

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS CRUDOS
DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A ECOSISTEMAS TROPICALES DEL
VALLE DEL CAUCA**

PAULA ANDREA PUENTE CANTILLO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2017**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS CRUDOS
DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A ECOSISTEMAS TROPICALES DEL
VALLE DEL CAUCA**

PAULA ANDREA PUENTE CANTILLO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**

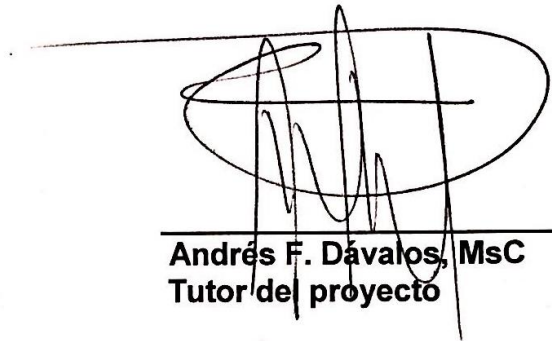
**TUTOR: NELSON HERNANDO CAICEDO, Ph.D.
TUTOR: ANDRÉS FELIPE DÁVALOS, MsC.**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2017**

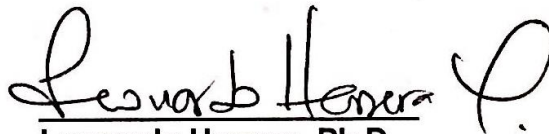
APROBADO POR



Nelson H. Caicedo, Ph.D
Tutor del proyecto



Andrés F. Davalos, MsC
Tutor del proyecto



Leonardo Herrera, Ph.D
Evaluador

AGRADECIMIENTOS

Principalmente, le agradezco a Dios por las bendiciones recibidas durante estos años de esfuerzo, asimismo, a mis padres, quienes nunca se cansaron de alentarme en este camino; sin ellos, esto no hubiera sido posible. A la Universidad Icesi y sus profesores, por hacer de mí una científica íntegra y ética; y a mis amigos, por su paciencia y consejos.

En suma, le doy gracias a mis tutores Nelson Caicedo y Andrés Dávalos, a María Camila Pizano y a sus contactos con el DAGMA: Catalina Silva, Sandra Franco y a sus guardabosques Carlos y William. A Guillermo Montoya, a Álvaro Barrera y a los chicos del semillero EBB (Ecología, Biosprospección y Bioprocesos), por su ayuda durante la realización del proyecto e igualmente, a Leonardo Herrera, quien fue un apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	10
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación	14
2.2. Marco teórico y estado del arte	15
2.2.1. Hongos endófitos	15
2.2.2. Bosques subandinos.....	18
2.2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y propiedades antioxidantes	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. METODOLOGÍA	23
4.1. Colecta, aislamiento y preservación de hongos endófitos.....	23
4.2. Cultivo en medio líquido de los aislamientos fúngicos y evaluación de la actividad antioxidante de sus fracciones de polisacáridos extracelulares.....	24
4.3. Caracterización fenotípica.....	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1. Colecta, aislamiento y preservación de hongos endófitos.....	25
5.2. Cultivo en medio líquido de los aislamientos fúngicos y evaluación de la actividad antioxidante de sus fracciones de polisacáridos extracelulares.....	31
5.3. Caracterización fenotípica.....	37
6. CONCLUSIONES	40
7. RECOMENDACIONES	41
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
9. ANEXOS	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Volumen obtenido en el medio líquido PDA y medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% para los aislamientos fúngicos	31
Tabla 2. Cantidades obtenidas de extracto crudo después de la etapa de liofilización para los aislamientos fúngicos y para los controles en medio líquido PDA y medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4%.....	33
Tabla 3. Terminología propuesta para los aislamientos fúngicos y los tipos de medio de cultivo líquidos.	34

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfico 1.** Interacción entre cada cepa y cada medio respecto al % inactivación del radical DPPH a los 5 minutos de reacción. 35
- Gráfico 2.** Efectos principales relacionados con **A.** la cepa y **B.** el medio para el porcentaje de inactivación del radical DPPH a los 5 minutos de reacción 36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recolección de muestras en el predio “La Carolina”	26
Figura 2. A. Control de corteza de yarumo blanco y B. Aislamiento fúngico contaminado para corteza yarumo blanco B.	26
Figura 3. Visualización de las hojas secas de <i>Cecropia peltata</i> recolectadas en el predio “La Carolina”.	27
Figura 4. A. Muestra de las hojas de <i>Otoba gracilipes</i> recolectadas en el predio “La Carolina” y B. Aislamiento fúngico hojas otobo juvenil A.	28
Figura 5. A. Muestra de la corteza de <i>Otoba gracilipes</i> recolectada en el predio “La Carolina” y B. Aislamiento fúngico corteza otobo juvenil B.....	28
Figura 6. A. Muestra de las hojas de <i>Vismia baccifera</i> recolectadas en el predio “La Carolina” B. Aislamiento fúngico hojas lacre B y C. Aislamiento fúngico hojas lacre A.	29
Figura 7. A. Muestra de la corteza de <i>Vismia baccifera</i> recolectada en el predio “La Carolina” B. Aislamiento fúngico corteza lacre B1 y C. Aislamiento fúngico corteza lacre B2.....	29
Figura 8. A. Control medio líquido PDA, B. crecimiento de la interfase consistente con el aislamiento (véase figura 5) y C. enturbiamiento del medio para corteza otobo juvenil B.	32
Figura 9. A. Control medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4%, B. crecimiento de la interfase consistente con el aislamiento (véase figura 5) y C. cambio de coloración en el medio para corteza otobo juvenil B.	32
Figura 10. A. Imagen general y B. acercamiento de la micromorfología del aislamiento fúngico correspondiente a hojas otobo juvenil A bajo la luz del microscopio a una magnificación de 40X.	37
Figura 11. A. Imagen general y B. acercamiento de la micromorfología del aislamiento fúngico correspondiente a hojas lacre A bajo la luz del microscopio a una magnificación de 40X.	38
Figura 12. A. Imagen general y B. acercamiento de la micromorfología del aislamiento fúngico correspondiente a corteza lacre B2 bajo la luz del microscopio a una magnificación de 40X.	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Relación de código de preservación con el aislamiento fúngico.....	52
Anexo 2. Curva de calibración absorbancia (515 nm) vs. concentración del radical DPPH.	52
Anexo 3. Ecuación de la curva y R^2 para la curva de calibración absorbancia (515 nm) vs. concentración del radical DPPH.	52
Anexo 4. Ecuación para calcular el % DPPH remanente.....	53
Anexo 5. Datos del porcentaje DPPH remanente para cada cepa siguiendo una cinética de reacción de 30 minutos.	53
Anexo 6. Gráfica que relaciona el % DPPH remanente respecto a cada cepa, siguiendo una cinética de reacción de 30 minutos.	54
Anexo 7. % de inactivación del radical DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL.	55
Anexo 8. Análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre los resultados obtenidos del % de inactivación del DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL.	55
Anexo 9. Comparación entre la interacción cepa*medio respecto al % de inactivación del DPPH.	56

