudos procedentes de hongos contra bacterias patógenas (Dax, 1997).

Los hongos filamentosos comprenden una colección de microorganismos industrialmente importantes, ya que algunos de ellos son usados para la producción de una gran variedad de metabolitos primarios o secundarios y otros más para enzimas de interés industrial, como las proteasas y lipasas (Pazouki y Panda, 2002).

Los antibióticos son metabolitos secundarios que se acumulan durante la fase estacionaria del hongo, y que poseen propiedades específicas contra bacterias u otros organismos (Alexopoulos y Mims, 1985, Arora *et al.*, 1992). Son sustancias que se obtienen de sólo ciertos géneros de hongos (incluido *Penicillium* y la levadura *Streptomyces*) y que en bajas concentraciones matan o inhiben el crecimiento de algunos microorganismos (Herrera y Ulloa, 1990).

Dentro de los hongos filamentosos aunque fuera de los convencionalmente considerados como productores de antibióticos, se encuentran los denominados hongos entomopatógenos, los cuales contribuyen de manera significativa en la industria agrícola (<http://infoagro.com/formación/cursos/cursos.ht>), y que por sus características, como se señalará en la siguiente sección, son potenciales productores de sustancias biológicamente activas.

## 2.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos se encuentran en la naturaleza en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc. Logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Estos organismos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de plagas de insectos.

Prácticamente todos los insectos son susceptibles a alguna de las enfermedades causadas por estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos; entre los más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Monzón, 2001). Los hongos entomopatógenos se clasifican dentro de la división Eumycota y en las siguientes subdivisiones: Mastigomycotina, Zigomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (Alexopoulos y Mims, 1985, Tanada y Kaya, 1993).

El desarrollo de las micosis causadas por hongos entomopatógenos puede ser separado en tres etapas (Monzón, 2001):

- Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto.
- Penetración a la hemolinfa.
- Desarrollo de los hongos.

Los hongos entomopatógenos usualmente causan mortalidad del insecto por una o más de las siguientes causas (<http://www.SANINET hongos entomopatógenos.htm>):

- Deficiencia nutricional,
- Invasión y destrucción de tejidos,

- Liberación de toxinas.

El proceso inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, la cual es la principal barrera contra la infección (compuesta principalmente de proteína, quitina y lípidos). Posteriormente se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste el hongo se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, que degradan los componentes químicos de la cutícula, facilitando la penetración física. (Charnley, 1997). Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo, formándose pequeñas colonias y estructuras del hongo. Aunque la patogenicidad es un proceso multifactorial, la producción de enzimas degradadoras de la cutícula puede ayudar en los procesos de infección. (Leger, 1993). Una vez que el huésped muere, los hongos emergen de su cuerpo para producir esporas las cuales, llevadas por el viento, lluvia o por insectos, pueden expandir la infección. Algunos hongos son patógenos obligados y así completan su ciclo vital, no pudiéndose llevar a cabo en un cultivo fuera del insecto vivo (<http://www.SANINET hongos entomopatogenos.htm>).

Muchos hongos entomopatógenos, sin embargo, son patógenos facultativos y capaces de cultivarse sin un insecto hospedero. Algunos son patógenos virulentos y matan al insecto en pocos días; otros producen infecciones crónicas y prolongadas (Rodríguez, 1990, Alatorre y Guzmán, 1994, Hill, 1994). Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado destruxinas, dimetildestruxina y protodestruxina, las cuales son sustancias de baja

toxicidad para el hombre pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nemátodos (Monzón, 2001).

### 2.3. METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO

El metabolismo primario de un organismo es la sumatoria de una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas, encaminadas a proporcionar energía y macromoléculas al organismo. Los metabolitos primarios comprenden aquellas sustancias de muy amplia difusión en la naturaleza y que se encuentran en todos los organismos vivos, siendo por tanto metabólicamente esenciales. Entre ellos se encuentran las macromoléculas más comunes, tales como las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, que forman parte entre otros de la maquinaria básica de los procesos vitales. Un grupo reducido de estos metabolitos primarios sirve como precursores de todas las otras sustancias que no pertenecen a esta categoría, como los llamados metabolitos secundarios (Romo, 1985, Muntañola, 1999).

El metabolismo secundario involucra principalmente procesos sintéticos cuyos productos finales no participan en la ruta común energética del organismo. Estos no son estrictamente necesarios para la sobrevivencia del organismo. La característica más importante de los metabolitos secundarios es su restringida distribución en la naturaleza, en algunos casos limitándose a especies o subespecies únicas; en consecuencia son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene (Domínguez, 1973, Deacon, 1993, Trigos, 1998).

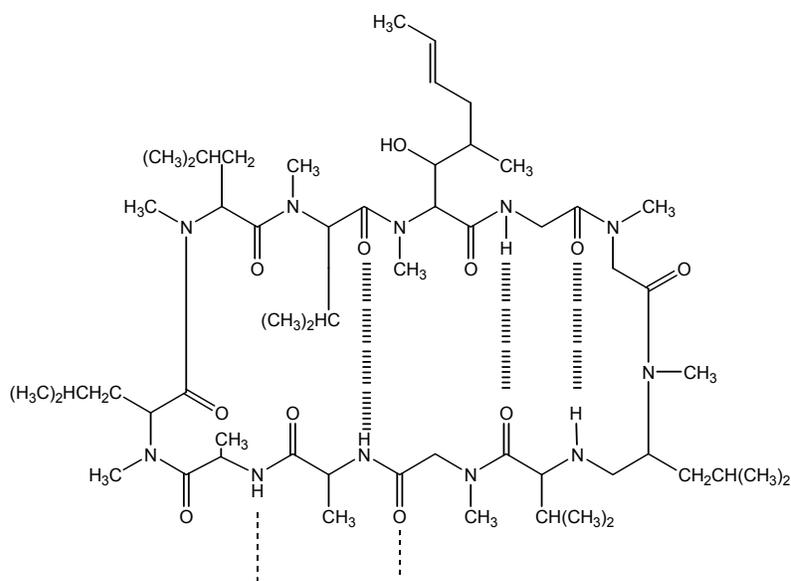
El estudio de los metabolitos secundarios de los hongos ha conducido al aislamiento de toda una gama de compuestos interesantes de origen fúngico que se pueden clasificar en:

1. Metabolitos secundarios derivados sin la intervención del acetato.
2. Metabolitos secundarios derivados de los ácidos grasos.
3. Policétidos.
4. Terpenos y esteroides.

5. Metabolitos secundarios derivados de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
6. Metabolitos secundarios derivados de los aminoácidos.
7. Metabolitos secundarios no incluidos en los grupos anteriores (Turner, 1971; Jennings y Lysek, 1999).

## 2.4. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PRODUCTORES DE METABOLITOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

Dentro de los estudios realizados con ciertos hongos entomopatógenos, se han reportado metabolitos biológicamente activos con una complejidad estructural importante, como es el caso de la ciclosporina A **1** (Fig. 2.1), encontrada en *Tolyocladium inflatum*, la cual es un fármaco inmunosupresor (Francis *et al.*, 2003, Delmarco *et al.*, 2004).

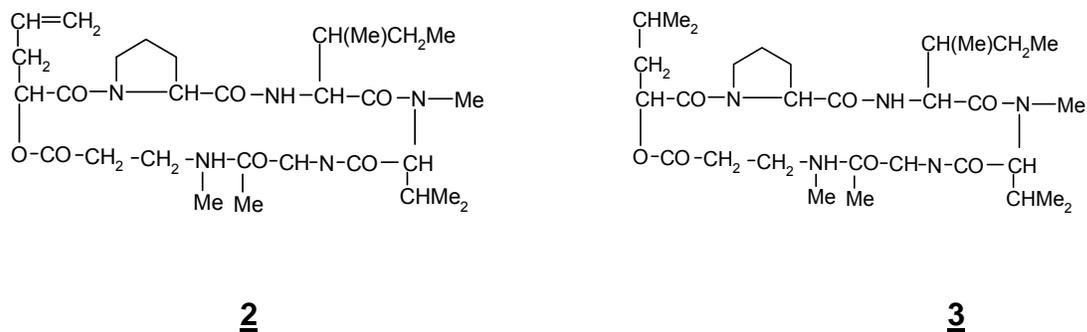


**1**

**Figura 2.1.** Ciclosporina A producida por *Tolyocladium inflatum*.

Otros estudios llevados a cabo con el hongo *Metarhizium anisopliae* permitieron identificar unos ciclodepsipéptidos llamados destruxinas A (DA) **2** y B (DB) **3** (Fig. 2.2), mostrando un efecto positivo en el tratamiento de hepatitis B. En dichos estudios se probó que la optimización de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas permiten incrementar la producción de destruxinas por *Metarhizium anisopliae*. Así, cuando el medio inicial fue suplementado con alanina, se incrementó 2 veces la producción de DA y DB. Examinando cuatro factores para la optimización de la producción de destruxinas: maltosa, peptona,  $\beta$ -alanina y glucosa, y usando la metodología de superficie de respuesta, la maltosa y la peptona fueron las mejores fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de destruxinas por *M. anisopliae*, con la adición de 0.1% (w/v) de  $\beta$ -alanina al medio inicial (Liu *et al.*, 2000).

En otros estudios se consiguieron aislar grandes cantidades de DA y DB a partir de mutantes y nuevas cepas de este hongo (Wei *et al.*, 1999, Hsiao y Ko, 2001, Feng *et al.*, 2004).

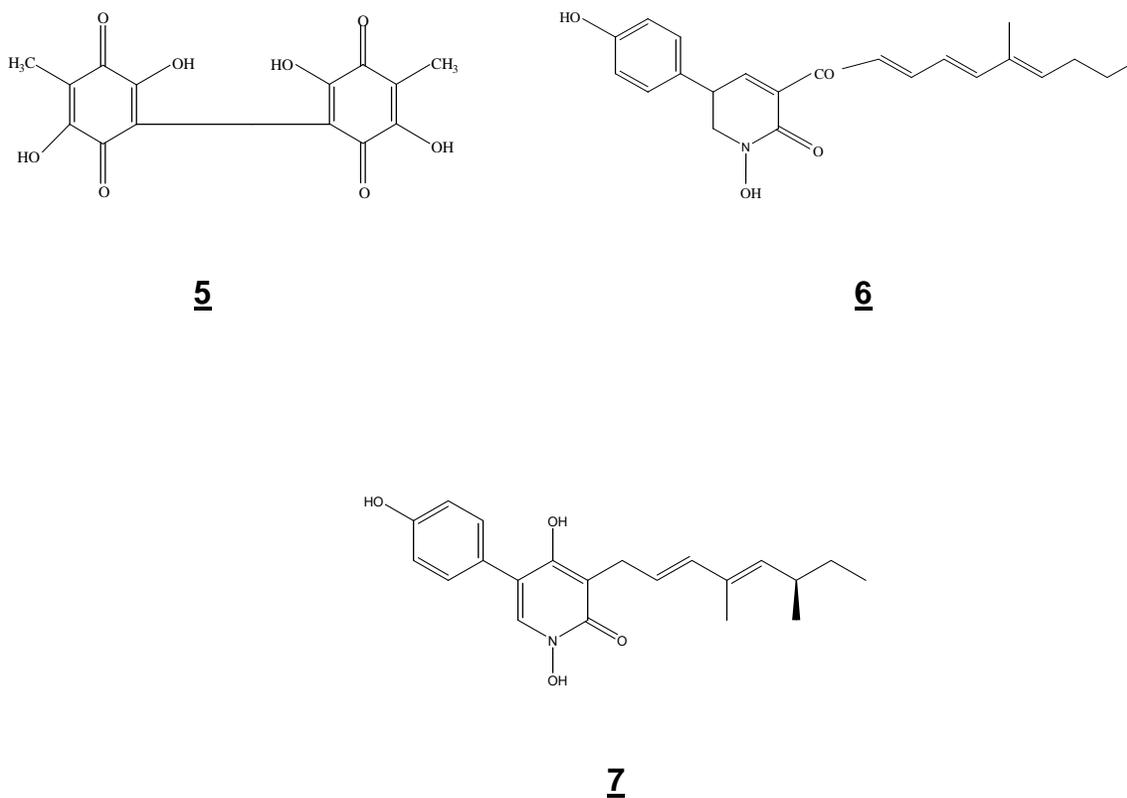


**Figura 2.2.** Destruxina A **2** y Destruxina B **3**, ciclodepsipéptidos producidos por *M. anisopliae*.



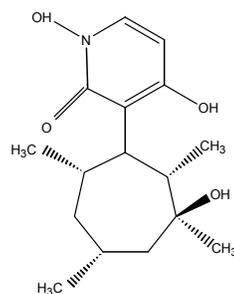
(Tanabe y Urano, 1983, Moore *et al.*, 1998) producidas normalmente por especies de *Beauveria*, fueron detectadas en este estudio por técnicas de HPLC y MS.

La máxima cantidad de oosporeína producida en reactores fue de 270 mg, después de 4 días de incubación (Strasser *et al.*, 2000). La oosporeína es un compuesto muy tóxico (Lloyd y Khachatourians, 1997), contaminante de comida de animales e inhibidor del crecimiento de plantas (Cole, 1981).



**Figuras 2.4.** Oosporeína 5, bassianina 6 y tenelina 7, compuestos producidos por *Beauveria brongniartii*.

En otros estudios realizados con el hongo entomopatógeno *Akanthomyces gracilis* cepa ARS 2910 se detectó actividad antimicrobiana en los extractos de cloroetano del micelio y caldo. Se identificó un compuesto nuevo nombrado acantomicina **8** (Fig. 2.5). Éste fue caracterizado usando cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) y probado en contra de *Staphylococcus aureus*, haciendo una aplicación directa del compuesto sobre una placa de agar conteniendo *S. aureus* y se probó que la acantomicina inhibe en concentración de 250 ng (Wagenaar *et al.*, 2002).

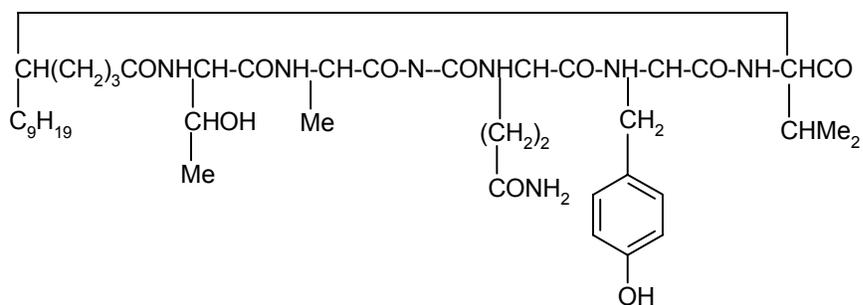
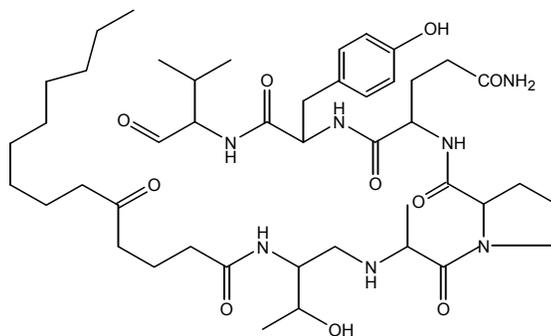


**8**

**Figura 2.5.** Acantomicina, antibiótico producido por *Akanthomyces gracilis*.

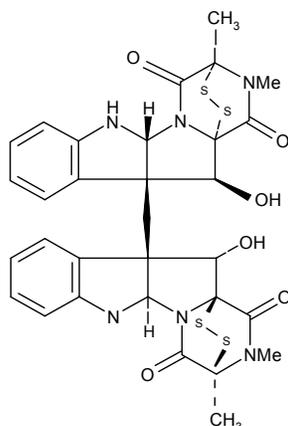
## 2.5. COMPUESTOS PRODUCIDOS POR EL GÉNERO *Lecanicillium*

***Lecanicillium lamellicola***. De esta especie se han logrado aislar dos compuestos conocidos como MSD-A43F **9** y Verlamelina **10** (Fig. 2.6), este último de importancia por ser un antibiótico ciclodepsipéptido activo contra hongos fitopatógenos (Bycroft, 1988).

**9****10**

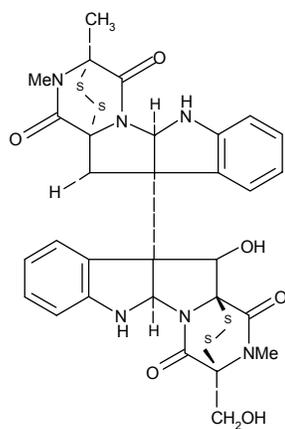
**Figuras 2.6.** Compuestos producidos por *Lecanicillium lamellicola*.

De *Lecanicillium spp.* se ha aislado un antibiótico tipo epitiodioxopiperazina conocido como Verticilina A **11** (Fig. 2.7) (Turner, 1971, Cole, 1981, Bycroft, 1988).

**11**

**Figuras 2.7.** Verticilina A, antibiótico producido por *Lecanicillium spp.*

*Lecanicillium tererum.* De este hongo se logró aislar un antibiótico de tipo epitiodioxopiperazina, conocido como dihidroxaetocina o melinacidina IV **12** (Fig. 2.8). Dicho antibiótico presenta actividad antibacteriana y antitumoral aunque es altamente tóxico (Bycroft, 1988).

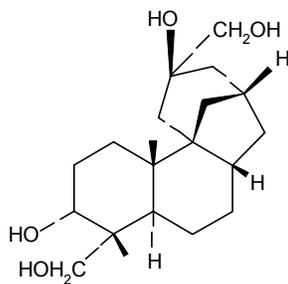
**12**

**Figuras 2.8.** Melinacidina IV, antibiótico producido por *Lecanicillium tererum*.

## 2.6. COMPUESTOS PRODUCIDOS POR LA ESPECIE *Lecanicillium lecanii*

*Lecanicillium lecanii* ha sido descrito ampliamente como un agente para el control de diversas plagas de mosquita blanca (Ekbohm, 1979), áfidos, cóccidos (Easwaramoorthy y Jayaraj, 1978), royas (Carrión, 1988, Whipps, 1993) y trips (Helyer *et al.*, 1992), entre otras.

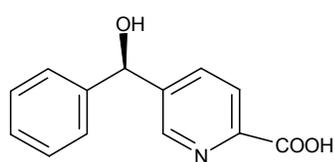
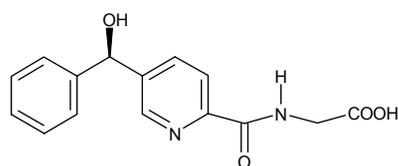
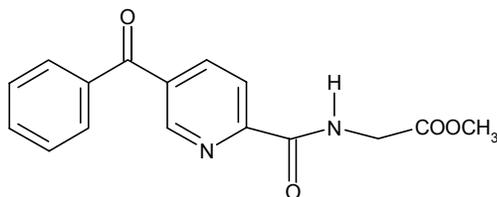
*L. lecanii* (en su forma *Cephalosporium aphidicola*) es un hongo muy versátil, el cual tiene la capacidad de transformar algunos diterpenoides en derivados hidroxilados (Hanson, 1995). Esta capacidad está relacionada con la producción endógena de la afidicolina **13** (Fig. 2.9) (Bucknall, 1973), diterpenoide tetrahidroxilado con actividad antitumoral. Este compuesto es también un agente antiviral en contra del Herpes simple Tipo 1. Es un inhibidor de la DNA polimerasa  $\alpha^2$  y muestra también actividad biológica como fitotóxico (Douros y Suffness, 1980, Spadari *et al.*, 1982; Oikawa *et al.*, 2002).



**13**

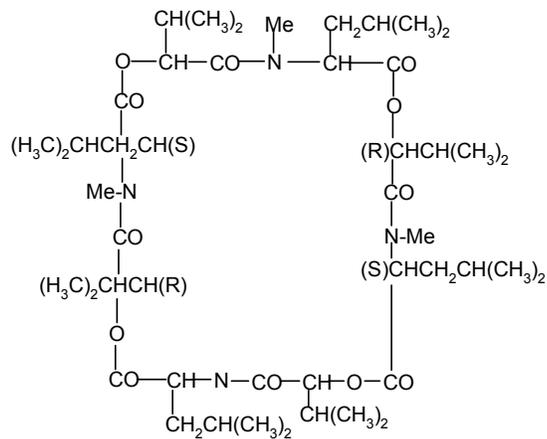
**Figuras 2.9.** Afidicolina producida por *L. lecanii*.

A partir de éste hongo se ha reportado el aislamiento de tres compuestos llamados vertilecanina A **14**, vertilecanina B **15** y vertilecanina C **16** (Fig. 2.10). La primera de las cuales presentó inhibición del crecimiento bacteriano. Este compuesto puede ser utilizado para el control de enfermedades bacterianas de plantas, animales o del hombre (Soman *et al.*, 2001).

**14****15****16**

**Figura 2.10.** Compuestos producidos por *Lecanicillium lecanii*.

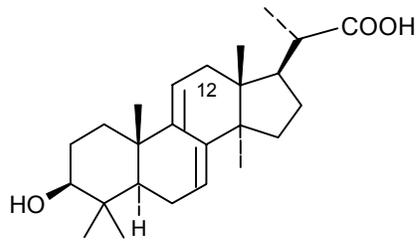
Bassianolido **17** (Fig. 2.11), antibiótico ciclodepsipéptido que muestra propiedades insecticidas, aislado de *Lecanicillium lecanii* (Suzuki *et al.*, 1977, Kanaoka *et al.*, 1978, Bycroft, 1988).



