

Universidad de Costa Rica
Sede de occidente.

TESIS PARA OPTAR ALGRADO DE LICENCIATURA EN LABORATORISTA
QUÍMICO

Detección de witanólidos producidos por hongos endófitos aislados del árbol de güitite (*Acnistus arborescens*) mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo.

Yendry Fabiola Salas Marín

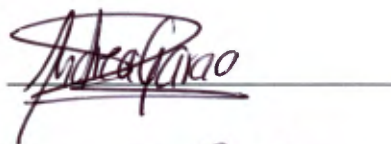
2021

HOJA DE APROBACIÓN

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN LABORATORISTA QUÍMICO

Detección de witanólidos producidos por hongos endófitos aislados del árbol de güitite (*Acnistus arborescens*) mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo.

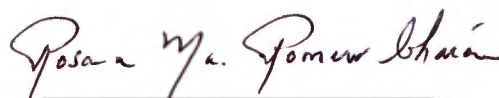
Presidente del Tribunal



Miembro del Tribunal



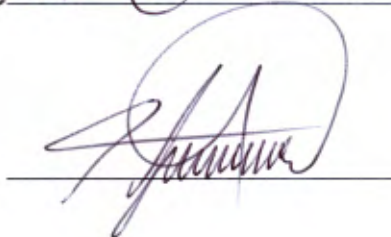
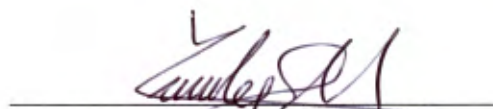
Ph.D. Rosaura M. Romero Chacón
Tutora



Ph.D. Max Chavarría Vargas
Lector



MBA. Diego Guerrero Oviedo
Lector

Yendry Fabiola Salas Marín
Sustentante

Dedicatoria

A mis padres y hermanas, quienes son los cimientos de mi educación y valores, les agradezco sin medida por su tiempo e invaluable consejos.

Por ser parte fundamental en el desarrollo de este proyecto y ser la motivación para crecer como persona y profesional.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), sus docentes y compañeros estudiantes, quienes permanecieron anuentes a brindarme su acompañamiento y guía durante cada etapa del proceso.

A la Dra. Rosaura M. Romero, por su disposición y mentoría, por confiar en mí para el desarrollo de la investigación.

A la Universidad de Costa Rica y su excelente cuerpo docente, por acrecentar en los estudiantes el gusto por la investigación y el compromiso con el quehacer profesional.

A los docentes de la carrera de Licenciatura en Laboratorista Químico de la Sede de Occidente, quienes dieron su aporte al proyecto, gerando un aprendizaje invaluable para mi crecimiento profesional.

A mis amigos, quienes me animaron y rieron conmigo a lo largo de estos meses.

Índice de Contenido

Dedicatoria.....	III
Agradecimientos	IV
Índice de Contenido.....	V
Índice de Cuadros.....	VII
Índice de Figuras	VIII
Abreviaturas y Acrónimos.....	IX
Resumen.....	10
1.1. Antecedentes.....	13
1.2. Problema y Justificación.....	20
1.3. Objetivos	20
1.3.1. Objetivo General.....	20
1.3.2. Objetivos Específicos.....	21
Capítulo 2. Marco Teórico	22
2.1. Características biológicas y taxonomía del árbol de güitite.....	22
2.2. Hongos endófitos.....	25
2.3. Biosíntesis y almacenamiento de metabolitos o sus precursores en plantas.	28
2.4. Técnicas empleadas en la cuantificación y caracterización de metabolitos secundarios	35
Capítulo 3. Metodología.....	41
3.1. Selección de los arbustos y muestreo para la obtención de cultivos de hongos endófitos.....	41
3.2. Extracción de corteza y hojas.....	41
3.3. Limpieza de tejidos y cultivos.	41
3.4. Codificación de muestras.....	41
3.5. Crecimiento de hongos en caldo papa dextrosa (PDB)	42
3.6. Detención del metabolismo secundario.....	43
3.7. Proceso para la obtención de extractos.	43
3.8. Caracterización de muestras	43
3.9. Condiciones de análisis por Infusión directa acoplada a espectrofotometría de masas (DIMS).....	48
3.10. Análisis de witanólidos por UPLC-ESI-Q-ToF/MS	48
Capítulo 4. Resultados y Discusión.....	50
4.1. Detección de witanólidos por Infusión directa acoplada a espectrofotometría de masas (DIMS) en extractos aislados de hongos endófitos del güitite para comparar su m/z experimental respecto al valor teórico.....	50
4.2. Selección de cepas para análisis por UPLC/MS-MS	52
4.3. Primera verificación de cromatogramas.....	52
4.3.1. Detección de Fisanólido A por UPLC-ESI-Q-ToF/MS	53
4.3.2. Detección de Witafisalino I por UPLC-ESI-Q-ToF/MS.....	55
4.4. Verificación de la producción de los compuestos detectados por parte de las cepas	59
4.4.1. Detección de Fisanólido A por UPLC-ESI-Q-ToF/MS	60

4.4.2. Detección de Witafisalino I por UPLC-ESI-Q-ToF/M	61
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	68
5.1. Conclusiones	68
5.2. Recomendaciones	69
Anexos	70
Referencias	75

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Resumen de antecedentes relacionados con la determinación de witanólidos en hongos endófitos aislados de diversas especies de plantas hospederas.....	18
Cuadro 2. Taxonomía del árbol de güitite.	22
Cuadro 3. Nombre, estructura, fórmula y masa molecular y masa monoisotópica de metabolitos aislados de plantas del género <i>Acnistus</i>	29
Cuadro 4. Codificación de muestras de hongos endófitos según su procedencia de cultivo y órgano de la planta.	42
Cuadro 5. Nombre y características de muestras de hongos endófitos provenientes del árbol de güitite	44
Cuadro 6. Sistema de elución utilizado en el análisis mediante UPLC.....	48
Cuadro 7. Compuestos detectados mediante el análisis por la técnica de Infusión Directa en Espectrofotometría de Masas (DIMS).....	50
Cuadro 8. Resultados de análisis efectuados por la técnica de Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC).	53
Cuadro 9. Resultados de análisis efectuados por la técnica de Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) en las cepas GCH1-2, GCH1-3 y GCC7.....	59

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras de witanólidos obtenidos a partir hojas de <i>Acnistus arborescens</i>	16
Figura 2. Anatomía del árbol de güitite. Cultivado en: Finca Juan Salas. Guadalupe, Zarcero, Alajuela, Costa Rica.....	24
Figura 3. (A) distribución espacial de la planta huésped (B) factores ambientales que afectan la estructura de la población y (C) distribución y ventajas que proveen los hongos endófitos.....	27
Figura 4. Esquema analizador de Tiempo de Vuelo con Ionización Electrospray (ESI-ToF)	36
Figura 5. Diagrama de trayectoria del ion en el analizador de Tiempo de Vuelo (TOF). Fuente: (Waters, 2019).	37
Figura 6. Corriente Total de Iones (TIC) por Ionización Electrospray en modo positivo (+ESI).	38
Figura 7. Corriente de ion extraído (XIC) para Espiramicina m/z 843,5213 y Fluoxetina m/z 310,1413.	38
Figura 8. Espectro de masas-masas.....	39
Figura 9. Ejemplo de reporte de composición elemental proporcionado por el software MassLynx™ del UPLC marca Waters, modelo Acquity.	40
Figura 10. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GVH3.1 utilizando el software MassLynx™ 2019.	51
Figura 11. Cromatogramas referentes al Fisanólido A presentes en la muestra tomada de la corteza del arbusto GCC7 (A) señal TIC (B) señal XIC; y (C) espectro masas/masas utilizando el software MassLynx™ 2020.....	54
Figura 12. Reporte de composición elemental para el Fisanólido A presente en la muestra GCC7 utilizando el software MassLynx™ 2020.	55
Figura 13. Cromatogramas referentes al Witafisalino I presentes en la muestra GCH1-2. (A) señal TIC (B) señal XIC; y (C) espectro masas/masas utilizando el software MassLynx™ 2020.....	56
Figura 14. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-2 utilizando el software MassLynx™ 2020.	57
Figura 15. Cromatogramas referentes al Witafisalino I presentes en la muestra GCH1-3. (A) señal TIC (B) señal XIC; y (C) espectro masas/masas utilizando el software MassLynx™ 2020.....	58
Figura 16. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-3 utilizando el software MassLynx™ 2020.	59
Figura 17. Cromatogramas (A) señal TIC y (B) señal XIC para el Fisanólido A presente en la muestra GCC7 utilizando el software MassLynx™ 2021.	60
Figura 18. Reporte de composición elemental para el Fisanólido A presente en la muestra GCC7 utilizando el software MassLynx™ 2021.	61
Figura 19. Cromatogramas (A) señal TIC y (B) señal XIC para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-2 utilizando el software MassLynx™ 2021.	62
Figura 20. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-2 utilizando el software MassLynx™ 2021.	63
Figura 21. Cromatogramas TIC y XIC para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-3 utilizando el software MassLynx™ 2021.	64
Figura 22. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-3 utilizando el software MassLynx™ 2021.	65

Abreviaturas y Acrónimos

CIMAR: Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología.

CIPRONA: Centro de Investigaciones en Productos Naturales.

DBE: Equivalentes de dobles enlaces.

DIMS: Infusión directa acoplada a espectrofotometría de masas.

EIMS: Ionización de electrones acoplada a espectrometría de masas.

ESI: Ionización por electro aerosol.

EtOAc: Acetato de etilo

EtOH: Etanol

FABSM: Espectrometría de masa bombardeada por átomos veloces

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

iFIT: En el espectro de masas representa la bondad de ajuste del espectro en comparación con un modelo de isótopo calculado para la fórmula especificada.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas-masas.

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas.

m/z: Relación masa-carga.

Masa calculada: Masa calculada por el software del equipo a partir de la masa reportada.

Masa: Masa real observada utilizada como guía para determinar la composición elemental.

mDa: En el espectro de masas representa la diferencia entre la masa observada y la masa calculada en miliDaltons.

MetOH: Metanol

M_{mi}: Masa monoisotópica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: Agar papa dextrosa.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

Si 60: Silica gel 60 (40-63µm).

TIC: Espectro de masas de corriente de iones totales.

TLC: Cromatografía de capa fina.

TPC: Contenido fenólico total.

UPLC-ESI-Q-ToF/MS: Cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrofotometría masas de tiempo de vuelo.

VCL: Cromatografía Líquida al Vacío

XIC: Espectro de masas de corriente de iones extraídos.

Resumen

La relación entre la planta y el hongo endófito va más allá de compartir un espacio y un medio de nutrición. Esta similitud se constató en los metabolitos secundarios, witanólidos, presentes tanto en el güitite, como en hongos endófitos aislados del mismo.

Para detectar la presencia de las especies, se realizó por triplicado el cultivo de inóculos de la corteza, hojas y tallo, su extracción y el análisis de los extractos mediante la técnica de infusión directa, acoplada a espectrofotometría de masas (DIMS) y cromatografía líquida de ultra resolución también acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-ToF/MS).

Se determinaron con precisión mediante sus espectros de masas-masas Witafisalino I en las muestras GCH1-2 y GCH1-3 señalando que son muestras equivalentes que contienen la especie en las hojas del arbusto. Asimismo, en la cepa GCC7 se detectó Fisanólido A, el cual es un metabolito que se encuentra en la corteza de las especies de la familia *Solanaceae*. La desviación estándar en todas las mediciones fue menor al 1,0 %.

Esta investigación se considera un aporte significativo, ya que, el güitite es una especie nativa de Costa Rica y escasamente analizada desde este enfoque. Reconociendo nuevas posibilidades y aportes a investigaciones realizadas en materia de semejanza de metabolitos con propiedades anticancerígenas y antioxidantes como las evaluadas en los witanólidos.

Palabras clave: extracto, inóculo, citotoxicidad, planta hospedera, metabolito secundario.

Cita bibliográfica

Salas, Y. (2021). *Detección de witanólidos producidos por hongos endófitos aislados del árbol de güitite (Acnistus arborescens) mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, Alajuela.

Capítulo 1. Introducción

La necesidad del ser humano por mantener un desarrollo biológico óptimo como ser vivo y en armonía con la naturaleza, lo llevan a reconocer que las plantas producen gran cantidad de sustancias con funciones y respuestas directas que generan un valor al ecosistema en el cual se desarrollan. Company, *et al.*, (2011) enfatizan que los registros fósiles de endófitos se remontan a más de 400 millones de años, lo que implica a estos microorganismos en la adaptación de la planta huésped a las transiciones de hábitat, propiciando relaciones mutualistas.

Las plantas pueden presentar organismos endófitos asociados a los cuales les provee alimento, hospedaje y protección. Según, Strobel y Daisy (2003), los hongos endófitos son sinérgicos a su huésped, lo que les permite evitar el ataque de otros organismos. Esta protección la realizan combatiendo otros hongos y plagas por medio de la generación de metabolitos secundarios. Estos son el producto secundario de la fotosíntesis, la mezcla de estas sustancias es única para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal y diversas rutas metabólicas. Además, influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores (Bruneton, 2000; Trease, 2006).

Las plantas hospederas, son beneficiadas por los hongos endófitos, ya que, según Sánchez, *et al.*, (2013), estos microorganismos pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño.

La relación entre la planta y el hongo endófito va más allá de compartir un espacio y un medio de nutrición. La similitud se constata mediante investigaciones realizadas que demuestran que ambas sintetizan los mismos compuestos. Por ejemplo, Zeng *et al.*, (2004) analizaron un hongo endófito que produce una sustancia análoga a la podofilotoxina aislada de *Diphylleia sinensis* (hospedera). Asimismo, se comprobó que tanto al arbusto como el hongo endófito asociado comparten metabolitos. Esto de acuerdo con lo expuesto por Qiu *et al.*, (2010), por medio del aislamiento e identificación de dos hongos endófitos productores de flavonoides de *Ginkgo biloba* L. *Ann.*

El arbusto de güitite (*Acnistus Arborescens (L.) Schlttdl*), familia Solanaceae, destaca por tener relaciones mutualistas. Este es nativo de Costa Rica y presenta una distribución natural desde México hasta Brasil. En Costa Rica crece en fincas y terrenos de la región central, así como en potreros como componente principal de las etapas sucesionales tempranas (Instituto Nicaragüense de Recursos Naturales (IRENA), 1983).

Este arbusto es uno de los más comunes en el país y su estudio ha generado hallazgos importantes. Los compuestos que este produce tienen propiedades anticancerígenas de interés para el tratamiento del cáncer de pulmón, de mama y de próstata (Veras *et al.*, 2004). Estos metabolitos presentan un amplio espectro de actividad biológica y se pueden agrupar en varias categorías que incluyen alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glucósidos, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, metabolitos alifáticos, lactonas, etc. (Zhang *et al.*, 2006).

Por otro lado, la familia Solanaceae se caracteriza por contener compuestos como fisangulidina A, fisangulatina A, wita-fisalina I, fisapruna A, wita-fisanólido, dihidrowitanólido E, fisanolido A, wita-fisalina A, fisalina B, fisalina D, fisalina F, fisalina G, fisalina J, fisalina T, fisalina U, fisalina V, acnistina A, acnistina E, daturametelina H, daturametelina I, daturametelina J, wita-fisalinas T, wita-fisalinas W y wita-fastuosina D (Nittala *et al.*, 1981; Ma *et al.*, 2006; Manickam *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016; Damu *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, el árbol de güitite no ha sido analizado con el propósito de determinar la similitud entre los metabolitos y sus respectivos hongos endófitos. Sin embargo, mediante investigaciones realizadas por Veras *et al.* (2004), Roumy *et al.* (2010) y Kupchan *et al.* (1969), se conoce que este arbusto produce sustancias de interés tales como wita-fisalina M, wita-fisalina F, wita-fisalina O, wita-fisalina N, witanólido D y witaferina A.

Para revisar la presencia o no de las especies de witanólidos mencionados en el párrafo anterior, en los hongos aislados de la planta supracitada, se realizó un cultivo de inóculos de la corteza, hojas y tallo, luego de extracción se analizaron los extractos mediante la técnica de infusión directa acoplada a espectrofotometría de masas (DIMS) y cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-

ToF/MS). Como lo señala Ballesteros *et al*, (2019) esta es la técnica más precisa y eficiente para determinar la abundancia de metabolitos secundarios en hongos endófitos.

1.1. Antecedentes

La colonización de hongos endófitos no es una oportunidad incidental debido a la quimiotaxis, sino una manifestación de reacciones de orientación de los organismos celulares libres como respuesta a estímulos específicos producidos por las plantas hospederas (Sieber, 2007). En 2004 Strobel y otros autores indicaron que los hongos endófitos son un grupo de microorganismos que resaltan como una fuente abundante y confiable de compuestos bioactivos y químicamente novedosos. Estos poseen estructuras y bioactividades únicas, lo que representa un enorme reservorio con alto potencial de explotación en áreas agrícolas e industriales (Tan & Zou, 2001).

Otra aplicación de los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos asociados con plantas medicinales es la posibilidad de ser utilizados para el tratamiento de enfermedades (Tejesvi *et al.*, 2007). El Cuadro 1 presenta varios casos.

La vincristina es un metabolito secundario que ha sido aislado a partir de un endófito *Talaromyces radicus* de las hojas de *Catharanthus roseus*, mediante Cromatografía de capa fina (TLC) y Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en China (Yang, *et al.* 2004). La vincristina se usa principalmente para complementar regímenes de quimioterapia contra la leucemia linfoblástica aguda y el nefroblastoma. En el mismo país, Huang, *et al.* (2007), evaluaron 16 cultivos fúngicos de *Chaetomium* sp. cultivados en caldo de Czapek, con respecto a la capacidad antioxidante, la actividad inhibidora de la xantina oxidasa, la actividad antimicrobiana y el contenido fenólico total (TPC).

De las investigaciones señaladas, se determinó una correlación significativa entre la capacidad sy el TPC en las muestras analizadas. Además, describe que el hongo presenta un potencial antioxidante debido a los flavonoides y los derivados de ácido fenólico presentes, lo cual provee opciones viables para el tratamiento de patologías degenerativas como el Alzheimer y el cáncer.

Caso semejante se presenta en la India con la planta *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn L (Cacinaceae) y su hongo endófito *Fusarium solani*. Dicho hongo produjo camptotecina, 10-

hidroxicamptotecina y 9-metoxi camptotecina (Shweta, *et al.*, 2010). Asimismo, en Australia la especie *Wollemia nobilis* se asocia a un hongo endófito conocido como *Pestalotiopsis guepinii* el cual produce paclitaxel, compuesto que se utiliza para tratar diferentes tipos de cáncer (Strobel *et al.*, 1997).

Chakravarthi *et al.*, (2008), también aislaron a partir de un hongo proveniente de la planta *Taxus celebica* cultivada en India, el metabolito paclitaxel, compuesto que posteriormente también fue obtenido de los hongos *Fusarium solani*, *Metarhizium anisopliae*, *Mucor rouxianus*, provenientes de la hospedera *Taxus chinensis* cultivada en China (Deng, *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2009). Otros hongos de la misma planta *Ozonium* sp., tales como *Alternaria alternata*, *Botrytis* sp., *Ectostroma* sp., *Fusarium mairei*, *Papulaspora* sp. y *Tubercularia* sp., resultaron positivos para la presencia del gen *Taxus taxadieno* sintasa (TS), un gen que limita la velocidad en la ruta biosintética del taxol mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). (Zhou, *et al.*, 2007; Guo, *et al.*, 2009 y Wu, *et al.*, 2013).

Además, en Korea, también se comprobó que los hongos endófitos de *Taxus cuspidata*: *Alternaria* sp., *Aspergillus niger var taxi*, *Botrytis* sp., *Fusarium arthrosporioide* y *Pestalotiopsis microspora*, produjeron paclitaxel (Kim & Ford, 1999).

Según Chen, *et al* (2010) el hongo endófito *Sordariomycete* sp asociado a la planta *Eucommia ulmoides* Oliver produce ácido clorogénico, el cual tiene propiedades antioxidantes que disminuyen el riesgo de sufrir enfermedades como Alzheimer y Parkinson. Esto se realizó en China, utilizando HPLC para seleccionar la cepa mediante la identificación de los productos de fermentación de las cepas aisladas de la hoja y la corteza de la planta. Los resultados positivos fueron nuevamente analizados por Cromatografía de Gases y Líquidos acoplados a Espectrofotometría de Masas (GC-MS y LC-MS).

Otro ejemplo de aislamiento de metabolitos se realizó en India. Chithra *et al* (2014), identificaron piperina mediante LC-MS, la cual fue extraída del hongo endófito *Colletotrichum gloeosporioides* procedente de la planta de pimienta (*Piper nigrum*). La piperina presenta actividad antimicrobiana, antidepresiva, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena (Chithra *et al.* 2014).