RESUMEN

Los hongos endófitos, son microorganismos que colonizan el interior de las plantas sin tener un efecto negativo sobre éstas. En este estudio, se obtuvieron 6 aislamientos fúngicos, los cuales fueron cultivados en medio PDA (papa dextrosa agar) a partir de muestras de hoja y corteza de otopo juvenil (*Otoba gracilipes*) y lacre (*Vismia baccifera*) encontradas en un Bosque Húmedo Montano Bajo: predio “La Carolina” (3°24'10.662"N, 76°36'52.774"W). La solución de esporas de las cepas aisladas: hojas otopo juvenil A, corteza otopo juvenil B, hojas lacre A, hojas lacre B, corteza lacre B1 y corteza lacre B2, fue inoculada por duplicado en medio líquido PDA y medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% para determinar la producción de polisacáridos extracelulares con elevada actividad antioxidante. De lo anterior, al ser evaluados espectrofotométricamente a 515 nm en un lector de microplatos, se obtuvo que el aislamiento correspondiente a hojas otopo juvenil A en comparación con otros, inactivó el radical libre DPPH en un 51,46% a los 5 minutos de reacción en medio PDA, a diferencia del medio líquido PDA con extracto de levadura (26,57%), por lo que se concluyó que el medio sí es un inductor de la producción de polisacáridos con elevada actividad antioxidante.

Consiguientemente, fue posible preservar 2 de los aislamientos fúngicos, con una concentración de $2,41 \times 10^4$ esporas/mL para las hojas otopo juvenil A y $7,78 \times 10^4$ esporas/mL para la corteza de otopo juvenil B, en una solución de glicerol al 10%. Fueron rotulados con el código EBB-ET (Ecología, Bioprocesos, Bioprospección – Endófitos Tropicales) y almacenados a -20°C , con espera a la realización de la prueba de viabilidad. Finalmente, se observaron características fenotípicas de los aislamientos empleando la técnica de la cinta adhesiva y tinción con azul de lactofenol, con lo cual, se identificaron las estructuras reproductivas de 3 de los aislamientos fúngicos: hojas otopo juvenil A, hojas lacre A y corteza lacre B2.

Palabras clave: aislamientos fúngicos, actividad antioxidante, medio PDA, preservar, características fenotípicas, estructuras reproductivas.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganism that grow inside plant tissues without causing any immediate negative effects. In this study, 6 fungal isolates were obtained which were cultivated in PDA medium (potato dextrose agar) from leaves and bark samples of otobo juvenile (*Otoba gracilipes*) and lacre (*Vismia baccifera*) found in a Humid Low Montane Forest: farm "La Carolina" (3°24'10.662"N, 76°36'52.774"W). Spore solution of the isolated strains: otobo juvenile leaves A, otobo juvenile bark B, lacre leaves A, lacre leaves B, lacre bark B1 and lacre bark B2, was inoculated in liquid medium PDA and liquid medium PDA with 0,4% yeast extract for duplicate to determine the production of extracellular polysaccharides with high antioxidant activity. Due to, when evaluated spectrophotometrically at 515 nm in a microplate reader, it was found that the isolation corresponding to otobo juvenile leaves A compared to others, inactivated the free radical DPPH by 51.46% after 5 minutes of reaction in PDA medium, unlike PDA liquid medium with yeast extract (26.57%), so it was concluded that the medium itself is an inducer of the production of polysaccharides with high antioxidant activity.

Therefore, it was possible to preserve 2 of the fungal isolates, with a $2,41 \times 10^4$ spores/mL concentration for otobo juvenile leaves A and y $7,78 \times 10^4$ spores/mL for otobo juvenile bark B, in a 10% glycerol solution. They were labeled with the code EBB-TE (Ecology, Bioprocess, Bioprospecting – Tropical Endophytes) and storage at -20°C, for later viability test. Finally, phenotypic characteristics of the isolates were observed using adhesive tape technique and lactophenol blue stain with which the reproductive structures of 3 of the fungal isolates were identified: otobo juvenile leaves A, lacre leaves A and lacre leaves B2.

Key words: fungal isolates, antioxidant activity, PDA medium, preserve, phenotypic characteristics, reproductive structures.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos, son microorganismos que viven en la forma micelial ocasionalmente o al menos una vez en su ciclo de vida, dentro de los tejidos vegetales de las plantas sin causar ningún síntoma aparente (Meenatchi, *et al.* 2016). Este tipo de hongos ha sido reportado en varias especies de plantas, contribuyendo a la diversidad de microorganismos en ambientes naturales, pues ofrecen multitud de ventajas aún desconocidas al hospedero, con inmensas aplicaciones en agricultura y medicina (Nalini *et al.* 2014) ya que son capaces de producir componentes bioactivos.

Los endófitos aislados reportados en la literatura han sido encontrados en tejidos de hojas, corteza, tallo e incluso en raíces con micorrizas, simbioses y patógenos (Meenatchi, *et al.* 2016). La mayoría de endófitos están clasificados en el filo Ascomycota, pero algunas especies han sido clasificadas también en Zygomycota y Basidiomycota (Rungjindamai *et al.* 2008; Min *et al.* 2014). Son numerosos los ejemplos de endófitos que se han convertido en patógenos, pues esporulan cuando las hojas senescen o las plantas se estresan o cuando las plantas producen frutos que eventualmente se pudren (Brown *et al.* 1998); empero, actualmente, estudios han probado que producen una extraordinaria variedad de metabolitos funcionales. De acuerdo con Schulz, *et al.* (2002), debido a la necesidad de satisfacer la continua búsqueda de nuevos productos por parte de las industrias tanto farmacéutica como agrícola y dado que los productos naturales se adaptan a una función específica en la naturaleza; junto con su grupo de investigadores, lograron aislar aproximadamente 6500 metabolitos secundarios de organismos que habitan en nuevos biótopos, en este caso, hongos endófitos de plantas herbáceas y árboles, examinando consigo su actividad biológica.