**17**

**Figuras 2.11.** Bassianolido, insecticida producido por *Lecanicillium lecanii*.

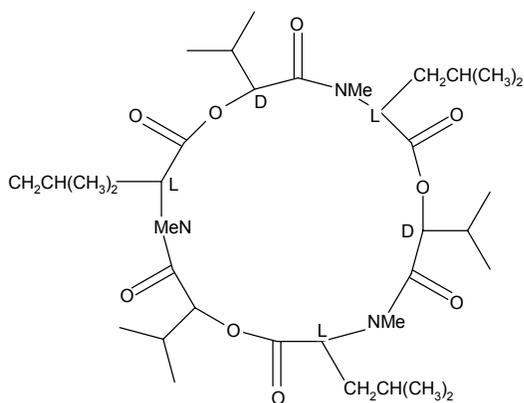
3-hidroxi-4, 4, 14-trimetil-7, 9 (11)-preg-nadien-20-ácido carboxílico **18** (Fig. 2.12). Antibiótico terpénico soluble en metanol con propiedades insecticidas (Bycroft, 1988).



**18**

**Figura 2.12.** Antibiótico producido por *Lecanicillium lecanii*.

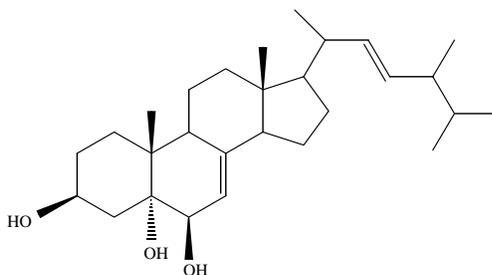
Eniatina C **19** (Fig. 2.13). Antibiótico ciclodepsipéptido aislado de *L. lecanii*. Muestra propiedades insecticidas, fitotóxicas y también inhibe la colesterol-acetil-trasferasa (Bycroft, 1988, Nilanonta, 2003).



**19**

**Figuras 2.13.** Eniatina C, antibiótico producido por *Lecanicillium lecanii*.

De *L. lecanii* también se logró aislar el cerevisterol **20** (Fig. 14) (Trigos *et al.*, 1997), un esteroide del cual se sabe que algunos de sus derivados tienen actividades citotóxicas (Valisolalao *et al.*, 1983, Kawagishi *et al.*, 1988).



**20**

**Figuras 2.14.** Cerevisterol, esteroide producido por *L. lecanii*.

Son muchos los estudios que se tienen con respecto a éste hongo, aunque la mayoría están enfocados hacia su aplicación en la industria agrícola. Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía reportada, *Lecanicillium lecanii* tiene la capacidad de producir compuestos con otro tipo de actividad biológica como la antibiótica, por tanto es un buen modelo de estudio para producir e identificar compuestos no sólo de importancia agrícola sino médica.

## JUSTIFICACIÓN

El reino de los hongos presenta una gran biodiversidad, con alrededor de 70,000 especies conocidas, y un estimado de 1.5 millones de especies en total. En particular, son conocidos por la producción de enzimas secretadas y metabolitos secundarios, muchos de los cuales han sido explotados por el hombre (Turner, 2000).

Dentro de esta gran biodiversidad existe un grupo de hongos conocidos como entomopatógenos, los cuales contribuyen de manera significativa en la industria agrícola. Sin embargo, se tienen reportes de que estos organismos son capaces de producir compuestos con actividad antibiótica y pese a ello son pocos los estudios que se tienen respecto a la producción de tales compuestos a partir de hongos entomopatógenos (Wagenaar *et al.*, 2001). Son por tanto un buen modelo de estudio para producir e identificar compuestos no sólo de importancia agrícola sino de interés médico, ya que estos participan en bioprocesos de control atacando insectos y esto los hace ser candidatos a producir sustancias con actividad biológica.

El mayor conocimiento de los metabolitos secundarios fúngicos utilizados en producción comercial se basa en los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas G y V y Cefalosporinas C), producidas desde hace más de 50 años. Es muy conocido que este tipo de metabolitos son producidos principalmente solo por algunas especies de *Penicillium* y *Streptomyces* (Herrera y Ulloa, 1990), lo que abre la posibilidad de estudiar otro tipo de hongos con los cuales se pueda ampliar el espectro de producción y obtención de metabolitos con actividad antibiótica.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Producir e identificar sustancias biológicamente activas a partir del cultivo de un hongo entomopatógeno seleccionado por su actividad antibiótica.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar microorganismos con capacidad para producir compuestos con actividad biológica a partir de cepas de hongos entomopatógenos de las especies *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*, a través del empleo de técnicas de bioensayo.
2. Llevar a cabo la producción, extracción, y purificación de sustancias bioactivas del hongo seleccionado, mediante el empleo de técnicas de cromatografía.
3. Caracterizar estructuralmente las sustancias biológicamente activas empleando técnicas de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, DEPT, HMBC, HSQC).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas de *Lecanicillium lecanii* fueron aisladas en el estado de Veracruz y donadas por la Dra. Keiko Shirai Matsumoto de la Universidad Autónoma Metropolitana, mientras que las cepas de *Beauveria bassiana* empleadas en éste estudio pertenecen a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de Colima y fueron donadas por el Dr. Víctor Hernández. Se probaron 10 cepas de hongos entomopatógenos; 5 de *B. bassiana* y 5 de *Lecanicillium lecanii*. En las Tablas 5.1 y 5.2 se da la relación de las cepas y los sustratos de los cuales fueron aisladas.

Tabla 5.1. Cepas de *Beauveria bassiana* empleadas

CLAVE C.N.R.C.B.	PATÓGENO	HUESPED	HOSPEDERO	ORIGEN
BbPM1	<i>B. bassiana</i>	Picudo del Manzano	Manzano	Arteaga, Coahuila
BbAPH2	<i>B. bassiana</i>	<i>Toxoptera aurantii</i>	Limón	Tecomán, Colima
BbGC35	<i>B. bassiana</i>	<i>Phyllophaga</i> sp.	Maíz	Atecuaro, Michoacán
BbD4	<i>B. bassiana</i>	<i>Diabrotica</i> sp.	Maíz	Jalisco
BbPCH	<i>B. bassiana</i>	<i>Brachistola</i> <i>magna</i>	-----	Durango

Tabla 5.2. Cepas de *Lecanicillium lecanii* empleadas.

CLAVE UAM-I	PATÓGENO	HUESPED	ORIGEN
EH348	<i>L. lecanii</i>	Mosquita blanca	Veracruz
EH457	<i>L. lecanii</i>	Mosquita blanca	Veracruz
EH458	<i>L. lecanii</i>	Mosquita blanca	Veracruz
EH460	<i>L. lecanii</i>	Mosquita blanca	Veracruz
EH2460	<i>L. lecanii</i>	Mosquita blanca	Veracruz

Las bacterias contra las cuales se probaron los extractos de las cepas de hongos antes mencionadas se presentan en las Tablas 5.3 y 5.4.

Tabla 5.3. Bacterias de importancia clínica empleadas en los bioensayos

BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	CLAVE
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphilococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Tabla 5.4. Bacterias de importancia agrícola empleadas en los bioensayos

BACTERIAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA	CLAVE LÁTEX*
<i>Erwinia carotovora</i>	BF-001
<i>Erwinia carotovora vs. atroseptica</i>	BF-002
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BF-003
<i>Xhantomonas campestris vs. vesicatoria</i>	BF-004

\* Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa.

### 5.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

Se probaron dos medios de cultivo sólidos: Agar Papa Dextrosa (PDA) para el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (Benhamou y Brodeur, 2000, Feng *et al.*, 2000, Barranco-Florido *et al.*, 2002) y Czapek-Dox adicionado con extracto de levadura (1%) para *Beauveria bassiana*, ambos de la marca BIOXON. Una vez determinada la cepa más bioactiva se procedió al cultivo en medio líquido en Caldo Papa Dextrosa (CPD), en un fermentador marca Applikon de capacidad de 3 L. El medio de cultivo usado en las pruebas de susceptibilidad para bacterias fue Caldo Müeller-Hinton (CMH). La composición de los medios de cultivo empleados se presenta en el anexo A-1 (pág. 92).

## 5.2. CONDICIONES DE CULTIVO

### 5.2.1. SELECCIÓN DE LA CEPA BIOACTIVA

Las 10 cepas en estudio se cultivaron en matraces Erlenmeyer de capacidad de 150 mL con 30 mL de medio de cultivo cada uno. *Beauveria bassiana* se inoculó (50 µl de suspensión de esporas) en el medio Czapek-Dox adicionado con extracto de levadura al 1%, mientras que *Lecanicillium lecanii* (50 µl de suspensión de esporas) se inoculó en PDA, previa esterilización en autoclave marca Slli Equipar a 121 °C y 15 lb. Ambos cultivos se incubaron durante 14 días a 25 °C y 27 °C, respectivamente. Una vez terminado el período de incubación, a la biomasa se le realizó una extracción con agua y otra con metanol. Los extractos fueron empleados en las pruebas de susceptibilidad por la técnica de microdilución en caldo (Pichardo y Behnke, 1993, Poupard *et al.*, 1994, NCCSL, 1994, Koneman, 1999).

### 5.2.2. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

#### 5.2.2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La CMI se define como la mínima dilución del compuesto con la cual los microorganismos no muestran crecimiento visible (Shyock *et al.*, 1998).

La CMI se determinó por el método de susceptibilidad por microdilución en caldo, empleando placas estériles de microdilución de 96 pozos marca Corning-Costar de poliestireno, de fondo redondo y con 6.4 mm de diámetro de pozo (para determinar la actividad bacteriostática). El medio de cultivo empleado fue caldo Müeller-Hinton (CMH), de acuerdo a Kohner y colaboradores en 1997. Las bacterias se sembraron 24 h antes de las pruebas de susceptibilidad, en medio de cultivo Agar Müeller-Hinton (AMH).

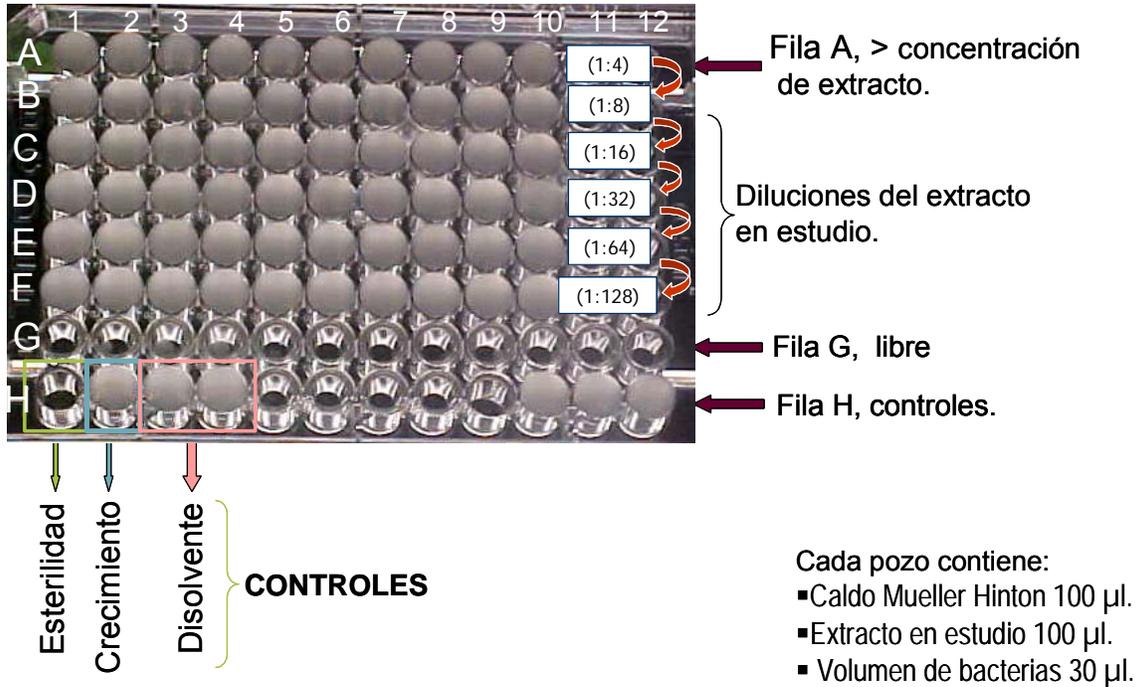
Preparación del inóculo estándar: con un palillo estéril picar una colonia bacteriana e introducirlo en un tubo con 15 mL de CMH e incubar a 37 ó 25 °C, según las bacterias, por 1 h a 150 rpm en agitador orbital Lab-Line.

Inóculo de bacterias (Lennette y Spulding, 1981, Rangdale *et al.*, 1997): La suspensión bacteriana se ajusta a 37,500 UFC/ml, partiendo del tubo de MacFarland ( $150 \times 10^8$  UFC/ml).

Procedimiento:

- A todos los pozos se les adiciona 100 µl de CMH.
- A la fila A (Fig. 5.1) se le adiciona 100 µl de los extractos metanólicos por duplicado, empleando una micropipeta múltiple de 8 canales de 30-300 µl marca Brand. El contenido de los pozos de la fila A se mezclan, se toman 100 µl y se traspasan a la fila B y así sucesivamente hasta la fila F.
- Se adicionan 30 µl del inóculo bacteriano a todas las filas, excepto a la G, la cual sólo contiene CMH (como control de esterilidad), mientras que la fila H se emplea como control de crecimiento (contiene medio y bacterias).
- Para evitar el secado por evaporación, la placa se coloca en una cámara de humedad controlada.
- Se incuba a 35 ó 27 °C, según las bacterias, durante 20 h.

La Figura 5.1 ejemplifica la prueba de susceptibilidad por microdilución en caldo.



**Fig. 5.1.** Prueba de susceptibilidad por microdilución en caldo.

#### 5.2.2.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA O LETAL (CMB)

Una vez determinada la CMI, se extrajeron 10 µL de cada uno de los pozos donde no hubo crecimiento visible y se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima bactericida por el método de siembra en agar (Gales *et al.*, 2001, Mendoza, 2002).

Procedimiento:

- Agitar la placa para mezclar el contenido de los pozos y continuar la incubación durante 4 h más, para tener un total de 24 h de incubación.
- Extraer 10 µl de los pozos donde no hay crecimiento bacteriano, se depositan en placas de AMH en forma de gota o por diseminación.
- Incubar durante 24 h a 35 ó 27 °C, según las bacterias.

Interpretación:

La CMB es la concentración del primer pozo donde no hubo crecimiento después del subcultivo en el agar.

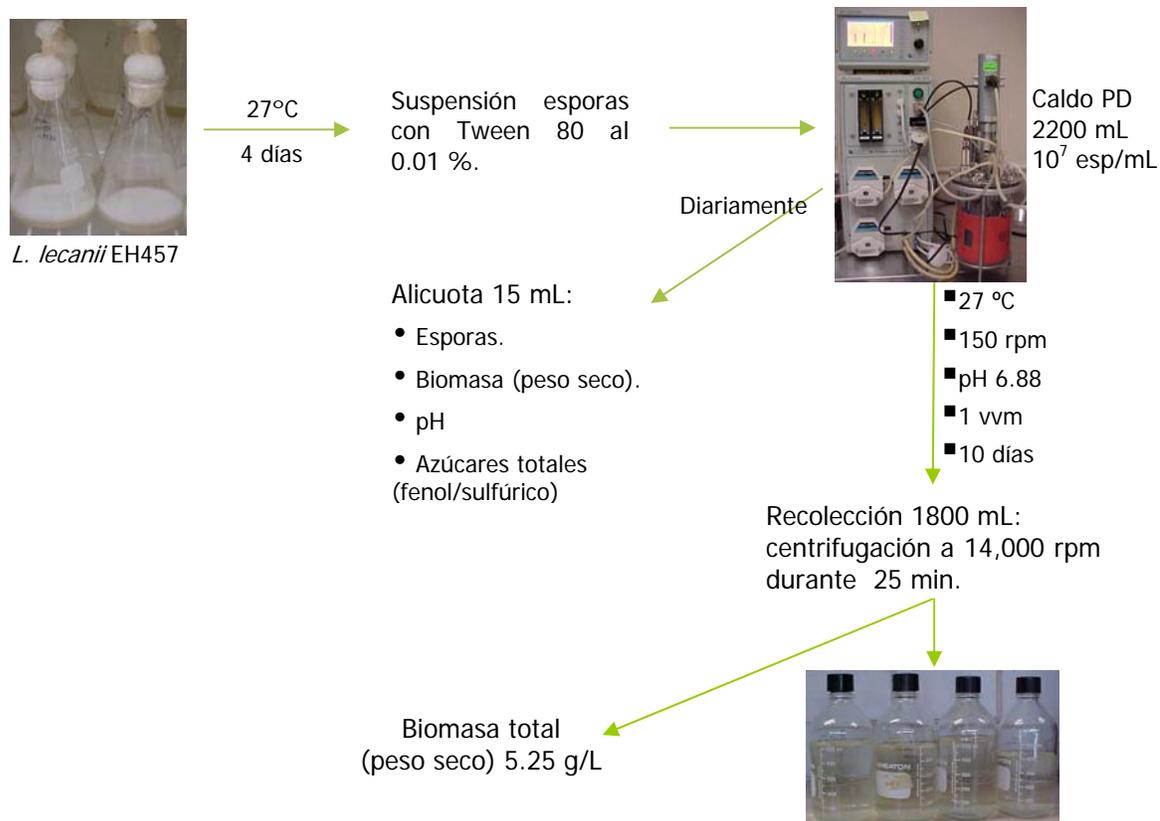
### 5.2.3. PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS DE *Lecanicillium lecanii* EN CULTIVOS LÍQUIDOS

La cepa con mayor actividad se seleccionó de cultivos en caja de Petri y posteriormente fue realizada una fermentación en Caldo Papa Dextrosa (CPD) en fermentador (Applikon, 3 L) como se muestra en la Figura 5.2, y otra en el medio de cultivo de fermentación (MCF) en fermentador (BIOSTAT, 7 L) como se muestra en la Figura 5.3. Se determinó biomasa (por peso seco), pH, azúcares totales (fenol-sulfúrico) y la actividad bacteriostática y bactericida de las cepas mediante las pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo y dilución en agar.

#### 5.2.3.1. CULTIVO EN CALDO PAPA DEXTROSA

*Lecanicillium lecanii* cepa EH457 se inoculó en matraces Erlenmeyer con PDA y se incubó a 27 °C durante 4 días. Una vez terminado el período de incubación se hizo

una suspensión de esporas con Tween 80 al 0.01%. Se prepararon 2.2 L de CPD en un fermentador Applikon, se esterilizó 20 min. Una vez esterilizado y frío se le inoculó la suspensión de esporas para tener una concentración de  $10^7$  esporas/mL en el cultivo líquido. Las condiciones de cultivo en el fermentador fueron: 27 °C, 150 rpm, pH inicial 6.8 (el cual no fue regulado durante el período de cultivo) y una aireación de 1.0 vvm, durante 10 días. Se tomaron muestras de 15 mL cada 24 h, a las cuales se les determinó concentración de esporas, pH, azúcares totales y se llevaron a cabo las pruebas de susceptibilidad. Después de terminado el período del cultivo líquido se recolectaron 1.4 L de caldo fermentado, los cuales se centrifugaron a 14,000 rpm durante 25 min. para separar la biomasa del caldo.