Por otra parte, la podofilotoxina es un metabolito ampliamente estudiado. En la provincia de Yunnan, China, Zhen, *et al.* (2004) detallan su aislamiento a partir del hongo endófito

Penicillium implicatum de las raíces, rizomas y pecíolos provenientes de la planta *Diphylleia sinensis*, con la ayuda de TLC y HPLC. Yang *et al* (2003) también determinaron podofilotoxina en el hongo *Monilia* sp. que crece en la planta *Dyosma veitchii*. Asimismo, en China, optimizando las condiciones de fermentación de cultivo se logró el aislamiento de este metabolito en los hongos endófitos *Penicillium* sp., *Phialocephala fortinii*, *Trametes hirsuta* y *Alternaria neesex*, todos provenientes de la planta *Sinopodophyllum hexandrum* (Li, 2007). Aunado a lo anterior, en India, Kour, *et al.*, (2008) aislaron el metabolito podofilotoxina del hongo *Fusarium oxysporum* originario de la planta *Juniperus recurva*.

Esto se logró a partir del lavado de los micelios con agua destilada estéril y homogenización en un desintegrador celular, posterior extracción de los micelios con cloroformo: metanol (4:1 v/v). La identidad de podofilotoxina se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrofotometría de masas (TLC, HPLC, LC-MS, LC-MS/MS). Asimismo, Lu *et al* (2006) en China, aislaron este metabolito a partir del cultivo del endófito *Alternaria* sp. presente en la planta *Sabina vulgaris* extraído con cloroformo y analizado por HPLC.

El trabajo de Zhang, *et al.*, (1998) en China, permitió aislar el compuesto vinblastina de los hongos endófitos *Alternaria* sp. y *Fusarium oxysporum* presentes en la planta ornamental *Catharanthus roseus*, mediante análisis por HPLC. La vinblastina se utiliza en combinación con otros medicamentos de quimioterapia para tratar el linfoma de Hodgkin y el cáncer de testículos.

Las especies detalladas anteriormente son ejemplo de la utilidad que el ser humano le ha dado a metabolitos secundarios aislados de plantas, caso semejante se presenta con el arbusto objeto de la presente investigación.

En Francia, Roumy *et al.* (2010) llevaron a cabo el fraccionamiento guiado por bioensayo de un extracto de las hojas de *Acnistus arborescens* con metanol. Ellos utilizaron el aislamiento guiado por bioensayo contra la bacteria que causa la pulmonía (*Pneumocystis carinii* (PCP)) y aislaron los siguientes compuestos (Figura 1):

1. (20R,22R) -5 β ,6 β -epoxi-4 β ,12 β ,20-trihidroxi-1-oxo-2-en-24-enolido
2. (20R,22R) -16 β -acetoxi-3 β ,4 β ;5 β ,6 β -diepoxi-12 β ,20-dihidroxi-1-oxo-24-enolido
3. Witanólido D

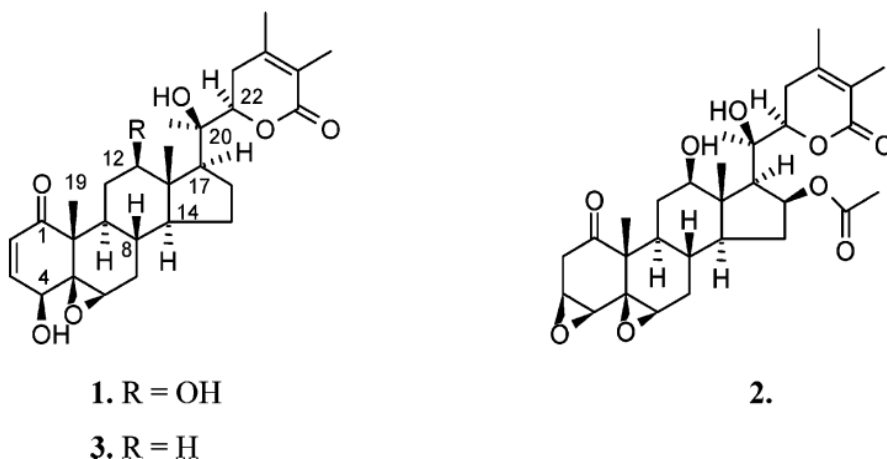


Figura 1. Estructuras de witanólidos obtenidos a partir hojas de *Acnistus arborescens*.
Fuente: Roumy *et al.* (2010).

La identificación de estos witanólidos se realizó mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) por análisis mono y bidimensional. Los autores también examinaron, la actividad antifúngica en trece hongos responsables de infecciones humanas (cinco dermatofitos y una no dermatófito, seis levaduras y una antibacteriana (*Pneumocystis carinii*)). También se determinó su citotoxicidad *in vitro* mediante pruebas en líneas celulares de leucemia mieloide crónica (Roumy, *et al.*, 2010).

En la determinación de Witafisalino I realizada por Misico *et al.*, (2000), se utilizaron 1,83 kg de la planta *Vassobia lorentzii* seca y pulverizada. La misma se extrajo con etanol a temperatura ambiente y el extracto obtenido (78 g) se particionó entre hexano, metanol y agua (30:3:1). La capa acuosa se lavó con hexano, se concentró, y se extrajo con cloroformo. Se separó mediante Cromatografía Líquida al Vacío (VLC), cromatografía en columna sobre gel de Si 60 (40-63 μm) y TLC preparativa. Respecto al análisis instrumental, los EIMS se realizaron en un espectrómetro de masas VG Trio-2 a 70 eV mediante la técnica DIMS.

Morantes, *et al.*, (2006), realizaron un análisis fitoquímico del arbusto *Acnistus arborescens*, para determinar la actividad citotóxica en cultivos de líneas celulares derivadas de tumores humanos de seno, de colon, de laringe, de cérvix y el linfoma histiocítico. Asimismo, se demostró que el güitite además de poseer witanólidos como principales compuestos bioactivos, posee otros metabolitos de interés biológico como son los esteroides,

terpenos, ácidos grasos y flavonoides glicosilados, este último grupo no reportado antes para esta especie.

El árbol de güitite (*Acnistus arborescens*) es comúnmente utilizado en América Central y América del Sur en la medicina tradicional contra varias enfermedades infecciosas, algunas de las cuales son causadas por hongos (De la Cruz *et al*, 2007).

Según lo señalan los trabajos citados, varias especies de hongos endófitos aportan soluciones al tratamiento de enfermedades y el mejoramiento de la calidad de vida de la población. Por lo tanto, resulta imperante generar metodologías eficientes para lograr el aislamiento de metabolitos secundarios y su correcta caracterización, con el objeto de determinar la analogía entre los compuestos presentes en el árbol y los aislados de hongos endófitos asociados a la planta hospedera.

En Costa Rica, el árbol de güitite (*Acnistus arborescens*) solamente se ha categorizado taxonómicamente (Rojas & Torres, 2012), al menos en lo que a reportes en la literatura se tienen.

Cuadro 1. Resumen de antecedentes relacionados con la determinación de witanólidos en hongos endófitos aislados de diversas especies de plantas hospederas

Metabolito Secundario	Hongo Endófito	Planta Hospedera	Referencia
(20R,22R) -5 β ,6 β -epoxi-4 β ,12 β ,20-trihidroxi-1-oxo-2-en-24-enolido	Bioensayo por fraccionamiento	<i>Acnistus arborescens</i>	Roumy, <i>et al.</i> 2010
(20R,22R) -16 β -acetoxi-3 β ,4 β ;5 β ,6 β -diepoxi-12 β ,20-dihidroxi-1-oxo-24-enolido			
Witanólido D			
Vincristina	<i>Talaromyces radicus</i> ,	<i>Catharanthus roseus</i>	Yang, <i>et al.</i> 2004
Xantina oxidasa		<i>Chaetomium</i> sp	Huang, <i>et al.</i> 2007
Camptotecina	<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i> E.	Shweta, <i>et al.</i> , 2010
10-hidroxycamptotecina		Mey. ex Arn L	
9-metoxi camptotecina		(cacinaceae)	
Paclitaxel	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	Strobel <i>et al.</i> , 1997
Paclitaxel	<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>	Chakravarthi <i>et al.</i> , 2008
Paclitaxel	<i>Fusarium solani</i> ,	<i>Taxus chinensis</i>	Deng, <i>et al.</i> , 2009; Liu, <i>et al.</i> , 2009
	<i>Metarhizium anisopliae</i> ,		
	<i>Mucor rouxianus</i> ,		
Paclitaxel	<i>Ozonium</i> sp.	<i>Taxus chinensis</i> var.	Zhou, <i>et al.</i> , 2007; Guo, <i>et al.</i> , 2009 y Wu, <i>et al.</i> , 2013
	<i>Alternaria alternata</i> ,	Mairei,	
	<i>Botrytis</i> sp.		
	<i>Ectostroma</i> sp.		
	<i>Fusarium mairei</i> ,		
	<i>Papulaspora</i> sp		
	<i>Tubercularia</i> sp.		

Cuadro 1. Resumen de antecedentes relacionados con la determinación de witanólidos en hongos endófitos aislados de diversas especies de plantas hospederas (*continuación*).

Metabolito Secundario	Hongo Endófito	Planta Hospedera	Referencia
Paclitaxel	<i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus niger</i> var <i>taxi</i> <i>Botrytis</i> sp. <i>Fusarium</i> arthrosporioide <i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus cuspidata</i> .	Kim & Ford, 1999
Ácido clorogénico	<i>Sordariomycete</i> sp,	<i>Eucommia ulmoides</i>	Chen, et al, 2010
Piperina	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Piper nigrum</i>	Chithra et al, 2014
Podofilotoxina	<i>Penicillium implicatum</i>	<i>Diphylleia sinensis</i>	Zhen, et al., 2004
Podofilotoxina	<i>Monilia</i> sp.	<i>Dysosma veitchii</i>	Yang et al (2003)
Podofilotoxina	<i>Penicillium</i> sp., <i>Phialocephala fortinii</i> , <i>Trametes hirsuta</i> <i>Alternaria neesex</i>	<i>Sinopodophyllum</i> <i>hexandrum</i>	Li, 2007
Podofilotoxina	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Juniperus recurva</i>	Kour, et al., 2008
Podofilotoxina	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Sabina vulgaris</i> .	Lu et al (2006)
Vinblastina	<i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharanthus roseus</i> .	Zhang, et al., 1998
Witafisalino I	-	<i>Vassobia lorentzii</i>	Misico et al., 2000

Fuente: Elaboración propia.

1.2. Problema y Justificación

La relación que permanece entre los hongos endófitos y la planta hospedera favorece el crecimiento de esta, reduce el ataque de depredadores y aumenta la síntesis de compuestos (Seiber, 2007).

Venieraki, Dimou y Katinakis (2017) señalan que los hongos endófitos que residen en las plantas son capaces de biosintetizar metabolitos secundarios farmacológicamente activos, similares o idénticos a los producidos por sus plantas hospederas.

Ejemplo de las especies citadas, son los witanólidos, estos intervienen positivamente en el desarrollo de actividades biológicas fundamentales. Además, son beneficiosas para la planta, favorecen su crecimiento y aumentan su protección ante los depredadores y los microorganismos del entorno (Jia, *et al.*, 2016).

En esta investigación se identificaron los metabolitos secundarios presentes en extractos aislados de los hongos endófitos del árbol de güitite (*Acnistus arborescens*), y se compararon con los compuestos reportados para la planta. La detección de estos se llevó a cabo mediante un proceso precursor de cultivo de inóculos, extracción en medio orgánico y análisis mediante las técnicas DIMS y UPLC-ESI-Q-ToF/MS, lo cual robusteció con nuevo conocimiento a investigaciones previas realizadas en otras plantas y sus respectivos hongos endófitos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Determinar los witanólidos producidos por hongos endófitos aislados del árbol de güitite (*Acnistus arborescens*) utilizando la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-ToF/MS).

1.3.2. Objetivos Específicos

- Obtener cultivos de hongos endófitos aislados del árbol de güitite.
- Establecer el proceso de extracción óptimo para la obtención de extractos de los cultivos de hongos endófitos.
- Analizar los extractos obtenidos en función de los witanólidos producidos mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-ToF/MS).
- Valorar los resultados obtenidos y señalar las investigaciones necesarias por realizar para la generación de una nueva fuente de witanólidos con posible actividad biológica.

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1. Características biológicas y taxonomía del árbol de güitite

Las plantas son especies que enriquecen con su belleza y complejidad los ecosistemas. Estas otorgan a su vez un sin número de beneficios para los individuos que se hospedan o reciben su protección.

Un ejemplo de una planta con alto valor para la investigación es el árbol de güitite. El botánico alemán Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal le otorgó al árbol de güitite el nombre binomial de *Acnistus arborescens* (L.) Schltidl. Su taxonomía se detalla en el Cuadro 2 (Rojas & Torres, 2012).

Cuadro 2. Taxonomía del árbol de güitite.

Taxonomía	
Nombre reconocido en Costa Rica	Güitite
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Tribu	<i>Physaleae</i>
Subtribu	lochrominae
Género	<i>Acnistus</i>
Especie	<i>Acnistus Arborescens</i> (L.) Schltidl.

Fuente: Elaboración propia.

Este arbusto se distribuye en el mundo desde México hasta Brasil y en Costa Rica es común encontrarlo en potreros de la Región Central. Se presenta como un árbol mediano tipo arbusto, de copa irregular. Su fuste es de porte bajo y su forma asimétrica. La corteza presenta surcos longitudinales con una superficie corchosa,

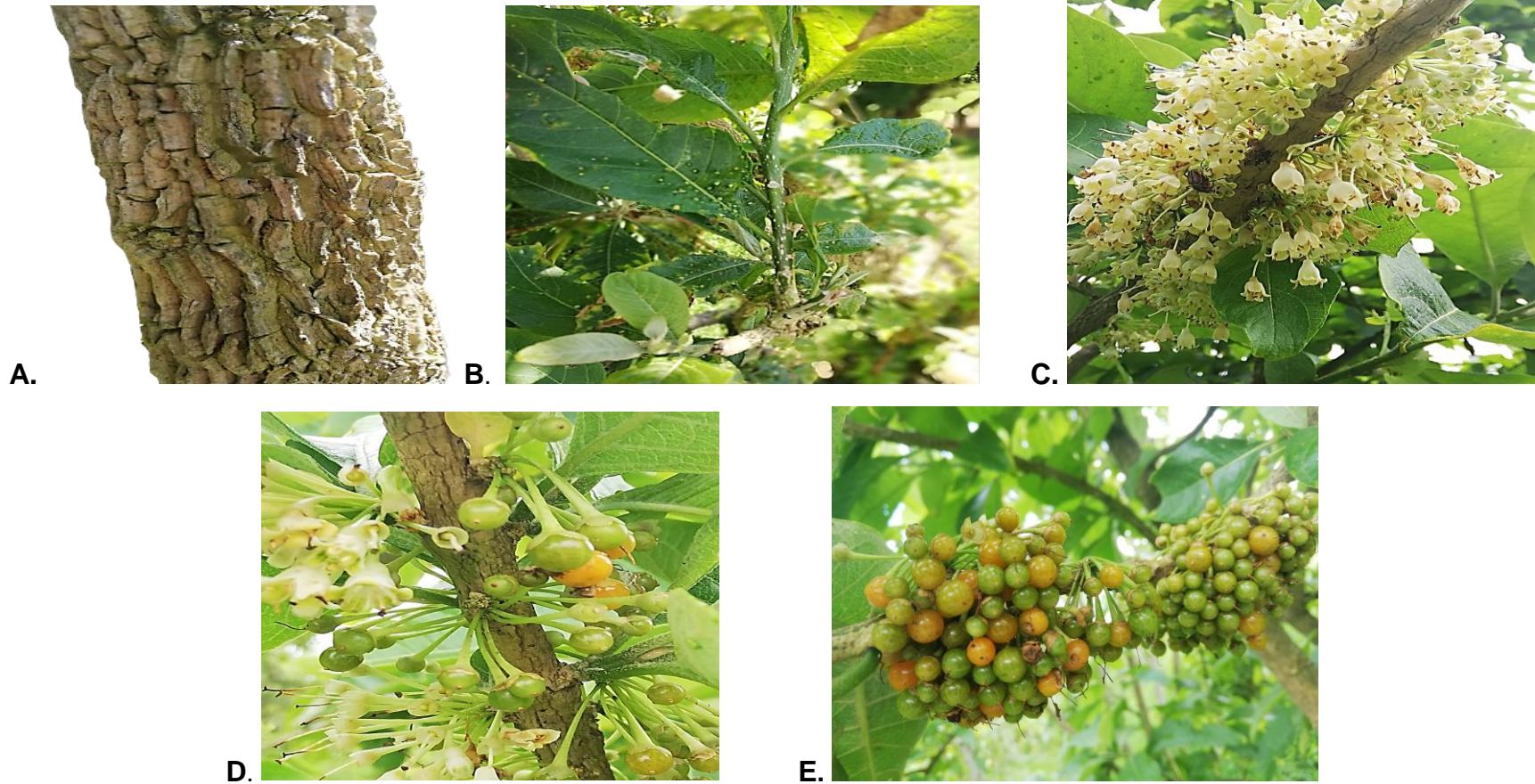
cremosa y suave (Instituto Nicaragüense de Recursos Naturales y del Ambiente (IRENA), 1983) (Figura 1A).

El follaje es perennifolio, de color verde brillante en el haz o superficie adaxial y blanquecino en el envés o superficie abaxial. Las hojas son simples alternas, con pecíolos gruesos y láminas elípticas de 15 a 20 cm de largo y 8 a 10 cm de ancho. Estas presentan mucha pubescencia en el haz, con un sabor amargo en toda la estructura foliar (Holdridge, 1979) (Figura 1B).

Rojas y Torres (2012), destacan que sus flores se agrupan en las axilas de las hojas, presenta cáliz verdoso y corola blanca de cinco pétalos de color crema de 1 cm de largo, son aromáticas y atractivas a muchas especies de aves e insectos (abejas, mariposas, libélulas, etc.) durante los meses de floración (agosto a noviembre) (Figura 1C). Fenómeno semejante ocurre con sus frutos en función con las aves, se trata de frutos carnosos tipo baya, de forma esférica, anaranjado al madurar, jugoso, dulce y de sabor agradable y de aproximadamente 7 mm de diámetro, mientras que las semillas son diminutas y numerosas, de color blanquecino (Figura 1D).

En relación con el manejo de la semilla y el desarrollo de la planta en viveros, Torres *et al.* (2001), indican que las semillas deben sembrarse al voleo en un sustrato con base de tierra y arena. Posteriormente, se debe cubrir la superficie. Según la calidad de la semilla, el porcentaje de germinación, la cual se experimenta tres meses después de la siembra, varía entre un 60 % a un 84 %. Asimismo, los frutos del güitite se recolectan de setiembre a diciembre y se reconoce su madurez mediante el color, la dispersión y la textura (Figura 1E).

Según los autores que anteceden, posterior a las cuatro semanas de germinación, las plántulas se encuentran listas para su repique o trasplante. Para lograr que estas se desarrollen favorablemente, se utilizan varios sistemas de producción: bolsa plástica, contenedores, maceta de papel, estaca o bandeja de plástico. Además, es indispensable aplicar sombra, y fertilización química u orgánica para mejorar su mantenimiento.



A. Corteza

B. Hojas y Tallos

C. Flores

D. Flores y Frutos

E. Racimo de frutos maduros y verdes

Figura 2. Anatomía del árbol de güitite. Cultivado en: Finca Juan Salas. Guadalupe, Zarcero, Alajuela, Costa Rica.

Fuente: Elaboración Propia.

2.2. Hongos endófitos

Los hongos endófitos mantienen relaciones simbióticas con otros organismos, igualmente, reciben los nutrientes y compuestos necesarios para completar su ciclo de vida a partir de la planta. Sin embargo, muchos endófitos logran sobrevivir bajo condiciones extremas e inhóspitas, mientras que la planta huésped no se comporta de la misma forma (Bacon y White 2000).

Los hongos endófitos residen asintómicamente dentro de una planta durante al menos una parte de su ciclo de vida (Guo *et al.*, 2001, Hyde y Soyong, 2008, Kusari *et al.*, 2012, O'Hanlon *et al.*, 2012, Clay *et al.*, 2016; Solís *et al.*, 2016). Los endófitos crecen inter o intracelular, sistémica o localmente dentro de sus anfitriones sin causar manifestaciones visibles de infección o enfermedad (Kusari *et al.*, 2012, Lo Presti *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2015). Asimismo, se encuentran en todas partes en diversos tejidos de las plantas aéreas y subterráneas de hepáticas, musgos, licófitos, equisetopsidos, helechos y espermatófitos de bosques naturales y ecosistemas agrícolas (Kusari *et al.*, 2012, Jeewon *et al.*, 2013, Doilom *et al.*, 2017; Potshangbam *et al.*, 2017).

Zhang y Nan (2006) señalan que la interacción planta-endófito es de carácter asintomático. La planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección, mientras que los hongos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas de tipo abiótico; a saber, tolerar la sequía y el estrés oxidativo, tolerancia a suelos ácidos con altos contenidos de zinc y aluminio, y tolerancia al estrés salino, entre otras (Zaurov *et al.*, 2001; Monnet *et al.*, 2001; Waller *et al.*, 2005).