Ahora bien, distintos estudios han demostrado que los polisacáridos extracelulares excretados por hongos endófitos presentan actividad antioxidante (Guo, *et al.* 2012; Ye, *et al.* 2013; Yadav, *et al.* 2014; Khiralla, *et al.* 2015; Prihantini, *et al.* 2016; Yan, *et al.* 2016), por lo que ésta ha sido una de las propiedades biológicas evaluadas en estos microorganismos, ya que la mayoría de antioxidantes conocidos actualmente son sintetizados industrialmente y se ha sospechado que son los responsables del daño hepático y la carcinogénesis (Yuan, *et al.* 2008). Debido a lo anterior, se han desarrollado estrategias para la obtención de antioxidantes naturales y así: contrarrestar la descontrolada producción de oxígeno derivado de radicales libres que pueden verse implicados en enfermedades crónicas (Mau *et al.* 2002), retrasar su progreso e igualmente, proteger el cuerpo humano (Luo, 2008; Mau *et al.* 2002).

Realizar investigación en ecosistemas poco explorados, incrementa la información existente en cuanto a diversidad, pues se estaría realizando un aporte nuevo a las bases de datos ya existentes. Por esta razón, a pesar de

que la actividad biológica de hongos endófitos y sus metabolitos no haya sido evaluada en bosques húmedos, como es el caso de esta investigación que se llevó a cabo en un Bosque Húmedo Montano Bajo, se encontró como una oportunidad significativa de contribución. No obstante, es importante mencionar que algunos estudios han arrojado información sobre la presencia de estos microorganismos en dichos ecosistemas, pero no se ha evaluado ningún tipo de actividad biológica (Suárez, *et al.* 2006; Vaz, *et al.* 2014; Molina, *et al.* 2015), pues no ha sido el foco de investigación.

Así pues, con el objetivo de establecer una colección de cepas de hongos endófitos con elevada actividad antioxidante, se recolectaron muestras de hojas y corteza de tres especies de árboles del bosque mencionado anteriormente: Otobo juvenil, *Otoba gracilipes*; Lacre, *Vismia baccifera* y Yarumo blanco, *Cecropia peltata*. Secciones pequeñas de estas muestras fueron puestas en cajas Petri con medio PDA después de la realización de una serie de lavados con el fin de eliminar la flora microbiana de la superficie, hasta obtener los aislamientos fúngicos. Posterior a esto, mediante una solución de esporas, fueron inoculados en dos medios de cultivo para observar cómo influían estos en la excreción de los polisacáridos. Luego de distintas etapas en las cuales se buscaba concentrar la fracción de polisacáridos, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antioxidante mediante la prueba del radical libre DPPH, para finalmente caracterizar fenotípicamente las cepas con alta actividad y establecer el cepario, para futuras aplicaciones: desde ecológicas hasta farmacéuticas.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación

Actualmente, se está buscando contribuir significativamente no sólo a la conservación de los ecosistemas, sino también al hecho de conferirles un uso sostenible con beneficios a la población. Es decir, se han llevado a cabo distintas estrategias para seleccionar y aislar de un medio específico un organismo presente en la naturaleza, y utilizar, según la literatura, sus propiedades ya sean industriales, agrícolas e incluso, medicinales. De esta manera, los hongos junto con sus metabolitos presentan infinidad de propiedades benéficas, en las que se destacan sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes, protectoras del sistema cardiovascular, antivirales e hipoglucemiantes (Royse y May, 2003).

Colombia es uno de los doce países con mayor diversidad del mundo después de Brasil y es uno de los once países que todavía conserva extensas superficies de su bosque original relativamente libre de amenazas (Bohórquez, *et al.* 2016). Lo anterior significa que, en dichos ecosistemas, los procesos naturales biológicos y evolutivos, continuarán generando y manteniendo la diversidad (Mittermeier, 1997) de la que dependen tanto seres humanos como animales. Por esto, conocer la biodiversidad requiere considerar distintos niveles jerárquicos de la organización de la vida: genes, especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas; junto con atributos importantes como composición, estructura y funcionalidad (Noss, 1990). Empero, la diversidad de endófitos tropicales es desconocida porque las investigaciones en estas áreas han sido muy limitadas, especialmente en países en desarrollo (Miles, *et al.* 2016), como es el caso de Colombia. A pesar de esto, ambientes extremos como el Bosque Húmedo Montano Bajo, ecosistema de interés en esta investigación, son ideales para el desarrollo de organismos con mecanismos de adaptación inusuales (Miles, *et al.* 2016), además de ser poco explorado en lo que concierne a hongos endófitos.

Vale la pena mencionar la importancia que se le ha dado a los hongos endófitos en los bosques de manglar, los cuales presentan una alta productividad de materia orgánica asociada a la biodegradación de biomasa vegetal procedente de los árboles y de la vegetación halófila que allí se encuentra (Sosa *et al.* 2009). Y, por tal razón, a lo largo de las zonas costeras de mundo, se han venido realizando investigaciones acerca del potencial que estos presentan, siendo un territorio más explorado. No sólo se ha logrado demostrar la actividad antioxidante (Yadav *et al.* 2014), sino también la antitumoral (Zhang *et al.* 2007), anticancerígena (Zong *et al.* 2012), hematopoyética, hepatoprotectora, y antidiabética (Jin *et al.* 2012), por mencionar algunas de ellas. Empero, debido a problemáticas relacionadas con el marco legal establecido en el *Manual de solicitud del contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados en Colombia* (Murillo *et al.* 2016), fue imposible realizar la investigación en este ecosistema, por lo que se pensó para la realización de este proyecto en un

ecosistema poco explorado y que además contara con un convenio marco de asociación entre la Universidad Icesi y el DAGMA, asociado a la recolección de muestras (Ley 489, 2015).

Por todo lo anterior, la hipótesis que se buscó responder fue si era posible inducir, a través del cultivo en medio líquido, la actividad antioxidante de los extractos crudos de aislamientos de hongos endófitos asociados a ecosistemas tropicales del Valle del Cauca. Simultáneamente, con la validación de esta hipótesis, se esperaría contribuir en la caracterización de microflora fúngica en ecosistemas poco estudiados hasta el momento en Colombia. Así como también, en el establecimiento de nuevas colecciones de cepas de hongos endófitos, dejando una puerta abierta para diferentes tipos de investigación entre los que se encuentra el desarrollo de bioproductos, por ejemplo. No obstante, se debe siempre considerar la normatividad legal vigente respecto a la recolección y acceso a recursos genéticos presentes en los ecosistemas del territorio nacional, pues las investigaciones en zonas con alto grado de diversidad, requiere de un arduo trabajo, necesario para la conservación de los ecosistemas.