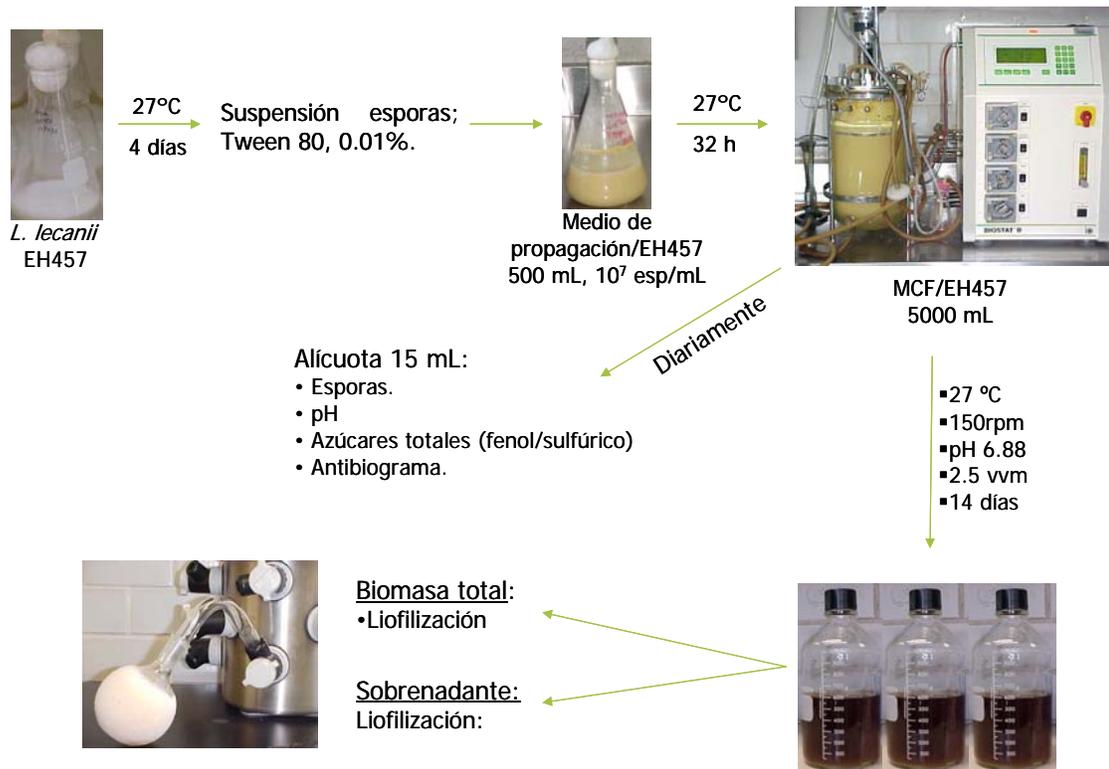


**Fig. 5.2.** Sistema de cultivo en CPD de *Lecanicillium lecanii* EH457

### 5.2.3.2. CULTIVO EN MEDIO COMPLEJO DE FERMENTACIÓN

*Lecanicillium lecanii* EH457 se inoculó en matraces Erlenmeyer con medio PDA y se incubó a 27 °C durante 4 días. Una vez terminado el período de incubación se hizo una suspensión de esporas con Tween 80 al 0.01%. Se prepararon 500 mL de medio complejo de inóculo (Somerson *et al.*, 1961) en matraz Erlenmeyer de 1 L, los cuales se esterilizaron durante 20 min. Una vez esterilizado y frío se le inoculó la suspensión de esporas para tener una concentración de  $10^7$  esporas/mL en el medio de propagación. Después de 32 h de cultivo a 150 rpm, éste se inoculó en 5 L de MCF en un fermentador Biostat de capacidad de 7 L, previa esterilización a 16 lb. de presión durante 20 min. Las condiciones de cultivo en el fermentador fueron: 27 °C, 150 rpm, pH inicial 6.88, 2.5 vvm, durante 14 días (Fig. 5.3). Se tomaron muestras de 15 mL cada 24 h, a las cuales se les determinó concentración de esporas, pH, azúcares totales y se llevaron a cabo las pruebas de susceptibilidad.

Después de terminado el período del cultivo líquido se recolectaron 4200 mL de caldo fermentado los cuales se centrifugaron a 14,000 rpm durante 25 min para separar la biomasa del caldo. Tanto la biomasa como el caldo se sometieron a liofilización y posteriormente se almacenaron a -20 °C.



**Fig. 5.3.** Sistema de cultivo en MCF de *Lecanicillium lecanii* EH457

#### 5.2.4. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Del cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii* cepa EH457, diariamente se tomaron alícuotas de 15 mL, las cuales se sometieron a estudio para determinar concentración de esporas, determinación de biomasa (en el caso del cultivo líquido CPD), pH, azúcares totales y se llevaron a cabo bioensayos durante el tiempo de cultivo.

##### 5.2.4.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS

###### CONCENTRACIÓN DE ESPORAS

De los 15 mL de alícuota del cultivo líquido se extrajeron 100  $\mu$ L y se llevaron a 1000  $\mu$ L con agua destilada estéril. Posteriormente se tomaron 300  $\mu$ L de la suspensión y se procedió al conteo en microscopio utilizando una cámara de Newbauer.

###### BIOMASA y pH

La biomasa se determinó por peso seco empleando una termobalanza Ohaus, previamente tarada y papel filtro Wathman No. 42. La biomasa se separó del caldo empleando una centrífuga Beckman Coulter a 10,000 rpm, durante 25 min. El pH se leyó en un pHmetro marca Conductronic pH120, previamente calibrado.

###### AZÚCARES TOTALES

Una vez separada la biomasa del caldo, se tomó 1 mL de éste último y se empleó para el análisis de azúcares totales por el método del fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Este método está basado en la reacción de los carbohidratos con fenoles en presencia de un ácido fuerte. Bajo condiciones fuertemente ácidas, los carbohidratos se deshidratan y forman furfural e hidroximetilfurfural, los cuales se condensan con el

fenol. La reacción completa resulta en la formación de un complejo de color amarillo-naranja que se puede leer a 490 nm (para las hexosas) y a 480 nm (para pentosas). El color producido es permanente y es útil para determinar pequeñas cantidades de azúcares y sus metilderivados, oligosacáridos y polisacáridos extraídos con diferentes disolventes.

#### Método:

- Se adicionan 2 mL de la solución de carbohidratos en tubos.
- Se adicionan 0.5 mL de fenol al 80%,
- Rápidamente se incorporan 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado con agitación continua y se deja reposar durante 10 min.
- Se agita nuevamente y se colocan los tubos en baño maría a 25-30 °C durante 10 a 20 min.
- Se leen las absorbancias del color característico amarillo-naranja a 490 nm para hexosas y 480 nm para pentosas y ácidos urónicos.
- Los blancos se preparan sustituyendo la solución de azúcares por agua destilada. Las soluciones se preparan por triplicado.

#### *Curva de calibración:*

La concentración de azúcares se determina con ayuda de una curva patrón de 0 a 0.1 g/L. A partir de las soluciones patrón de dextrosa (para el cultivo en CPD) y lactosa (para el cultivo en MCF) de 5 g/L se prepararon estándares de 0, 10, 20, hasta 100 µL. La curva de calibración realizada para dextrosa dio un coeficiente de regresión de 0.9993, y de 0.999 para la lactosa.

#### PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

A 10 mL del caldo centrifugado se le adicionaban 10 mL de metanol, se agitaba y se guardaba para las pruebas de susceptibilidad en refrigeración a 4 °C. Este tratamiento se repitió con un blanco del caldo de cultivo.

Una vez obtenidos los compuestos se repetirán las pruebas de susceptibilidad antes mencionadas para determinar la actividad de éstos.

### 5.3. EXTRACCIÓN

El caldo de fermentación de *Lecanicillium lecanii* en MCF se centrifugó (en un equipo Beckman-Coulter) a 10,000 rpm y 15 °C durante 25 minutos. Posteriormente se separó el sobrenadante y la biomasa, esta última se liofilizó (480 g) en un equipo Lab-Line y el caldo se redujo a un volumen de 1.4 L. Una vez liofilizado el caldo de fermentación de *L. lecanii* se realizaron extracciones clorofórmicas en un sistema de extracción líquido-líquido Marca SEV de capacidad de 5 L, se adicionaron aproximadamente 3 L de cloroformo al principio de las extracciones y se realizaron en total 4 extracciones clorofórmicas, las cuales se concentraron por separado en un rotavapor marca BÜCHI a una temperatura de 35 °C y 150 rpm. Después de realizar cromatografía en capa fina, empleando cromatofolios de gel de sílice Merck GF<sub>254</sub>, de 0.2 mm y revelando con lámpara de luz UV de longitud de onda corta y larga (254 y 365 nm, respectivamente) y con vapores de yodo (Tovar, 2000), los concentrados clorofórmicos que presentaron perfiles similares se juntaron y el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose un peso seco total de 440.2 mg.

### 5.4. PURIFICACIÓN Y OBTENCIÓN DE COMPUESTOS

El concentrado clorofórmico (440.2 mg) se purificó a través de cromatografía en columna compactada en seco, usando como soporte gel de sílice Merck de tamaño de malla 0.2-0.5 mm y de 0.040-0.062 mm, la cual una vez compactada se eluyó con hexano para separar grasas u otros compuestos de baja polaridad y posteriormente con mezclas de hexano/acetato de etilo, aumentando gradualmente la polaridad (7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 2:8; v:v) hasta eluir únicamente con acetato de etilo y posteriormente

etanol, logrando obtener dos compuestos puros (compuesto 1 y compuesto 2). El monitoreo de este proceso de separación se hizo mediante cromatografía en capa fina, revelando con luz ultravioleta de longitud de onda corta y larga (254-365 nm) y vapores de yodo.

Se obtuvieron 24.7 mg de cristales blancos en forma de aguja, procedentes de las fracciones del concentrado clorofórmico eluidas en hexano/acetato de etilo 1:1, con un R.<sub>f.</sub> de 0.08 al eluirse en hexano-acetato de etilo 6:4 y revelarse con luz ultravioleta de onda corta y onda larga y con vapores de yodo, nombrado compuesto 1, al que corresponden los siguientes datos espectroscópicos:

### COMPUESTO 1

**RMN <sup>1</sup>H:** (CD<sub>3</sub>OD) δ, ppm: 8.17 (1H, d, H-10 y H-12); 7.61 (1H, d, H-9 y H-13); 5.15 (1H, d, H-7); 4.13 (1H, td, H-5); 3.8 (2H, dd, H-6) y 3.6 (2H, dd, H-6).

**RMN <sup>13</sup>C:** (CD<sub>3</sub>OD) δ, ppm: 166.5 (C-3); 151.56 (C-9 y C-13); 148.58 (C-8); 124.13 (C-10 y C-12); 71.31 (C-7); 67.31 (C-2); 62.21 (C-6); 58.46 (C-5).

De las fracciones del concentrado clorofórmico eluidas con etanol se obtuvieron unos cristales blancos (25.0 mg), con un R.<sub>f.</sub> de 0.32 al eluirse en acetato de etilo-etanol 9:1 y revelarse con luz ultravioleta de onda corta y onda larga y con vapores de yodo denominado compuesto 2, al que corresponden los siguientes datos espectroscópicos:

### COMPUESTO 2

**RMN <sup>1</sup>H:** (CD<sub>3</sub>OD) δ, ppm: 6.76 (1H, d, H-9); 6.68 (1H, d, H-6); 6.61 (1H, dd, H-5); 3.81 (3H, s, H-8); 3.06 (2H, c, H-11); 2.8 (2H, t, H-3); 2.41 (2H, t, H-2); 1.92 (3H, s, H-13); 1.26 (3H, c, H-12).

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ , ppm: 182.6 (C-14); 175.4 (C-1); 148.9 (C-8); 145.9 (C-7); 133.7 (C-4); 121.9 (C-5); 116.2 (C-6); 113.3 (C-9); 56.4 (C-10); 39.9 (C-2); 39.4 (C-11); 32.6 (C-13); 27.6 (C-12); 23.8 (C-13)

## 5.5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS

De los compuestos aislados se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Anexo A-2, pág. 94), a 300 y 75 MHz, respectivamente, en un espectrómetro GEMINI 2000 marca Varian, y a 500 y 75 MHz, en un espectrómetro BRUKER DMX500, empleando como disolvente metanol deuterado y tetrametilsilano como referencia interna. También se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear COSY, DEPT, NOESY, HMBC, HSQC.

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de los espectros están expresados en partes por millón (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las abreviaturas empleadas para los espectros de  $^1\text{H}$  se dan a continuación:

Abreviatura	Señal
s	Simple
d	Doble
t	Triple
dd	Doble de dobles
c	Compleja

## 6. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 6.1 ACTIVIDADES BACTERIOSTÁTICAS Y BACTERICIDAS

Una vez obtenidos los extractos acuosos y metanólicos de las cinco cepas de *Beauveria bassiana* y de *Lecanicillium lecanii*, éstas se emplearon en las pruebas de susceptibilidad. En todos los casos, a excepción de uno, después de 14 días de cultivo en agar no se encontró actividad bacteriostática ni bactericida en los extractos acuosos de las cepas en estudio contra las bacterias probadas, a excepción del extracto acuoso de *Beauveria bassiana* cepa Bb PCH. No ocurrió así en los casos de los extractos metanólicos, en donde se detectó actividad tanto bacteriostática como bactericida contra las bacterias probadas.

Con las cepas de *Beauveria bassiana* empleadas no se tuvo gran actividad biológica en contra de las bacterias control, en general, con las cepas de *Lecanicillium lecanii* los resultados fueron satisfactorios, permitiendo la selección de una de ellas como cepa de partida para la producción de compuestos con actividad biológica.

Los resultados de las actividades bacteriostáticas y bactericidas de los extractos metanólicos del cultivo sólido de *B. bassiana* y de *L. lecanii* se muestran en las Tablas 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4.

**Tabla 6.1.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de extractos metanólicos de *Beauveria bassiana* contra bacterias de importancia clínica.

CEPA	BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS CLÍNICO		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Bb PM1	NP	NP	BT (1:16)
Bb APH2	NP	NP	NP
Bb GC35	NP	BT (1:8)	NP
Bb D4	NP	NP	NP
Bb PCH	NP	NP	BT (acuoso, 1:4)

BT = Actividad bacteriostática, BT y BC = Actividad bacteriostática y bactericida, NP = No presentó. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

En la Tabla 6.1 podemos observar que no se encontró actividad bacteriostática ni bactericida al probar los extractos metanólicos de las cepas de *Beauveria bassiana* contra *Escherichia coli* ni contra *Staphylococcus aureus* (a excepción de la cepa Bb GC35). En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* sí se presentó inhibición con Bb PM1.

**Tabla 6.2.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de los extractos metanólicos de *Beauveria bassiana* contra bacterias fitopatógenas.

CEPA	BACTERIAS FITOPATÓGENAS			
	<i>E. carotovora</i>	<i>E. carotovora</i> <i>vs. atroseptica</i>	<i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	<i>X. campestris vs.</i> <i>Vescicatoria</i>
Bb PM1	NP	BT y BC (1:18)	NP	BT (1:8) BC (1:4)
Bb APH2	NP	NP	NP	BT (1:8) BC (1:4)
Bb GC35	NP	NP	NP	BT (1:8) BC (1:4)
Bb D4	NP	NP	NP	BT (1:8) BC (1:4)
Bb PCH	NP	NP	NP	BT (1:8) BC (1:4)

BT = Actividad bacteriostática, BT y BC = Actividad bacteriostática y bactericida, NP = No presentó. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 6.2 observamos que se encontró una actividad bacteriostática y bactericida efectiva de los extractos metanólicos de las 5 cepas de *Beauveria bassiana* estudiadas en contra de la bacteria fitopatógena *Xantomonas campestris vs. vescicatoria* y sólo la cepa Bb PM1 presentó dichas actividades contra *Erwinia carotovora vs. atroseptica*.

**Tabla 6.3.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de los extractos metanólicos de *L. lecanii* contra las bacterias patógenas de interés clínico.

CEPA	BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS CLÍNICO		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EH348	BT y BC (1:8)	BT (1:8)	BT (1:32) BC (1:18)
<b>EH457</b>	<b>BT (1:16)</b>	BT (1:8)	<b>BT (1:64)</b> <b>*BC (1:32)</b>
EH458	BT (1:8)	BT (1:8)	BT y BC (1:32)
EH460	NP	BT (1:8)	BT (1:32) BC (1:18)
EH2460	BT (1:8)	NP	BT (1:32) BC (1:18)

BT = Actividad bacteriostática, BT y BC = Actividad bacteriostática y bactericida, BT y \*BC = Mayor actividad bacteriostática y bactericida, NP = No presentó. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

Como se observa en la Tabla 6.3, se presentó actividad bacteriostática en los extractos metanólicos de las cepas EH348, EH457, EH458 y EH2460 contra *Escherichia coli* y actividad bactericida sólo con EH438. Asimismo, hubo inhibición de *Staphylococcus aureus* con los extractos metanólicos de las primeras cuatro cepas de *Lecanicillium lecanii* estudiadas. Todas las cepas de *L. lecanii* presentaron actividad bacteriostática y bactericida en contra de *Pseudomonas aeruginosa*, en donde se observó una mayor actividad (dilución 1:64) de la cepa EH457 de *Lecanicillium lecanii*.

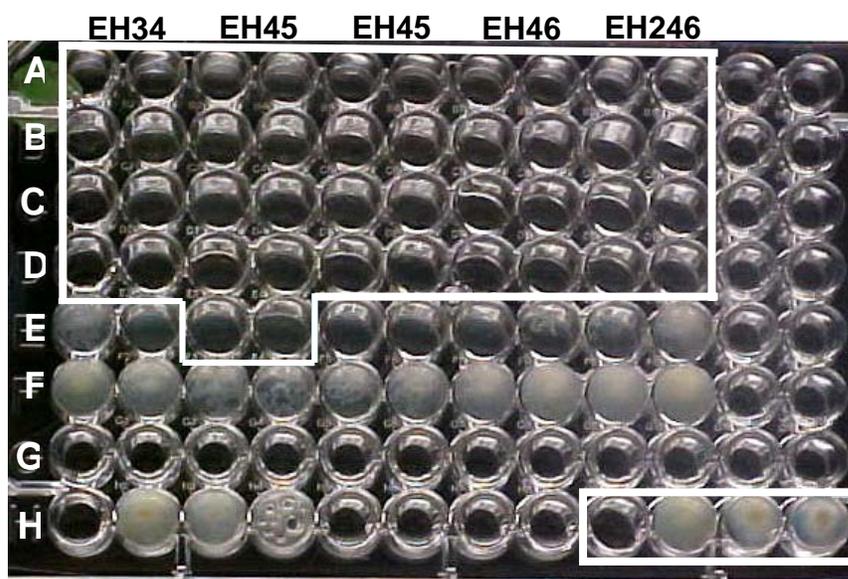
**Tabla 6.4.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad en medio sólido de los extractos de *L. lecanii* contra las bacterias de importancia agrícola.

CEPA	BACTERIAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA			
	<i>E. carotovora</i>	<i>E. carotovora vs. atroseptica</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>X. campestris vs. Vescicatoria</i>
EH348	BT (1:16)	BT y BC (1:4)	NP	NP
<b>EH457</b>	<b>BT (1:16)</b>	<b>BT y BC (1:8)</b>	<b>NP</b>	<b>BT (1:8)</b>
EH458	BT (1:16)	BT y BC (1:4)	NP	BT (1:8)
EH460	BT (1:16)	BT y BC (1:4)	NP	NP
EH2460	BT (1:8)	BT y BC (1:4)	NP	NP

BT = actividad bacteriostática, BT y BC = actividad bacteriostática y bactericida, BT y BC\* = mayor actividad bacteriostática y bactericida, NP = no presentó. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

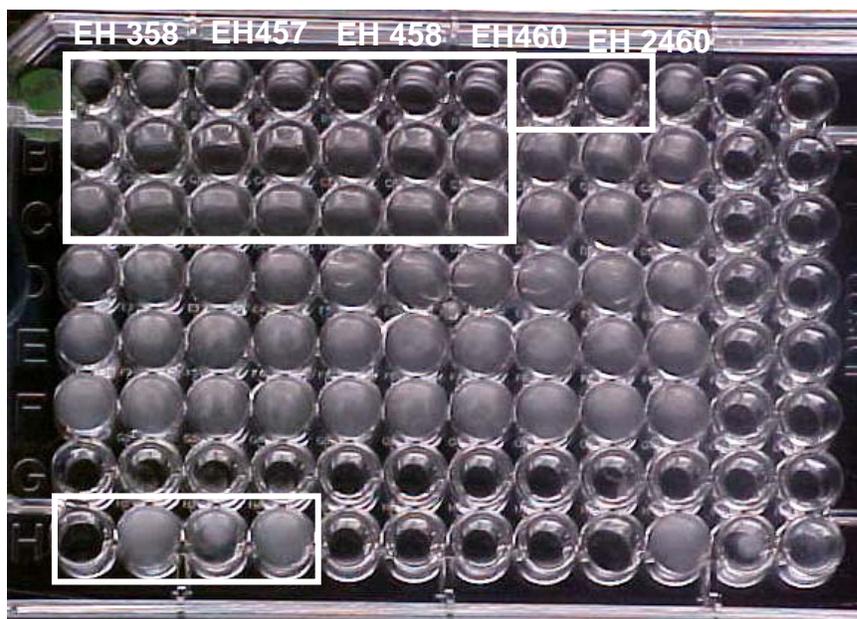
En la Tabla 6.4 se observa que se presentó actividad bacteriostática y bactericida en todas las cepas de *L. lecanii* estudiadas después de 10 días de cultivo contra *Erwinia carotovora vs atroseptica* y sólo actividad bacteriostática contra *E. carotovora*. Así mismo, los extractos metanólicos de las cepas EH 457 y EH458 fueron bacteriostáticos (dilución 1:8) contra *Xhantomonas campestris vs. vescicatoria* y en ningún caso se presentó inhibición contra *Agrobacterium tumefaciens*.

Las Fig. 6.1 y 6.2 son una muestra típica de las pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo de los extractos metanólicos de las cepas de *Lecanicillium lecanii* contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. Esta prueba determinó la actividad bacteriostática de dichos extractos.



**Fig.6.1.** Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de las cepas de *Lecanicillium lecanii* cultivadas en agar papa dextrosa contra *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Fig. 6.1 se puede observar que no se presentó crecimiento visible de *P. aeruginosa* al tratarla con los extractos metanólicos de las cepas de *Lecanicillium lecanii*. Se observó también mayor inhibición con la cepa EH457 de *L. lecanii* y se puede decir que el efecto bacteriostático no se debe al metanol, ya que el control del disolvente (pozo H-11 y H-12) presentó crecimiento bacteriano.



**Fig.6.2.** Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de las cepas de *Lecanicillium lecanii* cultivadas en agar papa dextrosa contra *Staphylococcus aureus*.

En el caso de la actividad de las cepas *Lecanicillium lecanii* contra *Staphylococcus aureus* hubo una mayor inhibición (dilución 1:8) con 3 de las 5 cepas en estudio, mientras que una de ellas no presentó actividad bacteriostática (EH 2460). De igual manera se observó que el metanol no tuvo efecto en dicha actividad ya que se presentó crecimiento bacteriano en el control del disolvente (pozo H-3 y H-4).

