



**Estabilización y mejora de la producción del
metabolito fúngico AD0157, inhibidor de la
angiogénesis**

**Estabilización e mellora da produción do
metabolito fúnxico AD0157, inhibidor da
anxioxénese**

**Stabilization and improvement of the
production of the fungal metabolite AD0157,
inhibitor of angiogenesis**

Alumna: Tania Arias Fernández

Febrero, 2018



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultad de Ciencias

**Estabilización y mejora de la producción del metabolito
fúngico AD0157, inhibidor de la angiogénesis**

**Estabilización e mellora da produción do metabolito
fúnxico AD0157, inhibidor da anxioxénese**

**Stabilization and improvement of the production of the
fungal metabolite AD0157, inhibitor of angiogenesis**

*Máster en Biotecnología Avanzada
2016-2018*

Empresa: Instituto Biomar, S.A.

Nombre del autor: Tania Arias Fernández

Vº Bº Tutores:

Dra. M^a Ángeles Vinuesa Navarro y Dr. Manuel Becerra en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En León, el 30 de enero de 2018

En Coruña, el 2 de febrero de 2018

Fdo. M^a Ángeles Vinuesa Navarro
Cargo: Técnico Jefe Dpto. Hongos
Instituto Biomar S.A.

Fdo.: Manuel Becerra
Cargo: Coordinador Máster
Biotecnología Avanzada

Agradecimientos

Al Instituto Biomar, S.A., por darme la oportunidad de realizar este trabajo. En especial al Departamento de Hongos, Marian, Neyla, Mélanie, Patricia, Mónica y Belén, gracias por enseñarme y transmitirme esa dedicación y pasión que tenéis por vuestro trabajo, fundamental para formar un buen equipo. También me gustaría agradecerle a Chema e Iván, por su ayuda en la última etapa del trabajo. Sin vosotros esto no hubiera sido posible.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIAL Y MÉTODOS	4
2.1. Procedencia, descripción y caracterización del hongo <i>Paraconiothyrium sp.</i>	4
2.1.1. Obtención de la cepa.....	4
2.1.2. Descripción morfológica.....	4
2.2. Estabilización genética. Tratamiento con Benomilo	5
2.3. AD0157	6
2.4. Optimización de la producción del compuesto AD0157	7
2.4.1. Fermentaciones de un volumen de 0.04 L.....	8
2.4.2. Fermentaciones de un volumen de 0.25 L.....	9
2.5. Extracción y purificación del compuesto AD0157 del caldo de cultivo	10
3. RESULTADOS	10
3.1. Identificación genética de la cepa y comparación morfológica con otras especies	10
3.2. Tratamiento con benomilo: clones obtenidos	11
3.2.1. Suspensión de esporas.....	11
3.2.2. Replicación en placa	12
3.3. Obtención del compuesto AD0157	13
3.3.1. Fermentaciones de un volumen de 0.25 L.....	13
3.3.2. Fermentaciones de un volumen de 0.04 L.....	18
3.4. Extracción y purificación del AD0157 del caldo de cultivo del hongo marino	22
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIÓN	26
6. REFERENCIAS	27
7. ANEXO	28

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo (OMS 2017). La elevada ratio de mortalidad en pacientes con esta enfermedad está asociada al proceso de metástasis del tumor inicial a tejidos distantes. Aunque esta diseminación de células tumorales puede ocurrir por diferentes mecanismos, la mayoría ocurre en procesos de angiogénesis y linfangiogénesis alterados, obteniendo así, acceso al sistema circulatorio (García-Caballero *et al.* 2017a, Varinska *et al.* 2017).

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Está estrictamente controlado por estimuladores e inhibidores, limitado en adultos a procesos relacionados con el ciclo reproductivo y reparación de hueso. Sin embargo, una desregulación continuada de este proceso está relacionada con otras enfermedades no neoplásicas como son las retinopatías proliferativas o diabéticas, psoriasis y artritis entre otras. La angiogénesis está considerada como uno de los principales marcadores del cáncer, donde juega un papel central en el crecimiento y en la metastatización tumoral. Por este motivo, es interesante su estudio como nueva diana terapéutica (García-Caballero *et al.* 2017b). Recientemente, la FDA (*Food and Drugs Administration*) aprobó el uso de inhibidores angiogénicos como tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis (García-Caballero *et al.* 2014).

La linfangiogénesis es el proceso encargado de la formación de nuevos vasos linfáticos. Estudios clínico-patológicos en micrometástasis, sugieren que los vasos linfáticos son usados como ruta inicial en la invasión tumoral hacia los nódulos linfáticos (LN). La presencia o no de células tumorales en estos nódulos es un marcador diagnóstico importante que ayuda en la predicción del estadio de la enfermedad y en la toma de decisiones terapéuticas. Por lo tanto, la linfangiogénesis representa una diana muy atractiva para la prevención y tratamiento de metástasis linfáticas (García-Caballero *et al.* 2017a).

La mayoría de los fármacos antiangiogénicos y antilinfangiogénicos tienen como diana el eje de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR-3/2) por su papel clave tanto en la estimulación y proliferación de células endoteliales vasculares (activación de las rutas PI3K/Akt y MAPK/ERK1-2) como del proceso de linfangiogénesis en situaciones patogénicas (Chiodelli *et al.* 2017, García-Caballero *et al.* 2013, 2017a, Varinska *et al.* 2017).

El uso de especies marinas está demostrando ser una fuente hasta ahora desconocida y muy rica en la obtención de productos muy interesantes de aplicación biotecnológica. Se caracterizan por tener estructuras químicas únicas, diferentes modos de acción, muy prometedores en cuanto a actividades biológicas y por presentar perfiles de toxicidad diferentes a los encontrados en especies terrestres (Varinska *et al.* 2017).

El compuesto AD0157, un pirrol (**Figura 3**) aislado y purificado de caldo de fermentación de un hongo marino *Paraconiothyrium sp.* HL-78gCHSP3-B005, seleccionado en un proceso de *screening* primario por sus propiedades angiomoduladoras *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (García-Caballero *et al.* 2014). También se describió su actividad inhibitoria frente a la linfangiogénesis (García-Caballero *et al.* 2017a, 2017b). Su actividad antiangiogénica se debe a la inducción de apoptosis en células endoteliales a través de la condensación de la cromatina, provocando una fragmentación del DNA incrementando la población en SubG1 y activando la ruta de las caspasas (García-Caballero *et al.* 2014). Todo apunta a que el compuesto AD0157 actúa en las rutas de señalización PI3K/Akt, fundamental en la regulación de la supervivencia, proliferación y migración celular y en el proceso de angiogénesis; y en la ruta MAPK/ERK1-2, controla la proliferación celular. En ambas rutas actúa inhibiendo la fosforilación de Akt y ERK1-2, teniendo mayor efecto en la primera ya que se necesita menor concentración. Cabe destacar la no toxicidad del compuesto (García-Caballero *et al.* 2014, 2017c). En cuanto al modo de acción en la linfangiogénesis, es un inhibidor dual de VEGFR-3, involucrado en la formación de vasos linfáticos; y VEGFR-2, formación de heterodímeros con VEGFR-3 (García-Caballero *et al.* 2017a).

La problemática para la obtención de este compuesto es doble, por una parte su producción es escasa, y por otra es irregular. Se observó que el hongo marino del que proviene, HL-78gCHSP3-B005, presenta habitualmente sectores dentro de sus colonias con morfologías variables, por lo que se supone que es inestable genéticamente. Los sectores son zonas de la colonia, que surgen como consecuencia de mutaciones a partir de una célula. Puesto que las colonias sobre placa de agar nutritivo presentan crecimiento circular a partir de un inóculo

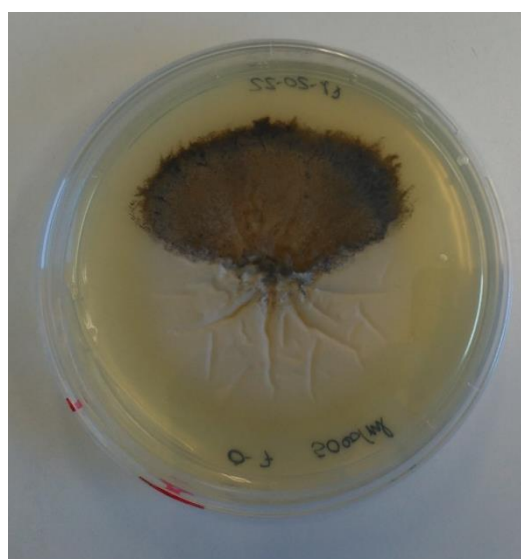


Figura 1. Sector en una colonia crecida en placa de agar nutritivo.

central, cuando una célula muta y esa mutación afecta a su morfología y a de sus descendientes, aparece una zona de morfología distinta, triangular denominada sector (**Figura 1**) (Pitt *et al.* 2009).

Para continuar con las pruebas *in vivo* es necesario obtener un peso mínimo del compuesto, y actualmente, se desconocen los parámetros críticos que permitan producir el compuesto de manera estandarizada. Los experimentos que se realizaron previamente a este trabajo se centraron en la variabilidad de la cepa, la evaluación del medio de producción y el número de pases de inóculo.

La variabilidad de la cepa y de su capacidad de producción se pone de manifiesto en las distintas tandas de selecciones clonales que se realizaron, obteniéndose clones con una buena producción. Sobre estos clones se realizaron pruebas de medios y sólo en el medio AG-12, empleado actualmente, se obtiene producción de AD0157. El número de pases de inóculo quedó establecido en uno. Sin embargo, sucede de forma cíclica que cuando se trabaja con un clon en las condiciones ideales, el compuesto deja de producirse y es necesario iniciar el trabajo de selección clonal de nuevo. Los principales objetivos que se plantean en este trabajo son:

- Estabilizar la cepa genéticamente, de manera que se pueda solventar el problema de la capacidad de variabilidad extrema del organismo productor.
- Definir las condiciones de fermentación para obtener una producción mejorada del compuesto AD0157.

Para solventar el problema de la variabilidad genética se realizará un aislamiento de clones estables después de realizar un tratamiento químico con benomilo, un compuesto antifúngico haploidizante ampliamente utilizado en estabilización, cuyo principio activo es el metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-il carbamato. Éste se une a la subunidad β de la tubulina, presente en los microtúbulos interfiriendo así, con la división celular, el transporte intracelular y la segregación cromosómica. Estos efectos hacen que las células permanezcan en la etapa metafase de la mitosis y provoca pérdidas cromosómicas con mayor probabilidad (Hastie 1970, Anderson & Yacoob 1984, Blasco *et al.* 2008).

