

ANÁLISIS QUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO *XYLARIA*

PRELIMINARY CHEMICAL ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM FOUR SPECIMENS *XYLARIA* GENUS

Isabel Mogollón^{1*}, Shailili Moreno², Teresa Iturriaga¹, Antonieta Taddei³

Universidad Simón Bolívar, (1) Departamento de Biología de Organismos, Laboratorio de Micología, (2) Departamento de Química, Laboratorio de Fitoquímica, (3) Departamento de Biología Celular, Laboratorio de Productos Naturales y Biotecnología, Sartenejas-Venezuela

*autor de contacto (e-mail: just.izza@hotmail.com)

Recibido: 02/05/2012 - Evaluado: 04/07/2012 - Aceptado: 17/07/2012

RESUMEN

Estudios *in vitro* de cuatro especies de hongos pertenecientes al género *Xylaria* han demostrado que son productores de metabolitos secundarios bioactivos. El objetivo de este estudio fue analizar la bioactividad y composición química de los extractos de los morfotipos USB: 1102, 1103, 1104 y 1105. Las muestras recolectadas en el estado Miranda, Venezuela, han sido identificadas como *Xylaria* spp. por sus características morfológicas. Los extractos fueron obtenidos con una mezcla cloroformo-etanol-hexano (3:2:1). Todos ellos mostraron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*; adicionalmente, todos los extractos, excepto el de 1105, inhibieron el crecimiento de *Candida tropicalis*. Se analizaron por cromatografía de capa fina mostrando ser mezclas de diferentes compuestos. Finalmente, el análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas permitió identificar la 4,4'-diocildifenilamina como el compuesto mayoritario común de todos los morfotipos, el cual podría ser responsable de la bioactividad observada.

ABSTRACT

In vitro studies of four specimens of fungi assigned to the genus *Xylaria* have shown they are producers of bioactive secondary metabolites. The aim of this study was to analyse the bioactivity and chemical composition of the extracts from the morphotypes USB: 1102, 1103, 1104 and 1105. The samples were collected from Miranda state, Venezuela; and these have been identified as *Xylaria* spp. due to their morphological characteristics. The extracts were obtained with a mixture of chloroform, ethanol and hexane (3:2:1). All of them show antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*; besides inhibiting the growth of *Candida tropicalis*. Thin layer chromatography analysis showed to be mixtures of different compounds. Finally, the analysis by gas/mass chromatography displayed the presence of 4,4'-diocildifenilamina as the majority compound common to all four morphologies, which could be responsible for the observed bioactivity.

Palabras clave: *Xylaria* spp.; bioactividad; metabolitos secundarios; hongos endofíticos

Keywords: *Xylaria* spp.; bioactivity; secondary metabolites; endophytic fungi

INTRODUCCION

Los hongos endófitos son microorganismos que habitan dentro de especies vegetales (en espacios inter e intracelulares), en un estado de simbiosis tipo mutualismo o de comensalismo, sin provocarles síntomas de enfermedad aparente (Lodge, 2001). La producción de metabolitos secundarios, tóxicos para herbívoros o microorganismos patógenos, es una característica común de muchos mutualismos endófitos y proporciona una base para la selección natural favoreciendo la simbiosis con la planta hospedera (Carroll, 1988).

La observación de los productos naturales de microbios endófitos ha permitido estudiar el grado de inhibición parcial o total de una amplia variedad de agentes nocivos causantes de enfermedades, incluyendo pero no limitando, a fitopatógenos como bacterias, hongos, virus y protozoarios que afectan a seres humanos y animales (Strobel & Bryn, 2003). El desarrollo de conocimientos sobre los hongos endofíticos genera gran interés por sus posibles aplicaciones como biocidas eficientes, de baja toxicidad y alta compatibilidad con el medio ambiente.