## 6.2. SELECCIÓN DE LA CEPA BIOACTIVA

Al comparar los resultados de los extractos metanólicos de las cepas de *Beauveria bassiana* y de *Lecanicillium lecanii* contra las bacterias patógenas de interés clínico, se pudo observar una mayor actividad tanto bacteriostática como bactericida de las cepas de *L. lecanii* en comparación con las de *Beauveria bassiana*, especialmente con la cepa EH457 de *Lecanicillium lecanii*, en donde se encontró una mayor

actividad bacteriostática contra *Escherichia coli* (en una dilución 1:16) y *Pseudomonas aeruginosa* (dilución 1:64), así como una mayor actividad bactericida (1:32) contra ésta última.

En cuanto a los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad contra las bacterias fitopatógenas, se pudo observar una mayor actividad tanto bacteriostática como bactericida de las cepas de *Lecanicillium*, en comparación con las cepas de *Beauveria bassiana*, en donde sólo se encontró actividad bacteriostática y bactericida contra *Xanthomonas campestris* vs *vescicatoria* con *Beauveria bassiana* y sólo la cepa Bb PM1 fue activa contra *Erwinia carotovora* vs *atroseptica*. En el caso de *Lecanicillium lecanii*, el extracto metanólico de la cepa EH457 presentó mayor actividad bacteriostática y bactericida contra *Erwinia carotovora* vs *atroseptica* en comparación con las demás.

De acuerdo a los resultados de las pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo, la cepa EH457 de *Lecanicillium lecanii* fue la que presentó mayor actividad de todas las cepas de hongos probadas tanto para las bacterias de importancia clínica (principalmente contra *Pseudomonas aeruginosa*) como para las de importancia agrícola y fue la empleada para estudios posteriores en cultivo líquido.

---

## 7. EVALUACIÓN ANTIBIÓTICA DE *Lecanicillium lecanii* EH457 EN CULTIVOS LÍQUIDOS

### 7.1. EVALUACIÓN ANTIBIÓTICA DE *L. lecanii* EH457 EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO CPD.

Una vez seleccionada la cepa de *L. lecanii* EH457, se procedió a su cultivo en medio líquido en fermentador, permitiendo tener condiciones de cultivo homogéneas. Se realizó monitoreo diario de la actividad para determinar el tiempo en que ésta se presentaba y de acuerdo a los resultados se observó que sólo se presentó actividad en el 5° y hasta el 10° día de cultivo contra *E. coli*, contrario a lo observado en el cultivo en agar, lo cual muestra que la producción de metabolitos se ve afectada por el tipo de cultivo empleado.

Asimismo se observó que la poca actividad presente no se debió ni al medio de cultivo ni al disolvente empleado, en este caso metanol, ya que no hubo actividad al tratar las bacterias con el control del caldo papa dextrosa ni con el control del disolvente. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad en caldo y agar papa dextrosa del cultivo de *Lecanicillium lecanii* EH457 contra las bacterias probadas se muestran en las Tablas 7.1 y 7.2.

**Tabla 7.1.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad de cultivo en agar papa dextrosa y caldo papa dextrosa de *L. lecanii* cepa EH457 contra bacterias de interés clínico.

BACTERIA	BACTERIOSTÁTICO		BACTERICIDA	
	PDA	CPD	PDA	CPD
<i>E. coli</i>	Día 14 (1:16)	Día 5-10 (1:16)	NP	NP
<i>S. aureus</i>	Día 14 (1:8)	NP	NP	NP
<i>P. aeruginosa</i>	<b>Día 14 (1:64)</b>	<b>NP</b>	<b>Día 14 (1:32)</b>	<b>NP</b>

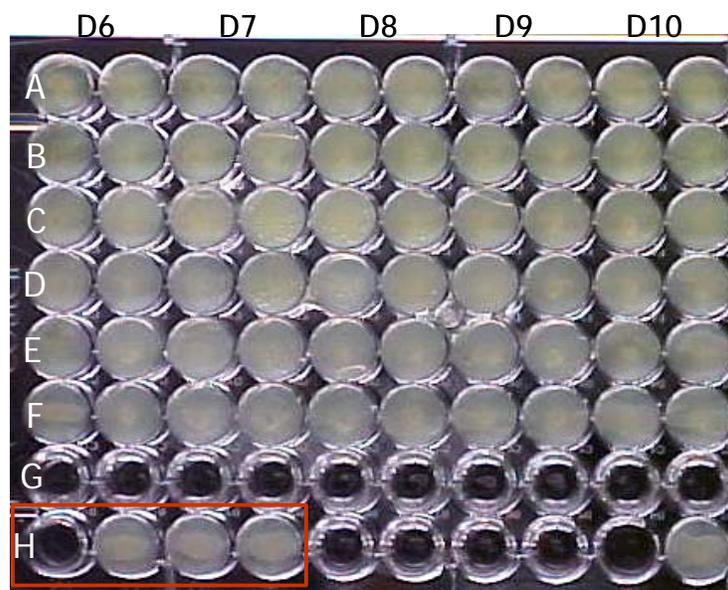
BT = Actividad bacteriostática, BT y BC = Actividad bacteriostática y bactericida, NP = No presentó. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

**Tabla 7.2.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad de cultivo en agar papa dextrosa y caldo papa dextrosa de *L. lecanii* EH457 contra bacterias de importancia agrícola.

BACTERIA	BACTERIOSTÁTICO		BACTERICIDA	
	PDA	CPD	PDA	CPD
<i>E. carotovora</i>	Día 14 (1:16)	NP	NP	NP
<i>E. carotovora vs. atroseptica</i>	Día 14 (1:8)	Día 8 (1:32)	Día 14 (1:8)	BT y BC Día 8 (1:32)
<i>A. tumefaciens</i>	NP	NP	NP	NP
<i>X. campestris vs. vesicatoria</i>	Día 14 (1:8)	NP	NP	NP

BT = Actividad bacteriostática, BT y BC = Actividad bacteriostática y bactericida, NP = No presentó. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

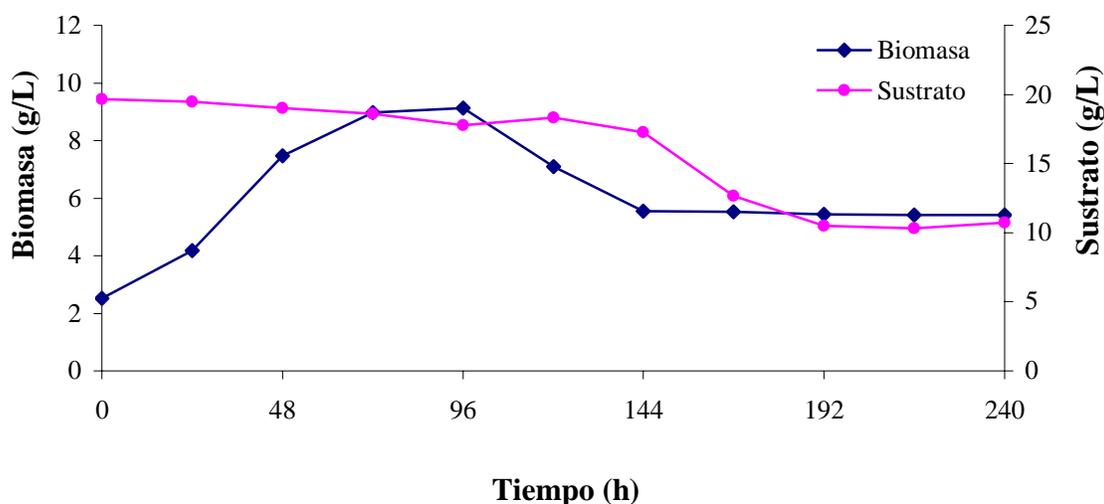
Después de 10 días de cultivo en caldo papa dextrosa se observó que la actividad tanto bacteriostática como bactericida de la cepa en estudio no se vio favorecida por el cultivo en caldo papa dextrosa, en comparación con los resultados obtenidos en el cultivo en agar papa dextrosa después de 14 días de cultivo (como se muestra en las Tablas 6.3 y 6.4), ya que sólo se encontró actividad bacteriostática contra *E. coli* y *Erwinia carotovora* vs *atroseptica* y bactericida contra ésta última. Contrario al resultado obtenido en el cultivo sólido contra *Pseudomonas aeruginosa*, en el cultivo líquido no se encontró ningún tipo de actividad contra ésta última durante el transcurso del cultivo, como se muestra en la Fig. 7.1.



**Figura 7.1.** Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de *L. lecanii* cultivado en CPD, del día 6 (D6) al día 10 (D10) de cultivo, contra *P. aeruginosa*.

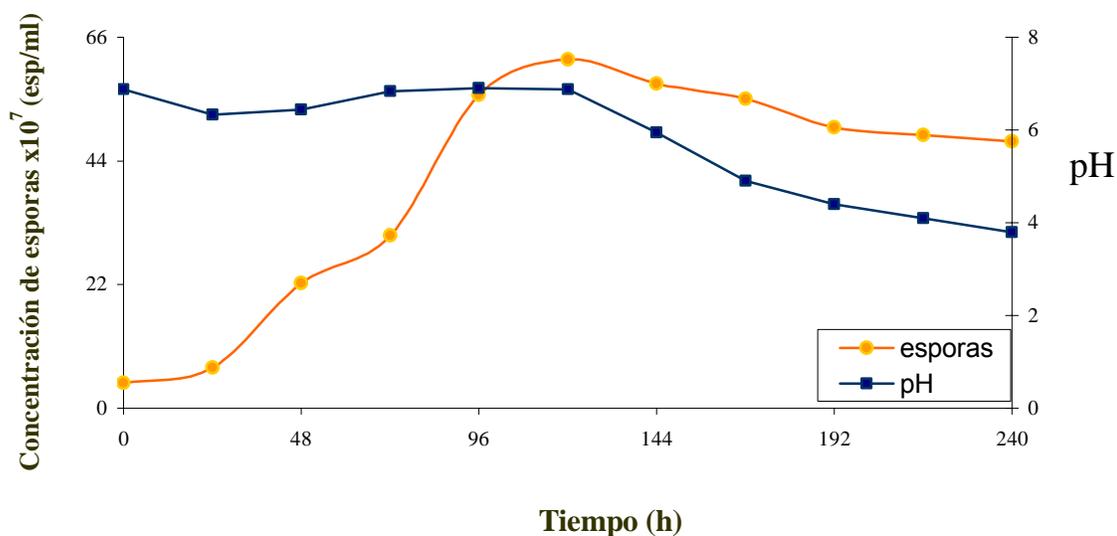
### 7.1.1. CINÉTICAS DE BIOMASA, pH, CONCENTRACIÓN DE ESPORAS Y AZÚCARES TOTALES EN CULTIVO EN CALDO PAPA DEXTROSA (CPD).

Los resultados de las determinaciones de biomasa, pH, concentración de esporas y consumo de sustrato en medio de cultivo líquido CPD se muestran en las siguientes figuras 7.2 y 7.3.



**Figura 7.2.** Formación de biomasa y consumo de sustrato por *L. lecanii* EH457 en CPD.

La máxima producción de biomasa se obtuvo en el 4° día (8.4 g/L), con un ligero consumo de sustrato, a partir de ahí se observó un decremento en la biomasa al igual que del sustrato, los cuales se mantuvieron constantes a partir del 6° día y hasta el final del cultivo. De acuerdo al comportamiento de la formación de biomasa y consumo de sustrato, este medio de cultivo fue efectivo sólo para el crecimiento del hongo en estudio, probablemente por ser un medio definido sin los nutrientes necesarios para la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica (Madigan *et al.*, 2004).



**Figura 7.3.** Determinación de esporas y pH en el cultivo en CPD de *L. lecanii*

En la Fig. 7.3 se observó que a partir del 5° día de cultivo en caldo papa dextrosa, se presentó una máxima concentración de esporas de  $6.2 \times 10^8$  esp/mL a un pH constante de 6.4. A partir de ahí y hasta el final del cultivo, tanto la concentración de esporas como el pH disminuyeron hasta tener  $4.3 \times 10^8$  esp/mL y un pH final de 3.8. *L. lecanii* dejó de crecer porque probablemente la fuente de carbono dejó de ser el sustrato limitante, dado la composición característica del CPD. El decremento en el pH pudo deberse a la formación de compuestos ácidos producidos por *Lecanicillium lecanii*.

## 7.2. EVALUACIÓN ANTIBIÓTICA DEL CULTIVO DE *Lecanicillium lecanii* EH457 EN MCF

Del cultivo líquido de *L. lecanii* cepa EH457 en medio complejo de fermentación se obtuvo una mayor actividad, tanto bacteriostática como bactericida, en comparación con los resultados obtenidos al emplear el medio de cultivo CPD. Los resultados se presentan en las Tablas 7.3 y 7.4.

**Tabla 7.3.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad en caldo papa dextrosa y medio complejo de fermentación de *L. lecanii* cepa EH457 contra bacterias de interés clínico.

BACTERIA	BACTERIOSTÁTICO		BACTERICIDA	
	Caldo Papa Dextrosa	Medio Complejo de Fermentación	Caldo Papa Dextrosa	Medio Complejo de Fermentación
<i>E. coli</i>	Día 5-10 (1:16)	NP	NP	NP
<i>S. aureus</i>	NP	<b>Día 6-14 (1:4)</b>	NP	NP
<i>P. aeruginosa</i>	NP	<b>Día 7-14 (1:8, 1:16)</b>	NP	<b>Día 7 (1:4)</b>

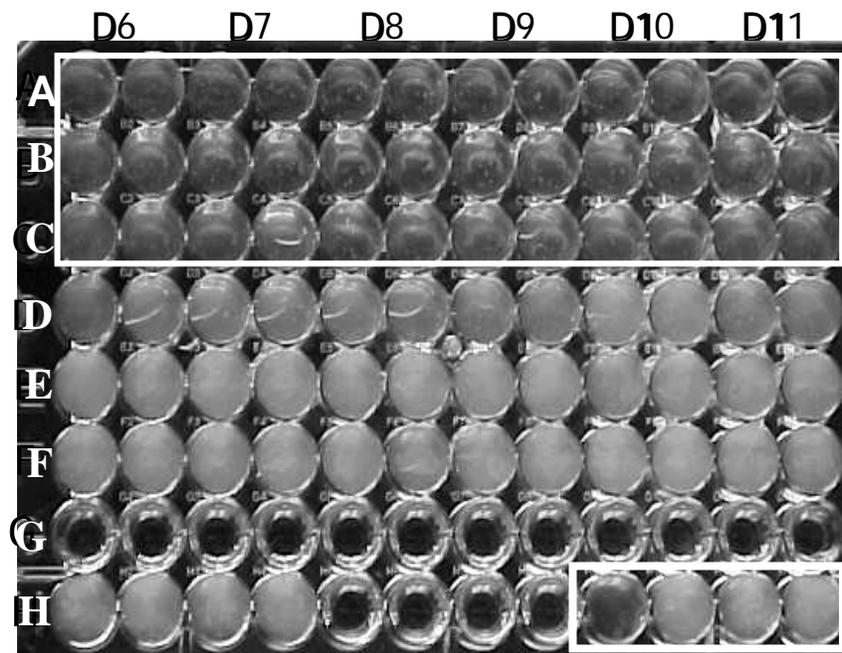
NP = No presentó actividad. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

**Tabla 7.4.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad en CPD y MCF de *L. lecanii* cepa EH457 contra bacterias de importancia agrícola

BACTERIA	BACTERIOSTÁTICO		BACTERICIDA	
	Caldo Papa Dextrosa	Medio Complejo de Fermentación	Caldo Papa Dextrosa	Medio Complejo de Fermentación
<i>E. carotovora</i>	NP	<b>Día 6-14 (1:16)</b>	NP	<b>Día 6-14 (1:16)</b>
<i>E. carotovora</i> vs. <i>atroseptica</i>	Día 8 (1:64)	<b>Día 7-14 (1:8)</b>	Día 8 (1:32)	<b>Día 7-14 (1:8)</b>
<i>A. tumefaciens</i>	NP	<b>Día 9-14 (1:8)</b>	NP	<b>Día 9-14 (1:8)</b>
<i>X. campestris</i> vs. <i>vescicatoria</i>	NP	<b>Día 9-14 (1:8)</b>	NP	<b>Día 9-14 (1:8)</b>

NP = No presentó actividad. Los números entre paréntesis reflejan la dilución en la que se encontró actividad.

Después de 14 días de cultivo en MCF se observó que la actividad tanto bacteriostática como bactericida de la cepa en estudio se vio favorecida, en comparación con los resultados obtenidos en el cultivo en caldo papa dextrosa. Contrario al resultado obtenido en el cultivo líquido contra *Erwinia carotovora*, en el cultivo en medio complejo de fermentación, hubo actividad contra ésta última, como se muestra en la Fig. 7.4.



**Figura 7.4.** Evaluación de actividad bacteriostática de las soluciones metanólicas de *L. lecanii* en MCF del día 6 (D6) al día 10 (D10) de cultivo contra *E. carotovora*.

Aquí se probó la actividad bacteriostática de *L. lecanii* a partir del 6° día de cultivo líquido en medio complejo de fermentación y hasta el día 11 contra *E. carotovora*. Como se observa en la Fig. 7.4, se presentó inhibición bacteriana durante el transcurso del cultivo. En este caso, podemos decir que la producción de metabolitos activos probablemente se llevó a cabo a partir del 6° día de cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii*.

### 7.2.1. CINÉTICA DE pH, CONCENTRACIÓN DE ESPORAS Y AZÚCARES TOTALES EN MCF.

En el 6° día de cultivo en MCF la concentración de esporas tuvo un máximo de  $9.78 \times 10^8$  esp/mL y hacia el final del cultivo se tuvo un pH de 7.9 (Fig. 7.5), lo que probablemente favoreció la producción de sustancias activas, lo cual se vio reflejado en los resultados de susceptibilidad (Tablas 7.3 y 7.4). El MCF es empleado en la producción metabolitos secundarios con actividad antibiótica como la penicilina G (Fernández, 1997, Madigan *et al.*, 2004), y fue efectivo para la producción de sustancias biológicamente activas de *Lecanicillium lecanii* en este estudio. En este caso, no se logró determinar con precisión la biomasa producida, ya que los sólidos de maceración de maíz no son completamente solubles y esto interfirió con la cuantificación.

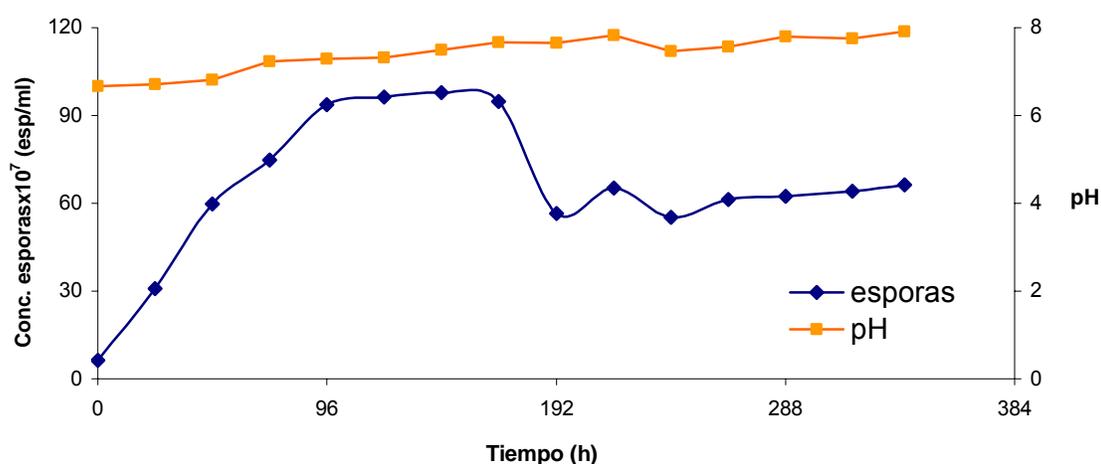


Fig. 7.5. Determinación de esporas y pH en el cultivo en MCF de *L. lecanii* EH457.

### 7.3. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de cada uno de los cultivos líquidos en las pruebas de susceptibilidad, se mostró que al emplear el CPD como medio de cultivo líquido la cepa EH457 de *L. lecanii* presentó actividad bacteriostática sólo para dos bacterias: *Escherichia coli* y *Erwinia carotovora* vs. *atroseptica*, a partir del 5° y 8° día de fermentación, respectivamente, y actividad bactericida sólo contra *Erwinia carotovora* vs. *atroseptica*.

En contraste, con el cultivo en MCF los resultados muestran actividad bacteriostática para 6 de las 7 bacterias probadas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Xhantomonas campestris* pv. *vescicatoria*), a partir del 6° y 7° día de fermentación en promedio, y actividad bactericida para 5 de ellas (no así para *Staphylococcus aureus*), a partir del 7° día y hasta el final del cultivo.

Por todos los resultados obtenidos en este estudio, se pudo concluir que el medio complejo de fermentación es un buen medio para la producción de sustancias con actividad biológica y que dichos metabolitos se producen en promedio a partir del 6° y 7° día y hasta el final del cultivo, por lo cual se procedió a la extracción, purificación, obtención y caracterización estructural de dichos metabolitos a partir del cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii* en este medio.