Respecto a la optimización de las condiciones de fermentación, el trabajo se centrará en modificar parámetros que no hayan sido trabajados previamente, centrándose en el tiempo y cantidad de inóculo, y en el tiempo de fermentación, manteniendo constante el medio, la temperatura y la agitación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Procedencia, descripción y caracterización del hongo *Paraconiothyrium* sp.

2.1.1. Obtención de la cepa

El hongo utilizado para la obtención del metabolito secundario AD0157 es *Paraconiothyrium* sp. HL-78gCHSP3-B005. Se aisló de un cordado no identificado recogido mediante buceo en una expedición marina realizada en Guatemala. La cepa se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo en la Universidad de Valencia, España (García-Caballero *et al.* 2014b)

El proceso de aislamiento de microorganismos a partir de muestras marinas se realiza mediante la trituración y siembra en placas de dichas muestras. En ellas crecieron múltiples hongos los cuales se aislaron de manera individual en placas con PDAs (*Potato Dextrosa Agar* con sales). Tras la desreplicación (proceso por el cual se eliminan colonias similares), la placa que contenía el hongo HL-78gCHSP3-B005 se seleccionó para hacer análisis genómico.

El ADN se extrajo de micelio crecido en placa con PDAs y se amplificaron mediante PCR las regiones ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*), secuencias flanqueantes de la región ribosomal 5.8S muy variables, utilizadas en la identificación taxonómica de hongos. A continuación, se purificaron con el *kit* comercial QIAquick® y se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación Secugen. Utilizando el programa Chromas se revisó la secuencia y se seleccionó la región más amplia posible y libre de indeterminaciones para realizar una comparación BLAST con aquellas recogidas en el GenBank. La secuencia mostró un porcentaje de similitud del 93% con la secuencia de *Paraconiothyrium variabile*. De forma paralela, se realizó un estudio taxonómico por morfología, observando el tipo de esporulación y la morfología de los conidios. Las características de los conidios y el bajo nivel de coincidencia no confirman la identificación a nivel de especie. (García-Caballero *et al.* 2014b). Debido a la similitud morfológica en cuanto a conidios con el *Paraconiothyrium africanum*, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando la herramienta Clustal Omega comparándola con la secuencia problema.

2.1.2. Descripción morfológica

Las colonias alcanzan 7 cm de diámetro en 10 días, a una temperatura de 25 °C en placas de PDAs en una cámara de cultivo que mantiene la humedad al 42%. La temperatura óptima de crecimiento está entre 24 y 28 °C y el rango de pH entre 5 y 7. La cepa de

Paraconiothyrium sp. HL-78gCHSP3-B005 se mantuvo congelada a -70 °C en glicerol al 20% (García-Caballero *et al.* 2014b).

Esta especie consta de un conidiocarpio picnidial de color marrón oscuro (**Figura 2A**). Los conidios, bicelulados separados por una pared fina y oscura, poseen un color marrón y tienen una forma elipsoide con los extremos obtusos (**Figura 2B**). Las observaciones se realizaron con microscopía óptica (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Axio Lab A1). En cuanto al cuerpo vegetativo, las hifas son finas, hialinas y no septadas.

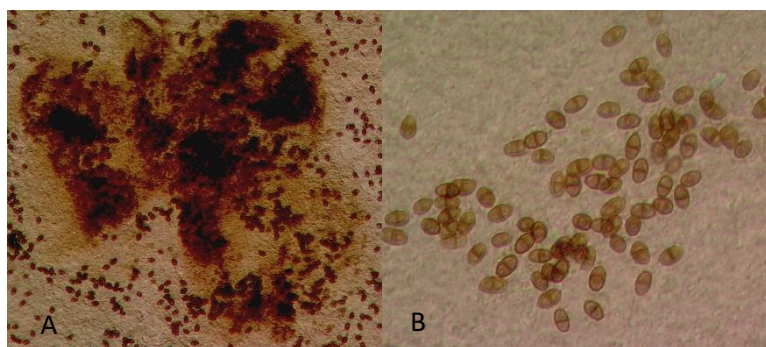


Figura 2. A. Conidiocarpio picnidial. B. Conidios. (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Axio Lab A1).

Debido a la supuesta inestabilidad genética, la morfología de las colonias es variable, desde el micelio blanco algodonoso con ausencia de esporulación, hasta micelio marrón con picnidios negros. Esta variabilidad de las colonias en cuanto a su morfología se obtuvo después de realizar una selección clonal consiguiendo los clones Fa, Fb, Fc, F7a y F7b que se utilizaron para la optimización de la producción del compuesto AD0157 (**Figura A1**).

2.2. Estabilización genética. Tratamiento con Benomilo

Para este ensayo se utilizó benomilo (metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-il carbamato 95%), un fungicida empleado como agente haploidizante (Hastie 1970, Upshall *et al.* 1977, Anderson & Yacoob 1984). Como no todos los clones fueron capaces de esporular, se realizó el ensayo de dos maneras diferentes, por suspensión de esporas y por replicación a placa.

La suspensión de esporas se realizó añadiendo H₂O destilada estéril con ayuda de una pipeta Pasteur sobre la placa esporulada y, con ayuda de un asa de siembra, se raspó para liberar las esporas intentando no coger agar. El volumen de H₂O destilada estéril se recogió con la misma pipeta utilizada anteriormente y se introdujo el contenido en un tubo Falcon de 50 mL. A continuación, se introdujeron 10 µL de la suspensión en una cámara de Neubauer para el conteo de esporas. Una vez calculadas las esporas contenidas por µL, se

realizó la dilución correspondiente hasta conseguir una cantidad final de 100 esporas por placa.

En ambos casos el primer paso fue hacer placas que contuvieran diferentes concentraciones de benomilo. Para ello se realizó una solución stock de 100 ppm en la cual 0.01 g de benomilo se disolvieron en 100 mL de DMSO (dimetilsulfóxido). A continuación, se preparó medio PDAs y tras ser autoclavado, se le añadió el antifúngico hasta conseguir una concentración de 0.5; 1 y 1.5 ppm en el caso del ensayo por replicación en placa y de 0.15; 0.30 y 0.45 ppm en la suspensión de esporas (Hastie 1970, Upshall *et al.* 1977).

Una vez hechas las placas con benomilo se hizo la replicación de todos los clones Fa, Fb, Fc, F7a y F7b por un lado y se sembró la suspensión de esporas de los clones esporulados Fa, F7a y F7b. Todas las placas se mantuvieron en una cámara de cultivo a 24°C.

2.3.AD0157

El compuesto AD0157 (**Figura 3**), fue aislado y purificado en 2008 del caldo de fermentación del hongo marino *Paraconiothyrium sp.* HL-78-gCHSP3-B005 y seleccionado por su actividad antiangiogénica en el proceso de *screening* primario. Además, su estructura química se determinó en el Instituto Biomar, S.A. (León, España) utilizando HPLC-APCI-MS (*high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*) y HRESI-MS (*High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry*). La estructura fue confirmada utilizando RMN (Resonancia Magnética Nuclear) (García-Caballero *et al.* 2014b).

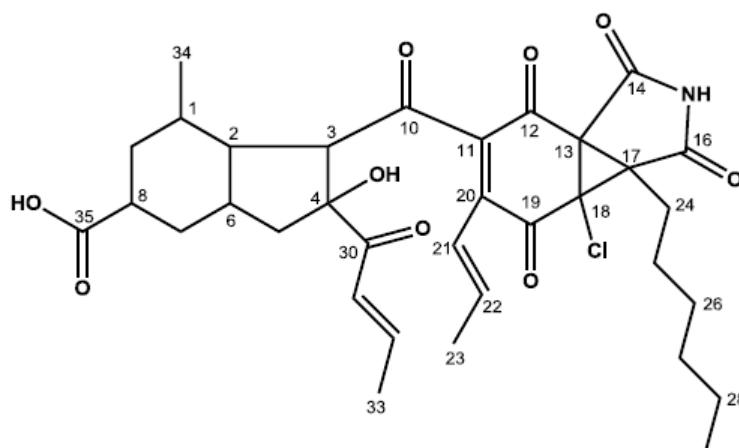


Figura 3. Estructura química del compuesto AD0157. (García- Caballero *et al.* 2014b)

Es un compuesto pirrol tricíclico, cuya fórmula química es $C_{34}H_{40}NO_9Cl$ (Fernández-Medarde *et al.* 2013). Está compuesta por los siguientes grupos funcionales: cetona, ácido

carboxílico, alcohol, halógeno y un grupo pirrol (ciclo aromático de 4 carbonos con un nitrógeno). La primera de ellas se puede observar en los carbonos 10, 12, 14, 16, 19 y 30; el ácido carboxílico en el 35; el alcohol en el 4; y el cloro en la 18.

El compuesto puro es detectado por HPLC (*high-performance liquid chromatography*) (Agilent Technologies 1100 Series) a un tiempo de retención de 4.25 min y un espectro de absorbancia representado en la **Figura 4**. Tiene tres picos máximos de absorbancia a una longitud de onda de 216, 234 y 324 nm.

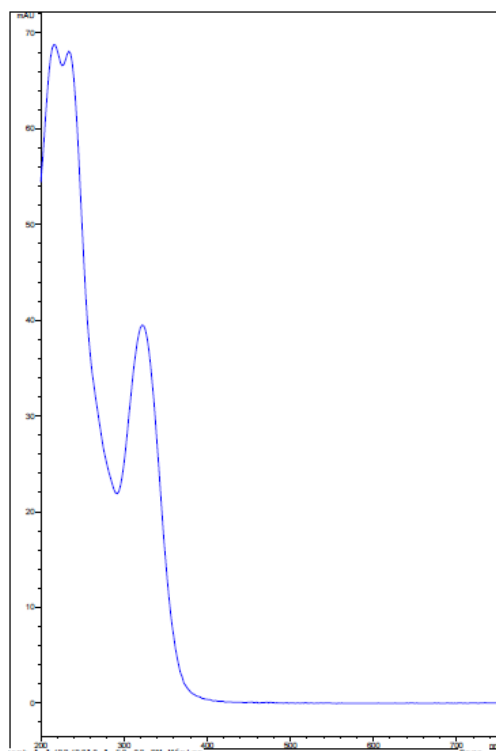


Figura 4. Espectro de absorción del compuesto puro AD0157 obtenido en HPLC (Agilent Technologies 1100 Series).