Estudios *in vitro* de hongos endófitos del género *Xylaria* han demostrado la producción masiva de metabolitos activos los cuales también pueden producirse cuando el hongo habita en los tejidos vivos de plantas (Davis *et al.*, 2003), incluso se ha demostrado que pueden proteger a su hospedador de necrosis foliar y muerte inducida por algún patógeno (Arnold *et al.*, 2003). Se han descubierto en *Xylaria* spp. nuevos compuestos y de características únicas como lo son: lactonas (Boonphong *et al.*, 2001), sesquiterpenoides (Smith *et al.*, 2002), xilaramida (Schneider *et al.*, 1996), xilarina (Schneider *et al.*, 1995), xiloquetales (Lin *et al.*, 2001), globoscina y maldoxina (Xing-Na *et al.*, 2005), entre otros; la mayoría de los cuales presentan actividad antifúngica, como por ejemplo, contra el fitopatógenos *Nematos poracoryli* (Schneider *et al.*, 1996). Los hongos endófitos son probablemente una de las principales fuentes potenciales de metabolitos bioactivos útiles para la medicina contemporánea (Dreyfuss & Chapela, 1994).

Estos antecedentes sugieren que las relaciones entre los organismos del género *Xylaria* y sus hospederos son complejas (Boonphong *et al.*, 2001). Para comprender plenamente la ecología, bioquímica y otros aspectos de este grupo, son necesarios estudios más completos. Con el objetivo de analizar la bioactividad y composición química de morfotipos del género *Xylaria*, en esta investigación se estudiaron cuatro cepas originarias de Venezuela; el estudio se inició con la caracterización morfológica de cada cepa y obtención de sus extractos orgánicos; posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de dichos extractos y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para identificar algunos compuestos químicos presentes en ellos, pudiendo ser los causantes de la actividad antimicrobiana observada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

En Junio de 2011, se colectaron cuatro morfotipos diferentes sobre troncos en descomposición, en el Bosque de la Virgen (10°45'03.41" N, 66°51'09.66" O), zona El Volcán, Estado Miranda (Venezuela). Las muestras fueron identificadas como pertenecientes al género *Xylaria* (clase Sordariomycetes, familia Xylariaceae, orden Xylariales) por sus características macro y microscópicas (color y aspecto del estroma bien desarrollado, color y aspecto de las ascomas, color y aspecto de las ascosporas) determinadas por observación directa en microscopio compuesto con 100X de aumento (Ju & Rogers, 1999). Luego se almacenaron en estufa a 30°C y se procesaron en un lapso de 48 h. Cada morfotipo está disponible en la "Micoteca Lorenzo De Montemayor" (MLDM), bajo los siguientes rótulos, los números asignados a cada muestra corresponden tanto a los especímenes en el herbario como a los cultivos:

- 1: *Xylariasp.* USB-1102
- 2: *Xylariasp.* USB-1103
- 3: *Xylariasp.* USB-1104
- 4: *Xylariasp.* USB-1105

Aislamiento *in vitro* de los morfotipos

Se esterilizaron superficialmente varios ascomas de cada morfotipo, mediante inmersión consecutiva durante 1 min en alcohol 70% (v/v), 3 min en hipoclorito de sodio 10% (v/v), 1 min en alcohol 70% (v/v) y cinco lavados de 1 min cada uno con agua destilada estéril. El procedimiento se realiza cuidadosamente, ya que sólo el ectoestroma (área superficial de los ascomas), y no las microestructuras, deben entrar en contacto con estos reactivos.

Después de la esterilización, el material se cortó en dos secciones, donde se podía observar la presencia de peritecios internos (niveles superiores del ascoma); se observó la cavidad peritecial (lóbulo donde se ubican los ascos y ascosporas) y se colocó una gota de agua para luego extraer los ascos con una aguja de disección; inmediatamente se inocularon en cápsulas de Petri previamente servidas con agar de extracto de Malta (MEA, Himedia) dosificado con 0,05% (m/v) de Cloranfenicol (ALDRICH). Luego se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días en Erlenmeyers de 500 ml. Éstos se repicaron hasta obtener cultivos axénicos.