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1. Hongos endófitos

Actualmente, se reconoce que la mayoría de las plantas en la tierra están asociadas con una o más especies de hongos endófitos (Schulz y Boyle, 2005; Rodríguez *et al.* 2009). Los hongos endófitos son definidos como microorganismos que viven dentro de los tejidos vegetales sin causar ningún daño aparente (Heredia *et al.* 2014), es decir, residen asintómicamente en los espacios apoplásicos y/o dentro de las células vivas de las plantas durante todo o al menos una parte de su ciclo de vida (Petrini, 1991). Este grupo de microorganismos se caracteriza por tener una sorprendente alta diversidad y heterogeneidad local, lo que complica la comprensión de su papel ecológico y los mecanismos que apoyan sus interacciones con la planta huésped (Rodríguez, *et al.* 2008; Partida y Heil, 2011; Peay *et al.* 2016). Sin embargo, según Nascimento *et al.* (2015), el endófito y su huésped, al encontrarse en un nicho ecológico muy específico, están sujetos a interacciones constantes y únicas, por lo que se ve favorecida la capacidad que tienen estos hongos para producir compuestos naturalmente bioactivos, algunos de los cuales pueden resultar potencialmente útiles en medicina, agricultura y en la industria (Strobel, 2003).

Adicional a lo anterior, para Schulz y Boyle (2005) en *The endophytic continuum*, los productos naturales continúan siendo una fuente importante de los nuevos productos farmacéuticos. Teniendo en cuenta que seis de los 20 medicamentos mayormente prescritos son de origen fúngico y que aproximadamente sólo el 5% de los hongos del mundo han sido descritos, éstos ofrecen un enorme potencial para nuevos productos farmacéuticos. Para optimizar la búsqueda, es necesario considerar que: los metabolitos secundarios que un hongo sintetiza corresponden a su respectivo taxón y nicho ecológico; y que las interacciones

metabólicas pueden desencadenar la síntesis de metabolitos secundarios. Esto, debido a que muchos estudios han demostrado que la simbiosis hongo-planta es lábil y fácilmente calificada como antagónica, neutra o mutualista, dependiendo de la etapa de vida del huésped y el hongo, del genotipo y de condiciones abióticas y bióticas (Hamilton *et al.* 2012). Por tal razón, es importante mencionar que el beneficio que los hongos endófitos proporcionan en un grupo diverso de plantas huésped ha sido comúnmente observado en ambientes pobres en nutrientes y cuando las plantas están bajo estrés como sequía, inundación, competencia de plantas y ataque de herbívoros y patógenos.

Recientemente, ha sido posible aislar moléculas o metabolitos secundarios a partir de hongos endófitos, que incluyen un número considerable de agentes novedosos antifúngicos, antibacterianos, citotóxicos y antivirales (Strobel, 2002), pero muy poco es conocido acerca de la capacidad antioxidante (Strobel *et al.* 2002). Asimismo, la dinámica de las interacciones entre la planta huésped y los microorganismos endófitos, aún no se conoce completamente; empero, de acuerdo con López *et al.* (2017), estos hongos pueden proteger a las plantas hospederas del ataque de herbívoros y patógenos, influyendo por lo tanto en la supervivencia de las plantas, la aptitud física y hasta en la distribución. Además de los factores ambientales (principalmente la temperatura y la humedad), las variaciones en la química, anatomía y madurez del tejido huésped colonizado, afectan la abundancia y composición de la comunidad de hongos endófitos (Sánchez *et al.* 2012). Esta comunidad, puede cambiar dramáticamente en relación con la edad de la hoja e incluso, con el tipo de tejido vegetal (Nascimento *et al.* 2015). Strobel (2003), sugirió que la probabilidad de encontrar nuevas y potenciales sustancias activas producidas por estos hongos, es mayor en plantas que se encuentran en entornos únicos ya que aquí, presentan nuevas estrategias de supervivencia bajo condiciones de estrés, por ejemplo; e igualmente, aquellas con una historia de interés etnobotánico.

A la fecha, sólo unas pocas plantas han sido investigadas por su biodiversidad endofítica y su potencial para producir metabolitos secundarios (Bhardwaj *et al.* 2014). Sin embargo, se han llevado a cabo estudios en diferentes partes del mundo sobre la biodiversidad endofítica, la taxonomía, la reproducción, la ecología del huésped y su efecto sobre el mismo (Bandra *et al.* 2001). Por tal razón, de acuerdo con Bhardwaj *et al.* (2014), los endófitos son vistos como fuentes excepcionales de productos naturales bioactivos, pues muchos de ellos están ocupando millones de nichos biológicos únicos que crecen en ambientes inusuales. Los estudios de diversidad funcional de los hongos endófitos se establecen asociados a ecosistemas específicos. Los bosques tropicales colombianos, presentan una mayor complejidad estructural que otros, originando abundantes gradientes, microclimas y microhábitats tanto horizontal como verticalmente (Gamboa, 2006). Lo anterior, puede ser un factor importante para determinar y predecir la abundancia de microorganismos como hongos endófitos, pues según Gamboa (2006), es común encontrar que las comunidades de endófitos varían con los estratos dentro del dosel, especialmente en la parte más alta.

En este sentido, los ecosistemas de alta biodiversidad como es el caso de los bosques subandinos, adolecían, hasta la fecha, de investigaciones orientadas a endófitos, por lo que fue una oportunidad significativa para explotar este tipo de ecosistemas, ya que la mayoría de postulados actuales no son más que especulaciones basadas en observaciones: muchos hongos endófitos aislados no pueden ser identificados, debido no sólo a que no esporulan sino también a que no pueden ser equiparados con especies descritas, pues la información taxonómica es compleja y limitada (Gamboa, 2006). A pesar de lo anterior, se tiene evidencia científica que, en bosques tropicales, se aislaron hongos endófitos correspondientes al género *Colletotrichum* y *Phomopsis* (Bills *et al.* 1992; Gamboa y Bayman, 2001; Gamboa *et al.* 2002; Schwarz *et al.* 2004; Gamboa *et al.* 2005).

Es importante mencionar que el número de personas en el mundo que están presentando problemas de salud debido a varios tipos de cáncer, bacterias resistentes a medicamentos, parásitos y hongos, está en incremento. Debido a lo anterior, el desarrollo de múltiples fármacos resistentes a microbios ha potenciado la necesidad de buscar nuevos y novedosos antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades en humanos (Wise, 2008). Una intensiva búsqueda de agentes nuevos y más efectivos para contrarrestar los problemas de salud ha llevado a encontrar alto potencial en endófitos, una fuente de compuestos medicinales útiles (Sharma *et al.* 2016), lo cual, es posible debido a la habilidad que éstos tienen de utilizar varios sustratos como consecuencia de la diversidad de su evolución biológica y bioquímica (Fernandes *et al.* 2009) y de esta manera, ser productores de metabolitos secundarios (Guanatilaka, 2006). Los endófitos comprenden una gran pero poco explorada proporción de diversidad fúngica (Yuanab *et al.* 2011; Perottoab *et al.* 2013).