2.4.Optimización de la producción del compuesto AD0157

Para ajustar las condiciones de fermentación del compuesto AD0157, se realizaron un total de 11 ensayos, cinco utilizando matraces de 0.25 L y 6 ensayos a una mayor escala empleando matraces de 2 L. Los volúmenes de fermentación por matraz fueron de 0.04 y 0.25 L respectivamente. La razón para optimizar la producción en dos volúmenes diferentes es la obtención de compuesto en cantidades suficientes para realizar ensayos *in vivo* (estudios a 0.25 L), y la realización de un escrutinio en fermentación líquida a partir de un número elevado de clones que se van generando al trabajar con la cepa (0.04 L).

En todos, el primer paso fue la creación del inóculo utilizando los clones seleccionados del hongo *Paraconiothyrium sp.* HL-78gCHSP3-B005, Fa, Fb, Fc, F7a y F7b, bien crecidos en placa. El medio utilizado fue JSAs con componentes no solubles. La fermentación tuvo lugar en el medio de producción AG-12. Ambos medios se ajustaron a un pH de 6.7.

2.4.1. Fermentaciones de un volumen de 0.04 L

Las variables estudiadas en este volumen fueron el tiempo de inóculo y fermentación, la cantidad de inóculo introducido en el medio de fermentación y la influencia de la edad de la placa.

El tiempo de inóculo se estudió recogiendo cuatro tacos de placas de 21 días que contenían los clones Fa, Fb, Fc y F7a con un sacabocados e introduciéndolos en matraces Erlenmeyer con 0.01 L de medio JSAs. Las condiciones de cultivo fueron 24 °C en una bandeja de agitación (Küner SHAKER) a 200 rpm (revoluciones por minuto) durante 6, 5, 4 y 3 días. Una vez hecho el inóculo, se dispensaron 0.005 L de inóculo en 0.04 L del medio AG-12 de fermentación contenidos en matraces con una capacidad de 0.25 L. Se mantuvieron a 24 °C y a 200 rpm en cámara de cultivo, durante 14 días. La toma de muestra se realizó en los días 7, 11 y 14.

La cantidad de inóculo necesaria se evaluó recogiendo con un sacabocados cuatro y dos tacos de placas de 16 días con el clon Fb, seleccionado por su mejor producción respecto a otras variables ensayadas, e introduciéndolos en matraces con 0.01 L de medio JSAs. Manteniendo las condiciones de 24 °C y 200 rpm en la cámara de cultivo seleccionando el tiempo de inóculo a 4 días. El pase a medio de producción AG-12 fue de un volumen de 0.0025 y 0.005 L dependiendo de si se introdujeran inicialmente 2 o 4 tacos. Se mantuvieron a 24 °C y a 200 rpm durante 11 días.

En cuanto a la influencia de la edad de la placa, se utilizó el clon Fb a diferentes edades: 136, 85, 67 y 34 días. Se recogieron 4 tacos y se introdujeron en 0.01 L de JSAs contenidos en matraces Erlenmeyer mantenido a 24°C y a 200 rpm durante 4 días. 0.005 L de inóculo se dispensaron a 0.04 L de medio AG-12 mantenido a 24 °C y 200 rpm durante 11 días.

También se evaluó la capacidad productora del compuesto AD0157 de los 5 primeros clones aislados del tratamiento con benomilo: TM01, TM02, TM03, TM04 y TM05. Para ello, se repitió el procedimiento recogiendo 4 y 2 tacos de las placas de 21 días de edad, introduciéndolas en 0.01 L de medio JSAs contenidos en matraces Erlenmeyer mantenidos

en las condiciones anteriores durante 4 días. El pase de 0.0025 y 0.005 L se realizó a 0.04 L de medio AG-12 y se mantuvo en las mismas condiciones durante 11 días.

En todos los casos, al realizar la cosecha (tiempo 11), se midió el volumen miceliar, centrifugación de 10 mL de caldo de cultivo a 3000 rpm durante 10 min, y el pH. La producción del compuesto AD0157 fue monitorizada mediante HPLC (Agilent Technologies 1100 Series).

2.4.2. *Fermentaciones de un volumen de 0.25 L*

Las variables evaluadas en este caso fueron el tiempo de inóculo y fermentación. Además, este volumen se utilizó para la obtención de peso del compuesto AD0157.

El primer ensayo diseñado coincide con el primero de volumen de 0.04 L. El tiempo de inóculo se estudió recogiendo ocho tacos de placas de 53 días que contenían los clones Fa, Fb, Fc, F7a y F7b con un sacabocados e introduciéndolos en matraces Erlenmeyer con 0.04 L de medio JSAs. Las condiciones de cultivo fueron 24 °C en una bandeja de agitación (Küner SHAKER) a 200 rpm durante 6, 5, 4 y 3 días. Una vez hecho el inóculo, se dispensaron 0.015 L de inóculo en 0.25 L del medio AG-12 de fermentación contenidos en matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad. Se mantuvieron a 24 °C y a 200 rpm en la cámara de cultivo durante 18 días. La toma de muestra para la monitorización de la producción mediante HPLC (Agilent Technologies 1100 Series) se realizó a tiempo 2, 4, 7, 9, 11, 14 y 18 días.

En el siguiente ensayo se utilizaron los clones Fa, Fb, Fc y F7a con una edad de placa de 24 días, se tomaron de nuevo ocho tacos con un sacabocados de cada clon y se introdujeron en matraces con 0.04 L de medio JSAs. Se mantuvieron a 24 °C y 200 rpm en la cámara de cultivo durante 6 días. Se dispensaron 0.015 L de inóculo a 0.25 L de medio AG-12 de producción. De nuevo se mantuvieron a 24 °C y 200 rpm en cámara de crecimiento esta vez durante 14 días. La toma de muestra se realizó a tiempo 7, 12 y 14.

El objetivo de los tres últimos ensayos fue conseguir peso del compuesto AD0157. Los volúmenes de fermentación fueron de 5 L en dos de ellos y 4 L en otro. Dichos volúmenes se dividieron a la mitad ya que los tiempos de fermentación estudiados fueron de 11 y 14 días. El tiempo de inóculo utilizado fue de 4 días y el clon seleccionado como mejor productor con interés industrial fue el Fb. El procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente y la toma de muestra fue realizada a 11 y 14 días de fermentación.

En la cosecha de todos los ensayos, además de la toma de muestra para la monitorización de la producción mediante HPLC, se evaluó el volumen miceliar y el pH. Estas dos medidas también se recogieron al dar el pase a medio de producción AG-12 para evaluar el estado del inóculo.

2.5.Extracción y purificación del compuesto AD0157 del caldo de cultivo

La extracción, realizada por el Departamento de Química del Instituto Biomar, S.A. se realizó a partir de 6.25 L de caldo de cultivo obtenidos de la cosecha del hongo marino *Paraconiothyrium sp.* HL-78-gCHSP3-B005. En primer lugar, al caldo se le añadió una mezcla de XAD180, una resina adsorbente, y celite como agente dispersante, dejándolo en agitación durante 1 h. A continuación, se realizó el filtrado desechando el caldo agotado.

A la resina y micelio recogidos se le añadieron 2.25 L de una mezcla de EtOAc/MeOH (acetato de etilo/ metanol) en proporción 3:1 y se mantuvo en agitación durante otra hora. Luego, se volvió a filtrar conservando esta vez el caldo dejándolo decantar durante 1 h. La fase orgánica se conservó y se secó con ayuda de un rotavapor, obteniendo una cantidad final de extracto crudo de 0.136 g.

El extracto fue separado según su polaridad utilizando una cromatografía en placa fina, TLC (*Thin Layer Chromatography*). La fracción correspondiente al compuesto AD0157 fue eluida con acetato-metanol en proporción 1:1, se observó mediante análisis en HPLC (Agilent Technologies 1200 Series ELSD) y se confirmó con MS-TOF (*Time of Flight*). El siguiente paso en la purificación fue una columna cromatográfica de la cual se obtuvieron dos fracciones activas. Cada una se analizó por separado realizando dos columnas cromatográficas en fase reversa obteniendo finalmente 0.0143 g del compuesto AD0157 con una pureza del 70%.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación genética de la cepa y comparación morfológica con otras especies

En total se obtuvieron 26 coincidencias entre la secuencia problema secuenciada en la región ITS1-5.8S-ITS2 y las ya existentes en el GenBank. La primera obtenida con un porcentaje de similitud del 93% fue *Paraconiothyrium variabile*. Otras coincidencias identifican la secuencia problema con el género *Camarosporium*, de nuevo con un porcentaje del 93%.

En referencia a la coincidencia obtenida entre las secuencias del *Paraconiothyrium africanum* con la problema después de realizar el alineamiento múltiple de secuencias utilizando la herramienta Clustal Omega, se encontró una similitud del 84.74% utilizando para la comparación un total de 590 nucleótidos.

3.2. Tratamiento con benomilo: clones obtenidos

3.2.1. Suspensión de esporas

Los clones probados en este ensayo (Fa, F7a y F7b) fueron seleccionados por su capacidad de esporulación. Inicialmente, las concentraciones probadas fueron 0.5; 1 y 1.5 ppm según Hastie (1970), Upshall *et al.* (1977), sin embargo, no se observó ningún crecimiento de manera que se repitió el experimento disminuyendo las concentraciones hasta 0.15; 0.30 y 0.45 ppm.

En total, se aislaron 75 clones, de los cuales 12 (16%) se correspondieron con el clon Fa, 58 (77.33%) con el clon F7a y 5 (6.66%) con el clon F7b. Todos ellos recogidos a concentraciones de 0.15 y 0.30 ppm. En la concentración más alta estudiada, 0.45 ppm, no se observó crecimiento.

De los 12 aislados del clon Fa, 8 (Fa01, Fa02, Fa03, Fa04, Fa05 y Fa06 0.15) correspondientes al 66.66%, se obtuvieron de las placas con una concentración de benomilo de 0.15 ppm. Cabe destacar la aparición de sectores en los aislados Fa01 y Fa02. Sólo 4 (Fa01, Fa02, Fa03 y Fa04 0.30) se aislaron de placas con una concentración de 0.30 ppm. En esta situación no se observó la aparición de sectores.