Asimismo, esta interacción puede reducir el impacto negativo causado por factores bióticos como insectos herbívoros (Schardl y Phillips, 1997; Bourassa *et al.*, 2006) y ácaros que causan pérdidas en los cultivos de cítricos (Paz *et al.*, 2006).

La relación planta-endófito es tan fuerte que puede llegar a estar involucrada en la resistencia sistémica inducida (Waller *et al.*, 2005), al permitir a la planta expresar su máximo potencial genético y exhibir altas tasas de germinación, mayor densidad,

mayor cantidad de biomasa en los tejidos y mejor producción de semilla, en comparación con las plantas libres de endófitos (Vila-Aiub *et al.*, 2003).

Aunado a lo anterior, resalta el hecho de que el mejoramiento de las condiciones de la planta y su medio se ven favorecidos por sustancias específicas que esta sintetiza y que puede recibir de otros organismos asociados. Estas relaciones están significativamente entrelazadas al favorecimiento de las condiciones de crecimiento, alimentación y desarrollo de los organismos que comparten dicho espacio. Las plantas a su vez subsanan de forma natural las necesidades generadas de sí y de su hogar, como es el caso de los metabolitos secundarios provenientes de los hongos endófitos.

Para Wink (1999), la síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos; es decir, que solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. El aumento en los niveles de metabolitos secundarios es importante para la supervivencia de las plantas. En la Figura 3 se muestran la distribución espacial de la planta huésped y los factores ambientales que afectan la estructura de la población y la distribución de hongos endófitos.

En la Figura 3A se muestra la distribución espacial de la planta huésped y los factores ambientales que afectan la estructura de la población y la distribución de hongos endófitos. En la Figura 3B se detallan los beneficios de las relaciones establecidas entre el hongo endófito y la planta hospedera potenciando su crecimiento y resistencia, así como promoviendo la acumulación de metabolitos secundarios.

La taxonomía de un total de noventa y seis plantas medicinales analizadas durante los últimos treinta años se muestra en Figura 3C. En adición a lo expuesto, Kelemu *et al.* (2001) afirman que, mediante la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, se logra mitigar el efecto de otros hongos causales de enfermedad, como es el caso de *Dechslera* sp., para la gramínea *Brachiaria* sp.

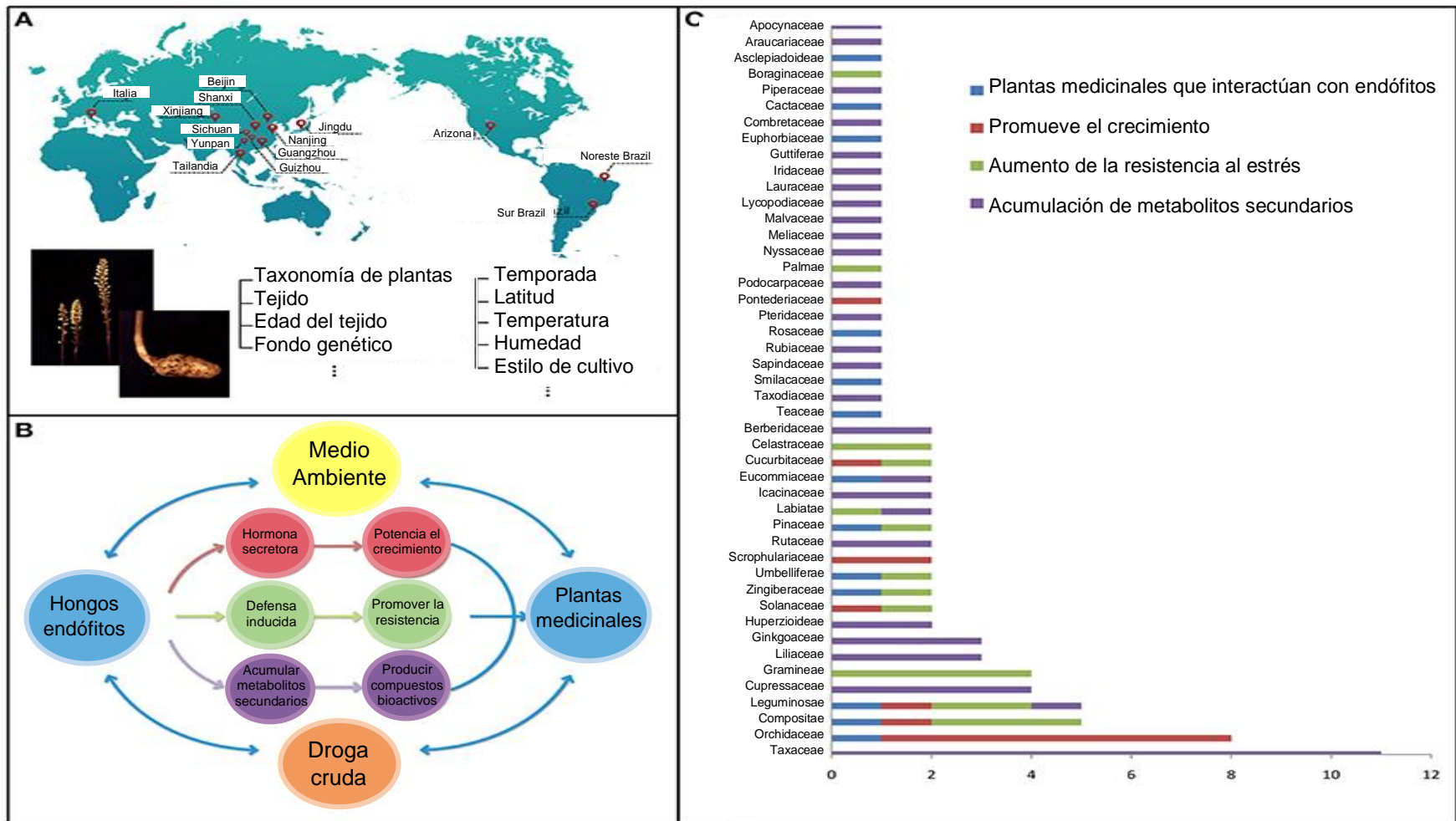


Figura 3. (A) Distribución espacial de la planta huésped (B) y los factores ambientales que afectan la estructura de la población y (C) distribución y ventajas que proveen los hongos endófitos.

Fuente: Modificado de (Jia *et al.*) (2016)

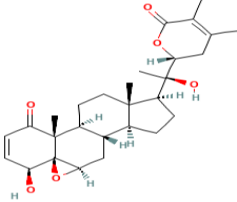
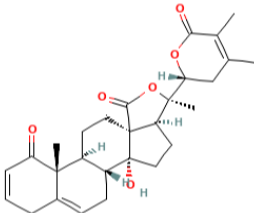
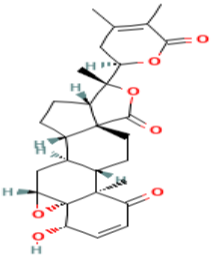
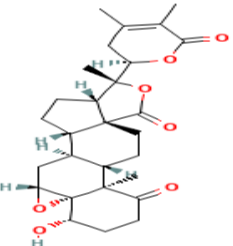
2.3. Biosíntesis y almacenamiento de metabolitos o sus precursores en plantas.

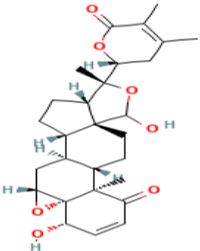
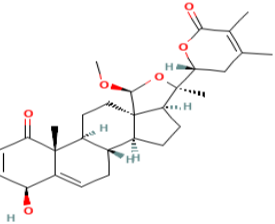
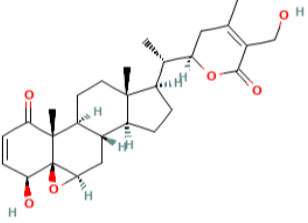
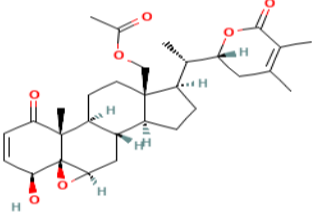
La biosíntesis y el almacenamiento de metabolitos o sus precursores, ocurre en diferentes lugares de la célula vegetal. La síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, los sesquiterpenos y los dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que algunas aminas y alcaloides se realizan en la mitocondria.

Por su parte, los compuestos solubles en agua se almacenan en las vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

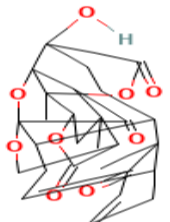
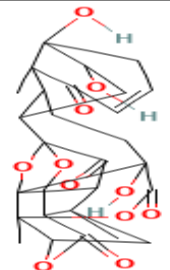
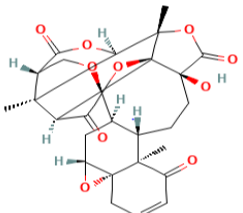
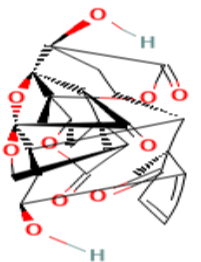
Las plantas del género *Acnistus* producen un conjunto de esteroides naturales de 28 carbonos (C_{28}) formados por lactonas clasificados como acnistinos, witanólidos, jaboroles y witañisalinos (Cuadro 3). Estas sustancias comúnmente son extraídas mediante percolación de las hojas del arbusto con etanol, donde posteriormente el extracto producido es evaporado en un rotavapor a presión reducida. El residuo es disuelto en algunos mililitros de agua y extraído con disolventes orgánicos como hexano, cloroformo y acetato de etilo, los cuales son utilizados como fases móviles para lograr la separación cromatográfica en sílice (Veras *et al*, 2004).

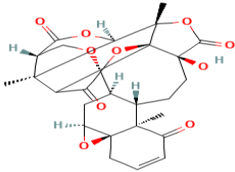
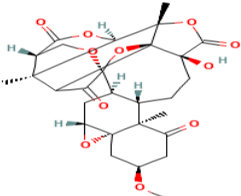

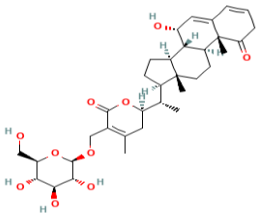
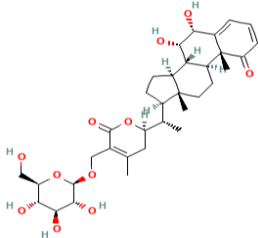
Cuadro 3. Nombre, estructura, fórmula y masa molecular y masa monoisotópica de metabolitos aislados de plantas del género *Acnistus*

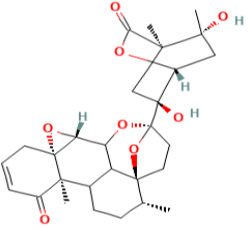
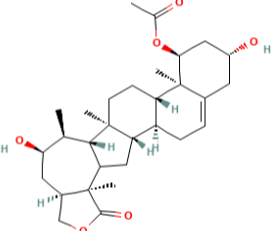
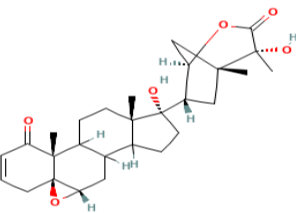
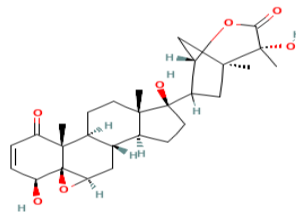
Metabolito Secundario	Estructura	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g/mol)	[M+H] ⁺	Referencia
Witanólido D		C ₂₈ H ₃₈ O ₆	470,606	471,2747	Nittala <i>et al</i> , (1981).
Witafisalino A		C ₂₈ H ₃₄ O ₆	466,574	467,2434	Damu <i>et al</i> , (2007).
Witafisalino M		C ₂₈ H ₃₄ O ₇	482,573	483,2383	Veras <i>et al</i> , (2004)
Witafisalino N		C ₂₈ H ₃₆ O ₇	484,589	485,2539	Veras <i>et al</i> , (2004)

Metabolito Secundario	Estructura	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g/mol)	[M+H] ⁺	Referencia
Witafisalino F/ Witafisalino O		C ₂₈ H ₃₆ O ₇	484,589	485,2539	Veras <i>et al</i> , (2004)
Witafisalino I		C ₂₉ H ₃₈ O ₆	482,620	483,2747	Misico, <i>et al</i> . (2002).
Witaferina A		C ₂₈ H ₃₈ O ₆	470,606	471,2747	Kupchan <i>et al</i> , (1969).
Witacnistino		C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512,643	513,2852	Kupchan <i>et al</i> , (1969).

Cuadro 3. Nombre, estructura, fórmula y masa molecular y masa monoisotópica de metabolitos aislados de plantas del género *Acnistus* (continuación).

Metabolito Secundario	Estructura	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g/mol)	[M+H] ⁺	Referencia
Fisalino B		C ₂₈ H ₃₀ O ₉	510,539	511,1968	Damu <i>et al.</i> (2007).
Fisalino D		C ₂₈ H ₃₂ O ₁₁	544,553	545,2023	Damu <i>et al.</i> (2007).
Fisalino F		C ₂₈ H ₃₀ O ₁₀	526,538	527,1917	Damu <i>et al.</i> (2007).
Fisalino G		C ₂₈ H ₃₀ O ₁₀	526,538	527,1917	Damu <i>et al.</i> (2007).

Metabolito Secundario	Estructura	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g/mol)	[M+H] ⁺	Referencia
Fisalino J		C ₂₈ H ₃₀ O ₁₀	526,538	527,1917	Damu <i>et al.</i> (2007).
Fisalino U		C ₂₉ H ₃₄ O ₁₁	558,580	559,2179	Damu <i>et al.</i> (2007).
Fisalino V		C ₃₀ H ₃₄ O ₁₀	554,592	555,2230	Damu <i>et al.</i> (2007).
Daturametelino I		C ₃₄ H ₄₈ O ₁₀	616,748	617,3326	Ma <i>et al.</i> (2006).
Daturametelino J		C ₃₄ H ₄₈ O ₁₁	632,747	633,3275	Ma <i>et al.</i> (2006).

Metabolito Secundario	Estructura	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g/mol)	[M+H] ⁺	Referencia
Fisangulidino A		C ₂₈ H ₃₆ O ₈	500,588	501,2488	Reyes <i>et al.</i> (2013).
Fisanólido A		C ₃₀ H ₄₄ O ₆	500,676	501,3216	Damu <i>et al.</i> (2007); Jin <i>et al.</i> (2012)
Acnistina A		C ₂₈ H ₃₈ O ₆	470,606	471,2747	Cardona <i>et al.</i> (2006).
Acnistina E		C ₂₈ H ₃₈ O ₇	486,605	487,2696	Cardona <i>et al.</i> (2006).

Fuente: Elaboración propia a partir de las citas indicadas en el Cuadro 3 (Nittala *et al.* 1981; Damu *et al.* 2007; Veras *et al.*, 2004; Misico, *et al.*, 2002; Kupchan *et al.*, 1969; Damu *et al.*, 2007; Ma *et al.* 2006; Reyes *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2012; & Cardona *et al.*, 2006).

El árbol de güitite ha generado interés debido a los hallazgos realizados de metabolitos secundarios, como los witanólidos, incluidos entre ellos los witacnistinos, la witaferina A, los witaferalinos, el witanólido D y sus derivados, los cuales, se han utilizado con fines medicinales, específicamente contra las infecciones causadas por bacterias, hongos, malaria, *leishmaniasis* y cáncer (Roumy, *et al.*, 2010).

Los metabolitos aislados del arbusto tienen actividad inhibidora de tumores (Kupchan *et al.* 1969), por lo que el encontrar el mismo tipo de compuestos en los hongos endófitos del güitite, podría contribuir al desarrollo de nuevas fuentes de obtención de dichos compuestos y usos en investigaciones relacionadas con posibles aplicaciones en la prevención y tratamiento del cáncer.

Roumy *et al.*, (2010) también reconocen el uso de witanólidos como sustancias citotóxicas, es decir, que tienen la capacidad de eliminar células cancerígenas, de acuerdo con la experimentación realizada en líneas de células de leucemia mieloide crónica humana, resistentes al imatinib, medicamento utilizado para tratar esta enfermedad.

Bajo este enfoque estos autores, llevaron a cabo una metodología de extracción utilizando hojas de güitite en polvo, las cuales fueron desengrasadas con éter de petróleo y extraídas posteriormente con metanol. El extracto metanólico se fraccionó, para luego ser extraído con agua, acetato de etilo y acetonitrilo. Cada fracción fue separada en columnas que contenían sílica gel y visualizadas con cámara bajo lámpara ultravioleta a longitudes de onda entre 254 y 365 nm.

Estos procesos se presentan como una de las alternativas para aislar los compuestos de interés en la presente investigación. Sin embargo, para lograr la separación de los metabolitos secundarios es necesario contar con el equipo óptimo, es decir, se deben considerar todas las variables intrínsecas en el análisis para garantizar la obtención de resultados precisos y buenas separaciones entre el extracto y dentro de este.

2.4. Técnicas empleadas en la cuantificación y caracterización de metabolitos secundarios

Una de las técnicas más empleadas en la detección y cuantificación de metabolitos secundarios en metabolómica es la cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría, masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-ToF/MS), en la cual se utilizan partículas de menos de 2 μm . El empleo de esta técnica mejora la resolución debido a que se minimiza la difusión del analito al atravesar la columna. Además, se utilizan altas presiones por lo que se reduce el tiempo de análisis y se aumenta el rendimiento en los ensayos (Macherius, *et al*, 2014).

Parte de la optimización de los análisis cromatográficos especialmente en la determinación de los metabolitos en muestras complejas como los extractos provenientes de hongos y plantas, se basan en aumentar su sensibilidad, con el propósito de mejorar la obtención de resultados confiables, pero, sobre todo, para generar datos claros y aplicables a las investigaciones.

Un ejemplo de estas variaciones es el uso de métodos como la infusión o inyección directa, en la cual la muestra no pasa por el cromatógrafo de líquidos. En este caso, se cuenta con una sonda que permite el paso directamente al detector de masas, sin necesidad de estipular condiciones cromatográficas debido a que el analito no atraviesa la columna de separación (Ibáñez, 2007).

Inicialmente, se inyecta la muestra previamente disuelta en un disolvente afín y se ioniza por electro aerosol (ESI por sus siglas en inglés). Luego se pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 kV y una presión de una atmósfera dentro de la cámara de ionización que contiene un magneto de 0,0025 mm (Young, *et al*, 2003).

Al salir del capilar, la muestra es atomizada con gas de desolvatación, el cual funciona con dos corrientes de nitrógeno gaseoso a 90 °C. Una de ellas pasa alrededor del capilar y genera una fina niebla de gotas de carga elevada (atomizadas). La evaporación del disolvente hace que aumente la densidad, la cual produce la desorción en fase gaseosa (Ramsay, *et al*, 2005) (Figura 4).

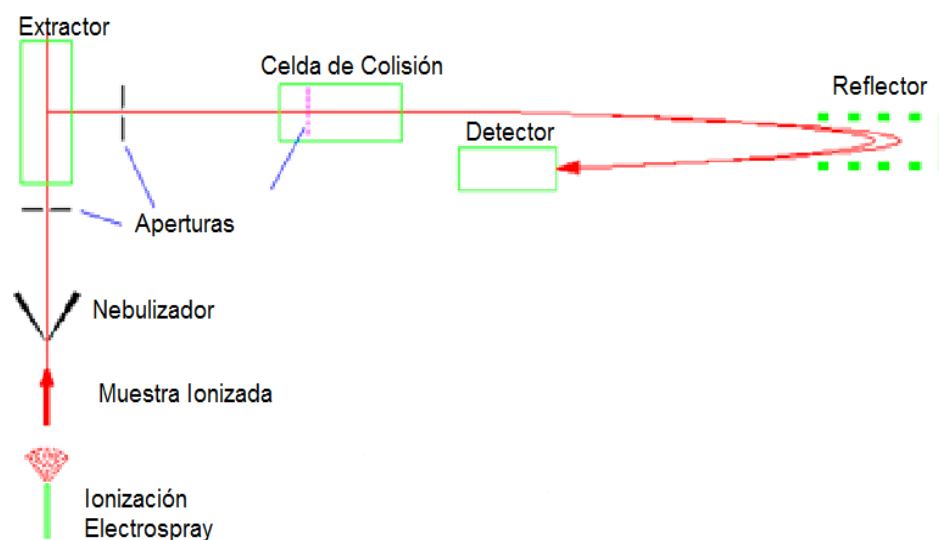


Figura 4. Esquema analizador de Tiempo de Vuelo con Ionización Electro spray (ESI-ToF)

Fuente: (Young *et al*, 2003).

Young *et al*, (2003) detallan que el análisis por ESI, se puede lograr mediante ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar, para obtener el ión molecular. Si se desea obtener una fragmentación, se puede inducir al aumentar el voltaje en la punta del cono del capilar. En muchos casos, se pueden determinar masas moleculares de macromoléculas con una precisión de $\pm 0,005\%$ (Ramsay *et al*, 2005).