## 8. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN, OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS

Después de 15 días de cultivo en MCF de *Lecanicillium lecanii* cepa EH457 el caldo se separó de la biomasa y se procedió a la extracción, purificación y caracterización estructural de los compuestos, como se menciona a continuación:

### 8.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS

Se obtuvieron 4.2 L del caldo de cultivo de *L. lecanii*, los cuales se concentraron en un liofilizador hasta 1.4 L y se extrajeron 4 veces con cloroformo. El cloroformo fue eliminado a presión reducida, obteniendo un peso seco total de 440.2 mg.

Este procedimiento se ha sugerido para la obtención de compuestos orgánicos, con resultados satisfactorios como en el caso de la obtención de cerevisterol a partir de *Lecanicillium lecanii* (Trigos *et al.*, 1999), así como también para la obtención de antibióticos nuevos como la xanthoepocina (Igarashi *et al.*, 2000).

### 8.2. PURIFICACIÓN Y OBTENCIÓN DE COMPUESTOS

Los 440.2 mg del concentrado clorofórmico del cultivo en MCF de *Lecanicillium lecanii* EH457 se sometieron a purificación por cromatografía en columna compactada en seco, se obtuvieron unos cristales blancos en forma de aguja (24.7 mg), con punto de fusión de 148 °C, provenientes de las fracciones del concentrado clorofórmico eluidas en hexano/acetato de etilo 1:1, con un  $R_f$  de 0.08 al eluirse en

hexano-acetato de etilo 6:4 y revelarse con luz ultravioleta de onda corta y onda larga y con vapores de yodo, denominado como compuesto 1.

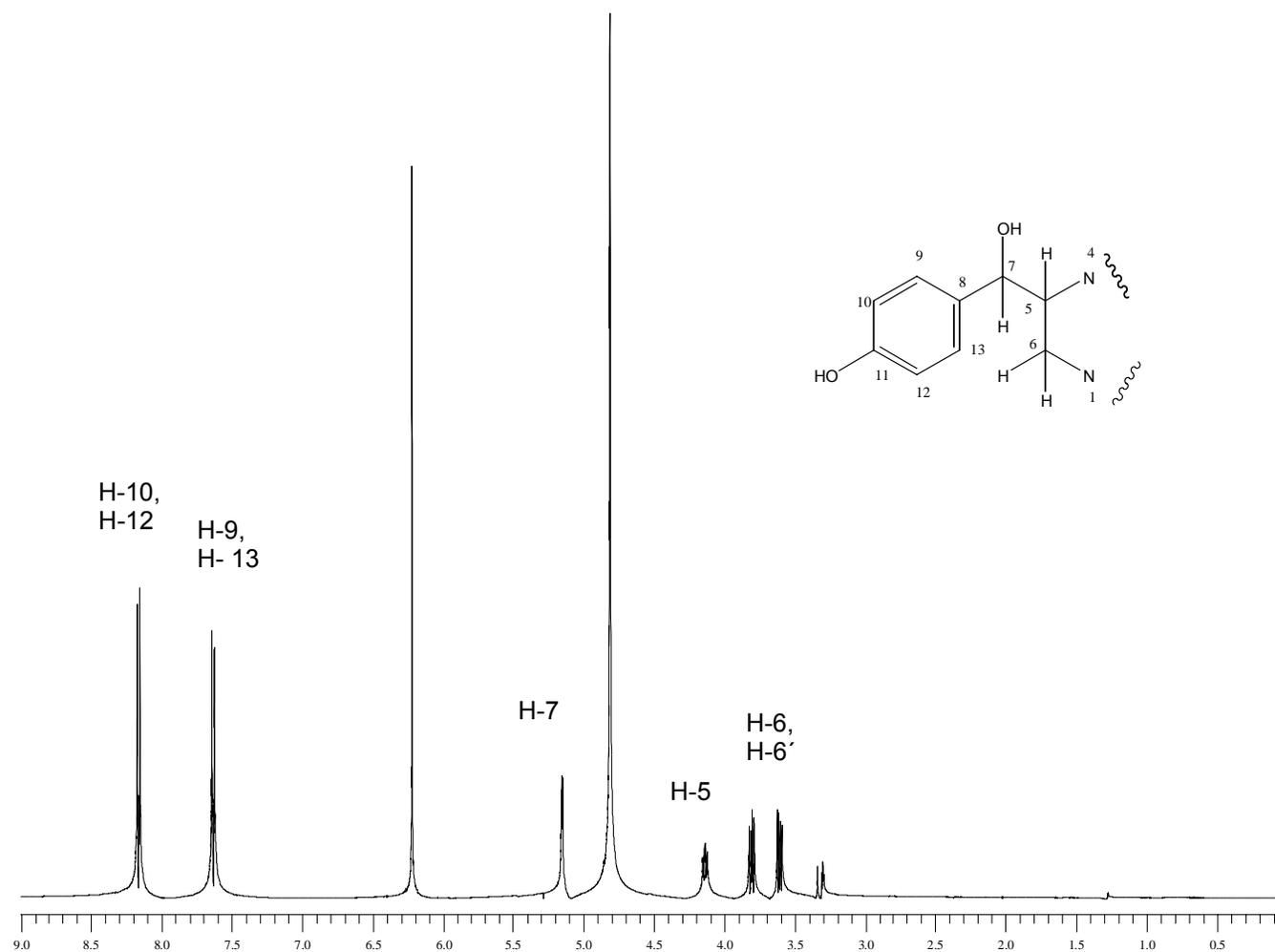
De las fracciones del concentrado clorofórmico eluidas con etanol se obtuvieron unos cristales blancos (25.0 mg), con punto de fusión de 178.5-182 °C, un R.<sub>f.</sub> de 0.32 al eluirse en acetato de etilo-etanol 9:1 y revelarse con luz ultravioleta de onda corta y onda larga y con vapores de yodo. Este segundo compuesto se denominó compuesto 2.

Los dos compuestos son solubles en metanol, de lo que se deduce son metabolitos polares con grupos hidroxilo en sus moléculas, lo cual les puede conferir algún tipo de actividad biológica (Boaventura *et al.*, 1994, Trigos *et al.*, 1995 y 1996).

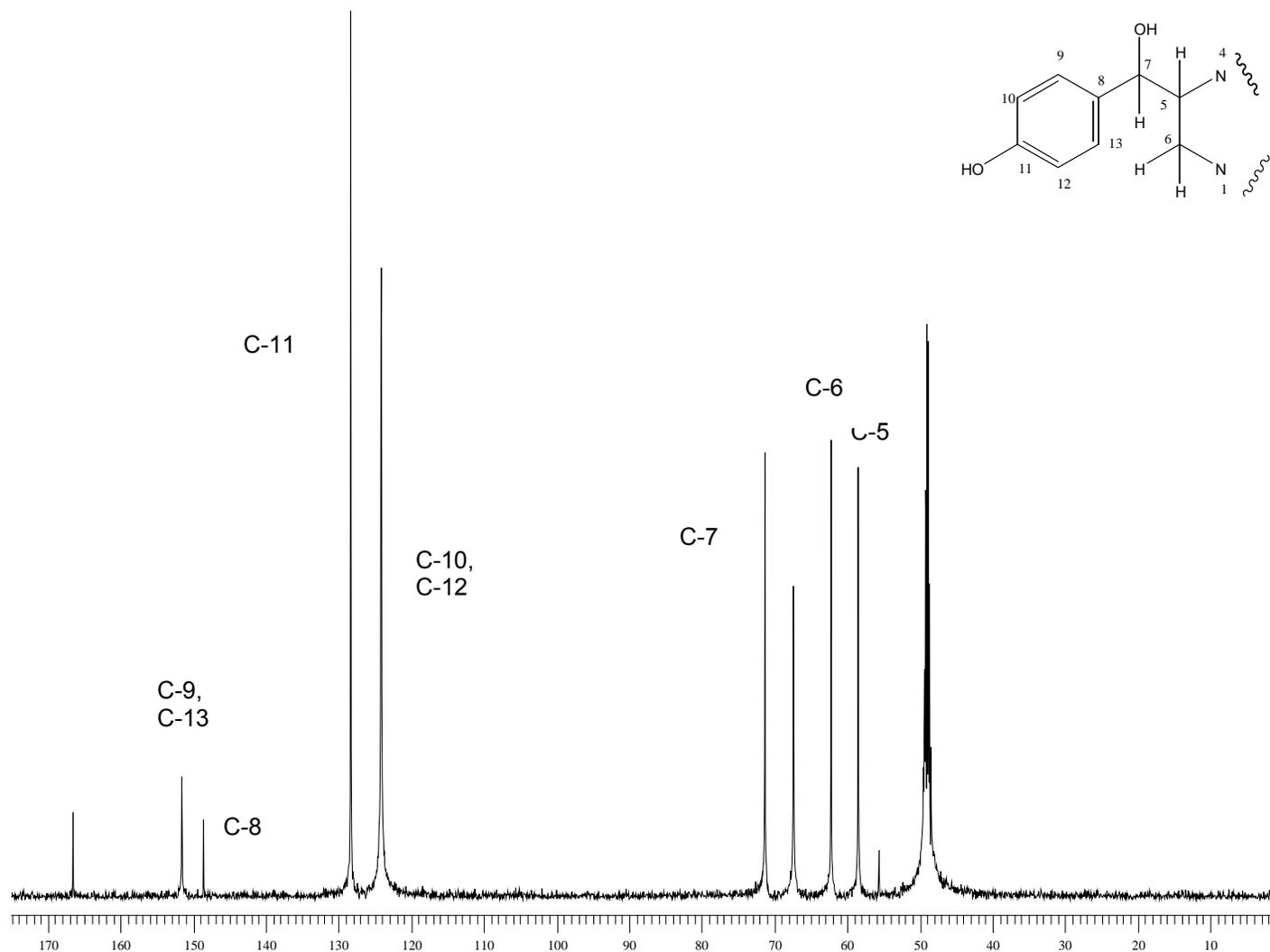
### 8.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO 1

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (**Espectro 8.1**) a 8.17 y 7.61 ppm se observaron dos señales dobles que evidenciaron al sistema  $\text{A}_2\text{-B}_2$  de los protones aromáticos H-10 y H-12 y H-9 y H-13, respectivamente; mientras que otra señal simple a 6.21 ppm se encuentra por elucidar. Una señal doble a 5.15 ppm y que integró para un protón, mostró a H-7. A 4.13 ppm apareció una señal triple doble que integró para un protón y que fue asignado para H-5, finalmente, dos señales doble de dobles a 3.8 y 3.6 ppm correspondieron a los protones H-6 y H-6'.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (**Espectro 8.2**) se apreciaron nueve señales atribuibles a los once carbonos presentes en la molécula, ya que dos de ellas corresponden a dos carbonos cada una. A 151.56 y 124.13 ppm se encuentran los carbonos del anillo aromático C-9 y C13, y C-10 y C-12, respectivamente, las señales a 128.00 y 71.31 ppm correspondieron a los carbonos base de los OH en C-11 y C-7, respectivamente, mientras que la señal en 62.21 ppm corresponde al carbono secundario C-6 y a 148.58 ppm se observa la presencia del carbono cuaternario C-8.

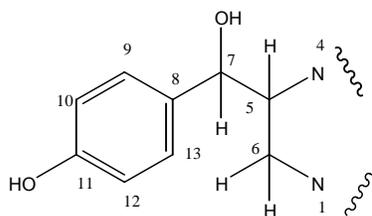


**Espectro 8.1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 1



**Espectro 8.2.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 1

Por todo lo anterior, al parecer se trata de un compuesto con una base estructural, como se indica en la Figura 8.1 y cuya elucidación estructural se encuentra actualmente en estudio.

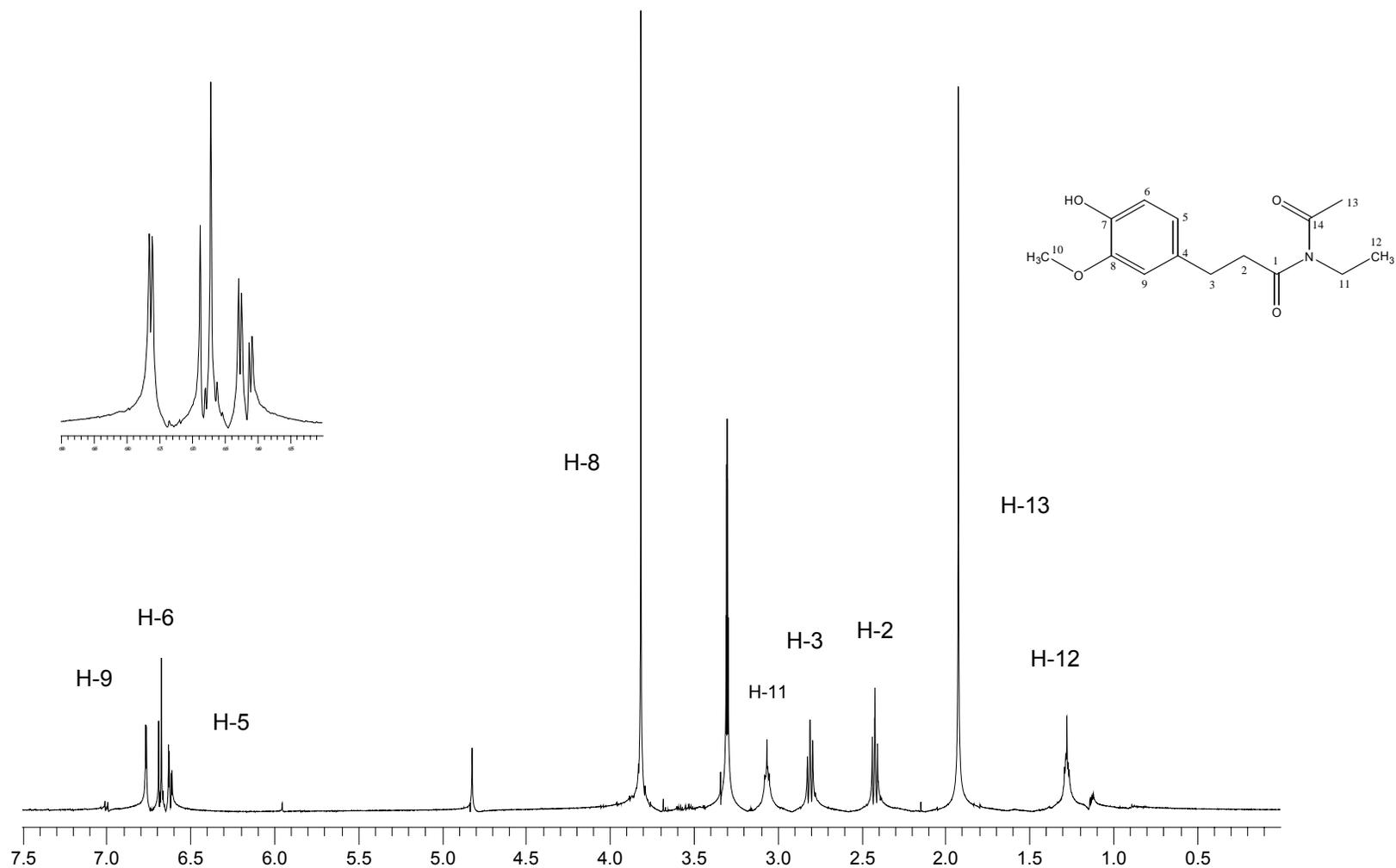


**Figura 8.1.** Base estructural del compuesto 1

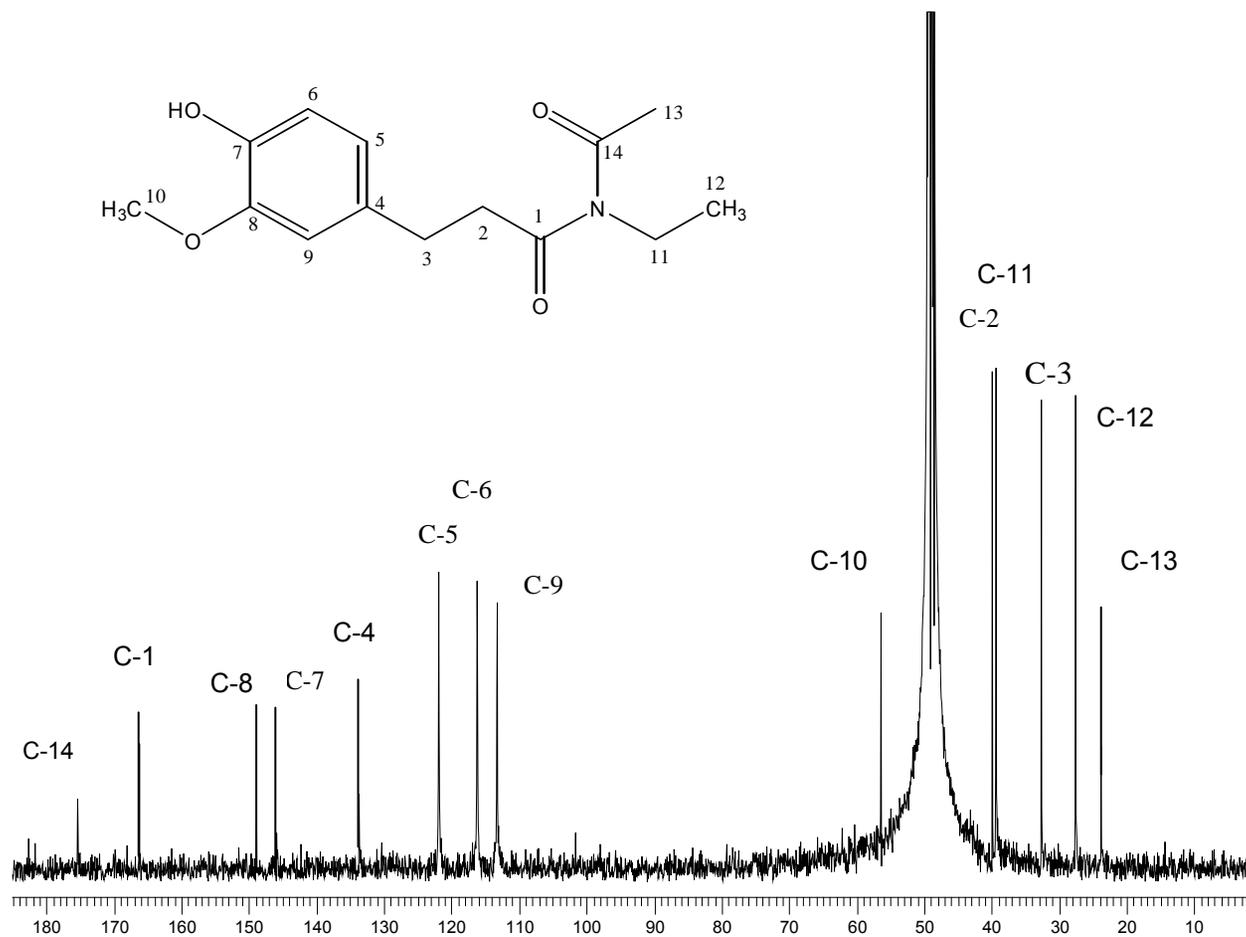
#### 8.4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPUESTO 2

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 8.3**) realizado en  $\text{CD}_3\text{OD}$  se aprecian tres protones aromáticos a 6.76, 6.68 y 6.71 ppm, apareciendo como señal doble ( $J=1.93$  Hz), doble ( $J=8.00$  Hz), y doble de dobles ( $J=1.9$  y  $8.00$  Hz) que corresponden a los protones H-9, H-6 y H-5, respectivamente, presentes en el anillo aromático y que se pueden apreciar claramente en la ampliación del espectro; un singulete que integró para tres protones y que apareció a 3.81 ppm que correspondió a los tres protones del grupo metoxilo sobre 8; a 3.06 ppm aparece una señal compleja atribuible a los dos protones en 11; a 2.80 ppm ( $J=7.6$  Hz) y 2.41 ppm ( $J=7.6$  Hz) aparecen dos tripletes que integran para dos protones cada uno, correspondientes a los metilenos en 3 y 2. Un singulete a 1.92 ppm indicó la presencia de un grupo metilo unido a un grupo carbonilo que resultó ser de los protones del metilo en la posición 13. Finalmente, una señal compleja a 1.26 ppm indicó la presencia de un metilo en la posición 12.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 8.4**) efectuado con  $\text{CD}_3\text{OD}$  se pudieron observar 14 señales correspondientes a los 14 carbonos presentes en la molécula y en las que se destacan dos señales de grupo carbonilo correspondientes al C-14 y C-1 a 182.6 y 175.4 ppm, respectivamente; seis señales aromáticas a 148.9, 145.9, 133.7, 121.9, 116.2 y 113.3 ppm, atribuibles a los carbonos 8, 7, 4, 5, 6 y 9, respectivamente.



**Espectro 8.3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 2



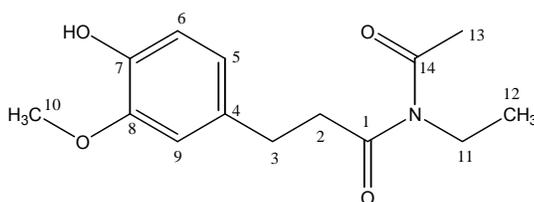
**Espectro 8.4.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 2

Así mismo, el resto de los carbonos aparecieron a 56.4, 39.9, 39.4, 32.6, 27.6 y 23.8 ppm, cuyas asignaciones correspondieron a los carbonos 10, 2, 11, 3, 12 y 13, respectivamente. Estas asignaciones y los de RMN de  $^1\text{H}$  se pudieron confirmar mediante los experimentos COSY, HSQC y HMBC.