En cuanto al clon F7a, de los 58 aislados (77.33%), sólo 7 (12.07%) se obtuvieron de las placas de 0.15 ppm (F7a01, F7a02, F7a03, F7a04, F7a05, F7a06 y F7a07 0.15). Los 51 restantes, del clon F7a01 al F7a40 0.30 (87.93%), se aislaron de las placas con una concentración de benomilo de 0.30 ppm. En los clones F7a14, F7a20, F7a23, F7a26 y F7a28 se encontraron dos sectores por placa bien diferenciados (a y b), cabe destacar que en el clon F7a20 los sectores encontrados fueron 3 (a, b y c).

Del clon F7b se aislaron 5 clones que corresponden al 6.66% de los aislados totales. F7b01, F7b02, F7b03 y F7b04 0.15, obtenidos de placas con la menor concentración de antifúngico (0.15 ppm) y sólo el clon F7b01 0.30 de placas con 0.30 ppm de benomilo. En este caso no se observó la aparición de sectores.

En cuanto al tiempo de crecimiento, todos los clones (Fa, F7a y F7b) aparecieron a los 6 días de realizar la siembra de la suspensión de esporas en las placas de menor concentración, 0.15 ppm. A los 13 días se observaron clones en placas de 0.30 ppm. Referente a la aparición de sectores con crecimiento homogéneo y apariencia algodonosa (Day & Jones 1971, Upshall *et al.* 1977, Anderson & Yacoob 1984), sólo se obtuvieron en los aislados de esporas a los 22 y 25 días de los clones Fa y F7a. Podría ser llamativa la existencia de un mayor número de aislados de placas sometidos a mayor concentración del antifúngico. Se realizó así con la finalidad de conseguir el mayor número de clones con menos dotación genética, y así más estables, con la capacidad de producir el compuesto de interés AD0157. Es importante señalar que los sectores aparecidos se replicaron a placas de PDAs.

3.2.2. *Replicación en placa*

En este ensayo los clones utilizados fueron Fa, Fb, Fc, F7a y F7b. Las concentraciones utilizadas fueron 0.5; 1 y 1.5 ppm según Hastie (1970), Upshall *et al.* (1977).

En total, se aislaron 12 clones, de los cuales 2 (16.66%) se correspondieron con el clon Fa, 5 (41.66%) con el clon Fb, 1 (8.3%) con el clon Fc, 3 (25%) con el clon F7a y 1 (8.3%) del clon F7b. A pesar de que se obtuvieron aislados de todas las concentraciones (0.5; 1 y 1.5 ppm), la mayoría (73%) se recogieron de placas con 0.5 ppm.

En cuanto al clon Fa, los dos aislados (TM04 y TM10) fueron recogidos de placas con una concentración de benomilo de 0.5 ppm. De los 5 aislados obtenidos a partir del clon Fb, TM01 y TM15 se consiguieron de placas con una concentración de 0.5 ppm; TM02 de una placa con 1 ppm de concentración y TM05 y TM08 de placas con 1.5 ppm. Del clon Fc sólo se obtuvo un aislado (TM13) a partir de una placa de 0.5 ppm de concentración de benomilo. Del clon F7a, los 3 aislados recogidos (TM04, TM09 y TM12) se recogieron de placas con 0.5 ppm de concentración. Por último, perteneciente al clon F7b se aisló el clon TM11 de una concentración 0.5 ppm de antifúngico.

En cuanto al tiempo de crecimiento, los clones Fa y Fb aparecieron a los 6 días de realizar la replicación en las placas de menor concentración, 0.5 ppm. Los aislados de los clones Fc, F7a y F7b se recogieron a los 20, 12 y 26 días respectivamente de placas con una concentración de 0.5 ppm de benomilo. Cabe destacar que las primeras cepas en crecer tras realizar la replicación en las placas con la mayor concentración del antifúngico (1 y 1.5 ppm) fueron las que contenían el clon Fb, tardando 12 y 14 días. De este modo, se podría confirmar

la hipótesis inicial de su haploidía, ya que según Upshall *et al.* (1977), las cepas haploides son más tolerables al tratamiento. Utilizando esta metodología no se observaron la aparición de sectores.

3.3. Obtención del compuesto AD0157

3.3.1. Fermentaciones de un volumen de 0.25 L

El primer ensayo fue diseñado para determinar el tiempo de inóculo y fermentación, en matraces de 0.25 L, ya que se sospechaba la necesidad de un mayor tiempo de inóculo y fermentación del rutinario, debido a la complejidad de la molécula.

En la **Tabla 1** y **A1** se pueden observar los resultados correspondientes al estudio del tiempo de inóculo y de fermentación necesarios para la obtención del compuesto AD0157. En general, se observó un buen crecimiento y un pH de inóculo más ácido, alrededor de 4.5 debido a la actividad metabólica del hongo, y de fermentación alrededor de 6.7, dato esperable debido a la escasez de crecimiento en medio de producción AG-12.

En lo referente al volumen miceliar en el medio de inóculo JSAs, los datos medidos fueron similares en todos los clones (Fa, Fb, Fc, F7a y F7b) y a diferentes días de inóculo (3,4, 5 y 6 días). Los valores oscilan entre 30 y 54% destacando que en la mayoría se observó mayor crecimiento en tiempos de inóculo de tres y cuatro días excepto el clon F7a que fue a 5 días (43%). Los valores de pH oscilan entre 4.51 y 5.13. Además de ser similares en su conjunto, si se analizan los datos de manera independiente agrupando a los clones según el día de inóculo, se observa que la similitud es mayor. Cabe destacar que los clones F7 (F7a y F7b) tienen valores mayores (de 4.82 a 5.09), alrededor de 5, si se comparan con el resto de clones (Fa, Fb y Fc).

En cuanto al volumen miceliar obtenido de la cosecha en medio AG-12 (**Tabla 1**) es inferior al recogido en el inóculo. Los valores oscilan entre el 15 y 30%, los más bajos corresponden a los clones F7a y F7b. El clon que mantuvo mayor crecimiento fue el Fb alcanzando un valor del 30% a cuatro días de inóculo. El pH registrado en este caso es más alto, oscilando entre 5.62 y 6.89 (**Tabla 1**). Destaca la fermentación inoculada con el clon Fb de 4 días por tener el pH más bajo 5.62. Por último, el color de fermentación observado en todos los clones fue marrón claro.

Tabla 1. Medidas de volumen miceliar y pH del inóculo en medio JSAs y de la cosecha en medio AG-12. Ensayo para evaluar el tiempo de inóculo y fermentación en un volumen de 0.25 L.

Clon	Tiempo inóculo (días)	Medio	Vol. miceliar (%)	pH	Clon	Réplica	Medio	Vol. miceliar (%)	pH
Fa	6	JSAs	30	4.72	Fa	6	AG-12	24	6.62
	5	JSAs	45	4.67		5	AG-12	29	6.64
	4	JSAs	42	4.55		4	AG-12	25	6.74
	3	JSAs	50	4.65		3	AG-12	24	6.72
Fb	6	JSAs	44	4.70	Fb	6	AG-12	27	5.62
	5	JSAs	42	4.68		5	AG-12	27	6.17
	4	JSAs	50	4.57		4	AG-12	30	6.47
	3	JSAs	47	4.64		3	AG-12	23	6.07
Fc	6	JSAs	44	4.66	Fc	6	AG-12	25	6.56
	5	JSAs	47	4.65		5	AG-12	30	6.65
	4	JSAs	47	4.56		4	AG-12	23	6.73
	3	JSAs	53	4.51		3	AG-12	25	6.57
F7a	6	JSAs	40	5.06	F7a	6	AG-12	18	6.49
	5	JSAs	43	5.09		5	AG-12	17	6.39
	4	JSAs	38	4.91		4	AG-12	19	6.47
	3	JSAs	37	4.82		3	AG-12	20	6.53
F7b	6	JSAs	41	5.07	F7b	6	AG-12	19	6.69
	5	JSAs	40	5.13		5	AG-12	15	6.76
	4	JSAs	45	4.91		4	AG-12	17	6.83
	3	JSAs	54	4.90		3	AG-12	18	6.89

Referente a la producción del compuesto AD0157 (**Tabla A1**), a 2 y 4 días de fermentación no se observó pico en el espectro obtenido por HPLC. A día 7, los clones productores fueron el Fa, con inóculo de 6 días; y el Fc, con inóculos de 3 y 4 días. Los picos obtenidos fueron de poca intensidad, 8 mAU (miliunidades de absorbancia) en el primer caso y de 2.1 y 0.5 mAU en el segundo. A día 9, los clones productores fueron el Fa, Fb, Fc y F7a. Cabe destacar el clon Fa con un inóculo de 6 días que fue capaz de producir un pico de 36 mAU a un tiempo de retención de 4.182 min y una coincidencia del 99.94%. A tiempo 11, se observó producción en todos los clones excepto en el clon F7b. Sobresale el clon Fa con inóculo de 6 días de nuevo con un pico de 52 mAU a un tiempo de retención de 4.182 min y una coincidencia del 99.93%. El clon Fb fue el segundo mejor productor con un inóculo de 4 días con un pico de 35 mAU. A 14 días de fermentación, el clon Fb fue el mejor productor de AD0157 con la obtención de picos de 36, 50, 70 y 98.5 mAU de absorbancia con unos tiempos de retención alrededor de 4.18 min en los matraces con inóculos de 6, 5, 4 y 3 días. La coincidencia fue del 99.92% en los dos primeros casos, del 99.87% en el inóculo de 4 días y de un 99.99% en el matraz con un inóculo de 3 días. A tiempo 18, el único clon productor fue el Fb obteniendo un pico de 70 mAU, a un tiempo de retención de 4.186 min y una coincidencia del 99.99%. El clon F7b, sólo fue capaz de producir a un tiempo de fermentación de 14 días y obteniendo un pico máximo de 3 mAU.

Por lo tanto, este ensayo además de confirmar la necesidad de mayor tiempo, permitió descartar el clon F7b ya que sólo se observó producción a tiempo de fermentación de 14 días. En el clon Fa se observó una producción prematura, pero a un tiempo de inóculo de 6 días, lo que a nivel industrial es menos eficaz al alargar el proceso. Sin embargo, el clon Fb destacó por ser el que, a menos tiempo de inóculo (3 y 4 días), produjo picos más altos.