Según Chen *et al*, (2013), al entrar a la fuente de iones, se ioniza de forma positiva y se adquiere un protón de más, lo cual genera la masa monoisotópica (M_{mi}), que representa la masa del isótopo más abundante. Es decir, que la M_{mi} de una molécula es la suma de la M_{mi} de los elementos en su fórmula empírica.

Para Huo *et al*. (2018), cuando la muestra es atomizada y cargada positivamente, se ingresa al sistema de masas, es decir, al detector de cuadrupolo de tiempo de Vuelo (QToF). La muestra es sometida durante un periodo de aproximadamente $1 \mu s$ a un pulso de electrones que dan lugar a la ionización (ESI). Seguidamente, se aplica un potencial de aceleración durante un tiempo menor (100 ns) que el utilizado para la generación de iones de forma que los iones de la muestra son acelerados de forma casi simultánea. Luego, los iones alcanzan una zona de deriva libre de campo, a lo largo de la cual se

mueven a velocidad constante hasta alcanzar el detector, este tiempo suele ser de microsegundos, por lo que se exige el uso de detectores sumamente rápidos (Ramsay *et al*, 2005).

Los iones más livianos viajarán a mayor velocidad a lo largo de la zona de deriva y llegarán antes al detector, el cual registra los “tiempos de vuelo” de los distintos iones, es decir, que la velocidad adquirida por cada ion será inversamente proporcional a su relación masa-carga (m/z). En síntesis, la determinación de estos tiempos deriva la relación m/z de los iones (Wiley & McLaren, 1955).

Por otra parte, Huo *et al.* (2018) indican que la forma de recorrido en el analizador es otro factor que influye en la sensibilidad de la determinación. En este caso específico se eligió el modo de recorrido V+ principalmente por el aumento en la capacidad del ensayo para generar resultados óptimos y confiables. El término V+ hace referencia a que el ion precursor se mantendrá cargado positivamente y realizará una trayectoria como lo indica la letra V, es decir, inicia su traslado por el analizador en la parte superior, baja y luego retoma la elevación correspondiente (Figura 5).

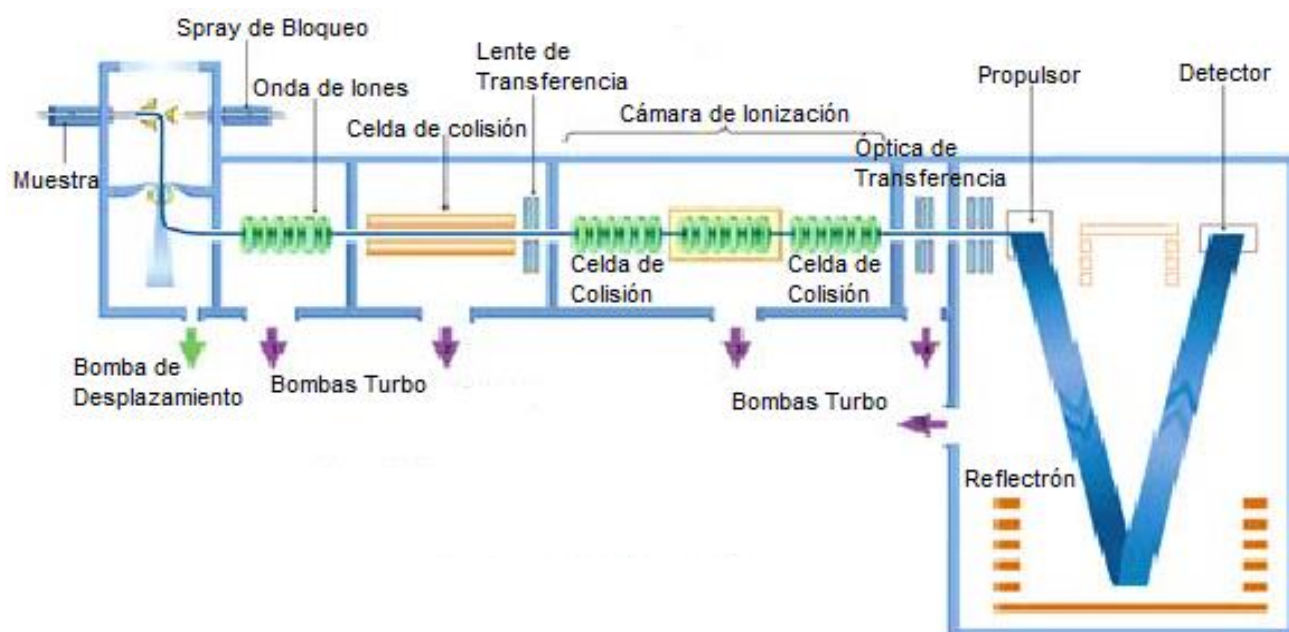


Figura 5. Diagrama de trayectoria del ion en el analizador de Tiempo de Vuelo (TOF).
Fuente: (Waters, 2019).

La técnica UPLC MS/MS con su *software* brinda un espectro de masas que proporcionar una corriente de iones totales (TIC) (Figura 6), el cual, proyecta valores de m/z mediante los cuales se muestran y se suman todas las intensidades de los picos en el espectro. A partir de este, se puede producir el espectro de corriente de iones extraídos (XIC) (Figura 7) a través de la selección de una sola masa, dilucidando claramente la masa y fórmula molecular resultante (Douglas, 2009).

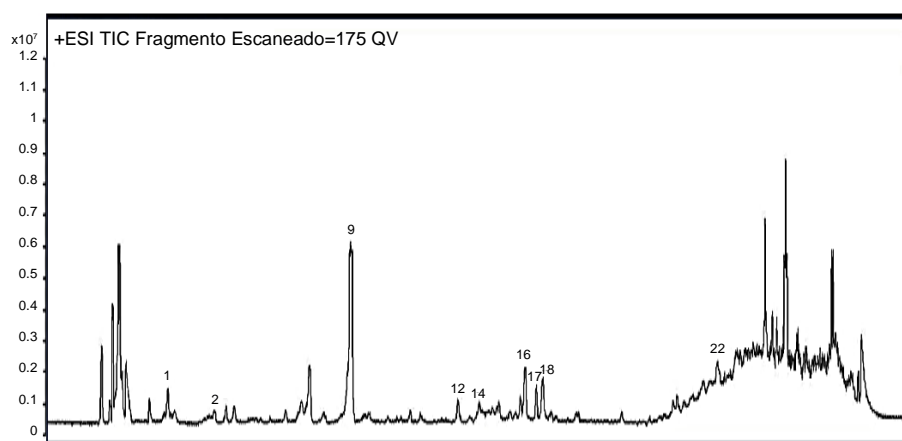


Figura 6. Corriente Total de Iones (TIC) por Ionización Electrospray en modo positivo (+ESI).

Fuente: (Wang *et al*, 2020).

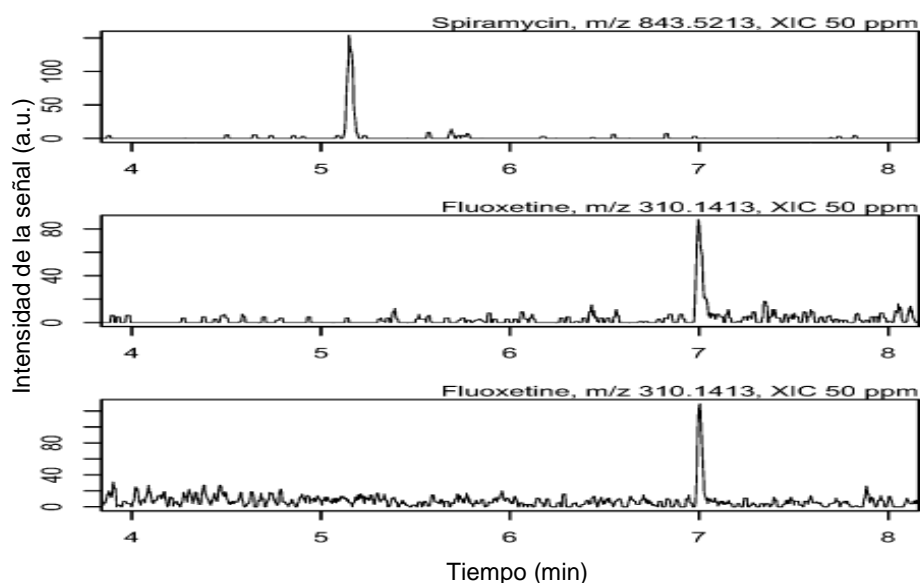


Figura 7. Corriente de ion extraído (XIC) para Espiramicina m/z 843,5213 y Fluoxetina m/z 310,1413.

Fuente: (Vergeynsta *et al*, 2013).

Partiendo de la información generada por los cromatogramas TIC y XIC, así como el tiempo de permanencia, definido como la duración en la que se recopila cada señal del ion de acuerdo con la relación m/z . Estas señales de masas referentes de todos los componentes de la muestra generan un cromatograma o espectro masas-masas (Figura 8), el cual muestra los picos de los iones de mayor abundancia y sus masas moleculares respectivas (Huo *et al*, 2018).

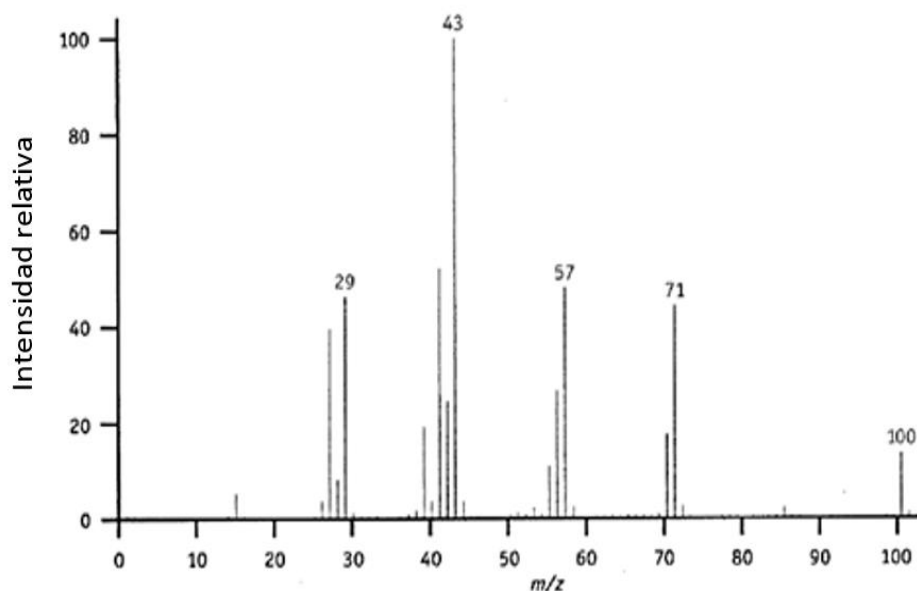


Figura 8. Espectro de masas-masas.
Fuente: (Waters, 2019).

Un espectro de masas es la información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación m/z de cada uno de ellos (Chung-Hsuan, 2008). Asimismo, la presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificados a partir de su masa, se relaciona con la estructura química de cada compuesto.

Por ejemplo, el *software* *MassLynx*TM que contiene el equipo marca Waters, modelo Acquity, permite el análisis de datos correspondientes a las variables cuantificadas por el equipo mediante el reporte de composición elemental (Figura 9). Este a su vez, genera información acerca de los parámetros de caracterización del analito ensayado, permitiendo constatar la presencia de una especie en una matriz compleja previamente

tratada, utilizando la masa molar de la misma que es comparada con la masa monoisotópica calculada por el *software* del equipo.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 5.0 PPM / DBE: min = 1.0, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Apagado

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares e Impares

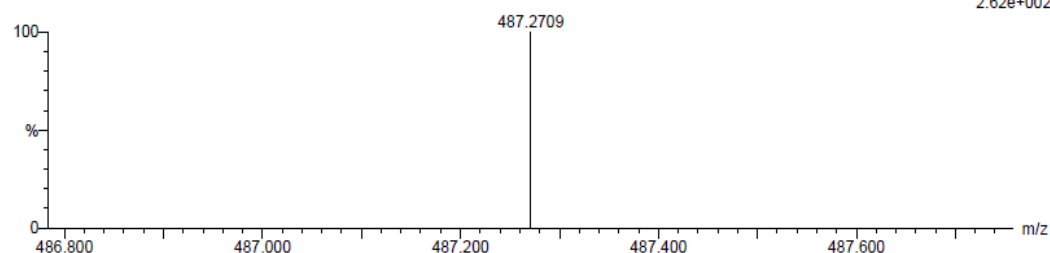
38 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

Elementos Utilizados

C: 0-34 H: 0-49 O: 0-11

GCC4 80 (1.573) AM (Cen,4, 80.00, Ar,9200.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00)

22222
1: TOF MS ES+
2.62e+002



Máximo	Mínimo	5.0	5.0	1.0	50.0			
Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula	
487.2709	487.2696	1.3	2.7	9.5	22.0	0.0	C28 H39 O7	

Figura 9. Ejemplo de reporte de composición elemental proporcionado por el software MassLynx™ del UPLC marca Waters, modelo Acquity.

Fuente: (MassLynx™, 2020).

Este espectro permite generar un aporte investigativo y de comprobación de hipótesis, así como el estudio de las plantas y su aplicación con miras de mejorar la salud y la calidad de vida de las personas. Englobando un sin número de posibilidades, tanto de transformación de las matrices complejas, como de la apertura al estudio de las técnicas apropiadas para su determinación y caracterización, siendo una herramienta tecnológica de alta sensibilidad, reflejada en la obtención de resultados precisos y confiables.

Capítulo 3. Metodología

3.1. Selección de los arbustos y muestreo para la obtención de cultivos de hongos endófitos.

Se trabajó con aislamientos de hongos endófitos provenientes de la corteza y hojas de árboles de güitite localizados de la entrada al edificio donde se localiza el auditorio de la Ciudad de la Investigación, ocho metros Sur y cinco Este, a una elevación de 1220 msnm, coordenadas 9°56'21'' latitud norte y 84°2'38'' longitud oeste.

Los arbustos muestreados presentaron un ciclo de vida perenne, una altura aproximada de 4,0 m y no se encontraban en etapa de floración ni fructificación durante este estudio (Cuadro 4) (Anexo 1)

3.2. Extracción de corteza y hojas.

Se procedió a esterilizar el cuchillo, bisturí y pinzas con fuego de un mechero para remover la primera capa de la corteza. Se realizaron cinco cortes de los micelios en Agar Papa Dextrosa (PDA) de aproximadamente 1,0 cm de largo por 5,0 mm de ancho. Con ayuda de las pinzas y el bisturí, se retiraron los fragmentos y se almacenaron en microviales con 1,0 mL de agua destilada estéril.

3.3. Limpieza de tejidos y cultivos.

Los fragmentos estuvieron en contacto con el fuego momentáneamente y se procedió a “sembrar” los discos de inóculos en medio PDA, contenido en placas *Petri* de 90,0 mm. Posteriormente, los cultivos se trasladaron a placas *Petri* de 60,0 mm en el mismo medio de crecimiento para obtener cepas puras.

3.4. Codificación de muestras.

La codificación de muestras de hongos endófitos se realizó según la procedencia del cultivo y órgano de la planta como se indica en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Codificación de muestras de hongos endófitos según su procedencia de cultivo y órgano de la planta.

Muestra	Localización	Órgano de la Planta
G1H1-3	Invernadero	Hoja
G1H3-2	Invernadero	Hoja
GCC2	CIMAR	Corteza
GCC4	CIMAR	Corteza
GCC5	CIMAR	Corteza
GCC6	CIMAR	Corteza
GCC7	CIMAR	Corteza
GCH1-1	CIMAR	Hoja
GCH1-2	CIMAR	Hoja
GCH1-3	CIMAR	Hoja
GCH2-1	CIMAR	Hoja
GCH2-2	CIMAR	Hoja
GIH1-2	Invernadero	Hoja
GIH1-4	Invernadero	Hoja
GIH2-1	Invernadero	Hoja
GIH2-4	Invernadero	Hoja
GIH2-5	Invernadero	Hoja
GIH1-1	Invernadero	Hoja
GVH3-1	In vitro	Hoja

Fuente: Elaboración propia

3.5. Crecimiento de hongos en caldo papa dextrosa (PDB)

Se esterilizaron seis erlenmeyers de 1,0 L y doce de 500,0 mL en una autoclave a 121 °C durante 15 min. Para la preparación del medio se pesaron 12,0 g de PDB en cada uno de los seis erlenmeyers de 1,0 L y se llevaron a un volumen de 500,0 mL para evitar derrames al disolver en la autoclave, bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo, citados anteriormente.

Una vez generado el medio de cultivo, se trasvasaron 250,0 mL a cada erlenmeyer de 500,0 mL previamente esterilizados. Seguidamente, se procedió con una punta de micropipeta a realizar los cortes en los tejidos jóvenes (periferias) de los hongos

cultivados en las cajas *Petri*. Se esterilizó el bisturí con el mechero para tomar cuatro discos de inóculos y colocarlos en el caldo.

Los discos de inóculos restantes de cada muestra fueron almacenados en tubos criogénicos graduados de plástico de 2,0 mL con tapa para cultivos posteriores.

Finalmente, se colocaron los erlenmeyer tapados en la parte superior con papel aluminio y se homogenizaron en un agitador orbital de sobremesa marca Thermo Scientific™ modelo MaxQ™ 4000 durante una semana a 144 rpm y 25 °C (Anexo 2).

3.6. Detención del metabolismo secundario

Transcurrido el tiempo de crecimiento de los hongos, estos fueron trasvasados en su medio de cultivo a tubos cónicos estériles para centrífuga PP w/PE con tapón de rosca de 200,0 mL marca Thermo Scientific™. Posteriormente, fueron colocados en el congelador por dos semanas (Anexo 2).

3.7. Proceso para la obtención de extractos.

Concluidas las dos semanas, se descongelaron las muestras y se tomaron aproximadamente 125,0 mL de biomasa fúngica y caldo. Se licuaron y filtraron dos veces con algodón. El filtrado resultante se trasvasó a un balón de destilación de 250,0 mL y se redujo el volumen de agua de la muestra con la ayuda de un rotavapor. Posteriormente, este material fue trasvasado a un embudo de separación de 250,0 mL. Seguidamente, se realizó la extracción por triplicado con 10,0 mL de acetato de etilo. El extracto obtenido se evaporó y se tomó el peso de la masa final (Anexo 4). Se diluyó en 1,0 mL de metanol y se trasvasó a un tubo Eppendorf.

3.8. Caracterización de muestras

Paralelo al proceso de extracción se realizó una caracterización de los cultivos de hongos endófitos como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Nombre y características de muestras de hongos endófitos provenientes del árbol de güitite

Muestra	Fecha de inoculación	Fecha de extracción	Caracterización
Primera Etapa de Cultivos			
GVH3-1	30 de noviembre del 2018	31 de enero del 2019	Licuada turbio Hongo redondo Sin espuma al licuar Olor levadura
G1H3-2	06 de diciembre del 2018	13 de febrero del 2019	Olor "Levadura" Apariencia amarillenta Presencia de Hifas Presencia de inóculos (Negros) (dos)
GCC5	30 de noviembre del 2018	13 de febrero del 2019	Hongo pequeño Color blancuzco Mayormente líquido
GCC6	06 de diciembre del 2018	18 de febrero del 2019	Turbidez del medio Hongo Blanco Olor levadura Algodonoso Esférico Gran cantidad de espuma al licuarse
GIH1-2	06 de diciembre del 2018	18 de febrero del 2019	Hongo Algodonoso Blanco No segmentado Presencia de inóculos (Negros) (dos) Olor levadura Gran cantidad de espuma al licuarse
GCH2-2	06 de diciembre del 2018	20 de febrero del 2019	Tres Hongos esféricos Hifas color blanco No generó espuma Filtrado turbio Sin olor

Muestra	Fecha de inoculación	Fecha de extracción	Caracterización
Primera Etapa de Cultivo			
GIHI-1	06 de diciembre del 2018	20 de febrero del 2019	Hongo pequeño Esférico Pocas hifas Blanco Olor levadura
GCH1-3	06 de diciembre del 2018	21 de febrero del 2019	Hongo pequeño Blanco Hifas blancas Olor levadura Licuado turbio
G1H1-5	06 de diciembre del 2018	27 de febrero del 2019	Hongo esférico, Blancos Sin Hifas Olor levadura Licuado sin espuma
GCC2	06 de diciembre del 2018	27 de febrero del 2019	Hongo pequeño Esférico Olor levadura Espuma al licuar Difícil extracción
GCH2-1	06 de diciembre del 2018	28 de febrero del 2019	Hongo tono rosáceo Sin hifas Sin espuma al licuar Fase orgánica rosácea
GIH2-5	06 de diciembre del 2018	28 de febrero del 2019	Hongos esféricos Blancos Sin hifas Olor levadura Rígidos (gelatinosos) Espuma al licuar Partículas negras Micelios

Cuadro 5. Nombre y características de muestras de hongos endófitos provenientes del árbol de güitite (*continuación*).