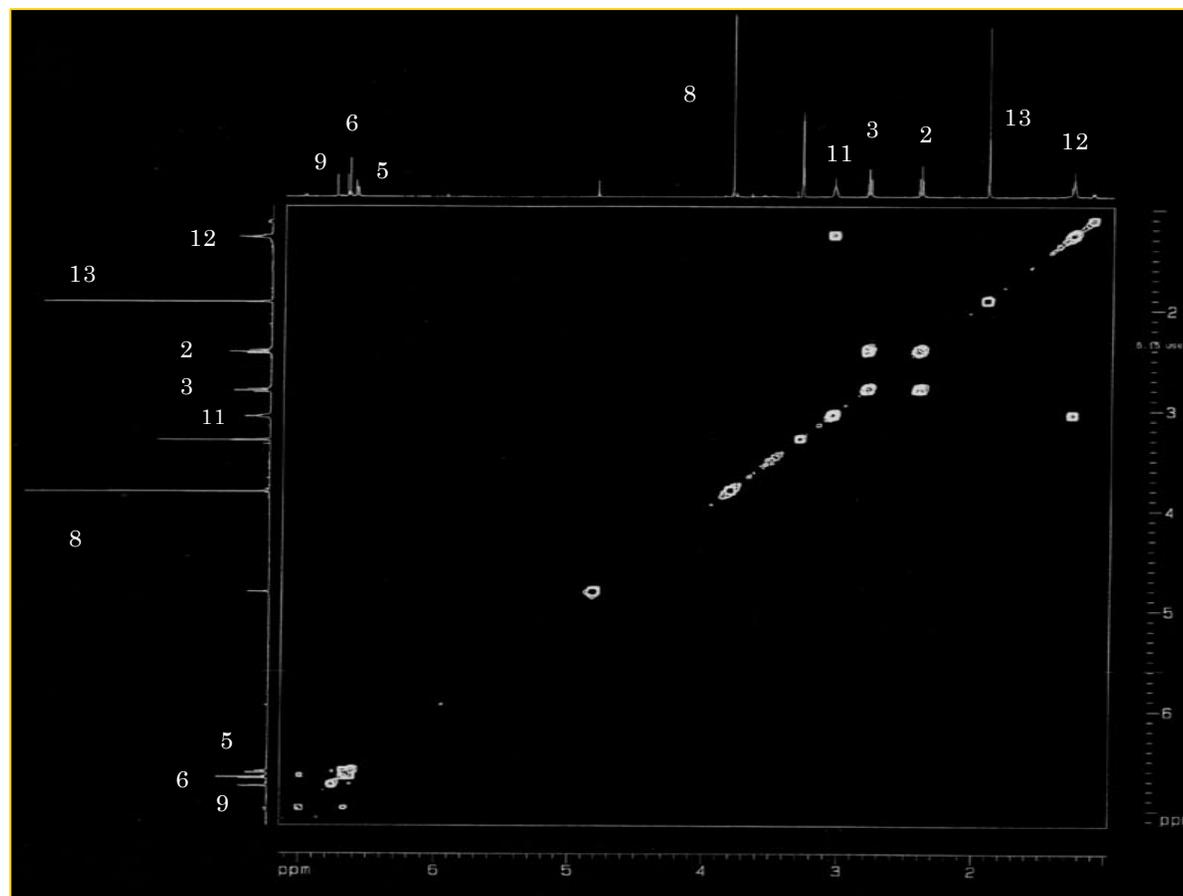
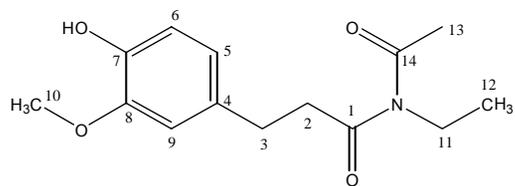
Así mismo, en el experimento COSY (**Espectro 8.5 y 8.6**) se apreciaron claramente los acoplamientos entre H-6 y H-5, H-5 y H-9.

En el experimento de HMBC a dos y tres enlaces (**Espectros 8.7, 8.8 y 8.9**) se pudieron apreciar los siguientes correlaciones entre carbono y protón: C-14 con H-13; C-1 con H-3 y H-2; C-8 con H-6; C-7 con H-9 y H-5 y H-8; C-4 con H-6 y H-3 y H-2; C-5 con H-9 y H-3; C-9 con H-5 y H-3; C-2 con H-3; C-11 con H-3; C-3 con H-2 y C-12 con H-11, y con el experimento HSQC (**Espectro 8.10**) se pudieron confirmar las correlaciones carbono protón presentes en la molécula.

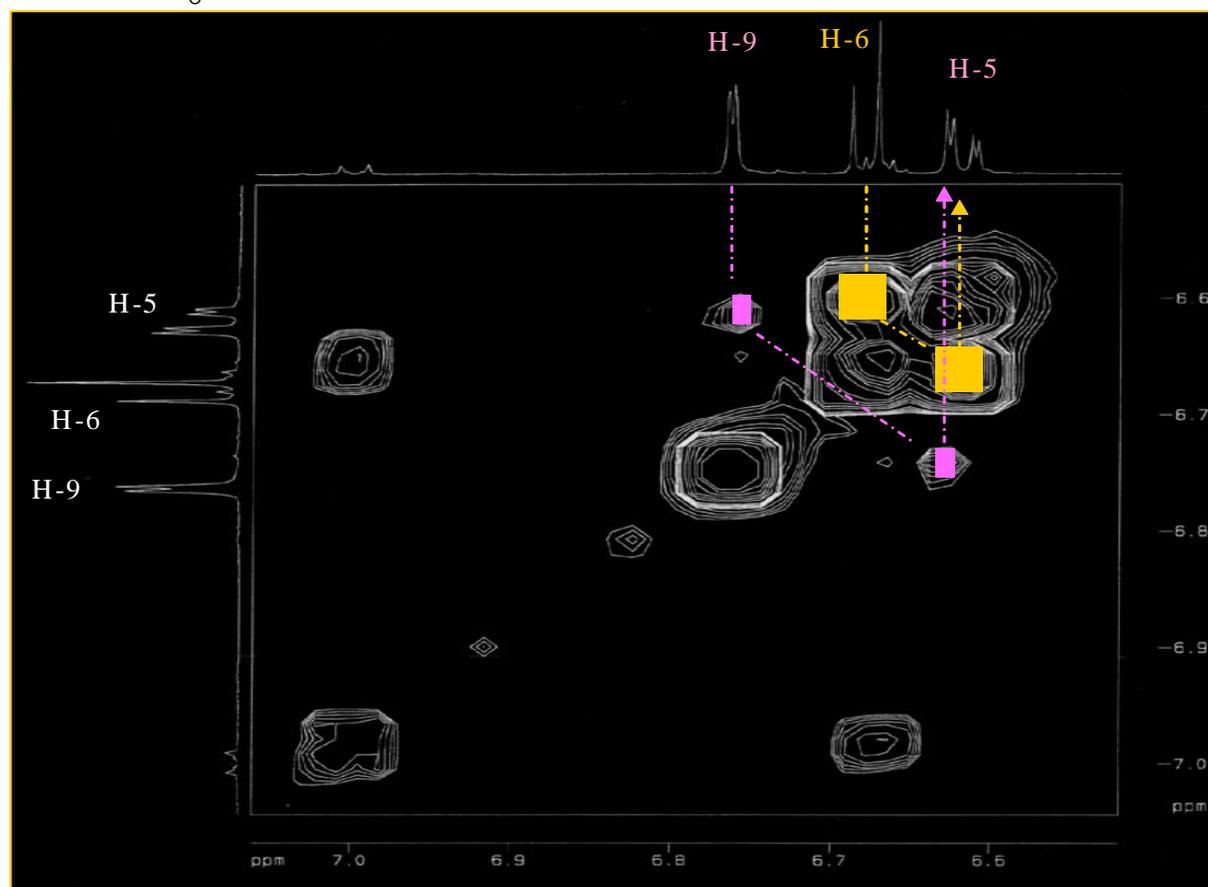
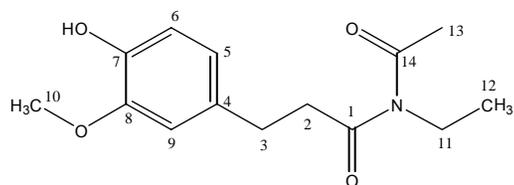
El total de las asignaciones se encuentra resumido en la Tabla 8.1 y por todo lo anterior se propone la siguiente probable estructura (Fig. 8.2):



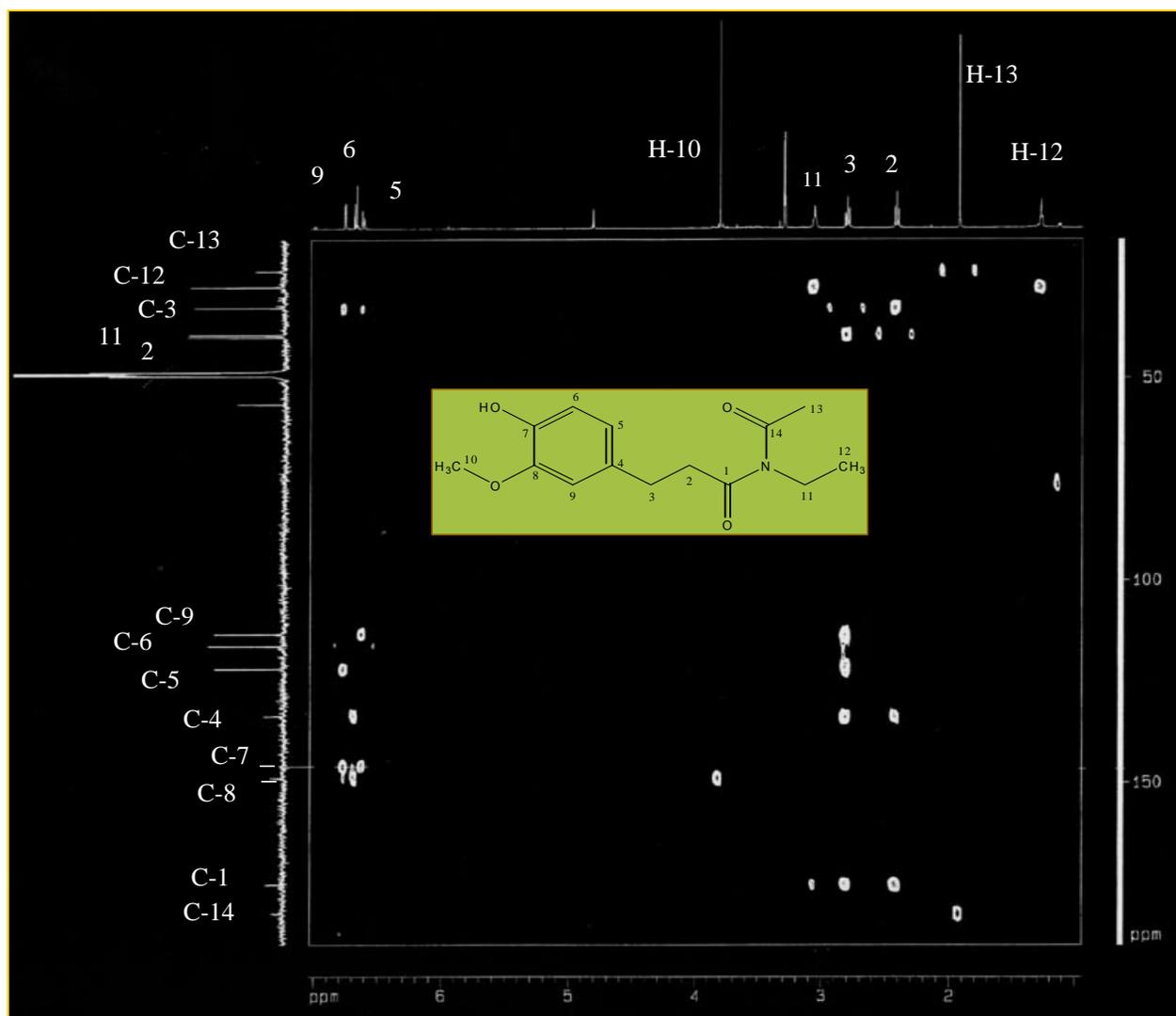
**Figura 8.2.** Compuesto 2, nombrado lecanina.



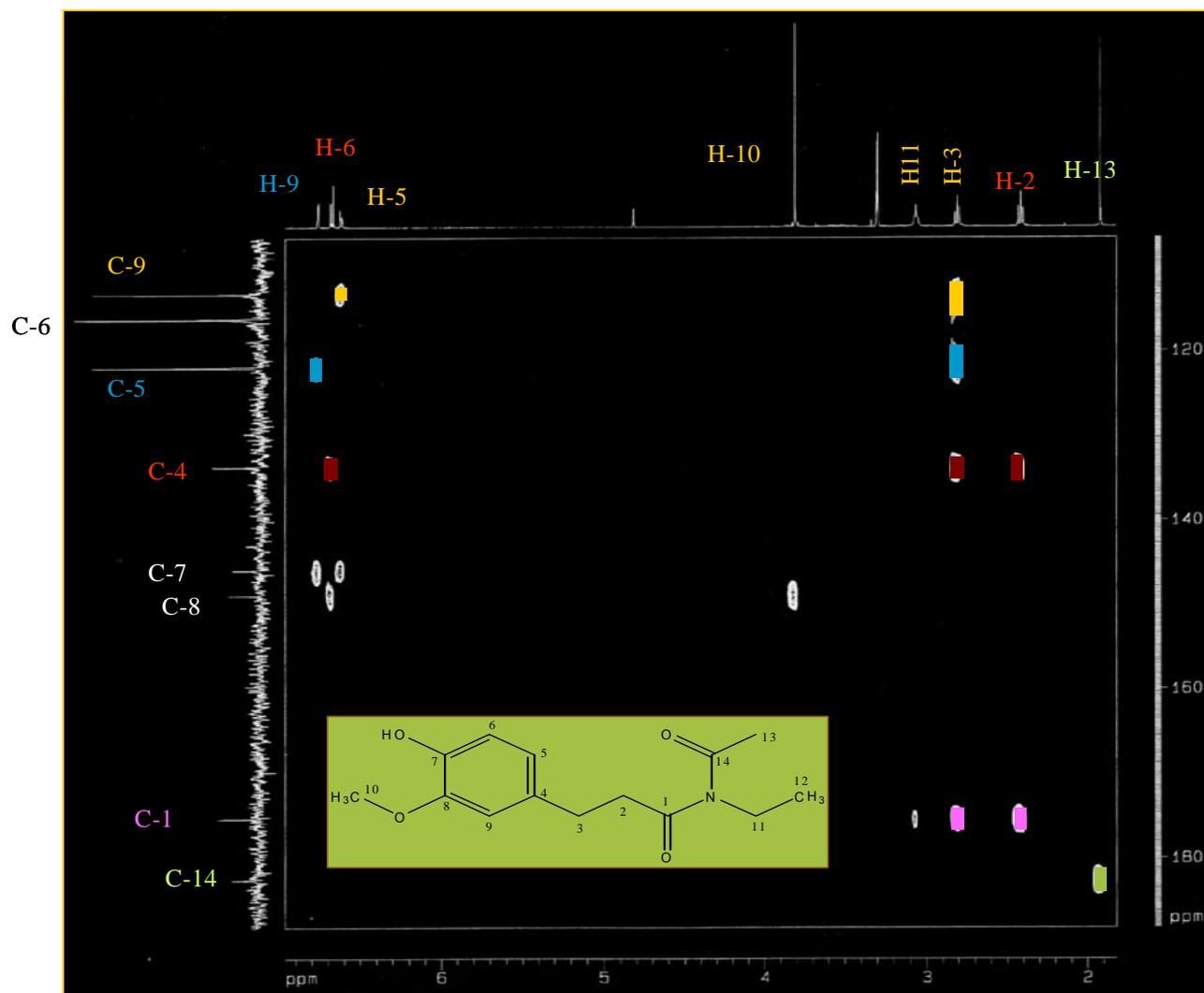
**Espectro 8.5.** Experimento COSY en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 2



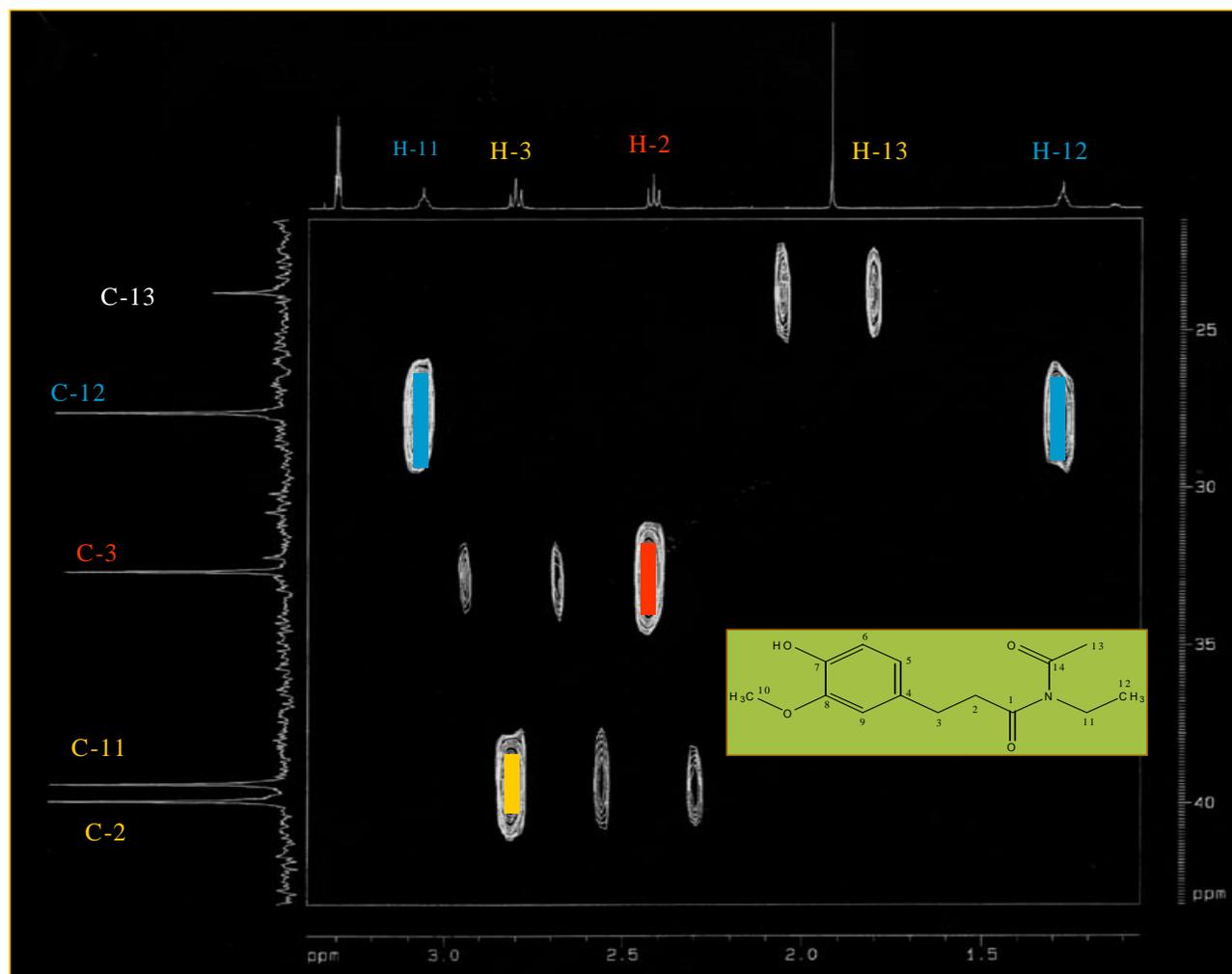
**Espectro 8.6.** Ampliación del experimento COSY en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 2



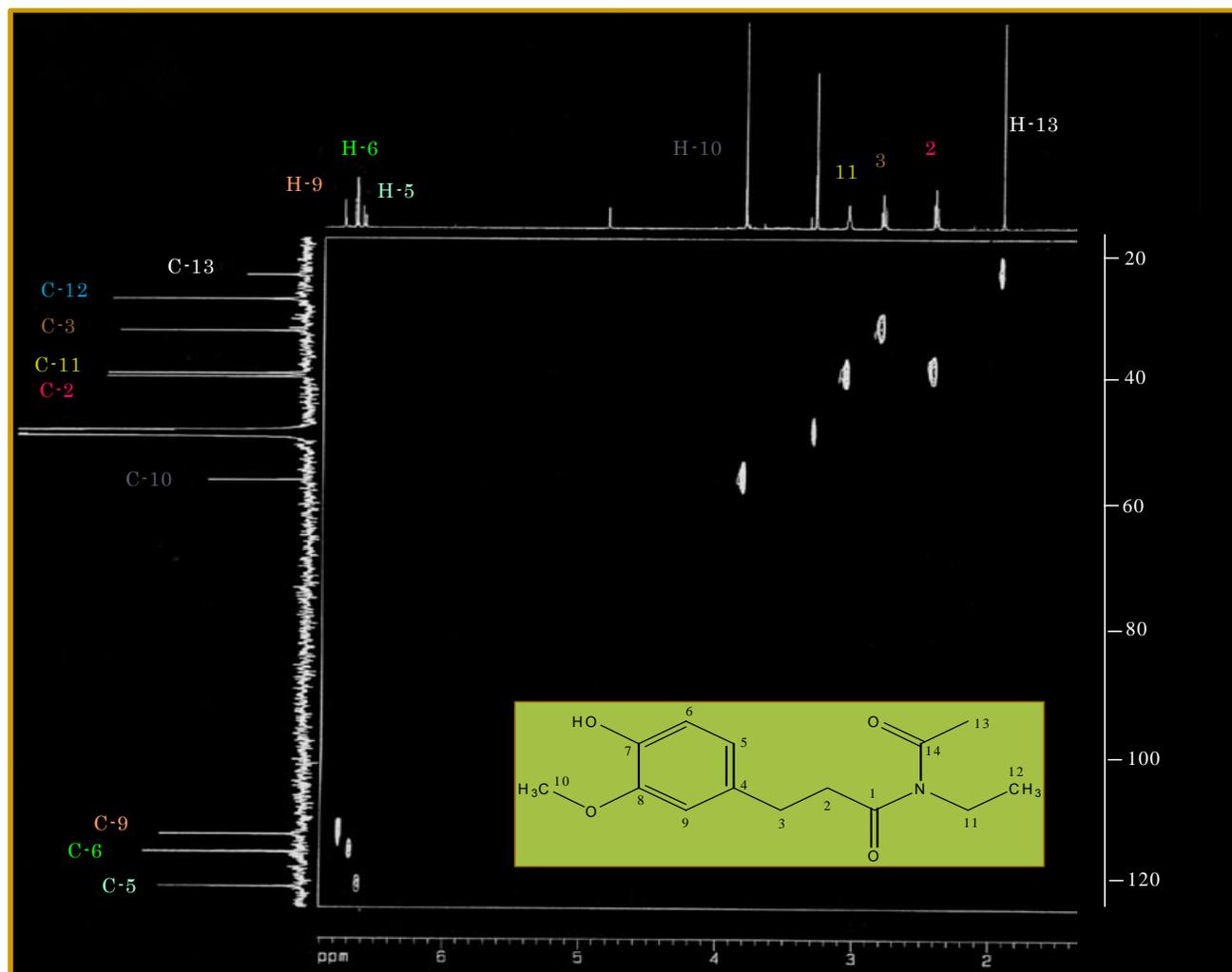
**Espectro 8.7.** Experimento HMBC en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 2



**Espectro 8.8.** Ampliación del experimento HMBC en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 2



**Espectro 8.9.** Ampliación del experimento HMBC en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 2



**Espectro 8.10.** Experimento HSQC en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 2

**Tabla 8.1.** Datos espectrales de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2 (en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  ppm).