Desde el descubrimiento del paclitaxel, un potente anticancerígeno aislado de hongos endófitos como *Taxomyces andreanae* y *Pestalotia spp.*, los endófitos como nuevas fuentes de metabolitos bioactivos, incluyendo anticancerígenos, antimicrobianos, antipalúdicos y otras actividades, han suscitado mucha atención por parte de los investigadores de todo el mundo (Cui *et al.* 2015). Los metabolitos aislados de hongos endófitos pertenecen a diversos grupos estructurales que incluyen: esteroides, xantinas, fenoles, isocumarinas, quinonas y terpenoides (Schulz *et al.* 2002), sólo por mencionar algunos. Según este mismo autor, la proporción de nuevas estructuras producidas por endófitos (51%), es considerablemente mayor que la producida por los hongos aislados del suelo (38%), lo cual, demuestra que los hongos endófitos son una buena fuente de nuevos metabolitos secundarios y sugiere que, igualmente, juegan un papel fundamental en la estrategia de vida endofítica. Es relevante mencionar que el uso biotecnológico de estos metabolitos para productos farmacéuticos o agroquímicos está aún en etapa de desarrollo: para ejemplificar, es concebible que la rugulosina, una micotoxina generada por un endófito de la picea y activo contra la lombriz de pino (Miller *et al.* 2002), podría producirse comercialmente; siendo esto un incentivo para futuras aplicaciones no sólo farmacéuticas sino también agrícolas en Colombia, a partir de hongos endófitos.

En los últimos 25 años, se ha realizado mucho progreso en la historia de vida, filogenia y ecología de los hongos endófitos (Zhang *et al.* 2006). Empero, la inmensa biodiversidad del reino fungi plantea muchos desafíos aún no resueltos. Tradicionalmente, los hongos endófitos han sido y siguen siendo caracterizados morfológicamente, lo que, sin embargo, a menudo no es suficiente para determinar la especie, pero puede ayudar a distinguir el género (Díaz *et al.* 2012). Los estudios morfológicos tienen como objetivos identificar las especies por su estructura orgánica como el color, el patrón y la forma de la colonia. Aunque es bien sabido que su apariencia puede beneficiar la caracterización, los resultados pueden mostrar que varias especies son iguales, cuando realmente no lo son (Rodríguez *et al.* 2009). De acuerdo con Díaz *et al.* (2012), una alternativa actual es la codificación de ADN o caracterización molecular, pues tiene como objetivo reducir el análisis de identificación conflictivo y dudoso previo de varias especies, incluyendo la de hongos. En un futuro, se espera que investigadores puedan identificar especies gracias a un simple código de barras, siendo esto un gran avance tanto en las bases de datos como en las futuras investigaciones. Así, con esta información sobre técnicas actuales, se deja como una puerta abierta para su implementación debido a que traería consigo un mayor grado de exactitud en cuanto a resultados.

2.2.2. Bosques subandinos

La cordillera de los Andes surge de la actividad tectónica y de la deriva continental en Sudamérica, fenómeno que se originó por el choque de la placa de Nazca con la placa Sudamericana (Fittkau *et al.* 1968; Pielou, 1979; Brown y Lomolino, 1998). Este evento, dio lugar a una compleja cadena de montañas que se extiende desde el sur del continente, hasta Venezuela, y que comprende una variedad de ecosistemas cuyas características han sido determinadas, en parte, por los factores climáticos y, a una escala más local, por la altitud (Grubb y Whitmore, 1996). Entre estos ecosistemas, se encuentran los bosques andinos, los cuales se ubican entre los 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y el límite inferior de los páramos y las punas, alrededor de los 3300 msnm (Brujinzeel, 2004).

De acuerdo con Tobón (2009), la importancia de los bosques andinos radica en que son ambientes de alta energía y de abundante agua, en forma de humedales y complejas redes hídricas que drenan hacia las partes medias y bajas de las cuencas, donde se asienta gran parte de la población de los países andinos, como Bogotá, Quito y Mérida. Estos ecosistemas, además de su aporte hídrico, controlan el microclima del territorio, como resultado de la captura de la humedad adicional de la niebla que pasa entre el dosel y las ramas; la disminución de la radiación solar hacia la superficie del bosque; la baja velocidad del viento dentro de los bosques (Arroyave, 2007); la abundancia de epífitas en las ramas y en tronco de los árboles (Tobón, 2009; Hofstede, 1995); y la presencia de una capa gruesa de musgo en el suelo, la cual captura el agua de la precipitación y la libera lentamente durante los períodos secos (Avendaño, 2007).

Así pues, la altitud es el factor ambiental que más afecta a los bosques andinos, definiéndose tres tipos: bosque montano bajo o subandino, bosque montano alto y bosque altoandino o bosque de niebla (Grubb y Whitmore, 1996). En sentido general, los bosques andinos no tienen un rango de altitud definido, pues se encuentran distribuidos en altitudes diferentes dependiendo de las condiciones ambientales de cada sitio y de su exposición a las corrientes de masas de aire humedecido (Tobón, 2009). Sin embargo, suelen ubicarse a altitudes que oscilan entre los 1000 y 3500 msnm en las áreas tropicales (Rangel, 2000) y en las áreas subtropicales, entre 1500 y 2500 msnm (Brown y Kapelle, 2011). De esta manera, según la clasificación de pisos altitudinales y variaciones hecha por Holdridge (1982), el bosque de interés para esta investigación, siendo un bosque subandino o Bosque Húmedo Montano Bajo (bh-MB), tiene una precipitación promedio anual que varía entre los 1000 y 2000 mm, una temperatura media anual entre 12 y 18 °C y lo más importante: una franja altitudinal que oscila entre los 2000 y 3000 msnm.