Fermentación y Obtención del extracto

Para la obtención en masa y posterior obtención de los extractos de cada morfotipo, éstos fueron sembrados, tomando porciones de 2 cm² de cada cultivo axénico obtenido; estos inóculos se colocaron dentro de Erlenmeyers de 500 mL contentivos de 200 mL de medios de cultivo sólido. A fin de evaluar el medio en el cual se produce mayor cantidad de biomasa y mayor estromatización, se utilizaron dos medios sólidos: MEA y Agar de Maíz (CMA, Himedia), ambos dosificados con 0,05% (m/v) de cloranfenicol. Posteriormente, se incubaron por 2 meses a temperatura ambiente en condiciones de laboratorio.

Se pesó la biomasa y se extrajeron los micelios, macerándolos embebidos en una mezcla de cloroformo, etanol y hexano (3:2:1v/v) (Castillo-Machalskis *et al.*, 2006); las mezclas se trituraron en mortero y se filtraron separando el micelio del extracto crudo, se colocaron en viales y la mezcla de solventes se dejó evaporar a presión atmosférica por 2 semanas, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Finalmente, se determinó la masa de cada extracto seco y el porcentaje de rendimiento en la obtención de cada uno de ellos.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de cada extracto (40 mg/mL en cloroformo) fue determinada mediante la técnica del antibiograma o sensibilidad bacteriana por difusión en discos (Bauer *et al.*, 1966). Se utilizaron soluciones de 1x10⁸ bacterias/mL de las bacterias Gram-positivas *S. aureus* (ATCC 25923) y *B. cereus* (ATCC 14579); las cepas Gram-negativas *E. coli* (ATCC 35218) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) en medio de cultivo Mueller Hinton; la levadura *C. tropicalis* (MLDM 372) y el patógeno *Fusarium oxysporum* (MLDM 343) en medio de cultivo Papa Dextrosa. Se utilizó un blanco del solvente CHCl₃ (control negativo) y se emplearon, como controles positivos, discos de las siguientes sustancias antibióticas y antifúngicas comerciales: Amikacina (30µg), Polimixina (300UI), Sulfametoxazol/Trimetropina (23,75µg; 1,25µg), Nistatina (100UI) marca BBL- Sensi-Disc y Anfotericina B (25µg/ml, 7 µL) marca Sigma, según el bioensayo y el microorganismo patógeno utilizado.

Análisis químico de los extractos e Identificación de metabolitos

Se realizó cromatografía de capa fina de cada extracto (40 mg/mL en diclorometano/etanol 1:1) sobre cromatofolios de Silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK) de 0,25 mm; sembrando 1 µL de las muestras mediante inyección directa sobre la placa, con una micropipeta capilar de vidrio. Además, se analizaron los extractos (2 mg/mL en cloroformo) mediante cromatografía de gases con detector de masas (CG/EM) en un cromatógrafo de gases HP5890 Serie II, en modo sin división de inyección, acoplado a un espectrómetro de masas HP5971A, con fuente de ionización por impacto electrónico con energía de ionización de 70 Ev. Las condiciones del cromatógrafo se ajustaron a: temperatura del inyector: 270°C, rampa de calentamiento desde 70°C hasta

300°C, a una velocidad de 10 °C/min, y temperatura del detector 300°C; cada análisis se realizó a presión constante de 10 psi para el gas de arrastre en el puerto de inyección. La identificación se llevó a cabo por comparación con los espectros reportados en la base de datos NIST® (NIST, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSION

Clasificación taxonómica y cultivo *in vitro*

Las muestras colectadas son morfotipos característicos de organismos del género *Xylaria*, mostrando ectoestroma oscuro en la madurez y endoestroma claro con peritecios negros incluidos y con ostiolos tapizados en ellos, también revestidos de paráfisis, ascos cilíndricos y ascosporas oscuras unicelulares (Ju & Rogers, 1999). Asimismo, cada muestra evidenció diferencias morfológicas que las distinguían entre ellas: textura del ectoestroma (de liso a rugoso), tamaño (de 1cm-6cm de largo y 0,1cm-1cm de ancho) y morfología de los ascomas (con o sin lóbulo en el ápice del estroma, con o sin estípite aparente, con o sin fase anamorfa en el ápice del estroma), entre otras características (Figura 1). En condiciones *in vitro*, las cepas mostraron un crecimiento acorde a lo reportado en hongos de este género (Dreyfuss & Chapela, 1994), y a partir de aproximadamente la segunda semana la mayoría de los morfotipos mostraban estromatización; las muestras USB-1102 y USB-1105 mostraron pequeñas formaciones de ascomas tempranos.

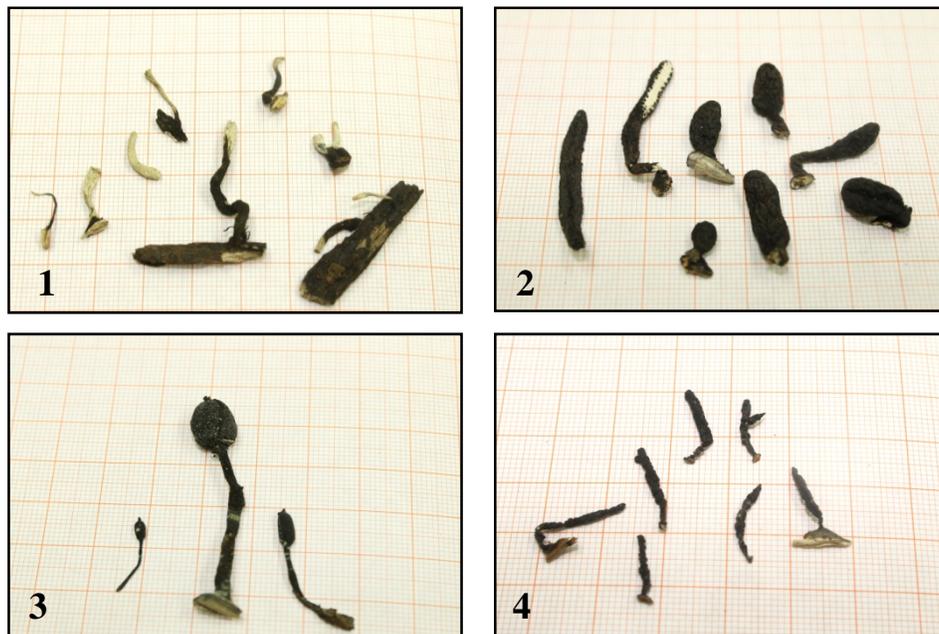


Fig. 1.: Ascomas de los morfotipos colectados. 1. USB-1102, 2. USB-1103, 3. USB-1104, 4. USB-1105

Los cuatro morfotipos estudiados se inocularon en los medios MEA y CMA, mostrando un crecimiento más abundante y rápido en medio de cultivo MEA, por lo que éste fue el medio seleccionado para la obtención en masa de cada una de las cepas, y posterior obtención de los extractos. Este medio está compuesto por digesto peptídico de tejido animal, maltosa, dextrina y agar; a diferencia del CMA que está compuesto por infusión de harina de maíz y agar; puede considerarse que la presencia de suplementos peptídicos, maltosa como fuente de carbono y diferencias en el pH de ambos medios, influyeron en la velocidad de crecimiento y desarrollo de los morfotipos. Estudios previos, realizados con otros microorganismos, han demostrado la importancia de la composición del medio de cultivo en el cual crece la especie ensayada, incluyendo su efecto sobre la producción de sustancias bioactivas (Moreno *et al.*, 2011; Thakur *et al.*, 2009).

Obtención de los extractos orgánicos y evaluación de su actividad antimicrobiana

En la Tabla 1 se muestra la masa y el porcentaje de rendimiento del extracto orgánico obtenido para cada cepa, siendo USB-1103 la que produce mayor cantidad de compuestos solubles en la mezcla de extracción.