C	$\delta$	$^1\text{H}/^{13}\text{C}^{**}$ Conectividad	RMN $^1\text{H}$ Multiplicidad***	$^1\text{H}/^1\text{H}^{**}$ Conectividad
1	175.4			H-3 y H-2
2	39.9	H-2 ( $\delta$ , 2.41)	t (7.6)	H-3
3	32.6	H-3 ( $\delta$ , 2.8)	t (7.6)	H-2
4	133.7			H-6 y H-3 y H-2
5	121.9	H-5 ( $\delta$ , 6.61)	dd (1.9 y 8.00)	H-9 y H-3
6	116.2	H-6 ( $\delta$ , 6.68)	d (8.00)	
7	145.9			H-9 y H-5 y H-8
8	148.9	H-8 ( $\delta$ , 3.81)	s	H-6
9	113.3	H-9 ( $\delta$ , 6.76)	d (1.93)	H-5 y H-3
10	56.4			
11	39.4	H-11 ( $\delta$ , 3.06)	c	H-3
12	27.6	H-12 ( $\delta$ , 1.26)	c	H-11
13	23.8	H-13 ( $\delta$ , 1.92)	s	
14	182.6			H-13

\*Multiplicidad de experimento  $^{13}\text{C}$  y DEPT.

\*\*Las asignaciones fueron confirmadas por experimento  $^1\text{H}$ , COSY, HMBC y HSQC.

\*\*\*Multiplicidad por experimento de RMN  $^1\text{H}$ . Las constantes de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).

## 8.5. ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA

Se llevaron a cabo las pruebas de susceptibilidad para determinar la actividad bacteriostática y bactericida de los compuestos obtenidos como se muestra en la Fig. 8.3.

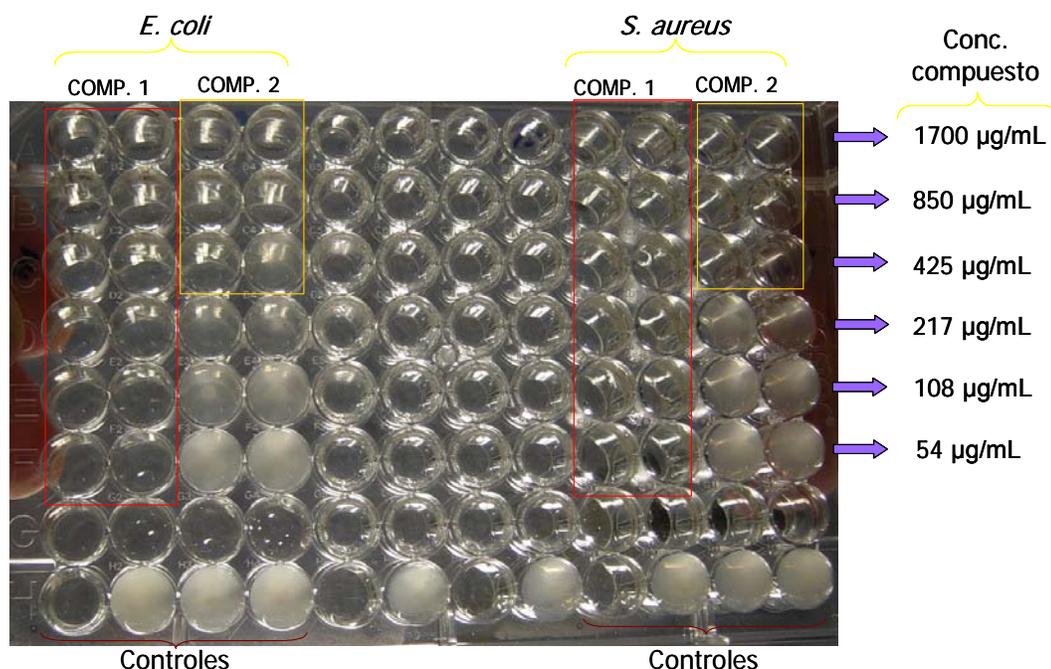


Figura 8.3. Evaluación de actividad bacteriostática de los compuestos 1 y 2 obtenidos en este estudio contra *E. coli* y *S. aureus*.

Como se observa en la Fig. 8.3, se detectó inhibición de los compuestos 1 y 2 obtenidos en este estudio contra las bacterias de importancia clínica *E. coli* y *S. aureus* y de igual manera se observó que el metanol no tuvo efecto en dicha actividad ya que se presentó crecimiento bacteriano en el control del disolvente.

Los resultados de las actividades bacteriostáticas y bactericidas de los compuestos obtenidos se presentan en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de los compuestos obtenidos de *Lecanicillium lecanii* EH457 contra bacterias control.

BACTERIA	COMPUESTO 1		COMPUESTO 2	
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>E. coli</i>	53	53	425	850
<i>S. aureus</i>	53	53	425	850
<i>E. carotovora</i>	53	53	217	1700

El compuesto 1 presentó una gran actividad antibiótica en contra de *Escherichia coli*, comparable con el antibiótico amoxicilina el cual presenta una CMI de 32  $\mu\text{g/mL}$  (Kucers, 1997; Moreno, 2001).

En la Tabla 8.3, se muestran reportes de algunos compuestos nuevos con actividad antibiótica y se puede apreciar que son comparables con los resultados obtenidos en éste trabajo, al menos para el compuesto 1.

Tabla 8.3. Tabla comparativa de concentración mínima inhibitoria (CMI) de compuestos nuevos obtenidos reportados en la literatura y de los obtenidos a partir de *Lecanicillium lecanii* EH457 en este estudio (compuesto 1 y 2).

COMPUESTOS NUEVOS	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. carotovora</i>
N-acetil-aureotamina (Taniguchi <i>et al.</i> , 2000)	>50	>50	--
Aureotina (Taniguchi <i>et al.</i> , 2000)	>50	>50	--
Actinopirona (Taniguchi <i>et al.</i> , 2000)	>50	>100	--
Dicciopanina A (Dörfell <i>et al.</i> , 2000)	--	50	--
Aclidomicina A (Cang <i>et al.</i> , 2001)	>100	50	--
SNF4435C (Kurosawa <i>et al.</i> , 2001)	NP	NP	NP
SNF4435D (Kurosawa <i>et al.</i> , 2001)	NP	100	NP
Acantomicina (Wagenaar <i>et al.</i> , 2002)	--	250 ng	--
COMPUESTO 1	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>53</b>
COMPUESTO 2	425	425	217

-- No se probó, NP = No presentó inhibición.

De igual manera, se comparó la actividad de los compuestos obtenidos en este estudio con respecto a algunos antibióticos comerciales activos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, como se muestra en la Tabla 8.4.

Tabla 8.4. Tabla comparativa de concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos reportados en la literatura y de los compuestos obtenidos en este estudio contra *E. coli* y *S. aureus*.

ANTIBIÓTICOS	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Eritromicina (Levin <i>et al.</i> , 1999)	100	> 100
Azitromicina (Levin <i>et al.</i> , 1999)	1.56	> 100
Vancomicina (Hiramatsu, 1998)	> 100	1.56
Amoxicilina (Kucers, 1997)	32	
Compuesto 1	53	53
Compuesto 2	425	425

De acuerdo a los resultados de actividad bacteriostática de los compuestos obtenidos en este estudio, se puede decir que estos compuestos, en especial el compuesto 1, tienen la particularidad de inhibir y matar tanto a una bacteria Gram negativa, como es el caso de *Escherichia coli* y *Erwinia carotovora*, como también a una Gram positiva como *Staphylococcus aureus*.

## 8.6. CONCLUSIONES

Este trabajo reporta por vez primera la presencia de dos compuestos con actividad antibiótica obtenidos a partir de *Lecanicillium lecanii* cepa EH457. El compuesto 1 aún se encuentra en estudio para elucidar su estructura, considerando que su bioactividad indica resultados muy interesantes.

De igual manera, se tuvo un rendimiento de 4.94 mg/L y de 5.0 mg/L para el compuesto 1 y el compuesto 2, respectivamente, y una productividad de 0.352 mg del compuesto 1/L·día y de 0.357 mg del compuesto 2/L·día.

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

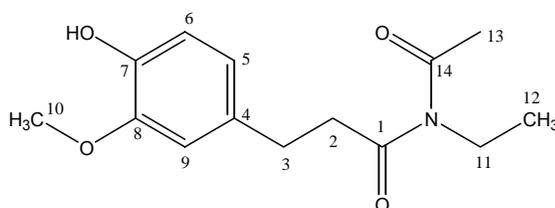
Las extracciones metanólicas del cultivo sólido de las cepas de *Beauveria bassiana* y de *Lecanicillium lecanii* empleadas en este estudio presentaron mayor actividad bacteriostática y bactericida contra las bacterias control en comparación con las extracciones acuosas.

Se presentó mayor actividad bacteriostática y bactericida de las cepas de *L. lecanii*, en comparación con las de *Beauveria bassiana*, empleando la técnica de microdilución en caldo. Dicha técnica fue una herramienta importante en la selección de la cepa EH457 de *Lecanicillium lecanii* para la producción de moléculas con actividad biológica.

Al llevar a cabo los cultivos líquidos de *Lecanicillium lecanii* cepa EH457 en caldo papa dextrosa se tuvo una menor actividad biológica (sólo contra *E. coli* y *Erwinia carotovora pv. atroseptica*) en comparación con el medio complejo de fermentación, en donde la actividad biológica de *L. lecanii* EH457 fue más evidente contra las bacterias de importancia agrícola empleadas al trabajar con este medio. Mientras que el caldo papa dextrosa es un buen medio para el crecimiento de *L. lecanii*, el medio complejo de fermentación fue efectivo para la producción de sustancias con actividad biológica en este estudio.

La actividad biológica de *Lecanicillium lecanii* EH457 se presentó a partir del 6° y 7° día y hasta el final del cultivo en medio complejo de fermentación, para la mayoría de las bacterias control (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia carotovora pv. atroseptica*, *Xhantomonas campestris* y *Agrobacterium tumefaciens*).

*Lecanicillium lecanii* cepa EH457 fue capaz de producir dos compuestos, los cuales presentaron actividad antibiótica en contra de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Erwinia carotovora*. La estructura del compuesto 1 se encuentra parcialmente dilucidada, mientras que la estructura del compuesto 2, nombrada como LECANINA y el cual es un probable antibiótico nuevo aislado a partir del cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii* EH457, es la siguiente:



LECANINA: Compuesto 2

Es importante realizar en un futuro estudios de optimización del medio de cultivo, para obtener mayores rendimientos y mejores resultados en cuanto a la actividad antibiótica y así asegurar la productividad de los compuestos activos. También deben realizarse pruebas de toxicidad para determinar si los compuestos obtenidos en éste estudio puedan ser empleados como moléculas con actividad biológica en un futuro y así abrir paso a los hongos entomopatógenos como una alternativa en la producción y obtención de estos metabolitos.

---

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alatorre, R. y Guzmán, U., 1994. *Glosario de términos de patología de insectos in Memorias del V Curso de Control Biológico*. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca, Oaxaca. pp.145-161.
2. Alexopoulos, C. y Mims, C., 1985. *Introducción a la Micología*. Omega, Barcelona. p. 3.
3. Arora D. K., Elander R. P. y Mukerji K. G., 1992. *Handbook of Applied Mycology*, Marcel Dekker Inc, U.S.A., (4). pp. 2-5, 433, 517 y 519.
4. Barranco-Flrido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. y Saucedo-Castañeda, G. 2002. Criteria of the selection of strains of Entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. **30**: 910-915.
5. Baum, J. A., Jonson, T. B. y Carlot, C. B. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. *In Biopesticides: Use and Delivery*. Ed. Humana Press. Totowa, NJ. pp. 189-209.
6. Benhamou, N. y Brodeur, J., 2000. Evidence of Antibiosis and Induced Host Defense Reactions in the Interaction Between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the Causal Agent of Green Mold. *Phytopathology*. **90**(9): 932-943.
7. Boaventura, M., Hanson, J., Hitchcock, P. y Takahashi, J., 1994. The biotransformation of ent-19-hydroxykauren-16-en-15-one by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*. **37**:387-389.

8. Bucknall, R. A., Moores, H., Simss, R. y Hesp, B., 1973. Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**:294-298.
9. Bycroft, B. 1988. *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*. Chapman and Hull. Londres. pp. 287, 399, 726.
10. Cang, S., Ohta, S., Chiba, H., Johdo, O., Nomura, H., Nagamatsu, Y. y Yoshimoto, A., 2001. New Naphthyridinomycin-type Antibiotics, Aclidinomycis A and B, from *Streptomyces halstedii*. *The Journal of Antibiotics.* **54**(3):304-307.
11. Carrión, G., 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. *Mic. Neotrop. Aplic.* **1**: 79-86.
12. Charnley, A. K., 1997. Entomopathogenic Fungi and their Role in Pest Control. The Mycota IV. *Environmental and Microbial Relationships*. Springer, Berlin. pp 185-201.
13. Cole, R. J., 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Vol. II. Academic Press, Nueva York. pp. 606, 830.
14. Dax, S. L., 1997. *Antibacterial Chemotherapeutic Agents*. Blackie A & P, Londres. pp. 1, 3, 5, 11.
15. Deacon, W., 1993. *Introducción a la Micología Moderna*. Editorial Limusa, México, D. F. pp. 11, 154, 300-316.
16. Delmarco, M. E., Frode, T. S. y Medeiros, S. Y., 2004. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A, in a murine model of pleurisy. *Transplant Immunology.* **12**(2):151-157.

17. Domínguez, X., 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa, S.A. México D. F. p. 45.
18. Dörfelt, H., Schlegel, B. y Gräfe, U., 2000. Dictyopanines A, B y C, New Bicyclic Sesquiterpene Esters from *Dictyopanus* sp. HKI 0181. *The Journal of Antibiotics*. **53**(8):839-843.
19. Douros, J. y Suffness, M., 1980. *New Anticancer Drugs*. Springer-Verlag, Berlin. p. 1496.
20. Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric Method for the Determination of Sugar and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
21. Easwaramoorthy, S. y Jayaraj, S. 1978. Effectiveness of the White Halo Fungus *Cephalosporium lecanii*, Against Field Populations of Coffee green Bug, *Coccus viridis*. *J. Invertebra. Pathol.* **32**:88-96.
22. Ekbohm, B. S., 1979. Investigations on the Potential of a Parasitic Fungus *Verticillium lecanii* for Biological Control of the Greenhouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Swedish J. Agric. Res.* **9**:409-442.
23. Feng, K. C., Liu, B. L. y Tzeng, Y-M., 2000. *Verticillium lecanii* Spore Production in Solid-State and Liquid-State Fermentations. *Bioprocess Engineering.* **23**:25-29.
24. Feng, K-C., Rou, T-M., Liu, C-B, Tzeng, Y-M. y Chang Y-N., 2004. Effect of Fungal Pellet Size on the High Yield Production of Destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology.* **34**:22-25.
25. Fernández, P., 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del

- último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis de Doctorado. España. Facultad de Biología. pp. 65, 67.
26. Francis, M. F., Lavoie, L., Winni, k. y Leroux, J., 2003. Solubilization of cyclosporin A in dextran-g-polyethyleneglycolalkil ether polymeric micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **56**:337-346.
27. Fox, M. A., 2000. *Química orgánica*. 2° Ed. Addison Wesley Longman, S.A. de C.V. México, D. F. pp. 166-188.
28. Gales, A. C., Reis A. O. y Jones R. N., 2001. Contemporary Assesment of Antimicrobial Susceptibility testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (1):183-190.
29. Hanson, J. R. 1995. Diterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **12**:207-218.
30. Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. *El reino de los Hongos*. Micología Básica y Aplicada. UNAM, México, D. F. p.471.
31. Helyer, N., Gill, G. y Bywater & Chambers, R., 1992. Elevated humidities for control of chrysanthemum pests with *Verticillium lecanii*. *Pestic. Sci.* **36**:373-378.
32. Hill, D., 1994. *Agricultural Entomology*. Timber Press, Hong Kong. pp. 100, 138, 152.
33. Hiramatsu, K., 1998. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist.* **1**:135-150.
34. Hsiao, Y. M. y Ko, J. L., 2001. Determination of Destruxins, Cyclic peptide Toxins, produced by differents Strains of *Metarhizium anisopliae* and their Mutants

- Induced by Ethyl Methane Sulfonate and Ultraviolet using HPLC Method. *Toxicon*. **39**: 837-841.
35. <http://infoagro.com/formación/cursos/cursos.ht>
36. <http://SANINET Hongos Entomopatógenos.htm>.
37. <http://www.science.oas.org>
38. Igarashi, Y., Kuwamori, Y., Takagi, K., Ando, T., Fudol, R., Furumai, T. y Oki, T., 2000. Xanthoepocin, a New Antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IF05762. *The Journal of Antibiotics*. **53**(9):928-933.
39. Jennings, D. y Lysek, G., 1999. Fungal Biology. *BIOS Scientific Publishers*. Nueva Yor. pp. 103-133.
40. Kanaoka, M., Isogai, K. A. y Suzuki, A., 1978. Synthesis of Bassianolide. *Agric. Biol. Chem.* **42**:629.
41. Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T. y Nakamura, T., 1988. Cytotoxic Steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*. **27**(9):2777-2779.
42. Kohner, P. C., Patel, R., Uhl, J. R., Garin, K. M., Hopkins M. K., Wegener L. T. y Cockerill, F. L., 1997. Comparison of Agar Dilution, Broth Microdilution, E. Test, Disk Diffusion, and Automated Vitek Methods for Testing Susceptibilities of *Enterococcus spp.* to Vancomycin. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**(12):3259-3260.
43. Koneman, E. W. 1999. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color*. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 612-618.

- 
44. Kucers, A., 1997. The use of antibiotics. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*. **15**(7):49.
45. Kurosawa, K., Takahashi, K. y Tsuda, E., 2001. SNF4435C and C, Novel Immunosuppressant Produced by a Strain of *Streptomyces spectabilis*. *The Journal of Antibiotics*. **54**(7):541 -547.
46. Leger, R. J., 1993. Biology and Mechanims of Insect-Cuticle Invasion by Deuteromycete Fungal Pathogens. *Parasites and Pathogens of Insects*. pp. 211-229.
47. Lennette, E. H. y Spulding E. H., 1981. *Manual de Microbiología Clínica*. Salvat. México, D. F. pp 419-424.
48. Levin, S. A. & V. Andreasen, 1999. Disease transmission dynamics and the evolution of antibiotic resistance in hospitals and communal setting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. pp 800-801.
49. Liu, B. L., Chen, J. W. y Tzeng, Y. M., 2000. Production of Cyclodepsipeptides Destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol. Prog.* **16**:993-999.
50. Lloyd, B. y Khachatourians, G., 1997. Toxic properties of Beauveria Pigments on Erythrocyte Membranes. *Toxicon*. **35**(8):1351-1356.
51. Madigan, T. M., Martinko, M. J. y Parker, J., 2004. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 10° Ed. Pearson Educación, S. A. Madrid. pp. 704, 968.
52. Mendoza G., 2002. Evaluación antibiótica de extractos metanólicos de hongos microscópicos del suelo. Tesis de Licenciatura, Xalapa, Ver. Facultad de Bioanálisis. p. 36.