Muestra	Fecha de inoculación	Fecha de extracción	Caracterización
		Primera Etapa de Cultivo	
GCC4	06 de diciembre del 2018	04 de marzo del 2019	Hongo redondeado Pequeño Sin hifas Olor leve levadura Poca espuma al licuarse Partículas en el algodón Micelios negros
GIH1-4	06 de diciembre del 2018	04 de marzo del 2019	Hongo redondo Sin hifas Olor leve levadura Blancos Poca espuma al licuarse
GCC7	06 de diciembre del 2018	06 de marzo del 2019	Hongo redondo Con hifas Micelios negros Poca espuma al licuar
GCH1-2	06 de diciembre del 2018	06 de marzo del 2019	Hongo esférico Blancos Apariencia de esponja Sin hifas Grumos en licuado
GIH2-1	30 de noviembre del 2018	07 de marzo del 2019	Hongo amorfo Micelios negros Con hifas Grumos al licuar Olor levadura

Muestra	Fecha de inoculación	Fecha de extracción	Caracterización
Primera Etapa de Cultivo			
GIH2-4	30 de noviembre del 2018	11 de marzo del 2019	Hongo con hifas Pequeño Micelios negros Olor levadura Grumos al filtrar Sin espuma al licuar
Segunda Etapa de Cultivos			
GCH1-1	06 de diciembre del 2018	25 de marzo del 2019	Licuada espesa Poca espuma Olor levadura Hifas adheridas al algodón
Tercera Etapa de Cultivos			
GCH1-2	06 de diciembre del 2018	01 de setiembre del 2020	Olor levadura Pocas esferas Material del hongo adherido a las paredes del erlenmeyer Poca espuma al licuarse
GCH1-3	06 de diciembre del 2018	01 de setiembre del 2020	Hongos redondos Pocas hifas Olor levadura Caldo cristalino Mucha espuma al licuarse
GCC7	06 de diciembre del 2018	01 de setiembre del 2020	Pocos hongos esféricos Material del hongo adherido a las paredes del erlenmeyer Olor levadura Mucha espuma al licuarse

Fuente: Elaboración propia

3.9. Condiciones de análisis por Infusión directa acoplada a espectrofotometría de masas (DIMS)

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica DIMS. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra resolución acoplado a espectrometría de masas-masas marca Waters, modelo Acquity. El cono de muestreo fue de 35,0, el cono de extracción a 3,5. Se analizó a un caudal de gas en el cono de 10,0 L/h, un caudal del gas y temperatura de desolvatación de 600 L/h y 300 °C, respectivamente, una temperatura de la fuente de 150 °C, un voltaje del capilar de 3,0 kV.

Se empleó leucina encefalina para la corrección de la masa: 556,2771 m/z por el método de ionización por electro aerosol en modo positivo (ESI (+)) para cuantificar en un ámbito de m/z de 50-2000.

3.10. Análisis de witanólidos por UPLC-ESI-Q-ToF/MS

Los extractos fueron analizados mediante la técnica UPLC-ESI-Q-ToF/MS. Se utilizó el mismo equipo y modelo que en el análisis anterior. Se utilizó una columna ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 µm con dimensiones de 1,0 mm x 100 mm, dos fases móviles, A (99,9 % Agua/0.1 % Ácido Fórmico) y B (99,9 % Acetonitrilo/0,1 % Ácido fórmico) en el gradiente descrito en el Cuadro 6, límites de presión bajo y alto de 500 psi y 15000 psi respectivamente.

La temperatura de la columna a 30 °C y 5 °C para la muestra inyectada en un rango de caudal de 10 µL a 0,1 mL/min. Las señales fueron cuantificadas en un detector de matriz de fotodiodos (PDA) a un rango de longitudes de onda entre 190 a 600 nm y un tiempo de corrida de 61,0 min. Se empleó leucina encefalina para la corrección de la masa: 556,2771 m/z por el método de ionización por electro aerosol en modo positivo (ESI (+)) para cuantificar en un ámbito de m/z de 50-2000 (Anexo 5).

Cuadro 6. Sistema de elución utilizado en el análisis mediante UPLC.

	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B	Curva
1	0,00	0,100	95,0	5,0	
2	8,00	0,100	20,0	80,0	6
3	20,00	0,100	0,0	100,0	6
4	25,00	0,100	0,0	100,0	6
5	60,00	0,100	0,0	100,0	6
6	61,00	0,100	95,0	5,0	6

%A 99,9 % Agua/0.1 % Ácido fórmico %B 99,9 % Acetonitrilo / 0,1 % Ácido fórmico

Fuente: Elaboración propia.

3.11. Selección de cepas

Se realizó un escrutinio de los espectros para seleccionar los de mayor confiabilidad y repetir el cultivo de dichas cepas siguiendo los pasos del 3.5 al 3.10.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1. Detección de witanólidos por Infusión directa acoplada a espectrofotometría de masas (DIMS) en extractos aislados de hongos endófitos del güitite para comparar su m/z experimental respecto al valor teórico.

Los extractos se analizaron mediante la técnica DIMS y se detectaron los compuestos enlistados en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Compuestos detectados mediante el análisis por la técnica de Infusión Directa en Espectrofotometría de Masas (DIMS).

Metabolito Secundario	[M+H] ⁺	GVH 3.1	GCC5	GCC6	GIH1-1	GIH1-2	G1H1-3	GIH2-5	GCC2	GCC4	GCC7	GCH1-1	GCH1-2	GCH1-3	GCH2-1
Witafisalino A	467,2434		467,2428	467,2455	467,2447	467,2447						467,2443	467,2448		
Witaferina A	471,2747				471,2751										
Witanólido D	471,2747	471,2736													
Witafisalino M	483,2383				483,2377										
Witafisalino I	483,2747	483,2754													
Witafisalino F/O	485,2539						485,255						485,2532		
Witafisalino N	485,2539						485,255						485,2532		
Acnistina E	487,2696			487,2692	487,2709			487,2702		487,2709					487,2713
Fisangulidino A	501,2488						501,2489			501,2499	501,2477				501,2487
Fisanólido A	501,3216	501,3229			501,3227				501,3215	501,3204					501,3235
Fisalino F	527,1917	527,1902	527,1898		527,1909	527,1923			527,1934	527,1903				527,1910	
Fisalino G	527,1917	527,1902	527,1898		527,1909	527,1923			527,1934	527,1903				527,1910	
Fisalino J	527,1917	527,1902	527,1898		527,1909	527,1923			527,1934	527,1903				527,1910	
Fisalino D	545,2023								545,2012						
Daturametelino I	617,3326				617,3339										
Daturametelino J	633,3275						633,3290					633,3278			

En la primera fila del cuadro se muestran los códigos (Cuadro 4) de las muestras ensayadas, además se resaltan en los recuadros en color rojo los resultados más representativos de los análisis.

Fuente: Elaboración propia a partir de los reportes de composición elemental generados por el software MassLynx™.

Según lo ensayado por los autores Misico *et al.*, (2000) en la determinación de Witafisalino I, en comparación con la metodología utilizada en las muestras de gütite, se observan coincidencias en cuanto a los métodos de extracción y el análisis instrumental aplicado. Esto se puede constatar con la detección de la señal o pico mediante la técnica DIMS, el cual representa la mayor abundancia del metabolito descrito en el minuto 2,629 para la muestra GVH 3.1 (Figura 10), con una m/z de 483,2754 (Cuadro 7). La $[M+H]^+$ y la fórmula molecular de este metabolito son 483,2747 y $C_{29}H_{38}O_6$ respectivamente (Cuadro 3).

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 5.0 PPM / DBE: min = 1.0, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Apagado

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares e Impares

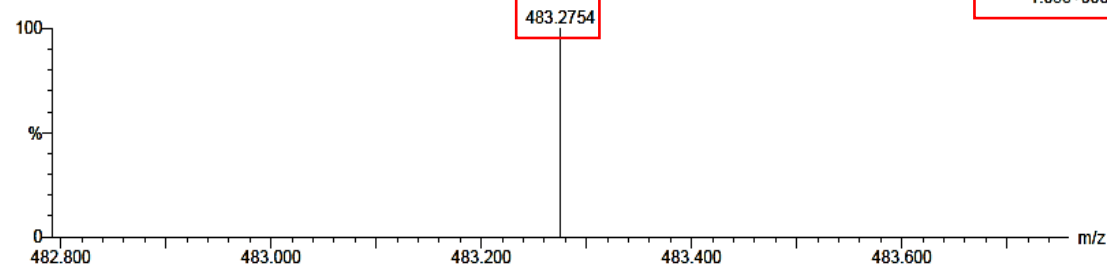
98 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (hasta 50 mejores coincidencias isotópicas para cada masa)

Elementos Utilizados

C: 0-50 H: 0-50 O: 0-30

GVH 3.1 A 134 (2.629) AM (Cen,4, 80.00, Ar,9200.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00)

22222
1: TOF MS ES+
1.05e+003



Máximo

Mínimo

5.0 5.0 1.0

50.0

Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula
483.2754	483.2747	0.7	1.4	10.5	25.0	0.0	$C_{29}H_{39}O_6$

Figura 10. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GVH3.1 utilizando el software MassLynx™ 2019.

Fuente: Elaboración propia.

La determinación por DIMS permitió observar una cantidad representativa de metabolitos secundarios (Cuadro 7) debido a que la técnica permite realizar un escaneo a nivel macro en los extractos, generando muchas señales que deben ser examinadas con detalle para obtener un pico específico del metabolito de interés. Esta es una limitación de la técnica, además de su incapacidad para discriminar entre compuestos isoméricos basados únicamente en una masa precisa (Bedair y Summer, 2008). El fenómeno citado es constatado en la determinación de los Fisalinos, F, G y J ($C_{28}H_{30}O_{10}$), los cuales presentan

la misma [M+M9 la misma [M+H]⁺ de 527,1917 (Cuadro 3) en las muestras GIH1-1, GIH1-2, GCC2, GCC4, GVH 3.1, GCC5 y GCH1-3 (Cuadro 7).

El pretratamiento de datos en DIMS es sencillo al prescindir del tiempo de retención y solamente requiere el 5.0 % del tiempo de análisis respecto a UPLC (Han, *et al*, 2008). Sin embargo, la matriz de la muestra, al no estar separada, puede generar falsos positivos o negativos como en el caso del Witaferina F/O y N (Cuadro 7) en las muestras G1H1-3 y GCH1-2.

Los efectos de supresión de iones causan algunas señales de baja abundancia, baja volatilidad o eficiencia de ionización por lo que puede ocasionar que no sean detectables (Draper, *et al*, 2013). Por ejemplo, la Witaferina A y el Witanólido D presentan la misma [M+H]⁺ de 471,2747, sin embargo, estos no fueron detectados en la misma muestra, tal como se observa en GIH1-1 y GVH3.1 (Cuadro 7), haciendo constar que una matriz no resuelta provoca una sensibilidad reducida y por lo tanto una disminución en la capacidad para la identificación de metabolitos (King, *et al*, 2000; Harry, *et al*, 2008).

La técnica DIMS provee un mayor rendimiento debido a que se debe invertir menos tiempo al realizar los análisis. En contraste, el rendimiento general de UPLC no es comparable al de DIMS. Se puede utilizar una elución de gradiente muy rápida en UPLC para obtener un rendimiento más cercano al de DIMS, pero sacrificaría tanto el rendimiento de separación como la capacidad de detección.

4.2. Selección de cepas para análisis por UPLC/MS-MS

Luego del análisis minucioso, se optó por seleccionar tres cepas (GCH1-2, GCH1-3 y GCC7) cuyos resultados se consideraron confiables desde el punto de vista analítico para un posterior análisis mediante UPLC/MS-MS. Debido a que estas presentaban una intensidad en los picos que se observaba de manera diferenciada, es decir, la separación cromatográfica realizada por el equipo fue precisa, detectando el metabolito de interés y cuantificando su m/z.

4.3. Primera verificación de cromatogramas

Las cepas seleccionadas en el proceso anterior, generaron los valores de m/z detallados en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Resultados de análisis efectuados por la técnica de Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC).

Cepa	Metabolito Secundario	[M+H] ⁺	m/z	σ
GCC7	Fisanólido A	501,3216	501.3203	0,09 %
GCH1-2	Witafisalino I	483,2747	483,2784	0,26 %
GCH1-3			483,2726	0,15 %

Fuente: Elaboración propia

4.3.1. Detección de Fisanólido A por UPLC-ESI-Q-ToF/MS

Se obtuvo el cromatograma generado por la señal del espectro de masas de corriente de iones totales (TIC) Figura 11A en la muestra GCC7 para el Fisanólido A $C_{30}H_{44}O_6$ cuya $[M+H]^+$ es 501,3216 (Cuadro 3). Asimismo, en la Figura 11B se presenta la señal del espectro de masas de corriente de iones extraídos (XIC) de 501,369, detectada para el metabolito citado y en la Figura 11C el espectro masas-masas que muestra la m/z de 501,3203 la cual, tiene una desviación estándar de 0,09 % (Cuadro 8) respecto al valor de $[M+H]^+$ mencionado anteriormente. Es decir, en la muestra analizada se determinó con certeza Fisanólido A, al minuto 15,552 como se muestra en el reporte de composición elemental (Figura 12).

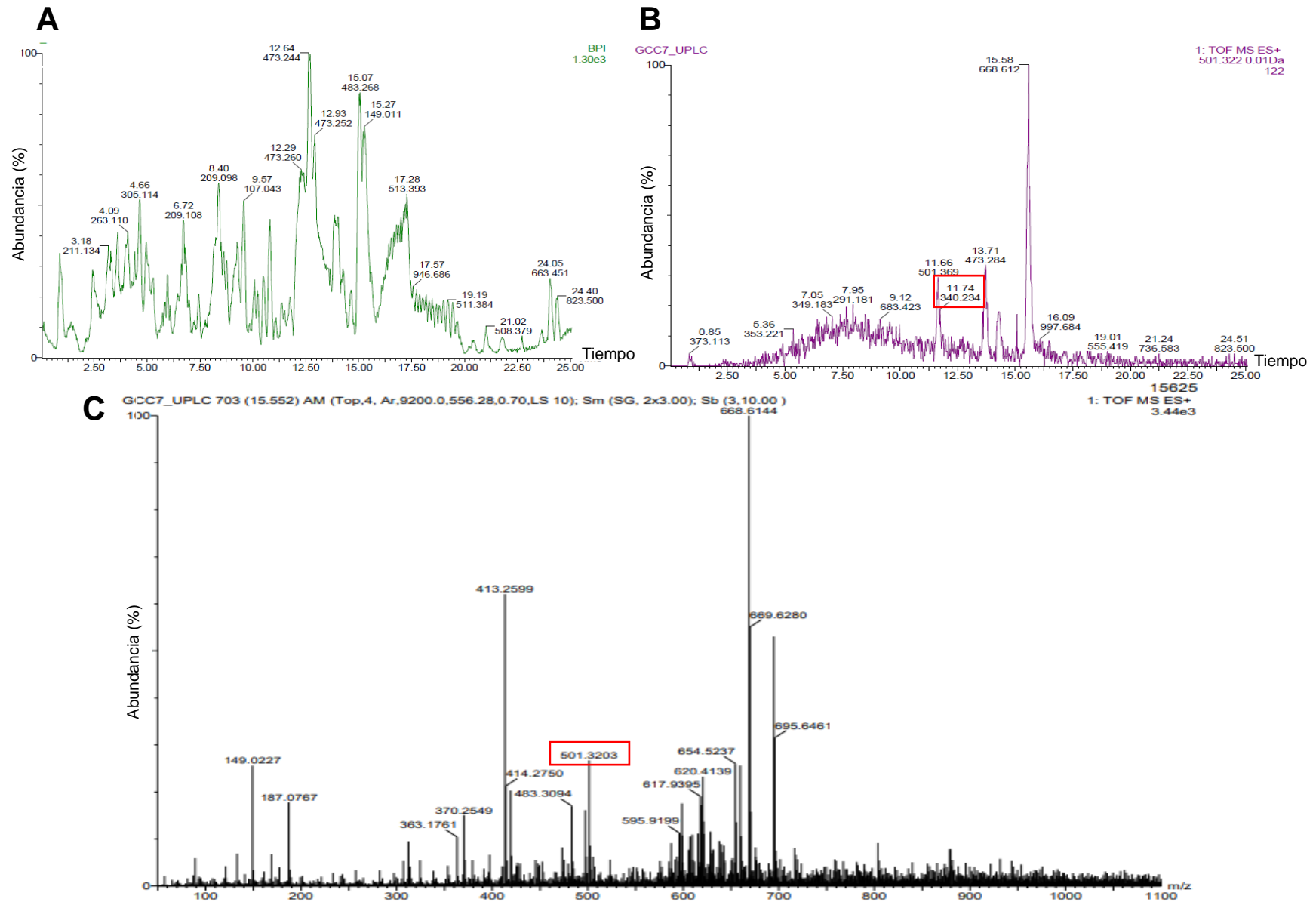


Figura 11. Cromatogramas referentes al Fisanólido A presentes en la muestra tomada de la corteza del arbusto GCC7 (A) señal TIC (B) señal XIC; y (C) espectro masas/masas utilizando el software MassLynx™ 2020.

Fuente: Elaboración propia.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 5.0 PPM / DBE: min = 0.5, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Apagado

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares

46 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

Elementos Utilizados

C: 0-38 H: 0-45 O: 0-6 Na: 0-1

GCC7 UPLC 703 (15.552) M (Top,4, Ar,9200.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00)

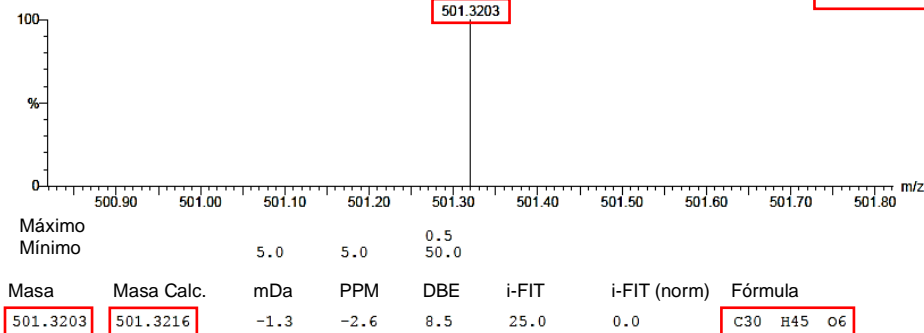


Figura 12. Reporte de composición elemental para el Fisanólido A presente en la muestra GCC7 utilizando el software MassLynx™ 2020.

Fuente: Elaboración propia.

Dados los resultados que anteceden, en la detección del Fisanólido A en muestra GCC7, la técnica UPLC/MS-MS presentó una alta precisión al detectar señales correspondientes a este metabolito, disminuyendo el efecto de matriz (Xu, *et al.*, 2019).

4.3.2. Detección de Witafisalino I por UPLC-ESI-Q-ToF/MS

Se determinó por UPLC el cromatograma generado por la señal TIC de 483,260 Figura 13A, se observa el correspondiente de la muestra GCH1-2 para el Witafisalino I $C_{29}H_{38}O_6$, cuya $[M+H]^+$ es 483,2747 (Cuadro 3). De igual manera, en la Figura 13B se presenta la señal XIC (483,268), ilustrando la corriente del ion extraído.

El análisis completo, observado en la Figura 13C muestra una m/z de 483,2784 la cual, tiene una desviación estándar de 0,26 % (Cuadro 8) respecto al valor de $[M+H]^+$ mencionado anteriormente. Asimismo, este metabolito fue detectado al minuto 14,982, tal como se muestra en el reporte de composición elemental (Figura 14).