Tabla 1: Cuantificación de los extractos orgánicos de *Xylaria* spp.

Muestra	Masa (mg)	Rendimiento (%)
USB-1102	14	0,091
USB-1103	30	0,199
USB-1104	20	0,133
USB-1105	5	0,034

Los extractos mostraron actividad antibacteriana de amplio espectro (Tabla 2), inhibiendo el crecimiento de cepas Gram (+) y Gram (-), al igual que los fármacos comerciales de este tipo; se destaca el efecto observado contra *B. cereus*, ya que todos los morfotipos exhiben mayor actividad que la ejercida por el antibiótico comercial Amikacina. Asimismo, todas las muestras, excepto USB-1105, mostraron actividad contra *C. tropicalis*; efectivamente todos los extractos mostraron bioactividad contra los microorganismos ensayados y, en la mayoría de los casos, los resultados son comparables a los mostrados por los antibióticos comerciales. Por otra parte, ninguna de las muestras mostró bioactividad contra *F. oxysporum*. Estos resultados son importantes tomando en cuenta que los extractos, a diferencia de los antibióticos, son una mezcla de compuestos y no una sustancia pura en alta concentración, por lo que en la fase actual de esta investigación se busca aislar los principios activos, para determinar su concentración mínima inhibitoria y contrastar directamente los resultados.

Tabla 2: Actividad antimicrobiana de extractos de *Xylaria* spp. (diámetro de la zona de inhibición en mm).

Microorganismo	Extractos de los morfotipos				Controles					
	1102	1103	1104	1105	AN	SXT	PB	AB	NY	CHCl ₃
<i>Escherichia coli</i>	10	10	10	7	14	10	-	-	ND	-
<i>Bacillus cereus</i>	18	20	28	18	16	-	-	-	ND	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	12	16	-	-	16	-	8	ND	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	10	18	8	-	-	18	-	ND	-
<i>Candida tropicalis</i>	30	8	12	-	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	20	-

ND: no determinado; (-): ausencia de actividad; CHCl₃: cloroformo (discos con el solvente utilizado-control negativo).

Controles positivos antibacterianos comerciales Amikacina (AN), Polimixina B (PB), Sulfametoxazol/trimetoprima (SXT), Anfotericina B (AB) y el antimicótico Nistatina (NY).

Análisis cromatográfico de los extractos

Las cromatografías de capa fina se desarrollaron en el mismo sistema de solventes con el cual se disolvieron los extractos (diclorometano/etanol: 1:1v/v) y se observaron bajo luz UV, revelando fluorescencias de distintas tonalidades (a UV₂₅₄ y a UV₃₆₅) en todas las muestras. Esto sugiere, en primer lugar diferencias en la composición de cada extracto y, en segundo lugar la presencia de una variedad de compuestos disímiles en cada caso, que además tienen sistemas conjugados en sus estructuras, los cuales son característicos de este comportamiento óptico.

El análisis por CG/EM del extracto de cada morfotipo muestra que están constituidos por compuestos de naturaleza muy diversa (Tabla 3). En general, tienen componentes hidrocarbonados (alcanos y alquenos), aminas, ésteres,

aldehídos, alcoholes, cetonas, entre otros. Cabe destacar que algunos de los componentes son identificados en la mayoría o en todos los extractos (ej: 4,4'- dioctildifenilamina), por lo que podrían ser productos comunes en el metabolismo de las especies del género *Xylaria*. La 4,4'- dioctildifenilamina es identificada como compuesto común a todos los morfotipos, en promedio con un 21,01% del área, apareciendo a un tiempo de retención (TR) de 25,742min y con un 82,3% de certeza en la identificación. Cabe destacar que, trabajos anteriores reportan este compuesto como agente regulador del crecimiento de plantas, con capacidad antiozonante, y más específicamente se ha usado como medida reductor de las manchas causadas por ozono en ciertos organismos vegetales (Taylor & Rich, 1962). Un compuesto similar a la 4,4'- dioctildifenilamina, la difenilamina (DFA), es conocida comercialmente como un fungicida contra hongos levaduriformes (Sholberg *et al.*, 2004) y que también altera el metabolismo de algunas especies de *Candida* (Phai y Reuter, 1976); estos antecedentes postulan la posibilidad de que la 4,4'- dioctildifenilamina, identificada en todos los morfotipos estudiados de *Xylaria*, sea el compuesto responsable de la actividad antimicótica observada contra *Candida tropicalis* en la mayoría de las muestras (Tabla 2), con la excepción del morfotipo USB-1105 el cual no mostró actividad antifúngica, efecto que podría deberse a la poca masa obtenida de este extracto (Tabla 1).