Los bosques montanos y premontanos de los Andes tropicales, son considerados como centros de alta diversidad y endemismo (Myers *et al.* 2000; Rubiano *et al.* 2013). No obstante, esta región es una de las más transformadas debido a las lluvias, clima templado y riquezas de fuentes hídricas que han promovido los asentamientos humanos y el desarrollo de la agricultura y ganadería (Rudas *et al.* 2007), aunque esto no sucede de manera predominante en el predio “La Carolina”. Debido a estas características económicamente ventajosas, los ecosistemas nativos andinos han sufrido procesos de transformación que implican reducción y fragmentación del hábitat, pérdida de conectividad, aumento en las tasas de erosión, modificaciones en los suelos y contaminación, lo que desencadena consecuencias como la introducción y extinción de especies (Abadía *et al.* 2010). A pesar de esto, estudios han reportado que algunas plantas que viven tenazmente en condiciones extremas tales como áreas montañosas, oceánicas, polares y glaciales de gran altitud, pueden albergar hongos endófitos únicos y diversos, con significancia médica (Cui *et al.* 2015). Como las actividades biológicas de un hongo pueden variar con el biótomo del cual ha sido aislado, es relevante considerar el hábitat, así como recordar que las plantas perennes que crecen en áreas tropicales o semitropicales son anfitriones de una mayor diversidad de endófitos que los que crecen en climas más secos o más fríos (Arnold *et al.* 2000; Strobel, 2003).

Ahora bien, es importante mencionar que el estudio de hongos endófitos en este tipo de ecosistemas ha sido poco investigado en Colombia, debido a que la mayoría de científicos indagan acerca de la diversidad de flores, aves, reptiles y su relación con la altitud, pero sólo una minoría lo hacen en relación con este tipo de microorganismos. Empero, existen algunos estudios sobre gradientes altitudinales, los cuales destacan que cuando existen temperaturas muy bajas, disminuye la disponibilidad de nutrientes en los tejidos de las plantas debido a la presencia de una clase de endófitos, denominados endófitos septados oscuros o DSE por sus siglas en inglés (Camenzind *et al.* 2015), por lo que vale la pena afirmar que este tipo de microorganismos sí están presentes en ecosistemas

andinos. Asimismo, se han realizado estudios en Brasil y Argentina, por ejemplo, donde Vaz, *et al.* (2014), encontraron una diversidad de hongos endófitos asociados a una familia de plantas arbóreas, denominada *Myrtaceae*. Adicional a esto, en un estudio llevado a cabo en el Sur de Ecuador por Suárez, *et al.* (2006), se demostró la presencia de hongos endófitos al intentar analizar cómo los hongos tulasnellales, formaban micorrizas con orquídeas epífitas en un bosque andino; arrojando cierta evidencia que los hongos endófitos sí están presentes en este tipo de ecosistemas.

Especies de árboles como otobo juvenil y lacre, presentes en este tipo de ecosistemas y pertenecientes a la familia *Myristicaceae* e *Hypericaceae*, respectivamente, no han sido estudiadas respecto al potencial antioxidante que presentan los hongos endófitos asociados a sus tejidos vegetales. Sin embargo, de acuerdo con algunas investigaciones internacionales (Kuetze *et al.* 2010; Awaad *et al.* 2012; Casella *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; L. Garazd y M. Garazd, 2016), en otras especies de árboles pertenecientes a dichas familias, sí ha sido demostrado el potencial antimicrobiano; dejando de esta manera, una puerta abierta a investigaciones respecto a la actividad antioxidante en Colombia y en ecosistemas tropicales del Valle del Cauca, donde existen innumerables especies de árboles pertenecientes a estas familias.

2.2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y propiedades antioxidantes

La oxidación es un proceso biológico esencial que utilizan muchos organismos para la producción de energía. Empero, la producción descontrolada de oxígeno derivada de radicales libres, está involucrada en el inicio de muchas enfermedades como el cáncer, artritis reumatoide y aterosclerosis (Yuan, *et al.* 2008). Los radicales libres, son especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno que son generadas por diferentes procesos fisiológicos en el cuerpo. Si estos radicales son generados en grandes cantidades, conlleva al ataque de membranas lipídicas, proteínas, enzimas e incluso, al ADN; causando estrés oxidativo y en últimas, muerte celular. Estas especies reactivas son también responsables de enfermedades degenerativas como la diabetes mellitus y el cáncer; y desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer y el Parkinson (Yadav *et al.* 2014).

En el cuerpo humano, existen varios sistemas enzimáticos para la inactivación de radicales libres, pero micronutrientes como la vitamina E y la vitamina C, son los mayores antioxidantes naturales, los cuales deben ser provistos en la dieta, pues el cuerpo no es capaz de producirlos (Rammassamy, 2006). De esta manera, la protección contra radicales libres puede ser mejorada por el consumo de cantidades suficientes de antioxidantes exógenos. Un antioxidante es una molécula estable que dona un electrón a un radical libre para que este pueda terminar la reacción en cadena antes de que moléculas vitales sean dañadas (Halliwell, 1995). Adicionalmente, pueden contrarrestar el daño oxidativo de los tejidos incrementando las células de defensa natural e inhibiendo directamente los radicales libres. Sin embargo, la mayoría de los antioxidantes son sintéticos y

se ha sospechado que son los responsables del daño hepático y la carcinogénesis (Yan, *et al.* 2016).

Estudios recientes sugieren que el balance oxidativo juega un papel crucial en la modulación de las interacciones planta-hongo (Nanda *et al.* 2010; White y Torres, 2010; Redman *et al.* 2011). Parte del complejo sistema inmune de la planta es impulsado por ráfagas bifásicas de ROS, mediando el reconocimiento de hongos invasores y el establecimiento de respuestas de defensa en la planta (Hamilton *et al.* 2012). De acuerdo con Tanaka *et al.* (2006 y 2008), se demostró que las ráfagas de especies de oxígeno reactivas procedentes de un endófito mutualista inactivan las respuestas de defensa de las plantas contra el hongo, manteniendo así el mutualismo. No obstante, si la supresión de dicha respuesta es el resultado de un metabolismo fúngico, vegetal o simbiótico, aún se desconoce.

Si bien, aunque las ROS desempeñan un papel mecánico en la muerte celular programada, las respuestas de estrés generales y la señalización sistémica, también pueden tener múltiples efectos sobre el éxito de la infección por hongos o la colonización de endófitos y la respuesta de la planta, es decir, resistencia o aceptación (Hamilton *et al.* 2012). Más aún, los antioxidantes pueden ser usados para transmitir señales de estrés a través de la interacción oxidante-antioxidante, lo que puede facilitar la comunicación química entre el huésped y endófito asintomático, permitiendo al huésped reaccionar rápidamente a la patogénesis y diferenciar un patógeno de un mutualista (Hamilton *et al.* 2012). Tanka *et al.* (2006) sugieren que en la interacción entre hongos endófitos y plantas huésped, la producción tanto de ROS como de antioxidantes, puede ser el mecanismo mediante el cual las respuestas de resistencia hiepersensibles y sistémicas adquiridas del huésped están mediadas.