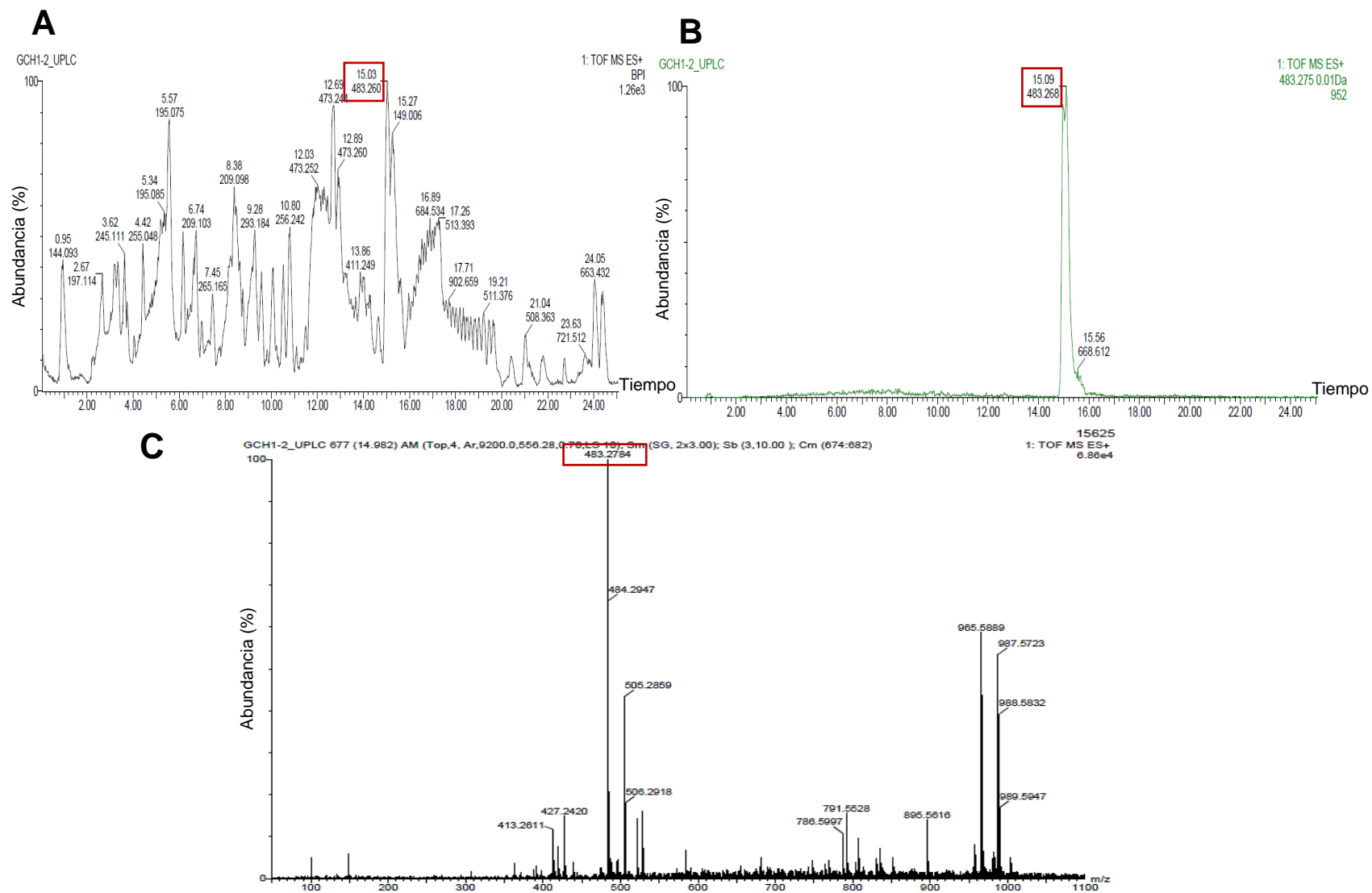


Figura 13. Cromatogramas referentes al Witafisalino I presentes en la muestra GCH1-2. (A) señal TIC (B) señal XIC; y (C) espectro masas/masas utilizando el *software* MassLynx™ 2020.

Fuente: Elaboración propia.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 10.0 PPM / DBE: min = 0.5, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Apagado

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Impares

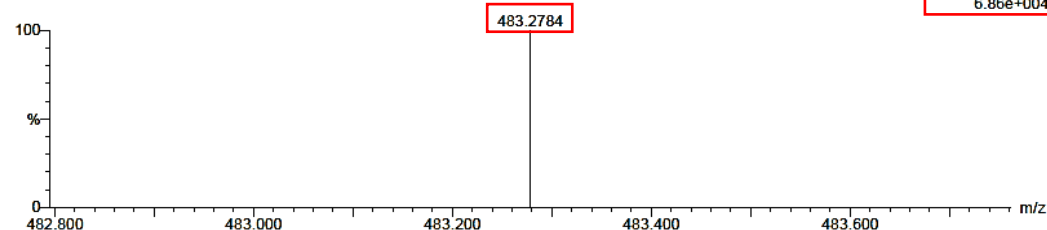
53 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

Elementos Utilizados

C: 0-38 H: 0-45 O: 0-6 Na: 0-1

GCH1-2 UPLC 677 (14.982) AM (Top,4, Ar,9200.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00); Cm (674:682)

15625
1: TOF MS ES+
6.86e+004



Máximo	Mínimo						
5.0	10.0	0.5	50.0				
Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula
483.2784	483.2747	3.7	7.7	10.5	36.4	0.0	C29 H39 O6

Figura 14. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-2 utilizando el software MassLynx™ 2020.
Fuente: Elaboración propia.

Se analizó el cromatograma generado por la señal TIC (483,252) Figura 15A en la muestra GCH1-3 para el Witafisalino I $C_{29}H_{38}O_6$ cuya $[M+H]^+$ es 483,2747 (Cuadro 3). En la Figura 15B se presenta la señal XIC de 483,260, la cual ilustra la corriente del ion extraído para el metabolito en estudio.

El análisis completo en la Figura 15C se muestra la m/z 483,2726 la cual tiene una desviación estándar de 0,15 % (Cuadro 8) respecto al valor de corrección de masa mencionado anteriormente. Es decir, que en la muestra analizada se detectó con certidumbre Witafisalino I al minuto 14,984 como se muestra en el reporte de composición elemental (Figura 16).

El promedio de la desviación estándar en la determinación de Witafisalino I en las muestras GCH1-2 y GCH1-3 es de 0,20 % respecto a sus valores de $[M+H]^+$ (Cuadro 3) y m/z (Figura 14 y Figura 16) es menor al 15,0 %, lo cual representa confiabilidad y precisión en la comparación de los valores determinados (Soto-Sosa, 2017; Cendejas-Bueno, 2018; Wang *et al.*, 2013; Kirwan, *et al.*, 2013).

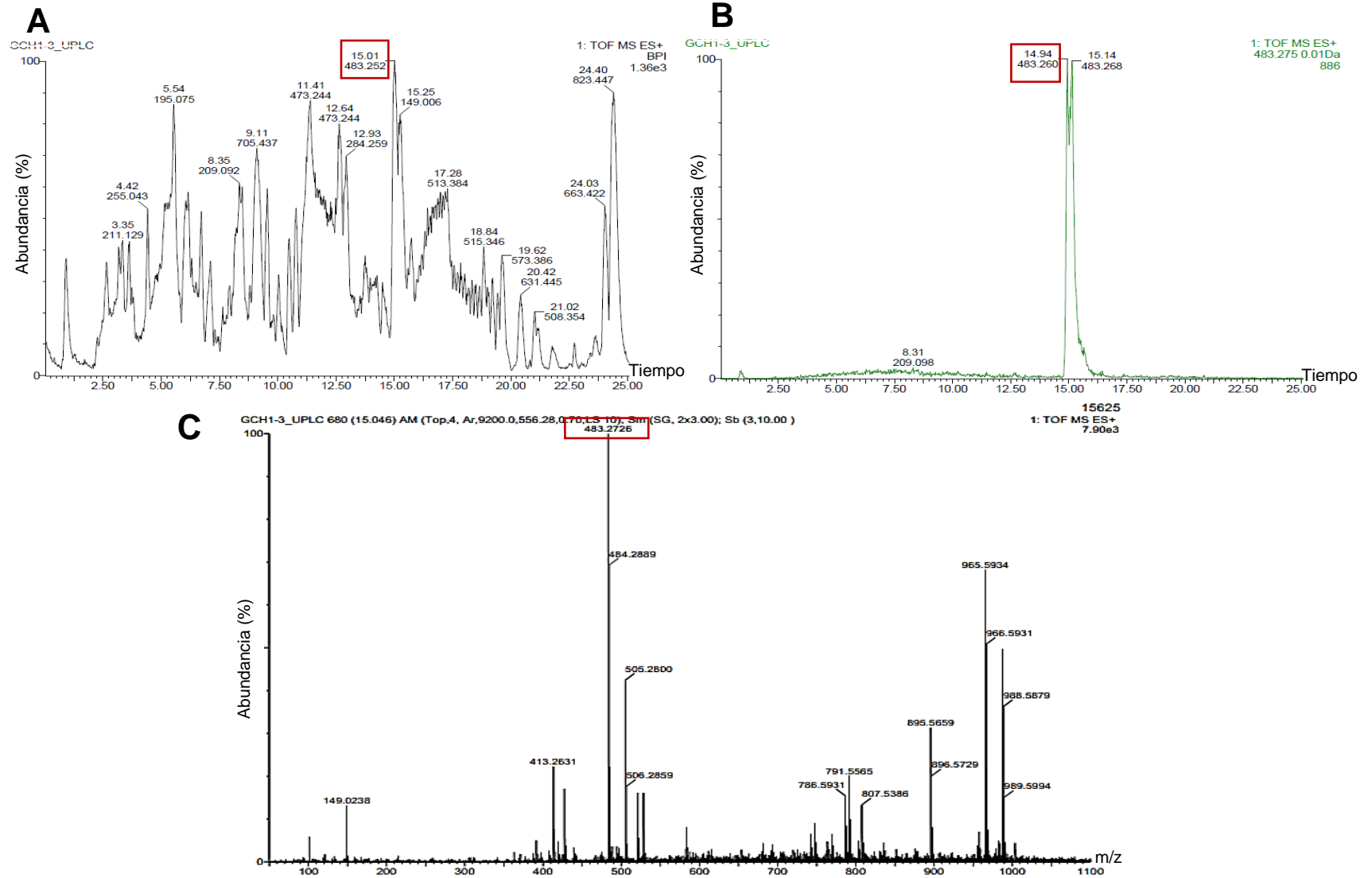


Figura 15. Cromatogramas referentes al Witafisalino I presentes en la muestra GCH1-3. (A) señal TIC (B) señal XIC; y (C) espectro masas/masas utilizando el software MassLynx™ 2020.

Fuente: Elaboración propia.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 5.0 PPM / DBE: min = 0.5, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Off

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares

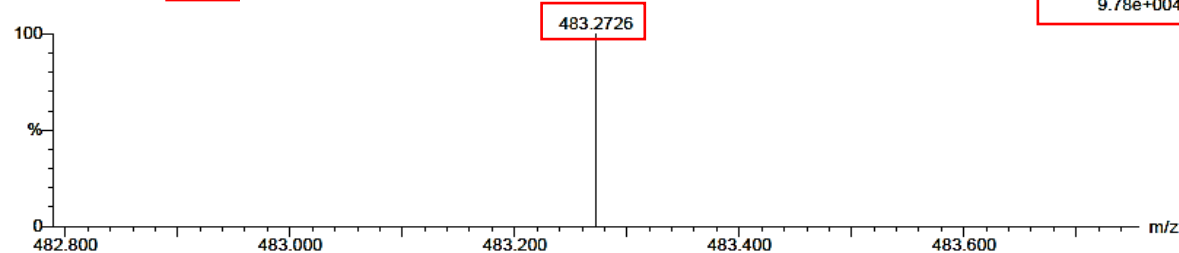
25 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

Elementos Utilizados

C: 0-38 H: 0-45 O: 0-6

GCH1-3 UPLC 677 (14.984) AM (Top,4, Ar,9200.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00); Cm (672:684)

15625
1: TOF MS ES+
9.78e+004



Máximo	Mínimo						
		5.0	5.0	0.5			
				50.0			
Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula
483.2726	483.2747	-2.1	-4.3	10.5	37.4	0.0	C29 H39 O6

Figura 16. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-3 utilizando el software MassLynx™ 2020.

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Verificación de la producción de los compuestos detectados por parte de las cepas

Con el objetivo de validar el ensayo realizado en la primera verificación por UPLC, se realizó nuevamente el cultivo de los hongos endófitos GCH1-2, GCH1-3 y GCC7. Los extractos se obtuvieron y fueron nuevamente analizados, encontrándose las m/z que se detallan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados de análisis efectuados por la técnica de Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) en las cepas GCH1-2, GCH1-3 y GCC7.

Cepa	Metabolito Secundario	[M+H] ⁺	m/z	σ
GCC7	Fisanólido A	501,3216	501,3200	0,11 %
GCH1-2	Witafisalino I	483,2747	483,2743	0,03 %
GCH1-3			483,2746	0,01 %

Fuente: Elaboración propia.

4.4.1. Detección de Fisanólido A por UPLC-ESI-Q-ToF/MS

Se obtuvo el cromatograma del pico generado por la señal XIC de 665,5330 al minuto 25,81, la cual ilustra la corriente del ion extraído que se detectó para el Fisanólido A $C_{30}H_{44}O_6$ cuya $[M+H]^+$ es 501,3216 (Cuadro 3)

Figura 17A. En la Figura 17B se ilustra la señal TIC 665,5330 al minuto 25,79. El reporte de composición elemental muestra la m/z de 501,3200 la cual, tiene una desviación estándar de 0,11 % (Cuadro 9) respecto al valor de $[M+H]^+$ mencionado anteriormente. Es decir, en la muestra analizada se determinó con certeza Fisanólido A al minuto 25,989; como se observa en la Figura 18.

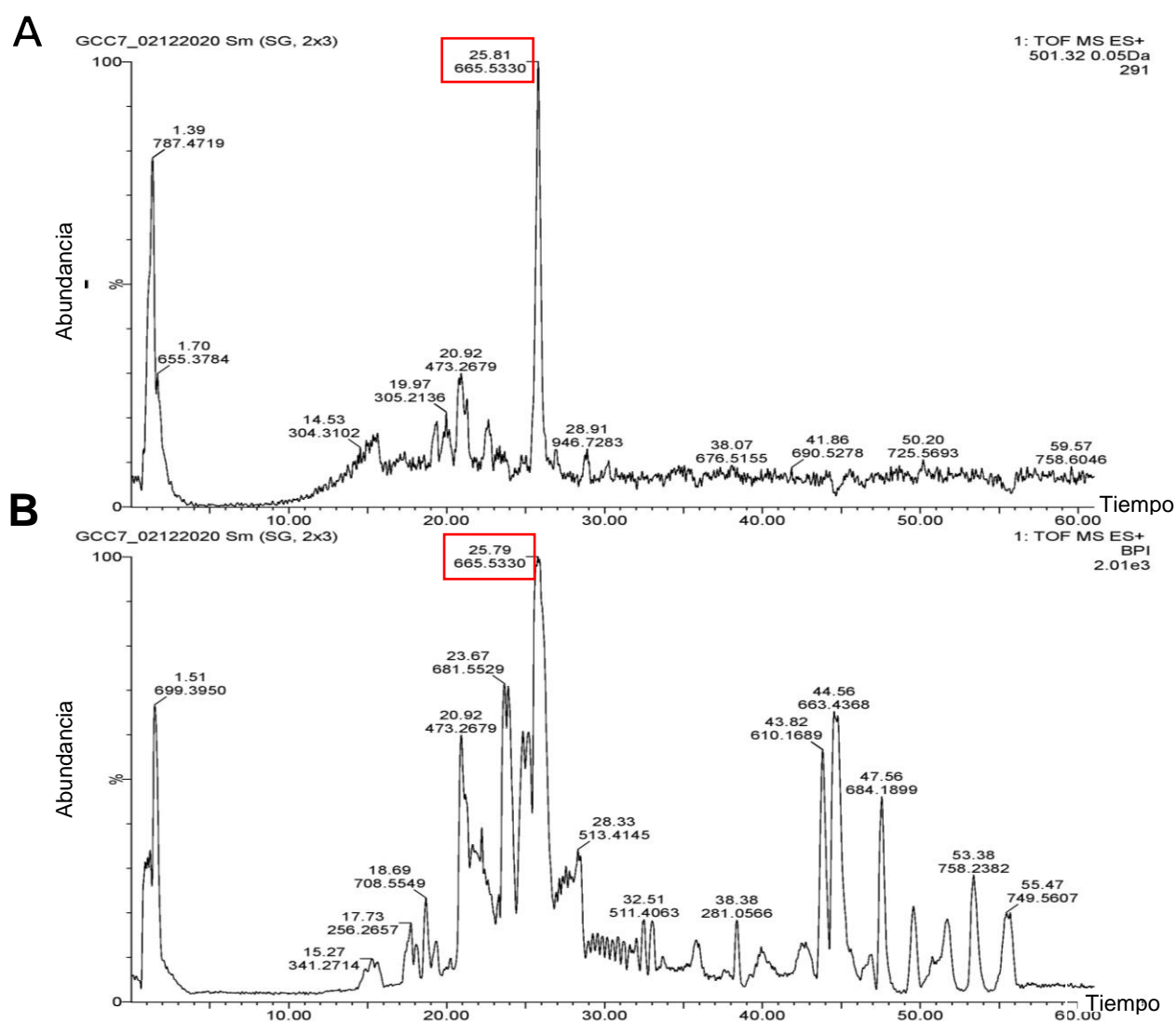


Figura 17. Cromatogramas (A) señal TIC y (B) señal XIC para el Fisanólido A presente en la muestra GCC7 utilizando el software MassLynx™ 2021.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 6.0 PPM / DBE: min = 1.5, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Off

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares e Impares

12 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

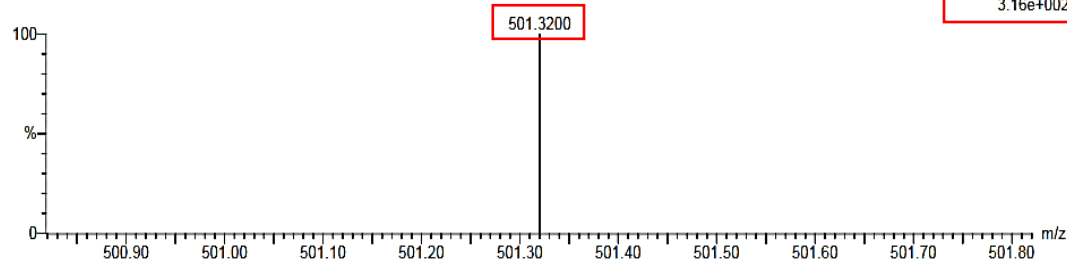
Elementos Utilizados

C: 0-30 H: 0-45 O: 0-6 Na: 0-1

SALAS Y/R ROMERO/GUIITITE

GCC7 02122020 1174 (25.989) AM (Cen,4, 80.00, Ar,8500.0,566.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00)

15625.00000000
1: TOF MS ES+
3.16e+002



Máximo	Mínimo						
		5.0	6.0	-1.5			
				50.0			
Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula
501.3200	501.3216	-1.6	-3.2	8.5	22.4	0.0	C30 H45 O6

Figura 18. Reporte de composición elemental para el Fisanólido A presente en la muestra GCC7 utilizando el software MassLynx™ 2021.

Fuente: Elaboración propia.

El Fisanólido A presente en la muestra GCC7 se asocia estrictamente a la cuantificación de metabolitos secundarios de la familia *Solanaceae*. Bajo esta premisa, de acuerdo con Singh, *et al.*, (2010), los cultivos de hongos endófitos de la corteza del árbol concentrarán mayor cantidad de analitos.

4.4.2. Detección de Witafisalino I por UPLC-ESI-Q-ToF/M

Se determinó por UPLC el cromatograma generado por la señal XIC al minuto 26,39; ilustrando la corriente del ion extraído Figura 19A de la muestra GCH1-2 para el Witafisalino I $C_{29}H_{38}O_6$, cuya $[M+H]^+$ es 483,2747 (Cuadro 3). De igual manera, en la Figura 19B se presenta la señal TIC al minuto 25,66.

El reporte de composición elemental muestra una m/z de 483,2743 la cual, tiene una desviación estándar de 0,03 % (Cuadro 9) respecto al valor de $[M+H]^+$ mencionado. Asimismo, este metabolito fue cuantificado en el minuto 11.832, tal como se muestra en la Figura 20.