Como ejemplo gráfico de la identificación de otros constituyentes, se muestra el cromatograma del extracto de USB-1105 (Figura 2), donde se evidencia la presencia de algunos compuestos minoritarios entre los que se identifica el escualeno (Tabla 3) con un 2,88% del área y un 89% de certeza en la identificación; este compuesto ha sido reportado como un intermediario en la biosíntesis del ergosterol, componente esencial de membranas fúngicas (Roberts *et al.*, 2003). También se muestra la presencia de un compuesto mayoritario (39,33% del área) para el extracto del morfotipo USB-1105 que aparece a un TR de 12,636min, identificado como 3,4-Dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina (con 92,1% de certeza) (Tabla 3), que también podría ser un compuesto potencialmente responsable de la actividad antifúngica o antibacteriana observada (en general mayor a la de las otras muestras) para este extracto, tomando en cuenta que existen reportes de la amplia actividad biológica exhibida por este tipo de compuestos, como es el caso de dihidroisocumarinas producidas en *Xylaria* sp. con actividad antifúngica (Oliveira *et al.*, 2011); y de la paepalantina, aislada de la planta brasilera *Paepalan thusvelozoides* que presenta actividad antibacteriana (Varanda *et al.*, 1997).

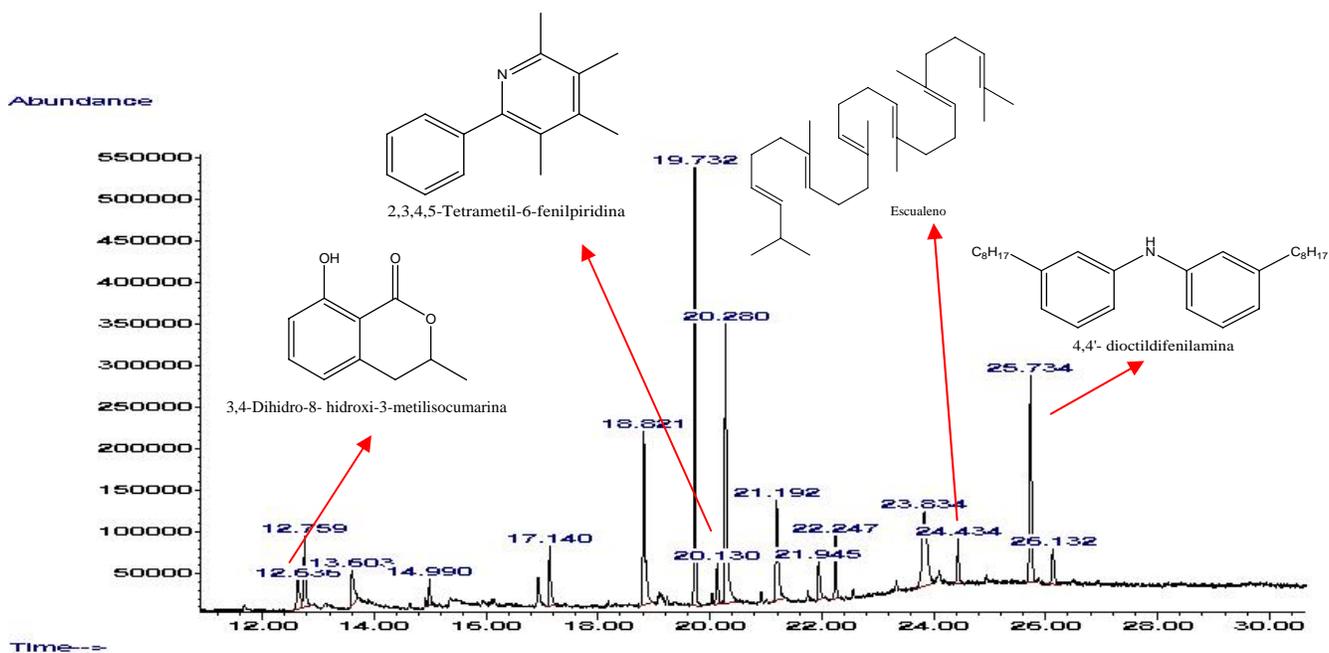


Fig. 2.: Cromatograma total de iones del extracto USB-1105

Tabla 3: Constituyentes identificados en los extractos de los morfotipos de *Xylaria* spp. USB-1102 (1), USB-1103 (2), USB-1104 (3), USB-1105 (4).

Constituyente	TR promedio (min)	Área (%)	Match	Morfotipo
4,4'- Diocildifenilamina	25,742	21,01	823	1,2,3,4
Escualeno	24,433	2,88	890	1,3,4
2,3,4,5-Tetrametil-6-fenilpiridina	20,125	2,55	812	1,3,4
Alfa-hexadeceno	12,610	1,47	924	1,3
2,6,10-Trimetil tetradecano	19,132	1,47	819	1
Heptacosano	24,582	18,23	814	1
6-Metiloctadecano	20,042	2,29	852	1
P-etoxi-benzaldehido	14,525	3,63	870	3