Fijando el tiempo de inóculo en 6 días, los resultados de volumen miceliar y pH se recogen en la **Tabla 2**. Los valores de volumen miceliar de los inóculos recogidos son del 28, 43, 39 y 16 % en los clones Fa, Fb, Fc y F7a. En cuanto al pH los datos obtenidos fueron de 4.23, 4.08, 4.04 y 4.55 respectivamente. En el medio de producción AG-12, se registraron porcentajes de volumen miceliar del 19, 20, 23 y 25% y unos pH de 4.92, 5.55, 5.88 y 6.95 de los clones Fa, Fb, Fc y F7a respectivamente. Referente al color de fermentación, en los clones Fb y el Fc se observó un color crema y en el resto un color marrón claro.

Tabla 2. Medidas de volumen miceliar y pH del inóculo en medio JSAs y de la cosecha en medio AG-12. Ensayo diseñado para evaluar la producción de AD0157 a partir de un inóculo de 6 días.

Clon	Medio	Vol. miceliar (%)	pH	Clon	Medio	Vol. miceliar (%)	pH
Fa	JSAs	28	4.23	Fa	AG-12	19	4.92
Fb	JSAs	43	4.08	Fb	AG-12	20	5.55
Fc	JSAs	39	4.04	Fc	AG-12	23	5.88
F7a	JSAs	16	4.55	F7a	AG-12	25	6.95

En cuanto a la producción de AD0157 (**Tabla 3**) en este caso, a tiempo de fermentación de 12 días, fueron productores todos los clones estudiados: Fa, Fb, Fc y F7a. El mejor productor fue Fc con la obtención de un pico de 27.7 mAU de absorbancia, a un tiempo de retención de 4.177 min y una coincidencia del 99.90%. A un tiempo de 14 días, todos los clones disminuyeron la producción excepto el Fa que la aumentó en un 67%, obteniendo un pico de 22.6 mAU, a un tiempo de retención de 4.186 y una coincidencia del 99.96%.

Comparando los resultados con el ensayo anterior, se observó que las fermentaciones ocurrieron de manera más lenta, encontrándose diferencias más significativas a tiempo de fermentación de 14 días, donde el clon Fa aumentó la producción aproximadamente un 96% de 1 a 22.6 mAU. Sin embargo, los clones Fb y Fc disminuyeron un 79 y un 84% de 36 a 7.6 mAU y de 48 a 7.6 mAU respectivamente. Estos datos se podrían explicar por la bajada del pH a 4.92, 5.55 y 5.88 pertenecientes a los clones Fa, Fb y Fc respectivamente.

Tabla 3. Resultados HPLC a tiempo de fermentación de 7, 12 y 14 días. Ensayo diseñado para evaluar la producción de AD0157 a partir de un inóculo de 6 días.

Clon	Tiempo fermentación (días)	Tiempo retención (min)	Pico (mAU)	Coincidencia (%)
Fa	t7	-	-	-
	t12	4.172	7.4	99.7352
	t14	4.186	22.6	99.9584
Fb	t7	-	-	-
	t12	4.167	14.9	99.9077
	t14	4.189	5.3	99.5262
Fc	t7	-	-	-
	t12	4.177	27.7	99.9036
	t14	4.197	7.6	99.8144
F7a	t7	-	-	-
	t12	4.168	16.2	99.9048
	t14	-	-	-

Después de seleccionar al clon Fb por su interés industrial, por ser el mayor productor con un tiempo de inóculo de 4 días y a un tiempo de fermentación de 11 y 14 días, gracias a los resultados obtenidos de las fermentaciones en matraces con volúmenes de 0.04 y 0.25 L, se organizaron tres ensayos para la obtención de peso del compuesto AD0157 para su posterior extracción y purificación. Los resultados recogidos de volumen miceliar y pH del primer ensayo (volumen de 5 L) se pueden observar en la **Tabla 4**. El inóculo de 4 días creado para la fermentación de 11 días tuvo un volumen miceliar del 48% y se registró un pH de 4.74. El creado para la fermentación de 14 días consiguió un crecimiento del 54% y un pH de 4.24. En la cosecha de la fermentación de 11 días se observó la aparición de dos colores en dos matraces de los 10 existentes, crema y marrón claro. Se analizaron por separado obteniendo unos datos de volumen miceliar de 22 y 10% y de pH de 5.68 y 5.14 pertenecientes al color crema y marrón claro respectivamente. En la fermentación de 14 días el color observado fue marrón claro obteniendo un volumen miceliar del 18% y un valor de pH de 5.43.

Tabla 4. Medidas de volumen miceliar y pH en medio JSAs y AG-12 a tiempo 11 y 14 días. Ensayo obtención de peso de AD0157, volumen total 5 L.

Clon	Medio	Tiempo (días)	Vol. miceliar (%)	pH	Clon	Medio	Tiempo (días)	Vol. miceliar (%)		pH
Fb	JSAs	11	48	4.74	Fb	AG-12	11	1	22	5.68
								2	10	5.14
	JSAs	14	54	4.24		AG-12	14	18	5.43	

Referente a la producción del metabolito de interés, la **Tabla 5** muestra la misma intensidad de pico, 7.5 mAU en los dos tiempos. Apareciendo a un tiempo de retención

similar alrededor de 4.2 min y una coincidencia mayor (99.96%) con el espectro del compuesto puro la fermentación de 14 días.

Tabla 5. Resultados HPLC a tiempo de fermentación de 11 y 14 días. Ensayo diseñado para evaluar la obtención de peso de AD0157, volumen total 5 L.

Clon	Tiempo fermentación (días)		Tiempo inóculo (días)	Tiempo retención (min)	Pico (mAU)	Coincidencia (%)
Fb	t11	1	4	-	-	-
		2	4	4.216	7.5	99.5381
	t14		4	4.226	7.5	99.9589

Los resultados de volumen miceliar y pH del segundo ensayo para la obtención de peso de AD0157, con un volumen total de fermentación de 4 L, se encuentran recogidos en la **Tabla 6**. El crecimiento en ambos inóculos para la fermentación de 11 y 14 días fue del 11%, el pH fue de 3.52 y 3.59 respectivamente. A 11 días de fermentación, el volumen miceliar registrado en el medio de producción AG-12 fue del 12% y el pH de 4.94. Por último, el color percibido fue marrón claro. A tiempo 14, se observaron de nuevo dos colores, uno crema con un crecimiento del 18% y un pH de 5.56, y otro marrón con un volumen miceliar del 16% y un valor de pH de 4.91.

Tabla 6. Medidas de volumen miceliar y pH en medio JSAs y AG-12 a tiempo 11 y 14 días. Ensayo obtención de peso de AD0157, volumen total 4 L.

Clon	Medio	Tiempo (días)	Vol. miceliar (%)	pH	Clon	Medio	Tiempo (días)	Vol. miceliar (%)	pH	
Fb	JSAs	11	11	3.52	Fb	AG-12	11	12	4.94	
	JSAs	14	11	3.59		AG-12	14	1	18	5.56
								2	16	4.91

Los valores obtenidos de la producción del compuesto AD0157 fueron muy bajos en intensidad y corresponden a las fermentaciones de color marrón claro. A tiempo 14, se obtuvo un pico de 4.1 mAU, a un tiempo de retención de 4.243 min y una coincidencia del 98.6% (**Tabla 7**).

Tabla 7. Resultados HPLC a tiempo de fermentación de 11 y 14 días. Ensayo diseñado para evaluar la obtención de peso de AD0157, volumen total 4 L.

Clon	Tiempo fermentación (días)		Tiempo de inóculo (días)	Tiempo retención (min)	Pico (mAU)	Coincidencia (%)
Fb	t11		4	4.123	0.8	99.1548
	t14	1	4	-	-	-
		2	4	4.243	4.1	98.5908

En el último ensayo, volumen total de fermentación de 5 L, los valores recogidos de volumen miceliar y pH de los inóculos (**Tabla 8**) fueron del 35 y 45% y de 5.36 y 4.34 para las fermentaciones de 11 y 14 días respectivamente. Los datos recogidos de la cosecha fueron del 22 y 18% en cuanto a crecimiento y de 5.67 y 4.78 de pH. El color de fermentación observado a tiempo 11 fue crema y a tiempo 14 marrón claro.

Tabla 8. Medidas de volumen miceliar y pH en medio JSAs y AG-12 a tiempo 11 y 14 días. Ensayo obtención de peso de AD0157, volumen total 5 L.

Clon	Medio	Tiempo (días)	Vol. miceliar (%)	pH	Clon	Medio	Tiempo (días)	Vol. Miceliar (%)	pH
Fb	JSAs	11	35	5.36	Fb	AG-12	11	22	5.67
	JSAs	14	45	4.34		AG-12	14	18	4.78

No hubo producción del metabolito en la fermentación de 11 días. Sin embargo, en la de 14 días se observó un pico de 5.5 mAU, a un tiempo de retención de 4.196 y una coincidencia con el espectro del compuesto puro del 99.65% (**Tabla 9**).

Tabla 9. Resultados HPLC a tiempo de fermentación de 11 y 14 días. Ensayo diseñado para evaluar la obtención de peso de AD0157, volumen total 4 L.

Clon	Tiempo fermentación (días)	Tiempo de inóculo (días)	Tiempo retención (min)	Pico (mAU)	Coincidencia (%)
Fb	11	4	-	-	-
	14	4	4.196	5.5	99.6481

En dos de los ensayos diseñados para la obtención de peso, los valores recogidos de volumen miceliar son semejantes. En el otro, se observa un descenso del crecimiento en el inóculo del 78% aproximadamente. En cuanto al pH se observa un descenso si se compara con el primer ensayo (determinar el tiempo de inóculo y de fermentación) realizado. En estas fermentaciones aparecieron dos colores en el medio AG-12, podría explicarse porque al ser realizadas en matraces, las condiciones no son exactamente las mismas pudiendo encontrarse de este modo, diferencias entre ellos. Referente a la producción, el pico máximo alcanzado fue de 7.5 mAU, muy inferior al alcanzado en el primer ensayo analizado en las mismas condiciones (70 mAU).

3.3.2. Fermentaciones de un volumen de 0.04 L

El primer ensayo fue diseñado de nuevo para determinar el tiempo de inóculo y fermentación pero a un volumen menor (0.04 L), debido a la sospecha de necesitar mayores tiempos por la complejidad de la molécula, como se comentó en el apartado 4.3.1.

En la **Tabla 10** y **11** se pueden observar los resultados correspondientes al estudio del tiempo de inóculo y de fermentación necesarios para la obtención del compuesto AD0157. En cuanto al crecimiento del hongo medido como el volumen miceliar (**Tabla 10**) fue similar en todos los clones, alrededor del 25% en todos los días de inóculo excepto en el clon F7a, que fue ligeramente inferior, alrededor del 20%, destacando un volumen miceliar del 30% a 3 días de inóculo. El pH se mantuvo alrededor de 6.7 (pH del medio AG-12) en un rango de 6.37 a 7.40. Cabe destacar que los pH de 7 se observan en su mayoría en el clon F7a. Por último, el color de fermentación observado en todos los matraces fue un marrón claro.