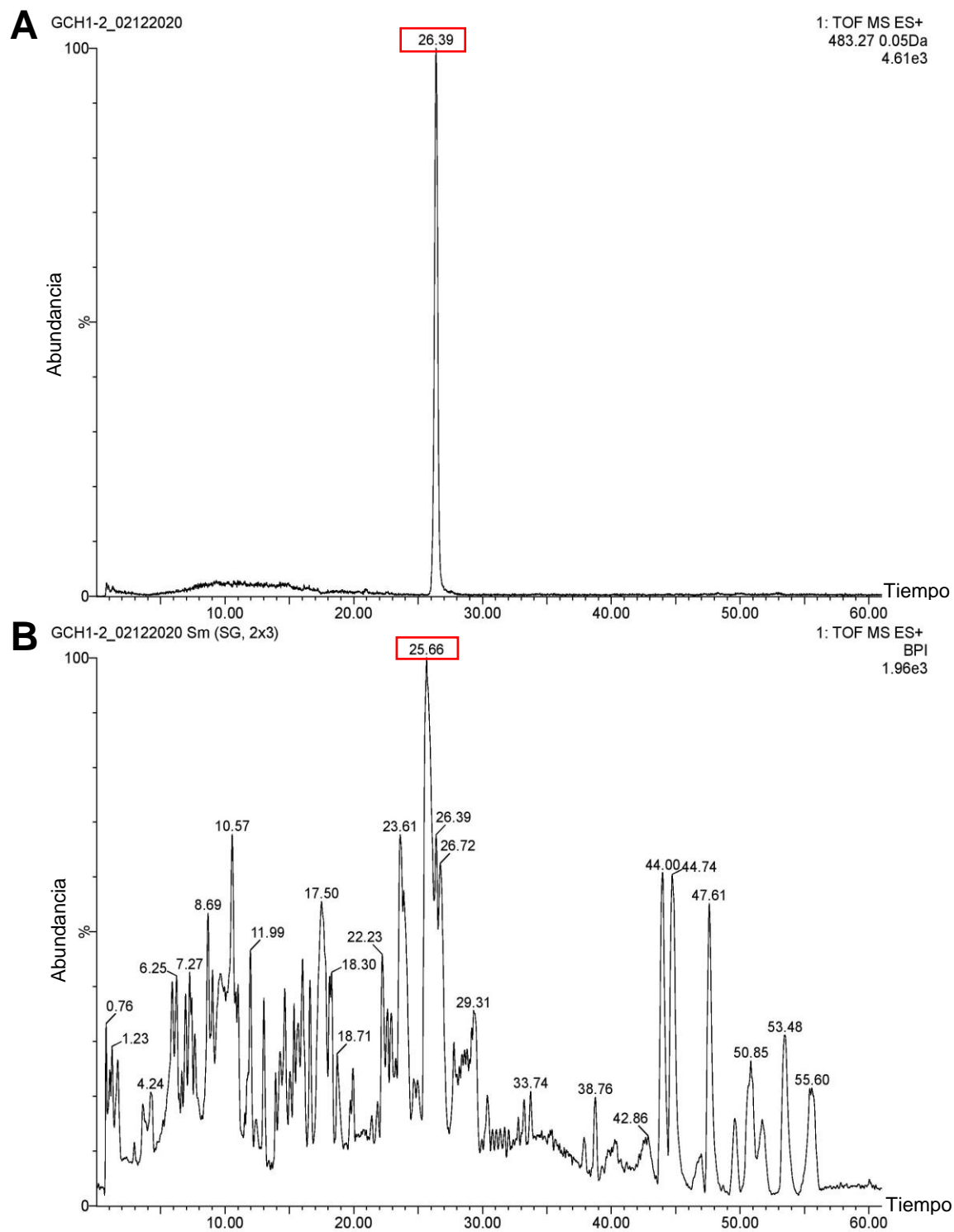


Figura 19. Cromatogramas (A) señal TIC y (B) señal XIC para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-2 utilizando el software MassLynx™ 2021.

Fuente: Elaboración propia.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Apagado

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares

14 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

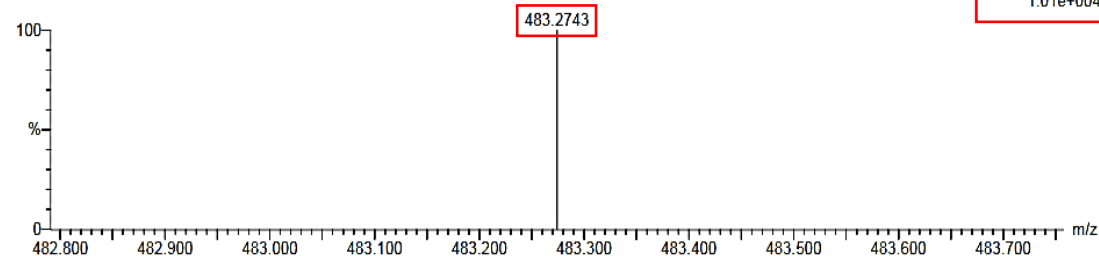
Elementos Utilizados

C: 0-30 H: 0-39 O: 0-6 Na: 0-1

SALAS Y/R ROMERO/GUITTIE

GCH1-2 02122020 534 (11.832) AM (Cen,4, 80.00, Ar,8500.0,556.28,0.70,LS 10); Sb (3,10.00); Cm ((534+1194))

15625.00000000
1: TOF MS ES+
1.01e+004



Máximo				-1.5
Mínimo	5.0	5.0		50.0

Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula
483.2743	483.2747	-0.4	-0.8	10.5	30.4	0.0	C29 H39 O6

Figura 20. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-2 utilizando el software MassLynx™ 2021.

Fuente: Elaboración propia.

Se analizó el cromatograma generado por la señal XIC en el minuto 26,39 Figura 21A de la muestra GCH1-3 para el Witafisalino I $C_{29}H_{38}O_6$, cuya $[M+H]^+$ es 483,2747 (Cuadro 3). De igual manera, en la Figura 21B se presenta la señal TIC al minuto 26,39; ilustrando la corriente iónica total.

El reporte de composición elemental muestra una m/z de 483,2746 la cual, tiene una desviación estándar de 0,01 % (Cuadro 9) respecto al valor de $[M+H]^+$ mencionado anteriormente. Asimismo, este metabolito fue cuantificado en el minuto 26,408; tal como se muestra en el (Figura 22).

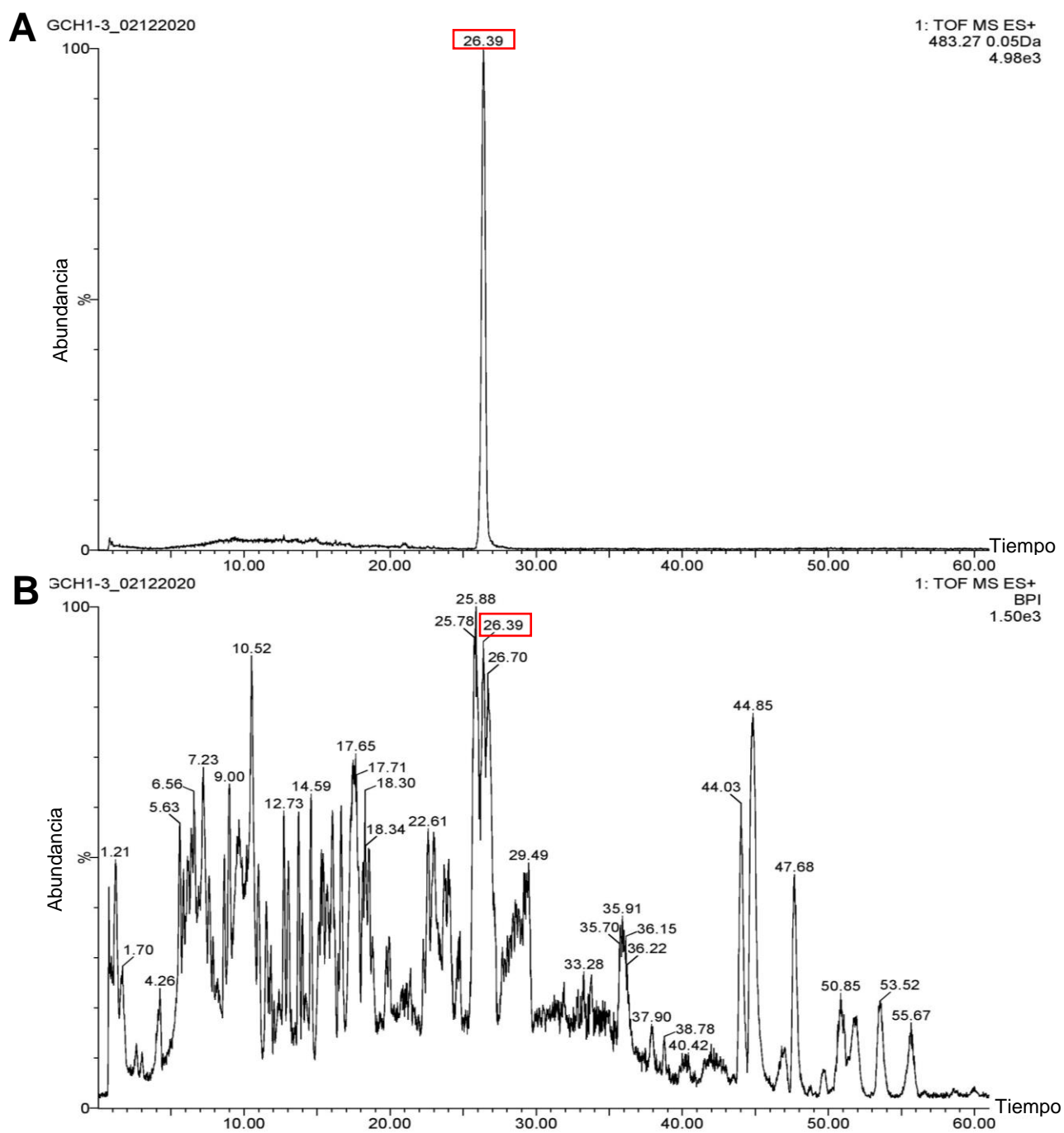


Figura 21. Cromatogramas TIC y XIC para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-3 utilizando el software MassLynx™ 2021.

Fuente: Elaboración propia.

Reporte Composición Elemental

Análisis de Masa Única

Tolerancia = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, máx. = 50.0

Predicción de Elementos: Apagado

Número de picos isotópicos utilizados para i-FIT = 3

Masa Monoisotópica, Iones de Electrones Pares e Impares

14 fórmula (s) evaluadas con 1 resultado dentro de los límites (todos los resultados (hasta 1000) para cada masa)

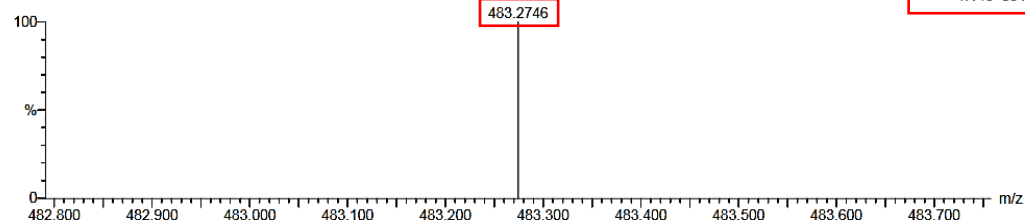
Elementos Utilizados

C: 0-30 H: 0-39 O: 0-6 Na: 0-1

SALAS Y/R ROMERO/GUITTIE

GCH1-3 02122020 1193 (26.408) AM (Cen,4, 80.00, Ar,8500.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3,10.00); Cm ((1220+1193))

15625.00000000
1: TOF MS ES+
1.14e+004



Máximo
Mínimo

	5.0	5.0	-1.5
			50.0

Masa	Masa Calc.	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (norm)	Fórmula
483.2746	483.2747	-0.1	-0.2	10.5	30.6	0.0	C29 H39 O6

Figura 22. Reporte de composición elemental para el Witafisalino I presente en la muestra GCH1-3 utilizando el software MassLynx™ 2021.

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con los espectros analizados de las muestras GCH1-2 y GCH1-3 (Figura 13, Figura 14, Figura 15, Figura 16, Figura 19, Figura 20, Figura 21 y Figura 22) se puede asociar que la presencia de witanólidos, específicamente Witafisalino I, se concentra mayoritariamente en las hojas (Cuadro 8 y Cuadro 9). Los ensayos realizados por los autores Veras *et al.*, (2004) y Batista *et al.*, (2016) confirman que en los extractos de las hojas de *Acnistus arborescens* se ha logrado determinar gran cantidad de estos metabolitos por técnicas de separación cromatográfica acopladas a espectrometría de masas, provenientes de procesos de extracción en matrices complejas como los hongos endófitos.

Por otro parte, las especies GCH1-2 y GCH1-3 se confirman como equivalentes, debido a las características morfológicas, organolépticas y de caracterización metabólica que presentan (Cuadro 5, Cuadro 8 y Cuadro 9). Además, la presencia de Witafisalino I en las mismas consolida dicha similitud.

Las muestras GCH2-2, GIH1-4, GIH2-1, GIH2-4 y GIH3-2 (Cuadro 5) no generaron resultados mediante las técnicas analíticas citadas. Esta disminución o total ausencia en la determinación en los análisis por UPLC según Pulok (2008) depende de la estabilidad

química del metabolito y está asociado a factores de degradación externa, generalmente ambientales como oxígeno, temperatura, luz, agua entre otros. Mientras, que en el interior de los tejidos los efectos degradativos se deben preferentemente a factores bioquímicos (enzimáticos).

Aunado a lo anterior, el proceso degradativo puede continuar originando metabolitos cada vez más simples hasta una mineralización total en forma de agua, anhídrido carbónico o convirtiéndose en residuos ligados que forman parte del propio edificio vegetal, perdiendo toda actividad biológica. Limitando la obtención de metabolitos con características particulares (Carril, 2009). Sin embargo, no es posible afirmar lo anterior para estos hongos, al menos, sin realizar otros experimentos.

En relación con el establecimiento del proceso de extracción óptimo para la obtención de extractos de los cultivos de hongos endófitos, se constató la reproducibilidad de la metodología aplicada, así como, de las condiciones utilizadas para la detección de los metabolitos secundarios por DIMS y UPLC (Kirwan, *et al.*, 2013), siendo este último de estricta necesidad cuando se requiere una detección exhaustiva de biomarcadores, confiriendo una mejor obtención de picos potenciales (Guo, *et al.*, 2020). Por lo que se puede considerar que los procesos aplicados son viables y confiables, a fin de que puedan ser aplicados en ensayos que involucren matrices complejas como las analizadas.

Las desviaciones estándar generadas por comparación entre los reportes de composición elemental y los valores de m/z teóricos es menor al 15,0 % (Cuadro 8 y Cuadro 9), lo que ratifica (Soto-Sosa, 2017; Cendejas-Bueno, 2018; Wang *et al.*, 2013; Kirwan, *et al.*, 2013) que la metodología de cultivo, extracción y detección de los metabolitos se desarrolló de forma precisa, respecto al valor nominal para todos los niveles de muestra control, logrando ser repetible y reproducible en dos ocasiones sucesivas, manteniendo niveles de detección óptimos y generando datos analíticamente significativos.

De acuerdo con los resultados de detección de metabolitos secundarios en *Acnistus arborescens*, el hallazgo de una nueva fuente de witanólidos con actividad biológica son las muestras GCH1-2, GCH1-3 y GCC7, debido a que los espectros de masas indican la presencia de Witafisalino I en las dos primeras y Fisanólido A en la tercera, con una

desviación estándar despreciable (Cuadro 8 y Cuadro 9) respecto al valor de m/z reportado en investigaciones que anteceden (Misico, *et al.*, 2000; Sun, *et al.*, 2016).

En relación con la actividad biológica de las especies ensayadas, el Witafisalino I presenta según Budhiraja, *et al.*, (2000) propiedades anticancerígenas, de radiosensibilización: es adoptágeno, antibacterial, inmunomodulador, antioxidante, hepatoprotector, antiestrés, antiinflamatorio antiartrítico y actividades de defensa contra los depredadores (insectos). Asimismo, se reporta citotoxicidad en bajas concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de Fisanólido A en líneas de células tumorales (Kuo, *et al.*, 2006).

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

1. Los cultivos de hongos endófitos aislados del güitite lograron realizarse adecuadamente por triplicado, garantizando la conformidad y validación de las etapas metodológicas sucesivas.
2. Se estableció el proceso de extracción óptimo para la obtención de extractos de los cultivos de hongos endófitos, demostrando reproducibilidad y trazabilidad, por lo que esta puede ser considerada como un referente en análisis posteriores en matrices complejas como las ensayadas.
3. Al analizar los extractos obtenidos en función de los witanólidos detectados mediante UPLC-ESI-Q-ToF/MS, se logra dilucidar con certeza al Fisanólido A y Witafisalino I, mediante sus espectros de masas-masas. La valoración de los resultados obtenidos señala que GCH1-2 y GCH1-3 son muestras equivalentes que contienen Witafisalino I.
4. El espectro de masas-masas de la muestra GCC7 indica con precisión la detección de Fisanólido A, el cual, es un metabolito que se encuentra en la corteza de las especies de la familia a la que pertenece el arbusto objeto de estudio.
5. La determinación de los witanólidos producidos por hongos endófitos aislados del árbol de güitite mediante UPLC-ESI-Q-ToF/MS fue precisa, esto avalado por las señales obtenidas y la despreciable desviación estándar con respecto a los valores teóricos colacionados.

5.2. Recomendaciones

1. Realizar una cuarta etapa de cultivo de las muestras GCH1-2, GCH1-3 y GCC7 en las que se obtuvo Witafisalino I y Fisanólido A respectivamente, para determinar mediante análisis cromatográfico de masas-masas con detección ultravioleta-visible, la concentración de metabolitos secundarios presentes.
2. Establecer las condiciones de cultivo óptimas para aumentar la producción de los compuestos de interés.
3. Obtener los protocolos de aislamiento de los compuestos detectados.
4. Coadyuvar al desarrollo de investigaciones de los hongos endófitos presentes en arbustos ubicados en diferentes sectores del país.

Anexos

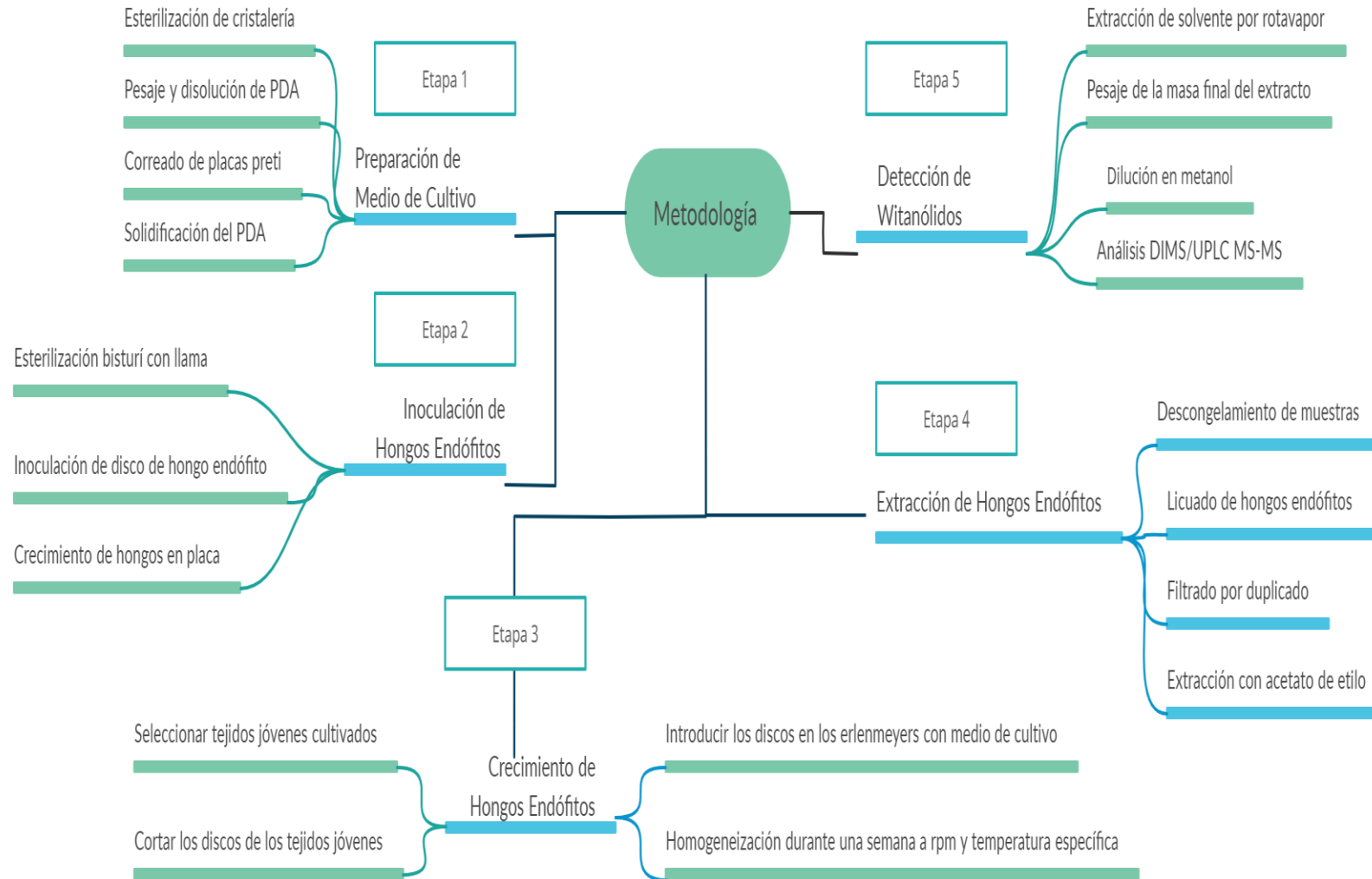
Anexo 1. Arbusto de güitite ubicado en los alrededores del CIMAR de la UCR del cual se obtuvieron las muestras para el cultivo de los hongos endófitos.



Anexo 2. Diagrama de flujo de la metodología aplicada en las etapas de cultivo y extracción de metabolitos secundarios, para su posterior análisis por DIMS y UPLC/MS-MS.