Etil ester del ácido hexadecanoico	17,125	0,38	786	3
3,4-Dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina	12,636	39,33	921	4
1-Undecanol	12,366	2,51	857	4
4-(1,1-Dimetilpropil)-ciclohexanona	13,603	2,92	754	4
2-Dodecanol	14,990	1,15	888	4
Etil-linolato	18,821	10,90	854	4

CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos de los morfotipos estudiados del género *Xylaria* exhiben un amplio espectro de acción antibacteriana; de igual forma, tres de los cuatros extractos ensayados mostraron actividad antifúngica contra *C. tropicalis*. Los extractos tienen diversidad en su composición química y los metabolitos identificados son de naturaleza química muy variada. En todos los extractos, se identificó la 4,4'- diocildifenilamina, como el constituyente mayoritario común, el cual posiblemente sea responsable de la actividad biológica observada. El compuesto 3,4-Dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina identificado en USB-1104 también podría ser un compuesto potencialmente responsable de la actividad antifúngica o antibacteriana observada. Este es el primer reporte de bioactividad y composición química preliminar en especies autóctonas del género *Xylaria* del estado Miranda, Venezuela; dejando la base para futuros estudios sobre aplicaciones de hongos endofíticos propios de esta región.

REFERENCIAS

1. Arnold, E., Mejía, L., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robbins, N., *et al.* (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100 (26), 15649-15654.
2. Bauer, A., Kirby, W., Sherris, I. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4), 493-496.
3. Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Pittayakhajonwut, D., Tanticharoen, M. & Thebtaranonth, Y. (2001). Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*. *J. Nat. Prod.*, 64, 965-967.
4. Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69, 2-9.