Tabla 10. Medidas de volumen miceliar y pH del inóculo en medio JSAs y de la cosecha en medio AG-12. Ensayo para evaluar el tiempo de inóculo y fermentación en un volumen de 0.04 L.

<i>Clon</i>	<i>Tiempo inóculo (días)</i>	<i>Medio</i>	<i>Vol. miceliar (%)</i>	<i>pH</i>
<i>Fa</i>	6	AG-12	25	6.42
	5	AG-12	25	6.87
	4	AG-12	25	6.63
	3	AG-12	32	7.36
<i>Fb</i>	6	AG-12	20	6.84
	5	AG-12	25	6.60
	4	AG-12	25	7.08
	3	AG-12	23	6.58
<i>Fc</i>	6	AG-12	20	6.37
	5	AG-12	25	6.52
	4	AG-12	26	6.68
	3	AG-12	27	6.60
<i>F7a</i>	6	AG-12	20	6.78
	5	AG-12	20	7.22
	4	AG-12	15	7.27
	3	AG-12	30	7.40

En la **Tabla 11** se muestran los resultados referentes al tiempo de fermentación y a la producción del compuesto de interés AD0157 a 11 días de fermentación, ya que, a 7 días sólo el clon Fc fue capaz de producir un pico de 2 mAU, apareció a un tiempo de retención de 4.197 min y una coincidencia con el compuesto puro del 98.96%. A 11 días, es destacable la producción de un pico de 17.4 mAU por el clon Fb con un inóculo de 4 días. En este tiempo de fermentación los clones Fa y Fc también fueron capaces de producir compuesto, pero en menor cantidad. A 14 días no se observó producción del metabolito en ningún clon.

En este caso, si se compara el ensayo con el realizado con un volumen de 0.25 L, el clon con producción prematura fue el Fc con un tiempo de inóculo de 6 días. Este hecho podría

explicarse por la diferencia de volumen utilizado, lo cual podría interferir tanto en el crecimiento como en la producción del metabolito. De nuevo, el mejor productor fue el clon Fb a menor tiempo de inóculo y de fermentación. Una posible causa a la ausencia de producción a tiempo 14 podría ser la alteración del comportamiento de la cepa al realizar en ensayo en un volumen menor. También habría que tener en cuenta que la cantidad de hongo suministrada al realizar el inóculo para este volumen es mayor en proporción a la cantidad empleada al realizar el inóculo para una fermentación de 0.25 L. Podría existir una posible saturación del medio ya que el volumen miceliar es similar, y esto dar lugar a una posible inhibición de la producción.

Tabla 11. Resultados HPLC a tiempo de fermentación 11 días.. Ensayo para evaluar el tiempo de inóculo y fermentación en un volumen de 0.04 L.

Clon	Tiempo fermentación (días)	Tiempo de inóculo (días)	Tiempo retención (min)	Pico (mAU)	Coincidencia (%)
Fa	t11	6	-	-	-
		5	-	-	-
		4	4.207	7.1	97.6282
		3	-	-	-
Fb	t11	6	4.136	12.9	99.8758
		5	4.215	5.9	99.8701
		4	4.205	17.4	99.6609
		3	-	-	-
Fc	t11	6	-	-	-
		5	4.215	2.6	97.4815
		4	-	-	-
		3	-	-	-

Para el estudio de la cantidad de inóculo que debe ser introducida en el medio AG-12 se utilizó únicamente el clon Fb (mejor productor a menores tiempos de inóculo y fermentación). Los resultados obtenidos (**Tabla 12**), muestran un volumen miceliar superior en los matraces cuyo inóculo fue creado a partir de dos tacos de micelio en placa con un 28% con respecto al 22% obtenido en matraces inoculados con 4 tacos. Referente al pH, el valor registrado fue similar en los dos casos: 6.32 y 6.35 en 2 y 4 tacos respectivamente. En cuanto a la producción del compuesto AD0157, a pesar de que el medio de fermentación tenía un color crema similar al de las anteriores fermentaciones con producción, el inóculo introducido en el medio de producción AG-12 no estaba muy crecido. Esta ausencia de crecimiento podría ser debida a la escasa edad de la placa utilizada (16 días). Para comprobar esta hipótesis se diseñó un ensayo cuyo objetivo fue estudiar la influencia de la edad de placa en la producción de AD0157.

Tabla 12. Resultados volumen miceliar (%) y pH. Ensayo para evaluar la cantidad de inóculo introducida en el medio de fermentación.

<i>Clon</i>	<i>Medio</i>	<i>Vol. miceliar (%)</i>	<i>pH</i>
<i>Fb (4 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	22	6.32
<i>Fb (2 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	28	6.35

La última variable estudiada fue la influencia de la edad de la placa en el crecimiento y en la producción del compuesto. Los resultados (**Tabla 13**) de volumen miceliar además de ser semejantes a los obtenidos en ensayos anteriores, lo fueron entre las distintas fermentaciones, alrededor del 26%. Este dato sorprende ya que la variabilidad en cuanto a la edad de las placas fue notable (136, 85, 67 y 34 días). De nuevo, no se observó producción del metabolito AD0157.

Tabla 13. Resultados de volumen miceliar (%) y pH. Ensayo programado para evaluar la influencia de la edad de placa en la producción de AD0157.

<i>Clon</i>	<i>Edad de la placa (días)</i>	<i>Medio</i>	<i>Vol. miceliar</i>	<i>pH</i>
<i>Fb</i>	136	<i>AG-12</i>	24	7.35
	85	<i>AG-12</i>	24	7.39
	67	<i>AG-12</i>	26	7.40
	34	<i>AG-12</i>	29	7.13

En la **Tabla 14**, se encuentran recogidos los datos correspondientes al volumen miceliar y al pH de los aislados (TM01, TM02, TM03, TM04 y TM05) tras aplicar el tratamiento con benomilo. Además, como los datos obtenidos del estudio de la cantidad de inóculo necesaria a añadir en el medio de producción no fueron concluyentes, se volvió a estudiar en este ensayo.

El volumen miceliar recogido de los matraces que contenían un inóculo hecho con 4 tacos va desde el 18 al 26% de crecimiento, datos similares a los obtenidos en el ensayo donde se evaluaba el tiempo de inóculo y de fermentación necesarios. En los inóculos realizados con 2 tacos de micelio, se obtuvieron unos valores de volumen miceliar entre 24 y 30%, ligeramente superior que los matraces realizados con inóculos de 4 tacos (18 y 26%). En cuanto al pH, en ambos casos se alcanzaron valores similares, alrededor de 7. Cabe destacar que el aislado TM02 obtuvo unos valores de 5.12 y 4.52 en 4 y 2 tacos respectivamente. En este ensayo se observó mayor variabilidad en los colores de fermentación. En los aislados TM01, TM04 y TM05 el color fue crema, en el TM02 marrón anaranjado y por último, en el TM03 un tono verdoso.

Tabla 14. Resultados obtenidos de volumen miceliar (%) y pH. Ensayo para ver la capacidad productora de los clones aislados de benomilo además de estudiar dicha producción modificando la cantidad de inóculo.

<i>Clon</i>		<i>Medio</i>	<i>Vol. Miceliar (%)</i>	<i>pH</i>
<i>TM01</i>	<i>(4 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	18	7.18
	<i>(2 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	24	7.27
<i>TM02</i>	<i>(4 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	26	5.12
	<i>(2 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	25	4.52
<i>TM03</i>	<i>(4 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	25	7.36
	<i>(2 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	25	7.55
<i>TM04</i>	<i>(4 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	24	7.36
	<i>(2 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	26	7.45
<i>TM05</i>	<i>(4 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	20	7.25
	<i>(2 tacos)</i>	<i>AG-12</i>	30	7.37

Referente a la producción de AD0157, sólo la fermentación correspondiente al clon TM02 cuyo inóculo fue realizado con 2 tacos de micelio, fue capaz de producir obteniendo un pico de AD0157 de 2.9 mAU de intensidad, a un tiempo de retención de 4.21 min y una coincidencia con el compuesto puro del 99.64%. La variabilidad del color de fermentación y la existencia de un solo productor de AD0157 no sorprende ya que, las cepas utilizadas son aislados de placas con benomilo, de manera que la pérdida de cromosomas podría haber afectado a genes involucrados en estas características.

3.4. Extracción y purificación del AD0157 del caldo de cultivo del hongo marino

Después de la extracción y posterior purificación del compuesto AD0157 mediante TLC, cromatografía y cromatografía en fase reversa de las dos fracciones activas se obtuvo una cantidad total de 0.0143 g con una pureza del 70%.

4. DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es un proceso complejo que conlleva la actuación de numerosos mecanismos. Las células endoteliales se activan por señales angiogénicas y son estimuladas para sintetizar y liberar enzimas degradativas las cuales le permiten migrar, proliferar y diferenciarse para dar lugar a un nuevo túbulo capilar (García-Caballero *et al.* 2013). Los vasos linfáticos son esenciales y están involucrados en el drenaje de fluidos, procesos inflamatorios y en el transporte de lípidos y vitaminas. Una sobreestimulación del proceso linfangiogénico está relacionado con la metastatización de células tumorales, procesos inflamatorios y el rechazo en transplantes. La inhibición de estos procesos podría ser una potente diana en cuanto a intervención farmacológica (García-Caballero *et al.* 2016).

Hay un número importante de compuestos naturales angio y linfomoduladores. La mayoría aislados de plantas o de microorganismos terrestres. Sin embargo, la investigación farmacéutica está interesada en la búsqueda de nuevos compuestos de origen marino ya que, debido a la gran diversidad de estos hábitats y a las diferentes condiciones existentes, estos organismos son capaces de producir metabolitos secundarios de gran interés en la industria farmacéutica tanto por sus estructuras químicas como el modo de acción, para el desarrollo de nuevos fármacos (García-Caballero *et al.* 2013).