Anexo 3. Resumen metodología aplicada a la detección de Witanólidos en el güitite.



Anexo 4. Datos experimentales de pesaje por diferencia realizado en el proceso de concentración de la muestra por extracción de solvente en rotavapor.

Muestra	Balón (g)	Balón + Muestra (g)	Masa Final (g)
Primera Etapa de Cultivo			
GCC2	109,84	109,80	0,040
GCC4	110,28	110,22	0,060
GCC5	109,72	109,77	0,050
GCC6	112,50	112,47	0,030
GCC7	109,83	109,79	0,040
GCH1-1	112,25	112,28	0,030
GCH1-2	151,32	151,29	0,030
GCH1-3	112,27	112,22	0,050
GCH2-1	112,35	112,33	0,020
GCH2-2	112,26	112,31	0,050
GIH1-1	109,87	109,82	0,050
GIH1-2	109,84	109,78	0,060
GIH1-4	112,52	112,48	0,040
GIH1-5	112,51	112,55	0,040
GIH2-1	112,26	112,28	0,020
GIH2-4	112,49	112,55	0,060
GIH2-5	112,52	112,49	0,030
GIH3-2	112,51	112,55	0,040
GVH 3.1	112,16	112,21	0,050
Segunda Etapa de Cultivo			
GIH1-1	109,85	110,58	0,730
Tercera Etapa de Cultivo			
GCH1-2	110,77	111,02	0,254
GCH1-3	110,59	110,91	0,326
GCC7	110,57	110,73	0,140

Anexo 5. Condiciones de análisis establecidas en el Software *MassLynx™* utilizado por el UPLC-ESI-Q-ToF/M marca Waters® modelo Acquity.

Acquity Binary Solvent Manager

Run Time: 61.00

General | Data | Analog Out | Events

A1 Water 0.1 % Formic Ac
 B1 Acetonitrile 0.1 % Form

Pressure Limits
 Low: 500 psi
 High: 15000 psi
 Seal Wash: 5.0 min

Gradient

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1		0.100	95.0	5.0	
2	8.00	0.100	20.0	80.0	6
3	20.00	0.100	0.0	100.0	6
4	25.00	0.100	0.0	100.0	6
5	60.00	0.100	0.0	100.0	6
6	61.00	0.100	95.0	5.0	6

Comment: [WHITANOLIDO PROYECTO RR

ACQUITY PDA eA Detector

Run

General | 2D Channels | Analog Out | Events

Lamp On

Enable 2D Data

λ Range: 190 nm to 600 nm

Temperature

Column: 30.0 °C Alarm Band: ± 5.0 °C

Sample: 5.0 °C ± 5 °C

EDC Delay Offset 0.4000
 Maldi Laser Firing Rate 0.0
 Maldi Plate Speed 1.0
 Maldi Laser Energy 250.0
 Maldi Pattern Filename c:\Masslynx\Spiral_96.ptn
 Maldi Lock Mass Pattern File c:\Masslynx\Spiral_96.ptn
 ToF Emulation Transfer Pulse Height (V) 0.1

Experimental Instrument Parameters
 Instrument Parameter Filename C:\MassLynx\CIPRONA.PRO\ACQUDB\jaa204_12072018.ipr
 Polarity ES+

Capillary (kV) 3.0
 Sampling Cone 35.0
 Extraction Cone 3.5
 Source Temperature (°C) 150
 Desolvation Temperature (°C) 300
 Cone Gas Flow (L/Hr) 10.0
 Desolvation Gas Flow (L/Hr) 600.0

Referencias

- Bacon CW, White JF (2000) Microbial endophytes. Marcel Dekker, New York. 341–388.
- Ballesteros-Vivasa D., *et al.* (2019). A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, *in vitro* assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 1: Withanolides-rich fractions from goldenberry (*Physalis peruviana* L.) calyces obtained after extraction optimization as a case study. *Journal of Chromatography A*. 1584: 155–164.
- Batista, P., *et al.* (2016). Withanolides from leaves of cultivated *Acnistus arborescens*. *Phytochemistry*. 130:321-327.
- Bourassa S., J. Brodeur & Y. Carrière. (2006). Endophyte-grass complexes and the relationship between feeding preference and performance in a grass herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 124(2):221 - 228
- Bruneton J. Farmacognosia. 2ª ed. España: Editorial ACRIBIA, S.A. 2000. p. 4.
- Budhiraja, R., Krishan, P. & Sudhir, S. (2000). Biological activity of Withanolides. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 59. 904-911
- Cardona, D., *et al.* (2006). Leishmanicidal activity of withajardins and acnistins. An experimental and computational study. *Tetrahedron*. (62):6822–6829. doi: 10.1016/j.tet.2006.04.101
- Carril, A. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. Reduca (Biología). 119-121.
- Cendejas-Bueno, E. (2018). *Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antifúngicos triazólicos en muestras preclínicas y clínicas*. (Tesis Doctoral en Farmacia) Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Chakravarthi, B. V., Das, P., Surendranath, K., Karande, A. A. & Jayabaskaran, C. (2008). Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *J. Biosci.* 33: 259–267. doi: 10.1007/s12038-008-0043-6
- Chen, X., Sang, X., Li, S., Zhang, S. & Bai, L. (2010). Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 447–454. doi: 10.1007/s10295-010-0690-0
- Chithra, S., Jasim, B., Sachidanandan, P., Jyothis, M. & Radhakrishnan, E. K. (2014). Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine* 21: 534–540. doi: 10.1016/j.phymed.2013.10.020

- Chung-Hsuan (Winston), C. (2008) Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Analytica Chimica Acta*. 624: 16-36.
- Clay et al. (2016) Diversity of fungal endophytes in non-native *Phragmites australis* in the Great Lakes Biol. *Invasions* 18: 2703-2716
- Company, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H. & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*. 62 (1):188–197.
- Damu AG, Kuo PC, Su CR, Kuo TH, Chen TH, Bastow KF, Lee KH, Wu TS. (2007). Isolation, Structures, and Structure-Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulate*. *J Nat Prod*. 70(7):1146-52.
- De la Cruz, H.; Vilcapoma, G.; Zevallos, P. (2007). *J. Ethnopharmacol*. 111:287–294.
- Deng, B. W., Liu, K. H., Chen, W. Q., Ding, X. W., & Xie, X. C. (2009). *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World J. Microb. Biotechnol*. 25:139–143. doi: 10.1007/s11274-008-9876-2
- Doilom, M., et al. (2017) Can ITS sequence data identify fungal endophytes from cultures? A case study from *Rhizophora apiculata* *Mycosphere*, 8 (10):1869-1892.
- Douglas, D. (2009). *Mass Spec. Rev*. 28:937–960.
- Draper, J., Lloyd, A. J., Goodacre, R. & Beckmann, M. (2013). Flow infusion electrospray ionization mass spectrometry for high throughput, non-targeted metabolite fingerprinting: A review. *Metabolomics*. 9:4-29.
- E. L. Harry, D. J. Weston, A. W. T. Bristow, I. D. Wilson & C. S. Creaser. (2008). *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. 871:357–361.
- Gemeinholzer, B. & Wink, M. (2001). Solanaceae: Occurrence of Secondary Compounds Versus Molecular Phylogeny, advances in Taxonomy and Utilization. *Nijmegen* 5:165-178.
- Guo, B. H., Wang, Y. C., Zhou, X. W., Hu, K., Tan, F., Miao, Z. Q., et al. (2009). An endophytic taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *Mairei*. *Afr. J. Biotechnol*. 5:875–877.
- Guo, et al. (2001). Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences *Mol. Phylogenet. Evol*. 20:1-13.

- Guo, N., Zhao, L. Zhao, Y., Li, Q., Xue, X., Wu, L., Gómez, M., Wang, K. & Peng, W. (2020). Comparison of the Chemical Composition and Biological Activity of Mature and Immature Honey: An HPLC/QTOF/MS-Based Metabolomic Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68:4062–4071. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07604>
- Han, J., *et al.* (2008). Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Metabolomics*. 4:128-140.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H & Sun M (2007). Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World J. Microb. Biot.* 23(9):1253-1263.
- Huo, J., *et al.* (2018) Identification and characterization of major constituents in *Juglans mandshurica* using ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF/MS). *Chinese Journal of Natural Medicines*. 16(7):0525-0545.
- Ibáñez M. (2007). Potencial de la cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas con analizadores de triple cuadrupolo y de tiempo de vuelo para la elucidación, cuantificación y confirmación de plaguicidas y productos de transformación en muestras ambientales. Tesis Doctoral. Universitat Jaume I de Castellón. Castellón de la Plana, España.
- Instituto Nicaragüense de Recursos Naturales y del Ambiente (IRENA). (1993). Flora arborecente de la ciudad de Managua y sus alrededores. Managua, NIC. IRENA. 98.
- Jeewon, R., *et al.* (2013) DNA based identification and phylogenetic characterisation of endophytic and saprobic Fungi from *Antidesma madagascariense*, a medicinal plant in Mauritius. *J. Mycol.* 2013:1-10.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H., Zheng, C, Rahman, K., Han, T. & Qin, L. (2016). A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Frontiers in Microbiology*. 7(906):1-14.
- Jin Z, Mashuta MS, Stolowich NJ, Vaisberg AJ, Stivers NS, Bates PJ, Lewis WH, Hammond GB. (2012) Physangulidines A, B, and C: Three New Antiproliferative Withanolides from *Physalis angulata* L. *Department of Chemistry*. 14(5):1230-3.
- K.D. Hyde, K. Soyong (2008). The fungal endophyte dilemma *Fungal Divers.* 33 (163):173.
- Kelemu, S., J. White Jr., F. Muñoz & Y. Takayama. (2001). An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: isolating, identifying, and

characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. *Canadian Journal Microbiology*. 47:55-62.

- Kim, S. U. & Ford, E. (1999). Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Nat. Prod. Organic. Chem.* 42:97–99.
- Kirwan, J.A., Broadhurst, D.I., Davidson, R.L. *et al.* (2013). Characterising and correcting batch variation in an automated direct infusion mass spectrometry (DIMS) metabolomics workflow. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405:5147–5157. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6856-7>
- Kour, A., Shawl, A. S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P. H., Suden, P., et al. (2008). Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World. J. Microb. Biot.* 24:1115–1121. doi: 10.1007/s11274-007-9582-5.
- Kumar, A., Patil, D., Rajamohanam, P.R. & Ahmad, A. 2013. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *PloS one*, 8:71805.
- Kuo PC, Kuo TH, Damu AG, Su CR, Lee EJ, Wu TS, Shu R, Chen CM, Bastow KF, Chen TH, Lee KH (2006). Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*. *Org Lett.* 8:2953-2956.
- Kupchan, S., et al. (1969). Tumor Inhibitors. XXXIX. Ia Active Principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and Structural and Spectral Studies of Withaferin A and Withacnistin. *The Journal of Organic Chemistry*. 34 (12). 3858-3866
- Kusari, S. (2012) Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem. Biol.* 19:792-798.
- Li, C. (2007). Fermentation conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* endophytic fungus on production of podophyllotoxin. *Food. Ferment. Ind.* 33:28–32.
- Liu, K., Ding, X., Deng, B., & Chen, W. (2009). Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:1171–1177. doi: 10.1007/s10295-009-0598-8
- Lo Presti, L. *et al.* (2015) Fungal effectors and plant susceptibility *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:513-545.
- Lu, L., He, J., Yu, X. P., Li, G. Z. & Zhang, X. (2006). Studies on isolation and identification of endophytic fungi strain SC13 from harmaceutical plant *Sabina vulgaris* Ant. and metabolites. *Acta Agric. Boreali Occidentalis Sin.* 15:85–89. doi: 10.3969/j.issn.1004-1389.2006.05.021

- M. Bedair & L. W. Sumner. (2008). TrAC. *Trends Anal. Chem.* 27:238–250.
- M. Salud (2014). Dirección Vigilancia de la Salud, Unidad de Seguimiento de Indicadores de Salud, Registro Nacional de Tumores.
- Ma L, Xie CM, Li J, Lou FC, Hu LH. (2006). Daturametelins H, I, & J: Three New Withanolide Glycosides from *Datura metel* L. *Chem Biodivers.* 3(2):180-6.
- Macherius A., Seiwert B., Schröder P., Huber C., Lorenz W. & Reemtsma T. (2014) Identification of Plant Metabolites of Environmental Contaminants by UPLC-QToF-MS: The in Vitro Metabolism of Triclosan in Horseradish. *Agricultural Food Chemistry.* 62:1001–1009.
- Manickam, A. Srivastava & A.B. Ray (1997). Withanolides from the flowers of *Datura fastuosa*. *Phytochemistry.* 47(7):1427-1429.
- Misico, R., *et al.* (2000). Induction of Quinone Reductase by Withanolides. *Journal of Natural Products.* 65:677-680.
- Monnet F., N. Vaillant, A. Hitmi, A. Coudret & H. Sallanon. (2001). Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum.* 113:557-563.
- Morantes, S. *et al.* (2006). Actividad Citotóxica y Análisis Fitoquímico de Fracciones Aisladas del Extracto Etanólico total de *Acnistus arborescens*. *Acta Farm. Bonaerense.* 25(4):491-6.
- Nittala, S., *et al.* (1981) Chlorinated withanolides acnztus from *wzthanza somnzfera* and *brevzflorus*. *Phytochemistry.* 20(11):2547 2552.
- O'Hanlon *et al.* (2012). Exploring the potential of symbiotic fungal endophytes in cereal disease suppression. *Biol. Control.* 63:69-78.
- Paz, Z., S. Burdman, U. Gerson & A. Sztejnberg. (2006). Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *Journal of Applied Microbiology.* Online Early Articles. Accepted.
- Potshangbam, M., *et al.* (2017). Functional Characterization of Endophytic Fungal Community Associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L Front. *Microbiol.* 8:325-330.
- Pulok, P. (2008). Quality Control Herbal Drugs. India: Business Horizons.
- Qiu, M., Xie, R., Shi, Y., Zhang, H. & Chen, H. (2010). Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Ann. Microbiol.* 60:143–150. doi: 10.1007/s13213-010-0016-5

- R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein & T. Olah, (2000). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11:942–950.
- Ramsay, S. L., Peter, J., Meikle, P. J., Hopwood, J. J. & Clements, P. R. (2005). Profiling oligosaccharidurias by electrospray tandem mass spectrometry: Quantifying reducing oligosaccharides. *Analytical Biochemistry.* 345:30-46.
- Reyes, M., *et al.* (2013) Physangulidine A, a Withanolide from *Physalis angulata*, Perturbs the Cell Cycle and Induces Cell Death by Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *J Nat Prod.* 76(1):2-7. doi: 10.1021/np300457g
- Rojas F. & Torres. (2012). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Güitite (*Acnistus arborescens*) *Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica).* 9 (22):2215-2504
- Roumy, V., *et al.* (2010) Antifungal and Cytotoxic Activity of Withanolides from *Acnistus arborescens*. *Journal of Natural Products.* 73(7):313–1317.
- Sánchez, R., *et al.* (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2):132-146.
- Schulz, B, *et al.* (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms *Curr. Sci.* 109:39-45.
- Seiber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fung. Biol. Rev.* 21:75-89. doi: 10.1016/j.fbr.2007.05.004
- Selosse, M. & C. Schardl. (2006). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist.* En prensa.
- Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B. T., Priti, V., Kumar, P. M., Ravikanth, G., *et al.* (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Lcacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry* 71:117–122. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.09.030.
- Singh, A., Duggal, S., Singh H., Singh J. & Katekhaye, S. (2010). Withanolides: Phytoconstituents with significant pharmacological activities. *International Journal of Green Pharmacy.* 229-237.
- Solis, M.J.L., *et al.* (2016). The diverse community of leaf-inhabiting fungal endophytes from Philippine natural forests reflects phylogenetic patterns of their host plant species *Ficus benjamina*, *F. elastica* and *F. religiosa* *Mycoscience.* 57:96-106.

- Soto-Sosa, J. (2017). *Desarrollo y validación de un método analítico por LC/MS/MS para la cuantificación de Leuprolide en plasma humano. Aplicación en un estudio de Farmacocinética en voluntarios sanos.* (Tesis de Maestría en Investigación Clínica). Centro de investigación y asistencia en tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A.C.
- Strobel G., & Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endo-phytes and their natural products. *Microbial Mol Biol Rev.* 67(4):491–502
- Strobel, G. A., Hess, W. M., Li, J. Y., Ford, E., Sears, J., Sidhu, R. S., *et al.* (1997). *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Aust. J. Bot.* 45:1073–1082. doi: 10.1071/BT96094
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat.Prod.* 67:257-268.
- Sun, C., *et al.* (2016). Antiproliferative and Anti-inflammatory Withanolides from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products.* 79(6):1586-97.
- Tan RX & Zou WX. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 18:448–45.
- Tejesvi MV, Nalini MS, Mahesh B, Parkash SH, Kinni RK, Shetty HS & Subbiah V. (2007). New hopes from endophytic fungal secondary metabolite. *Bol Soc Quim Mex.* 1:19–26.
- Torres, C; Carvajal, D; Rojas, F. & Arguedas, M. (2011). Reproducción de especies arbóreas y arbustivas de la región central de Costa Rica: Germinar. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. Disponible en: <http://www.tec.ac.cr/sitios/Docencia/forestal/Germinar/germinar%202.html>
- Trease, Evans W. *Farmacognosia.* 15th ed. España: Editorial Elsevier Limited. 2006. p. 41-51.
- Veras, M., *et al.* (2004). Cytotoxic Withaphysalins from the Leaves of *Acnistus arborescens*. *Journal of Natural Products.* 67(4):710-713.
- Vergeynsta, L., Van Langenhovea, H., Joosb, P. & Demeesterea, K. (2013). Accurate mass determination, quantification and determination of detection limits in liquid chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry: Challenges and practical solutions. *Analytica Chimica Acta.* 789:74–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.024>

- Vila-Aiub M.M., M. Martínez-Ghersa & C. Ghersa. (2003). Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. *Evolutionary Ecology* 17:441-456.
- Waller F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven, C. Neumann, D. Wettstein, P. Franken & K. Kogel. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* 102(38):13386-13391.
- Wang, S., Kuo, C. & Tseng, Y. (2013). Batch Normalizer: A Fast Total Abundance Regression Calibration Method to Simultaneously Adjust Batch and Injection Order Effects in Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data and Comparison with Current Calibration Methods. *American Chemical Society*. 85:1037–1046. <https://doi.org/10.1021/ac302877x>
- Wang, X., Ma, C., Yang, P., Wei, Y., Jia, J., Cao, G., Li, J. & Xin, Y. (2020). Integrated HPLC fingerprinting and multivariate analysis differentiates between wild and cultivated *Hedyotis diffusa* Willd. *Industrial Crops & Products*. 148:112223. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112223>
- Waters (2019). The Mass Spectrometry Primer. United States. Recuperado de: https://www.waters.com/waters/en_US/What-Types-of-Instruments-Are-Used%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10090937
- Wiley W.C. & McLaren J.B. (1955). Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments* 26:1150-1157.
- Wu, L., Han, T., Li, W., Jia, M., Xue, L., Rahman, K., *et al.* (2013). Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *Mairei* in China. *Curr. Microbiol.* 66:40–48. doi: 10.1007/s00284-012-0235-z
- Xua, R., Lina, Q., Qiuc, X, Chena, J., Shaoa, Y., Hua, G. & Lin, G. (2019). UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of imatinib, voriconazole and their metabolites concentrations in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 166:6–12. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.036>
- Yang X, Zhang L, Guo B & Guo S (2004). Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. *China Trade Herb Drugs* 35:79–81
- Yang, X., Guo, S., Zhang, L. & Shao, H. (2003). Select of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. *Nat. Prod. Res. Dev.* 5:419–422. doi:10.3969/j.issn.1001-6880.2003.05.012

- Young, S. P., Stevens, R. D., Yan, A., Yuan-Tsong, C. & Millington, D. S. (2003). Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 316:175-180.
- Zaurov D., S. Bonos, J. Murphy, M. Richardson & F. Belanger. (2001). Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Science*. 41:1981–1984.
- Zeng, S., Shao, H. & Zhang, L. (2004). An endophytic fungus producing a substance analogous to podophyllotoxin isolated from *Diphylleia sinensis*. *J. Microbiol.* 24:1–2. doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2004.04.001
- Zhang HW, Song YC, Tan RX (2006) Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep.* 23:753–771.
- Zhang Y. & Z. Nan. (2006). Growth and anti-oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal Agronomy and Crop Science*. Online Early Articles. Accepted.
- Zhang, L. Q., Guo, B. & Li, H. Y. (1998). Isolation of a fungus producing Vinbrastine. J. Yunnan. *Univ. Nat. Sci.* 20:214–215.
- Zhou, X., Wang, Z., Jiang, K., Wei, Y., Lin, J., Sun, X., *et al.* (2007). Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 43:490–494. doi: 10.1134/s000368380704014x
- Zhu, J.W. *et al.* (2000). Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiations and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* 8:455-463.