Los hongos endófitos han mostrado ser productores de numerosos compuestos antioxidantes que pueden desempeñar un papel en la tolerancia al estrés tanto biótico como abiótico en las plantas hospederas, al interrumpir la reacción en cadena de las ROS (Cui *et al.* 2015). De acuerdo con un estudio realizado por Huang *et al.* (2007), se examinó la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total de 292 cepas de hongos endófitos y se demostró una alta correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante. Aunque la variación en el nivel de producción fue alta en las especies endófitas, el 65% de los endófitos mostraron niveles de actividad relativamente altos (Hamilton *et al.* 2012). Estos investigadores identificaron ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, hidroxiantraquinonas y terpenoides fenólicos como potenciales antioxidantes fenólicos. A partir del endófito *Pestalotiopsis microspora*, antioxidantes como la pestacina e isopestacina, han sido identificados (White y Torres, 2010), los cuales son capaces de eliminar o inhibir los radicales libres superóxido e hidroxilo; así como Srinivasan *et al.* (2010) reportaron actividades antioxidantes altas en los cultivos de *Phyllosticta sp.* cuando fueron expuestos a especies reactivas de oxígeno.

Al mismo tiempo, es relevante destacar que los hongos endófitos también pueden producir carbohidratos con actividad antioxidante. Según Yuan, *et al.* (2008), se ha demostrado que los polisacáridos que están ampliamente distribuidos en los microorganismos son efectivos frente a la inhibición de ROS tanto *in vitro* como *in vivo*. Guo, *et al.* (2013) y Kanekiyo *et al.* (2005), afirman que los polisacáridos extracelulares producidos por microorganismos presentan estructuras únicas y actividades biológicas diversas; siendo un área de investigación importante para la búsqueda de nuevos fármacos, así como con potencial en la biología. Recientemente, se ha presentado interés en los polisacáridos excretados por hongos; además de que estos a menudo son producidos en el medio de crecimiento o permanecen unidos a la superficie celular (Seviour, *et al.* 1992). Por tal razón, se considera que los polisacáridos extracelulares podrían ser uno de los grupos más promisorios de compuestos antioxidantes; a pesar de no estar caracterizados en su totalidad (Yan *et al.* 2016).

Para ejemplificar, de acuerdo con White y Torres (2010), el manitol ha exhibido actividad antioxidante, pues con base en una investigación hecha por Richardson *et al.* (1992), se reportaron altas concentraciones de manitol y otros carbohidratos fúngicos antioxidantes potenciales en los apoplastos de tejidos de hierba infectados por *N. coenophialum*, un hongo endófito. Se ha planteado la hipótesis de que el manitol funciona como osmoprotector en plantas que también producen azúcar; además de que es producido por el estado endófito de *Alternaria alternata*, donde suprime la respuesta de defensa de la planta mediada por ROS en su huésped. Por tanto, es posible que los antioxidantes endófitos contribuyan a aumentar la tolerancia al estrés oxidativo en las plantas huésped (White y Torres, 2010). A pesar de lo anterior, es importante mencionar que este tipo de estudios no ha sido llevado a cabo en Colombia ni mucho menos en bosques subandinos, por lo que la información que queda es relevante en cuanto a diversidad fúngica y futuras aplicaciones.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Establecer una colección de hongos endófitos con elevada actividad antioxidante aislados a partir de ecosistemas tropicales del Valle del Cauca.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1** Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones de polisacáridos excretados por los asilamientos fúngicos durante su crecimiento.
- 3.2.2** Caracterizar fenotípicamente las cepas de hongos endófitos con elevada capacidad antioxidante.

4. METODOLOGÍA

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Microbiana localizado en la Universidad Icesi una vez fueron recolectadas las muestras de hojas y corteza de tres especies de árboles (Otobo juvenil, *Otoba gracilipes*; Lacre, *Vismia baccifera* y Yarumo blanco, *Cecropia peltata*) presentes en el predio “La Carolina” (3°24'10.662"N, 76°36'52.774"W), un Bosque Húmedo Montano Bajo, único en la cuenca del Río Meléndez, en la parte superior del corregimiento de Villa Carmelo, Municipio de Santiago de Cali. Consiguientemente, con el objetivo de establecer una colección de hongos endófitos con elevada actividad antioxidante, esta parte experimental se dividió en tres etapas: la primera, consistió en la colecta, el aislamiento y preservación de hongos endófitos; la segunda, en el cultivo de estos aislamientos en medio líquido a escala de laboratorio y la respectiva evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones de polisacáridos excretadas (PSE) por los hongos; y la tercera, en la caracterización fenotípica de las cepas que presentaron elevada actividad antioxidante.

4.1. Colecta, aislamiento y preservación de hongos endófitos

De acuerdo con el método de aislamiento realizado por Prihantini y Tachibana (2017) y siguiendo algunas modificaciones, bajo condiciones estériles, las muestras de hoja y corteza recolectadas fueron cortadas en secciones pequeñas de aproximadamente 0,5 cm y lavadas con tween 80 al 0,01% haciendo uso de un vórtex, como primera medida. Posterior a esto, se les realizó un enjuague con agua estéril, se remojaron en etanol al 70% durante 1 minuto y finalmente, en hipoclorito de sodio al 3% por 15 minutos, con el objetivo de eliminar la flora microbiana presente en la superficie, debido a que se buscaba aislar endófitos. Se lavaron nuevamente con tween 80 al 0,01% y se enjuagaron tres veces con agua estéril para ser sembradas en cajas Petri que contenían medio PDA a pH 4,5 suplementado con clindamicina (0,2 mL/100 mL), para inhibir el crecimiento de bacterias. Luego, las siembras se incubaron a 28°C por 7 días, según el procedimiento descrito en Sun *et al.* (2009). Además de lo anterior, para llevar a cabo un control, en medio líquido PDA a pH 4,5 se adicionaron pequeñas fracciones de las muestras ya desinfectadas y fueron puestas en un agitador a 100 rpm y 29°C.

Las cepas aisladas fueron preservadas por medio de una solución de glicerol, un crioprotector, siguiendo el protocolo descrito en *Long-Term Preservation of Fungal Cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): Protocols and Results*, de Ozerkaya *et al.* (2013), con algunas modificaciones. De esta manera, se llevó a cabo el lavado de esporas en las cajas Petri con una solución de glicerol v/v al 10% estéril, teniendo en cuenta que dicha solución no debía estar por debajo de 10⁶ esporas/mL. Una vez obtenida la solución, se adicionó la cantidad suficiente en crioviales estériles de 2 mL, los cuales, consiguientemente, fueron puestos en una criocaja, debidamente rotulados para luego ser introducidos en una nevera a -20°C.