El compuesto AD0157, un pirrol aislado del caldo de fermentación de un hongo marino se describió como antiangiogénico en un proceso de *screening* primario *in vitro*, utilizando un cultivo de células bovinas aórticas endoteliales (BAECs); *ex vivo*, inhibiendo la formación de los microvasos en anillos aórticos de ratón e *in vivo*, utilizando el pez cebra como modelo (García-Caballero *et al.* 2014, 2017b). Para los ensayos realizados como inhibidor de la linfangiogénesis *in vivo*, se utilizaron ratones, esponjas de oreja de elefante y el pez cebra; explantes mesentéricos de rata y anillos linfáticos de ratón *ex vivo* y células endoteliales linfáticas (LECs) *in vitro* (García-Caballero *et al.* 2016, 2017a, 2017b). La capacidad inhibitoria de ambos procesos al actuar sobre las rutas de señalización PI3K/Akt, MAPK/ERK1-2 y VEGF-C/VEGFR-3, dirige la investigación en el campo médico-farmacéutico a la creación de tratamientos que actúen sobre estas dianas (García-Caballero *et al.* 2016).

Además del compuesto AD0157, el toluquinol, una metilhidroquinona aislada del caldo de fermentación del hongo marino *Penicillium sp.* HL-85-ALS5-R04 (García-Caballero *et al.* 2013) y la aeroplysinina-1, una bromotirosina aislada de una esponja marina (Rodríguez-Nieto *et al.* 2002 y García-Vilas *et al.* 2016); entre otros, son compuestos naturales procedentes del medio marino, que actúan como inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis incrementando el número de terapias contra el cáncer. Todos ellos actúan bloqueando la activación de células endoteliales por VEGF (García-Caballero *et al.* 2017b).

Cabe destacar la baja citotoxicidad encontrada utilizando los compuestos citados. En el caso del AD0157, podría ser debido a la presencia del grupo 2,3-pirrolidindiona en su estructura. Saha *et al.* (2012) sugieren en un estudio el intercambio del anillo tiazolidinediona, utilizado en muchos fármacos hipoglucemiantes y contra el cáncer, por análogos del grupo pirrolidinediona, menos tóxico, proponiendo así, una alternativa más segura y selectiva en la creación de nuevos fármacos.

El interés en la obtención de una producción abundante de este compuesto es muy justificable dado su gran interés como molécula bioactiva. El trabajo realizado se centra en la observación del comportamiento inestable de la cepa tanto morfológica como químicamente y en el intento de fijar los parámetros críticos para obtener una buena producción del compuesto que asegure la continuidad del trabajo. Comenzando con la taxonomía de la cepa productora, se observa que a pesar de presentar una secuencia limpia de indeterminaciones que cubre las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADN que codifica para el ribosoma, su porcentaje de similitud con secuencias depositadas en GeneBank es escaso para asignar sin dudas una identificación.

La taxonomía de la cepa, por tanto, está todavía por asignar ya que, los datos obtenidos tras la realización del BLAST muestran un porcentaje de coincidencia de tan sólo el 93% con la especie *Paraconiothyrium variabile*, y al género *Camarosporium*. Ambos pertenecen al Orden Pleosporales pero la asignación de especie e incluso de género es cuestionable debido al bajo porcentaje obtenido. Los datos morfológicos apoyan más al género *Paraconiothyrium* por presentar en algunas especies conidios marrones bicelulares, septados por una pared fina y oscura (Verkley *et al.* 2004, 2008). El género *Camarosporium* contiene ascosporas y conidios multiseptados horizontal y/o verticalmente de color amarillento (Crous *et al.* 2017), más alejado de lo observado en la **Figura 2**. La comparación de la secuencia de la cepa utilizada con la del *Paraconiothyrium africanum*, se realizó por una mayor similitud aparente entre sus conidios, ambos septados, que con los del *Paraconiothyrium variabile*, unicelulares y de color marrón apagado (Verkley *et al.* 2008).

El objetivo fundamental de este trabajo fue conseguir optimizar las condiciones de producción del compuesto AD0157. Para ello se programaron ensayos en matraces de dos volúmenes diferentes (0.04 y 0.25 L) llevados a cabo de manera paralela con la finalidad de obtener por un lado, peso suficiente del compuesto para realizar ensayos *in vivo* (volumen de 0.25 L), y por otro, realizar una selección en fermentación líquida a partir de un número elevado de clones que se van generando al trabajar con la cepa (0.04 L).

Los resultados obtenidos al evaluar los diferentes clones (Fa, Fb, Fc, F7a y F7b) permitieron seleccionar al Fb como mejor productor por ser el que necesita menores tiempos de inóculo y fermentación para producir el compuesto AD0157. Las condiciones finales ajustadas fueron de 4 días para el tiempo de inóculo y de 11 y 14 días para el tiempo de fermentación. De todos modos, los resultados obtenidos no son concluyentes ya que no

presentan una tendencia clara en cuanto a la producción del metabolito. Vuelve a ponerse de manifiesto la pérdida y variabilidad de producción del compuesto AD0157 en condiciones similares de fermentación. Aunque la optimización de estas condiciones en matraz no se descarta, no es probable que el problema de la producción esté en la fermentación sino en la propia variabilidad genética de la cepa.

Esto lleva a plantearse posibles hipótesis que habría que comprobar continuando así con este proyecto. La primera podría ser una posible mutación de la cepa, para ello la solución sería seguir trabajando en tratamientos de estabilización con agentes químicos o mutagénesis con luz ultravioleta. Sin embargo, el problema de esta metodología es la creación de una colección de aislados que habría que comprobar, ya que la pérdida de cromosomas es totalmente aleatoria y por lo tanto, habría que seleccionar en primer lugar los clones estables y a continuación, los productores del metabolito AD0157.

Para realizar esta selección, en primer lugar se podría replicar cada clon a una nueva placa con PDAs observando su crecimiento, si lo mantiene constante y es igual aparentemente al clon del que proviene se congelaría. De este modo se haría una primera selección descartando las cepas más variables. En segundo lugar, se descongelarían los clones preseleccionados y se dejarían crecer en una placa de PDAs. De nuevo se observaría el crecimiento descartando las que no tuvieran una apariencia homogénea y similar al clon original. Una vez hecho el primer escrutinio, se pasaría a estudiar su capacidad productora. Para ello se programaría un ensayo utilizando un volumen de fermentación de 0.04 L y un tiempo de inóculo y fermentación de 4 y 11 días respectivamente. De este modo, sólo se seleccionarían los clones productores ya estabilizados genéticamente.

Otra hipótesis podría estar relacionada con la realización de ajustes en el protocolo. Como los medios utilizados tienen componentes no solubles, una distribución a los matraces no homogénea podría generar condiciones diferentes en cada uno de ellos. Una posible solución sería programar una fermentación en tanque de 5 L, de este modo todo el volumen estaría contenido en un mismo recipiente y las condiciones, que tendrían que ser estudiadas de nuevo, serían las mismas. Por último, cabe la posibilidad de que, al realizar el pase del inóculo al medio de producción, se esté seleccionando el micelio suelto en el medio, frente a los *pellets*. Esto podría influenciar la producción, ya que, aunque se sabe que el compuesto se produce en el micelio, las condiciones de oxigenación son muy distintas en el interior del *pellet* con respecto a la zona externa y al micelio suelto. El micelio suelto está en mayor

contacto con el oxígeno disuelto en el medio, mientras que los *pellets* al estar estructurados en capas concéntricas reciben oxígeno en distintas proporciones según la zona, siendo su interior considerablemente escaso en oxígeno.

Por otra parte, se comprobó que sólo existe producción en el medio AG-12 por una prueba de medios realizada previamente. Para incrementar dicha producción, se podría realizar una optimización del medio de producción (AG-12) y del inóculo (JSAs). De este modo se encontrarían las concentraciones adecuadas para una buena producción. Además, también se podría hacer uso de elicitores positivos para un aumento notable de la producción de un modo similar al que ejercen el sorbitol, la glucosa o el ácido salicílico en la producción del taxol (fármaco anticancerígeno) por un *Paraconiothyrium variabile* terrestre aislado del tejo (*Taxus baccata*) (Somjaipeng *et al.* 2013, 2015).

5. CONCLUSIÓN

Tras realizar el tratamiento con benomilo, un agente químico utilizado en estabilización, no se obtuvieron datos concluyentes en cuanto a la estabilización genética de la cepa debido a la necesidad de comprobar dicha estabilidad y la capacidad productora de los aislados obtenidos. Por lo tanto, el problema de la variabilidad extrema por parte de la cepa no está resuelto y por ello, sería necesario continuar con esta investigación.

Después de intentar definir las condiciones de fermentación para obtener una producción mejorada del compuesto AD0157, parece que el mejor tiempo de inóculo para las fermentaciones de un volumen de 0.04 y 0.25 L son 4 días. Sin embargo, el tiempo de fermentación varía a diferentes volúmenes, siendo de 11 días para fermentaciones de 0.04 L. Para un volumen de 0.25 L este tiempo no está tan definido, encontrándose a los 11 y 14 días. Los parámetros del resto de variables estudiadas (cantidad de inóculo necesaria e influencia de la edad de la placa) no se encuentran definidos debido a que los resultados obtenidos no son concluyentes. De nuevo, sería necesario continuar con esta investigación para asegurar las condiciones ya establecidas y determinar las que faltan.

Dado que el tiempo de realización del trabajo fue de cuatro meses y que el tiempo necesario para generar y evaluar una fermentación es de 3-4 semanas, es complicado obtener resultados favorables en tan poco tiempo. Aun así, aunque el trabajo realizado no permitió establecer los criterios de fermentación favorables a la producción del compuesto, sí se obtuvo información valiosa, que apunta hacia la pérdida de capacidad de producción de la

cepa. Por tanto, investigaciones futuras se centrarán en la estabilización u obtención de clones haploides que produzcan el compuesto de manera constante en el tiempo.