53. Monzón, A., 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. **64**: 95-103.
54. Moore, M. C., Cox, R. J., Diffin, G. R. y Hagan, D. O. 1998. Synthesis and Evaluation of a Putative Acyl Tetramic Acid Intermediate in Tenellin Biosynthesis in *Beauveria bassiana*. A New Role for Tyrosine. *Tetrahedron*. **54**(31):9195 -9206.
55. Moreno, F., 2001. Uso actual de las penicilinas clásicas. *Antibióticos Farma, S.A. Medicina General*. p. 266.
56. Muntañola, M., 1999. *Guía de los hongos microscópicos*. Omega Editores, Barcelona. pp. 21, 98.
57. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1994. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility testing of Yeasts, Approved Standard M27-A. *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards*: Villanova.
58. Nilanonta, C., Isaka, M., Chanphen R., Nuntawan, T-O., Tanticharoen, M. y Thebtaranonth, Y., 2003. Unusual Enniatins Produced by the Insect Pathogenic Fungus *Verticillium hemipterigenum*: Isolation and Studies on Precursor-Directed Biosynthesis. *Tetrahedron*. **59**:1015-1020.
59. Oikawa, H., Nakamura, K., Toshima, H., Toyomasu, T. y Sassa, T., 2002. Proposed Mechanism for the reaction Catalyzed by a Diterpene Cyclase, Aphidicolan-16 $\beta$ -ol Synthase: Experimental results on Biomimetic Cyclization and Examination of the Cyclization Pathway by ab Initio Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 9145-9153.
60. Pazouki, M. y Panda T. 2000. Understanding the Morphology of Fungi. *Bioprocess Engineering*. **22**(2): 127-143.

61. Pichardo, C. J. y Behnke, J. 1993. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. *Infectología*. **3**:215-222.
62. Poupard, J. A., Walsh, L. R. y Kleger, B. 1994. *Antimicrobial susceptibility testing Clinical issues for the 90s*. Edit. Plenum Press, Nueva York. pp. 41-45.
63. Rangdale, R. E., Richards, R. H. y Alderman, D. J., 1997. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial compounds against *Flavobacterium psychrophilum* the causal agent of rainbow trout fry síndrome (RTFS). *Aquaculture*. **158**:194, 196.
64. Rodríguez, L., 1990. *Plagas forestales y su control en México*. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo. pp. 35, 60.
65. Rodríguez, L. y Arredondo, B., 1999. Quién es quién en el control biológico en México. Directorio de especialistas, instituciones y laboratorios de organismos benéficos. INIFAP, SAGAR, CNSA, IICA. Folleto Técnico No. 23. División Agrícola, México, D. F.
66. Romo, A., 1985. *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Limusa. México D. F. pp. 23-40.
67. Shyock, T. R., White, D. W. y Werner, C. S., 1998. Antimicrobial susceptibility of *Morallena bovis*. *Veterinary Microbiology*. **61**:305-309.
68. Soman, A. G., Gloer, J. B., Wicklow D. T. y Dowd P. F., 2001. Vertilecanins: New Phenopicolinic Acid Analogs from *Verticillium lecanii*. *J. Nat. Prod.* **64**:189-192.
69. Somerson, N. L., Demain. A. L. y Nunheimer, T. D. 1961. Reversal of Lisine Inhibition of Penicillin Production by alfaaminoadipic acid. *Arch. Biochem.* **93**:238-241.

70. Spadari, S., Sala, F. y Pedrali, G., 1982. Aphidicolin: A specific Inhibitor of Nuclear DNA replication in Eukaryotes, *Trends in Biochemical Science*. **7**(1):29-32.
71. Strasser, H., Abendstein, D., Stupprer, H. y Butt, M., 2000. Monitoring of distribution of secondary metabolites produced by the entomopathogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research*. **14**(10):1227-1233.
72. Suzuki, A., Kanaoka, M., Isogai, K. A., Murakoshi, S., Ichinoe, M. y Tamura, S. 1977. Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Letters*. **18**(25):2167-2170.
73. Tamez, G. P., Galán, W., Medrano, R., García, G., Rodríguez, P., Gómez, F. y Tamez, G. S. 2001. Bioinsecticidas, su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. **4**(2):143-152.
74. Tanabe, M. y Urano, S., 1983. Biosynthetic studies with  $^{13}\text{C}$ : The Antifungal Antibiotic Iliacolin H. *Tetrahedron*. **39**(21):3569-3574.
75. Tanada, Y. y Kaya, H., 1993. *Insect pathology*. Academic Press, Nueva York. pp. 318-367.
76. Taniguchi, M., Watanabe, M., Nagai, K., Suzumura, K., Suzuki K. y Tanaka, A., 2000.  $\gamma$ -Pirone Compounds with Selective and Potent Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *The Journal of Antibiotics*. **53** (8):844 -847.
77. Tomoda, H., Huang, X-H., Cao, J., Nishida, H., Nagao, R., Okuda, S., Tanaka, H., Omura, S., Arai, H. e Inoue, K., 1992. Inhibition of acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsip. *J. Antibiot*. **45**(10):1626-1632.

78. Tovar, L., 2000. Estudio químico del hongo fitopatógeno *Fusarium semitectum*. Tesis de Licenciatura, Xalapa, Ver. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. pp. 19-21.
79. Trigos A, 1998. Química de los hongos. In: Ed Rivera A. Producción de vitamina D<sub>2</sub> a partir de hongos micromicetos: aspectos científicos, técnicos y económicos. Santa Fe de Bogota. pp.19-61.
80. Trigos, A., Amescua. C., Reyna, C. y Carrión, G. 1999. Cerevisterol from cultures of *Verticillium lecanii*. *Micol. Neotrop. Apl.* **10**:57-62.
81. Trigos, A., Reyna, S. y Cervantes, L., 1995. Three diketopiperazines from the cultivated fungus *Fusarium oxysporum*. *Natural Product Letters.* **6**:241-246
82. Trigos, A., Reyna, S., Galindo, G. y Ramos, J., 1996. Diketopiperazines from cultures of *Pestalotia palmarum*. *Natural Product Letters.* **8**:199-205.
83. Turner, B., 1971. *Fungal Metabolites*. Academic Press, Nueva York. pp. 1-25, 419.
84. Turner, G., 2000. Exploitation of fungal secondary metabolites old and new. *Microbiology.* **27**:118-120.
85. Valisolalao, J., Luu, B. y Ourisson, G., 1983. Steroids Cytotoxiques of *Polyporus versicolor*. *Tetrahedron.* **39**(17):2779-2785.
86. Wagenaar, M. M., Gibson, D. M., y Clardy, J., 2002. Akanthomycin, a New Antibiotic Pyridone from the Entomopathogenic Fungus *Akanthomyces gracilis*. *Organic Letters.* **4**(5):671-673.
87. Wei, J., Liu, B-L. y Tzeng, Y-M., 1999. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Chromatography A.* **830**:115-125.

88. Whipps, J. M., 1993. A Review of White Rust (*Puccinia horiana* Henn). Disease on Chrysanthemum and the Potential for its Biological Control with *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas. *Ann. Appl. Biology.* **122**:173-174.

---

## A-1. MEDIOS DE CULTIVO

**Agar Papa Dextrosa.** Empleado para *Lecanicillium lecanii*.

(g/L): Infusión de papa (sólidos) 4.0, dextrosa 20.0, agar 15.0, agua destilada 1.0, pH final  $5.6 \pm 0.2$ .

**Czapek-Dox con Extracto de Levadura al 1%.** Empleado para *Beauveria bassiana*.

(g/L): Sacarosa 30.0, nitrato de sodio 3.0, fosfato dipotásico 1.0, sulfato de magnesio 0.50, cloruro de potasio 0.50, sulfato ferroso 0.01, agar 15.0, extracto de levadura 0.2, agua destilada 1.0, pH final  $7.3 \pm 0.2$ .

**Caldo Papa Dextrosa.** Para el cultivo líquido de *Lecanicillium lecanii*.

(g/L): infusión de papa 200.0, dextrosa 20.0 g, agua destilada 1.0. Se ponen a hervir los trozos de papa con 500 mL de agua destilada por 30-60 min, se machacan y se filtra a través de gasa. Se adicionan los demás ingredientes al filtrado y se afora a 1L con agua destilada.

**Medio Complejo de Inóculo (MCI, Somerson, et. al. 1961).** Para propagación de

*Lecanicillium lecanii*. (g/L): Sacarosa 20.0, sólidos de maceración de maíz 20.0, extracto de levadura 10.0, carbonato de calcio 5.0, agua destilada 1.0, ajustar pH a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N.

**Medio Complejo de Fermentación (MCF, Somerson, et. al. 1961).** Empleado para

la producción de *Lecanicillium lecanii*. (g/L): Lactosa 55.0, sólidos de maceración del maíz 35.0, carbonato de calcio 10.0, fosfato de potasio dibásico 7.0, agua destilada 1.0, ajustar pH a 6.8 con hidróxido de sodio 1 N.

**Caldo Müller-Hinton.** Medio de cultivo para determinación de actividad bacteriostática. (g/L): Extracto de carne 2.0, peptona de caseína 17.5, almidón 1.5, agua destilada 1.0.

**Agar Müller-Hinton.** Medio de cultivo para determinación de actividad bactericida. (g/L): Extracto de carne 2.0, peptona de caseína 17.5, almidón 1.5, agar 17.0, agua destilada 1.0.

## A-2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL (Fox *et. al.*, 2000).

Es frecuente el uso de técnicas espectroscópicas para identificar compuestos individuales. Muchas técnicas espectroscópicas se apoyan en la interacción de un compuesto con la *radiación electromagnética*, la cual se puede considerar como una partícula (llamada fotón) o una onda que viaja a la velocidad de la luz. Cuando se considera como una onda, la luz se puede describir por su longitud de onda ( $\lambda$ ) o su frecuencia ( $\nu$ ). La longitud de onda es la distancia que abarca un ciclo ondulatorio completo. La frecuencia es el número de ciclos ondulatorios que pasan por un punto fijo en un tiempo definido (un *hertz*, *Hz*, equivale a un ciclo por segundo). Para algunas técnicas espectroscópicas la longitud de onda define el contenido de energía, y para otras se emplea la frecuencia.

### ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Al igual que los electrones, los protones y los neutrones tienen espín. Un núcleo que contiene un número impar de protones o de neutrones (o de ambos) tiene espín y es magnéticamente activo. El núcleo más pequeño que satisface este requisito es el  $^1\text{H}$ , pero también lo satisfacen el  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  y el  $^{31}\text{P}$ . Estos núcleos se comportan como si giraran en torno a un eje, y por tanto tienen momento angular. Puesto que el núcleo tiene carga positiva, este movimiento de rotación sobre un eje hace que se comporte como si fuera un imán diminuto. De acuerdo con las exigencias de la molécula cuántica, cuando un núcleo con un espín neto se coloca en un campo magnético grande, su orientación con respecto al campo magnético externo define estados de energía cuantizados para el núcleo. En caso de núcleos con espín de  $\frac{1}{2}$ , como  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , son posibles dos orientaciones: la orientación a favor del campo externo o en contra del mismo. La alineación del espín nuclear a favor del campo

magnético es ligeramente más favorable que la alineación en contra del campo, de modo que estas dos alineaciones son de distinta energía. En consecuencia, el número de moléculas cuyos núcleos tienen una alineación paralela es ligeramente mayor que el de las que tienen núcleos con alineación antiparalela. La transición entre estos dos estados de espín proporciona abundante información acerca del ambiente que rodea a los núcleos de las moléculas.

Los núcleos se pueden inducir a saltar de un estado de espín de baja energía a uno de mayor energía por medio de energía electromagnética de una frecuencia tal que coincida con la diferencia de energía entre los dos estados. A la inversa, cuando un núcleo en el estado de mayor energía cae al estado de más baja energía, se emite energía electromagnética de esa frecuencia. El espín que da origen a ambos estados es una propiedad del núcleo del átomo, y la técnica se conoce como **espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**. Cuando los núcleos de una muestra están saltando rápidamente entre ambos estados, se dice que están en **resonancia** con la radiación electromagnética aplicada.

La frecuencia de la energía que se requiere para inducir el salto entre estados de espín en los núcleos varía en proporción directa con la magnitud del campo magnético aplicado. Cuanto mayor es la intensidad del campo, más grande es la diferencia entre los estados de espín paralelo y antiparalelo, y mayor es la energía de la señal necesaria para inducir el cambio. Los espectrómetros de RMN comerciales tienen imanes muy grandes que emplean cables superconductores para generar un campo magnético. Con estas intensidades de campo se requiere una energía del orden de las radiofrecuencias para inducir el salto entre estados. Los espectrómetros de RMN se clasifican por la frecuencia que emplean para cambiar el estado de espín de los núcleos magnéticamente activos. Las máquinas de campo más alto disponibles en la actualidad de fabricantes de instrumentos comerciales operan a 750 MHz (1 megahertz, MHz, equivale a 1 millón de ciclos por segundo). Los espectros que emplean señales de 100 a 300 MHz son mucho más comunes. En

realidad, estas frecuencias corresponden a muy poca energía: 100 MHz equivale a alrededor de  $1 \times 10^{-5}$  Kcal/mol, y esta energía de radiofrecuencia sólo puede ser absorbida por los núcleos que se comportan como imanes en un campo magnético aplicado. Los núcleos de hidrógeno y de carbono son los de mayor interés. El isótopo más abundante del hidrógeno,  $^1\text{H}$ , tiene un espín neto de  $\frac{1}{2}$ , lo mismo que  $^{13}\text{C}$ . Aunque éste último representa sólo el 1.1% del carbono presente en las muestras normales y es preciso utilizar instrumentos muy sensibles para observar los cambios de estado de espín de su núcleo, la abundancia de información que contienen los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  hace que valga la pena construir y usar estos instrumentos.

**Protección.** La densidad electrónica en torno a cada átomo de la molécula varía con la naturaleza de los átomos circundantes y es ligeramente distinta para cada átomo no equivalente. En esencia, el núcleo de un átomo experimenta un cierto grado de *protección* respecto al campo magnético externo. Por tanto, cada núcleo específico experimenta un campo efectivo diferente y, en consecuencia, emite energía a una frecuencia distinta. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra.

**Desplazamientos químicos.** Las frecuencias se informan como la diferencia (en partes por millón, ppm) entre las señales que se registran para una muestra y la de un compuesto de referencia, el tetrametilsilano (TMS), que se agrega a la muestra para la espectroscopía tanto de protones ( $^1\text{H}$ ) como de carbono ( $^{13}\text{C}$ ). Así pues, las señales se informan como *desplazamientos químicos*, o cambios, respecto a este estándar en la escala delta ( $\delta$ ), donde 1  $\delta$  equivale a 1 ppm y la señal del tetrametilsilano es el 0. Puesto que la escala  $\delta$  se basa en la relación de la diferencia de frecuencia entre un estándar y una muestra a la frecuencia del estándar, los valores son independientes de la intensidad del campo magnético. Las señales a

frecuencias más bajas (y campos más bajos) que la del estándar tienen valores  $\delta$  positivos. La mayoría de las señales de protones varían entre 0 y 12 ppm; el intervalo para el carbono es más grande, de 0 a 250 ppm. Debido a estas diferencias en la escala, es más probable encontrar una superposición accidental de dos señales no equivalentes en un espectro de protones que en uno de carbono.

Casi todas las señales aparecen a frecuencias inferiores a la del estándar y se dice que están a *campos más bajos*. El silicio de TMS es la causa de la posición en campos altos de sus protones y carbonos respecto a los de la mayor parte de los compuestos inorgánicos. Puesto que el silicio es menos electronegativo que el carbono, el enlace C-Si del TMS está polarizado hacia los átomos de carbono de los grupos metilo. Esta densidad electrónica protege los núcleos de hidrógeno y de carbono de estos grupos respecto al campo magnético aplicado. De los núcleos activos que resuenan a frecuencias ligeramente inferiores a las del TMS se dice que aparecen en la *región de campos más altos* del espectro de RMN; los que se desplazan a frecuencias mucho más bajas, en la *región de campos más bajos*.

**Interpretación de los espectros.** A partir del número de señales se establece el número de tipos distintos de núcleos presentes; el desplazamiento químico de cada señal revela detalles acerca del ambiente químico de cada tipo de núcleo, y el desdoblamiento de señales permite deducir cuántos protones están cerca de cada uno.

## ESPECTROSCOPÍA DE RMN DE $^{13}\text{C}$

Un espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  proporciona dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al número de tipos diferentes de átomos de carbono, y el desplazamiento químico de cada señal, que está determinado por el entorno molecular de cada carbono. En las condiciones

instrumentales ordinarias cada núcleo de  $^{13}\text{C}$  no equivalente se registra como una señal aguda y definida. Lo agudo de la señal en este caso es importante por dos razones. Primero, una señal aguda se concentra en un intervalo de frecuencias angosto y por tanto se distingue con más facilidad del ruido aleatorio que producen los circuitos electrónicos. Segundo, cuanto más angosta es la señal mejor es la *resolución*, es decir, la separación entre señales que están próximas entre sí. El espectro de  $^{13}\text{C}$  nos permite contar no sólo el número de carbonos diferentes que hay en una molécula de estructura desconocida, sino además tener cierta idea del entorno inmediato de cada tipo de átomo de carbono.

Es posible contar el número de tipos diferentes de carbonos presentes en una molécula con base en su espectro de  $^{13}\text{C}$ , pero la intensidad de cada señal sólo tiene una relación aproximada *con el número* de átomos de carbono que producen esa señal. La diferencia de tamaño de las señales se debe a diferencias en la rapidez con la que los átomos de carbono se relajan a la distribución de equilibrio de sus dos estados de energía en presencia de un campo magnético. *La intensidad de la señal de RMN de  $^{13}\text{C}$  no tiene una correlación exacta con el número de átomos de carbono que dan origen a una señal determinada.* La señal que produce el carbono de un grupo metilo suele ser algo más débil que la de los átomos de carbono metilénicos ( $\text{CH}_2$ ) y metínicos ( $\text{CH}$ ), aunque es más intensa que la de los carbonos cuaternarios, que es bastante débil.

## ESPECTROSCOPÍA DE RMN DE $^1\text{H}$

Las señales de los protones de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , como las de los carbonos en la RMN de  $^{13}\text{C}$ , se registran como máximos de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  proporciona cuatro elementos de información importantes:

- El número de señales distintas,
- El desplazamiento químico,

- El patrón de desdoblamiento y
- La integración de la intensidad de las señales.

**Desplazamientos químicos.** La interpretación de un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se inicia con la determinación del número de señales con desplazamientos químicos definidos. Puesto que en los desplazamientos químicos de los protones influyen en primer término el átomo al cual están unidos y de manera secundaria los otros átomos de las inmediaciones, los protones de los grupos funcionales comunes absorben en regiones características de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

**Curva de integración.** La intensidad relativa de una señal en la espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  es proporcional al número de protones que contribuyen a la señal. La RMN de protones difiere de la RMN de carbono en este aspecto. La *curva de integración* es una medida del área bajo las señales. La elevación vertical del escalón de una curva de integración sirve para calcular la proporción del número de átomos de hidrógeno que dan origen a cada señal. Puesto que el área absoluta bajo la curva de integración depende de la sensibilidad del instrumento, no del número de átomos de hidrógeno, la integral muestra una relación de número de átomos, no el número absoluto de cada tipo. Los datos de la integración se informan junto con el desplazamiento químico de la señal; por ejemplo, 5.1  $\delta$  (3H).

**Desdoblamiento espín-espín.** En los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  cada señal aparece como un patrón complejo, no como una señal individual. El desdoblamiento de una señal puede aportar información valiosa acerca de la estructura de la molécula porque es el resultado directo de la interacción con los protones vecinos. El número de líneas de un **multiplete** indica el número de hidrógenos que hay en carbonos adyacentes. Los patrones de desdoblamiento que se observan se deben a la interacción de espín magnético de cada núcleo de  $^1\text{H}$  con los núcleos vecinos. Esta interacción se describe como **acoplamiento**.

El grado de separación entre las líneas de un multiplete, conocido como **desdoblamiento**, varía en proporción directa con el efecto de los hidrógenos vecinos sobre el campo magnético. En general, cuanto más próximos en el espacio están los protones, mayor es el desdoblamiento. La magnitud de este desdoblamiento se conoce como **constante de acoplamiento**, la cual suele designarse como  $J$ .

**Efecto de la simetría.** La presencia de simetría en una molécula da por resultado núcleos (de hidrógeno y de carbono) que dan origen a señales de la misma frecuencia. Por tanto, el número de señales de resonancia distintas para una molécula simétrica es menor que el número de átomos individuales.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

Luz María Zenit Tovar Castro

El día 26 de Julio de 2004

Comité tutorial:

Director: Dr. Ángel R. Trigos Landa  
Universidad Veracruzana-LÁTEX

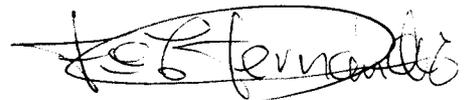


Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dra. Keiko Shirai Matsumoto  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Sinodal: Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Sinodal: Dr. Samuel Cruz Sánchez  
Universidad Veracruzana-SARA