5. Castillo–Machalskis, I., D 'Armas, H., Centeno, S. & Núñez, M. (2006). Actividad antifúngica de extractos crudos de hongos marinos aislados de raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). *Bol. Centro Invest. Biol.*, 40 (1), 68-77.
6. Davis, C., Franklin, J., Shaw, J. & Vilgalys, R. (2003). Endophytic Xylaria (Xilariaceae) among liverworts and angiosperms: Phylogenetics, distribution and symbiosis. *American Journal of Botany*, 90 (11), 1661-1667.
7. Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. (1994). Potential of fungi in discovery of novel low molecular weight pharmaceuticals. In: The discovery of Natural Products with Therapeutic Potential(ed. V.P. Gullo). Butterworth-Heinemann, London, UK: 49-80.
8. Taylor, G.S. & Rich, S. (1962). Antiozonant-Treated cloth protects Tobacco from fleck. *Science*, 135 (3507), 928.
9. Ju, Y.M. & Rogers J. D. (1999). The *Xylariaceae* of Taiwan (excluding *Anthostomella*). *Mycotaxon*, 73, 343-440.
10. Lin, Y., Wu, X., Feng, S., Jiang, G., Luo, J. & Zhou, S. (2001). Vrijmoed LLP, Jones EBG, Steingrover K, y Zasila F. Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast. *J. Org. Chem.*, 66, 6252-6256.
11. Lodge, D.J. (2001). Diversidad mundial y regional de hongos. En: Hernández, H.; García-Aldrete, A.; Álvarez, F.; Ulloa, M. (eds). Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Instituto de Biología. UNAM, Fondo de Cultura Económica, México: 291-301.
12. Moreno, S., Taddei, A., Castelli, C., Llatas, I. & Rosas-Romero, A. (2011). Isolation, identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. from soils of the Sucre State, Venezuela. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 3 (1), <http://www.idea.gob.ve/publicaciones/RETvol3n1.pdf>
13. NIST/EPA/NIH MassSpectral Database, S.R.D., SRD Program. (2005). National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD.
14. Oliveira, C., Regasini, L., Silva, H., Pfenning, L., Young, M., Berlinck, R., *et al.* (2011). Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. And *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with Piper aduncum and Alibertia macrophylla. *Phytochemistry Letters*, 4 (2), 93-96,
15. Phai, L.D. & Reuter, G. (1976). Changes in the polysaccharide biosynthesis of *Candida guilliermondii* induced by diphenylamine. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 16 (3), 197-199.
16. Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L. & Goad, L.J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 126 (2), 129-142.
17. Schneider, G., Anke, H. & Sterner, O. (1995). Xylarin, an antifungal *Xylaria* metabolite with an unusual tricyclic uronic acid moiety. *Nat. Prod. Lett.*, 7, 309-316.
18. Schneider, G., Anke, H. & Sterner, O. (1996). Xylaramide, a new antifungal compound and other secondary metabolites from *Xylaria logipes*. *Z. Naturforsch. C.*, 51 (11-12), 802-806.
19. Sholberg, P.L., Harlton, C., Haag, P., Le´vesque, C.A., O'Gorman, D. & Seifert, K. (2004). Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. That cause postharvest blue mold of apples using b-tubulin gene sequences. *Postharv. Biol. Technol.*, 36, 41-49.

20. Smith, C.J., Morin, N.R., Bills, G.F., Dombrowski, A.W., Salituro, G.M., Smith, S.K., *et al.* (2002). Novel sesquiterpenoids from the fermentation of *Xylaria persicaria* and selective ligands for the NPY Y5 receptor. *J. Org. Chem.*, 67, 5001-5004.
21. Strobel, G. & Bryn, D. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. DOI: 10.1128/MMBR.67.4: 491-502.
22. Thakur, D., Bora, T.C., Bordoloi, G.N. & Mazumdar, S. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces sp.* 201. *Journal of Medical Mycology*, 19, 161-167.
23. Varanda, E.A., Raddi, M.S., Dias, F. de L., Araújo, M.C., Gibran, S.C., Takahashi, C.S., *et al.* (1997). Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (Paepalantine) isolated from *Paepalan thusvellozioides*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 17 (2), 85-95.
24. Xing-Na, W., Ren-Xiang, T. & Ji-Kai, L. (2005). Xylactam, a New Nitrogen-containing Compound from the Fruiting Bodies of *Ascomycete Xylaria euglossa*. *The Journal of Antibiotics*, 58, 268-270; doi:10.1038/ja.2005.31