6. REFERENCIAS

- Anderson, JB., Yacoob, R. (1984). Benomyl-induced somatic segregation in diploid *Armillaria mellea*. *Phytopathology*. 74: 612-615.
- Blasco, L., Feijoo-Siota, L., Veiga-Crespo, P., Villa, TG. (2008). Genetic stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* oenological strains by using benomyl. *Int. Microbiol.* 11: 127-132.
- Chiodelli, P., Rezzola, S., Urbinati, C., Signori, FF., Monti, E., Ronca, R., Presta, M., Rusnati, M. (2017). Contribution of vascular endothelial growth factor receptor-2 sialylation to the process of angiogenesis. *Oncogene*. 36: 6531-6541.
- Crous, WP., Groenewald, ZJ. (2017). The Genera of Fungi-G4: *Camarosporium* and *Dothiora*. *IMA Fungus*. 8(1): 131-152.
- Damm, U., Verkley, GJM., Crous, PW., Fourie, PH., Haegi, A., Riccioni, L. (2008). Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*. 20: 9-17.
- Day, AW., Jones, JK. (1971). p-Fluorophenylalanine-induced mitotic haploidization in *Ustilago violácea*. *Genet. Res. Camb.* 18: 299-309.
- Fernández-Medarde, A., Cañedo, L., Vinuesa, MA., Sánchez-López, JM., Calvo, B., Martínez-Insua, M., Quesada, AR., García-Caballero M., Medina, MA. Compounds, Their Preparation and Use in Medicaments. Patente Europea. EP 13382284. 09-07-2013.
- García-Caballero, M., Marí-Beffa, M., Cañedo, L., Medina, MA., Quesada, AR. (2013). Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiostatic that interferes the Akt pathway. *Biochem. Pharmacol.* 85: 1727-1740.
- García-Caballero, M., Cañedo, L., Fernández-Medarde, A., Medina, MA., Quesada, AR. (2014a). The Marine Fungal Metabolite, AD0157, Inhibits Angiogenesis by Targeting the Akt Signaling Pathway. *Mar. Drugs*. 12: 279-299.
- García-Caballero, M., Cañedo, L., Fernández-Medarde, A., Medina, MA., Quesada, AR. (2014b). The Marine Fungal Metabolite, AD0157, Inhibits Angiogenesis by Targeting the Akt Signaling Pathway. *Mar. Drugs*. 12 (Suppl): S1.
- García-Caballero, M., Blacher, S., Paupert, J., Quesada, AR., Medina, MA., Noël, A. (2016). Novel application assigned to toluquinol: inhibition of lymphangiogenesis by interfering with VEGF-C/VEGFR-3 signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* 173: 1966-1987.
- García-Caballero, M., Paupert, J., Blacher, S., Van de Velde, M., Quesada, AR., Medina, MA., Noël, A. (2017a). Targeting VEGFR-3/-2 signaling pathways with AD0157: a potential strategy against tumor-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastases. *J. Hematol. Oncol.* 10: 122.
- García-Caballero, M., Quesada, AR., Medina, MA., Marí-Beffa, M. (2017b). Fishing anti(lymph)angiogenic drugs with zebrafish. *Drug Discov. Today*. 0: 1-9.
- García-Caballero, M., Martínez-Poveda, B., Medina, MA., Quesada, AR. (2017c). The Natural Antiangiogenic Compound AD0157 Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells. *Front. Pharmacol.* 8: 802.
- García-Vilas, JA., Martínez-Poveda, B., Quesada, AR., Medina, MA. (2016). Aeropylsinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug. *Mar. Drugs*. 14(1): 1.
- Hastie, AC. (1970). Benlate-induced instability of *Aspergillus* Diploids. *Nature*. 226: 77.

- Organización Mundial de la Salud [sede Web]. WHO Media Center; 2017 [Acceso 27 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- Pitt, JJ., Hocking, AD. (2009). Methods for Isolation, Enumeration and Identification. In: Fungi and Food Spoilage. Springer, Boston, MA: 19-52.
- Rodríguez-Nieto, S., González-Iriarte, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., Medina, MA., Quesada, AR. (2002). Antiangiogenic activity of aeropylsinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. FASEB J. 16 (2): 161-163.
- Saha, S., Chan, DSZ., Lee, CY., Wong, W., New, LS., Chui, WK., Yap, CW., Chan, ECY., Ho, HK. (2012). Pyrrolidinediones reduce the toxicity of thiazolidinediones and modify their anti-diabetic and anti-cancer properties. Eu. J. Pharmacol. 697: 13-23.
- Somjaipeng, S. Ecophysiological approaches to enhance production of the anti-cancer drug taxol by *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum* and lysozyme by *Pichia pastoris*. [tesis doctoral]. Cranfield: Cranfield Health/ School of Applied Sciences. University of Cranfield; 2013.
- Somjaipeng, S., Medina, A., Kwasna, H., Ordaz-Ortiz, J., Magan, N. (2015). Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variabile* from English yew trees (*Taxus baccata*). Fungal Biol. Biotechnol. 119 (11): 1022-1031.
- Upshall, A., Giddins, B., Mortimore, ID. (1977). The Use of Benlate for Distinguishing Between Haploid and Diploid Strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. J. Gen. Microbiol. 100: 413-418.
- Varinska, L., Kubatka, P., Mojzis, J., Zulli, A., Gazdikova, K., Zubor, P., Büsselberg, D., Caprnda, M., Opatrilova, R., Gasparova, I., Klabusay, M., Pec, M., Fibach, E., Adamek, M., Kruzliak, P. (2017). Angiomodulators in cancer therapy: New perspectives. Biomed. Pharmacother. 89: 578-590.
- Verkley, GJM., da Silva, M., Wicklow, DT., Crous, PW. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. Stud. Mycol. 50: 323-335.

7. ANEXO

Tabla A1. Resultados HPLC a tiempo de fermentación de 7, 9, 11, 14 y 18 días. Ensayo para evaluar el tiempo de inóculo y fermentación en un volumen de 0.25 L.

Clon	Tiempo fermentación (días)	Tiempo de inóculo (días)	Tiempo retención (min)	Pico (mAU)	Coincidencia (%)
Fa	t7	6	4.185	8	98.2
		5	-	-	-
		4	-	-	-
		3	-	-	-
	t9	6	4.182	36	99.9381
		5	4.182	3	98.5
		4	-	-	-
		3	-	-	-
	t11	6	4.182	52	99.9264
		5	4.182	8	99.7692
		4	-	-	-
		3	4.182	3	99.8730
t14	6	4.183	1	99.6282	
	5	4.189	15	99.9717	
	4	-	-	-	
	3	-	-	-	
Fb	t9	6	4.176	2.5	95.8884
		5	4.177	1	97
		4	4.175	6	97.3923
		3	4.176	8	99.6665
	t11	6	4.180	14	99.779
		5	4.181	16	99.630
		4	4.181	35	99.8048
		3	4.183	34	99.8465
	t14	6	4.184	36	99.9243
		5	4.181	50	99.9266
		4	4.189	70	99.8685
		3	4.189	98.5	99.9890
	t18	6	4.176	40	99.9868
		5	4.175	30	99.9801
		4	-	-	-
		3	4.186	70	99.9906
Fc	t7	6	-	-	-
		5	-	-	-
		4	4.189	2.1	96.54
		3	4.176	0.5	95.37
	t9	6	4.171	5	94.1891
		5	4.181	4	97.12
		4	4.187	10	95.4938
		3	4.185	12	98.1436
	t11	6	4.181	20	99.6188
		5	4.184	32	99.7327
		4	4.182	32	99.8532
		3	4.184	28	99.8035
	t14	6	4.187	48	99.8812
		5	4.191	35	99.8904
		4	4.185	8	99.9247
		3	-	-	-
F7a	t9	6	-	-	-
		5	4.189	4	99.6202
		4	4.191	10	98.6454
		3	-	-	-
	t11	6	-	-	-
		5	4.185	10	99.9511
		4	4.187	14	99.5781
		3	-	-	-
	t14	6	4.178	5	99.8132
		5	-	-	-
		4	-	-	-
		3	-	-	-
F7b	t14	6	-	-	-
		5	4.188	1	99.4660
		4	4.186	0.5	99.1474
		3	4.190	3	99.8456

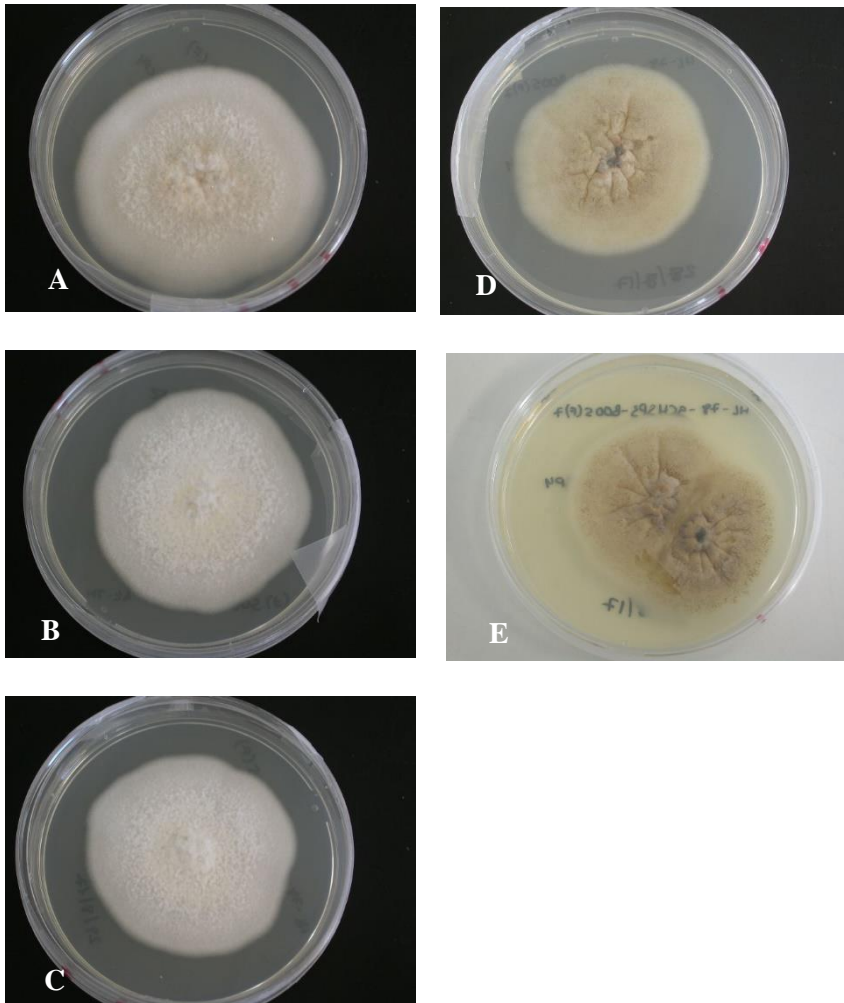


Figura A1. **A.** Clon Fa. **B.** Clon Fb. **C.** Clon Fc. **D.** Clon F7a. **E.** Clon F7b. Clones utilizados en los diferentes ensayos programados para el estudio de las diferentes variables: tiempo de inóculo y de fermentación, cantidad de inóculo e influencia de la edad de la placa