4.2. Cultivo en medio líquido de los aislamientos fúngicos y evaluación de la actividad antioxidante de sus fracciones de polisacáridos extracelulares

Esta parte experimental se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos por el diseño de experimentos factorial con DCA (Diseño Completamente al Azar) para evaluar el efecto del tipo de medio de cultivo (medio líquido PDA y medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% ambos a pH 6), como factor sobre la producción de polisacáridos extracelulares con actividad antioxidante por parte de las cepas fúngicas crecidas en éstos. El número máximo de cepas a evaluar fue de 6, correspondientes al crecimiento de las muestras de hojas y corteza. El procedimiento anterior fue hecho por duplicado, obteniendo así un total de 24 unidades experimentales, con sus respectivos controles.

De esta manera, a los aislamientos fúngicos obtenidos en la etapa anterior, se les realizó un lavado con 1 mL de tween 80 al 0,01% con el objetivo de recuperar las esporas de la caja Petri. Esto, se repitió hasta recuperar aproximadamente 15 mL de solución de esporas en un tubo Falcon para la posterior inoculación de 3 mL en los dos medios de cultivo previamente dichos, por duplicado. Es importante tener en cuenta que antes de realizar el inóculo en el medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4%, éste fue filtrado usando una membrana de 0,2 mm bajo condiciones estériles, con el fin de eliminar la posibilidad de crecimiento bacteriano.

Los experimentos de cultivo que se encontraban en frascos HATSU® fueron puestos en un agitador a 75 rpm y 29°C por un periodo de 5 días. A partir de aquí, fueron puestos en una incubadora a 30°C, sin agitación, pues con ensayos preliminares, se demostró crecimiento óptimo sin presencia de agitación, además que la literatura también reporta estos datos (Elfita *et al.* 2014). Lo que se obtuvo de cada muestra, se filtró con filtros de café #4 y fue llevado a un rotavaporador RC 900 de KNF® a 40°C de baño maría y agitación del balón de 163 rpm, con el fin de separar la fracción de polisacáridos del medio desgastado y concentrarla a una cantidad aproximada de 15-20 mL. Dicha fracción fue recolectada en un tubo Falcon de 50 mL, al cual se le agregaron dos veces la cantidad obtenida anteriormente en etanol al 96% para posterior centrifugación por 20 minutos a 3900 rpm. Finalmente, se obtuvo un pellet, el cual, fue disuelto en 25 mL de agua destilada tipo I y llevado a diálisis con una membrana SnakeSkin® de 3500 Molecular-Weight Cutoff (MWCO) hasta dejar las moléculas de interés. Después de aproximadamente 48-72 horas, fue recogido, congelado a -80°C y llevado a un liofilizador FDU-1110 · 2110 EYELA® por 24 horas. Este procedimiento también fue realizado con los controles de cada medio de cultivo, con lo que fue posible obtener los extractos crudos de polisacáridos de cada muestra.

El porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra liofilizada fue evaluado usando el ensayo de radicales libres DPPH según la metodología descrita por Chao *et al.* (2015), con algunas modificaciones. Antes de llevar a cabo la reacción,

se debió adecuar la muestra para que fuera soluble, es decir, se disolvieron 10 mg de cada extracto crudo (2 mg/mL) en una relación 3:1 de agua y metanol (75% de agua y 25% de metanol) en un balón aforado de 5 mL. De esta manera, la mezcla de la reacción consistió en agregar 50 µL de muestra ya solubilizada, junto con 100 µL de una solución 100 µM de DPPH en metanol. Lo anterior, fue medido espectrofotométricamente en un lector de microplatos Synergy™ H1 Multi-Mode Reader de BioTek®, a 515 nm por cuadruplicado, siguiendo una cinética de reacción de 30 minutos y teniendo en cuenta los respectivos blancos y controles.

Como blanco general se usaron 150 µL de metanol (Abs_{blanco}) y como control general, 100 µL de la solución DPPH y 50 µL de metanol ($Abs_{controlDPPH}$); adicionalmente, las muestras de cada polisacárido extracelular tuvieron su respectivo blanco, siendo este: 50 µL de muestra y 100 µL de metanol ($Abs_{blanco muestra}$). Lo anterior fue necesario debido a que las muestras no presentaron las mismas características: en algunas se evidenció turbidez o coloración característica en solución, con lo cual se redujo el error al aplicar este blanco. De esta forma, siguiendo dichas modificaciones, el porcentaje de inactivación del radical DPPH por parte de las muestras se determinó usando la ecuación 1, presentada a continuación (García *et al.* 2012):

$$\% \text{ inactivación} = 100 - \left[\frac{[(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) - Abs_{blanco muestra}] \times 100}{(Abs_{control DPPH} - Abs_{blanco})} \right] \quad (1)$$

4.3. Caracterización fenotípica

En primer lugar, para identificar las características del cultivo, según el procedimiento descrito por Rosemary, *et al.* (2013), el patrón de crecimiento y la pigmentación fue registrado durante el periodo de incubación, para facilitar posterior identificación. Por otro lado, la morfología de las colonias, junto con algunas estructuras características, fueron observadas haciendo uso del colorante azul lactofenol, del cual, se adicionó una gota sobre una lámina para microscopio. Sobre esta, se puso una porción pequeña de las esporas de la cepa haciendo uso de la técnica con cinta adhesiva (impronta), y posterior a esto, la placa fue observada en un microscopio Nikon® ECLIPSE E200 y se dejó registro fotográfico de lo observado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Colecta, aislamiento y preservación de hongos endófitos

Se colectaron muestras de hoja y corteza de *Otoba gracilipes*, *Vismia baccifera* y *Cecropia peltata* en el predio “La Carolina” (3°24'10.662"N, 76°36'52.774"W) (ver figura 1), a las cuales se les realizó el tratamiento adecuado de aislamiento por duplicado (A y B) en cajas Petri que contenían medio PDA. Después de distintos periodos de incubación, se obtuvieron 6 aislamientos fúngicos, de los cuales, dos pertenecen a las hojas del lacre, dos a la corteza del lacre, uno a las hojas de

otobo juvenil y el último, a la corteza de otro juvenil. Es relevante mencionar que se tuvieron en cuenta controles para cada muestra, pues éstos fueron importantes para asegurar que la metodología de aislamiento estuviera siendo aplicada correctamente. Es decir, constatar mediante esta etapa de esterilización de las muestras recolectadas, que los hongos finalmente aislados efectivamente sí vinieran de la parte interna y no de otro microorganismo que pudiera habitar en la superficie de los tejidos vegetales.

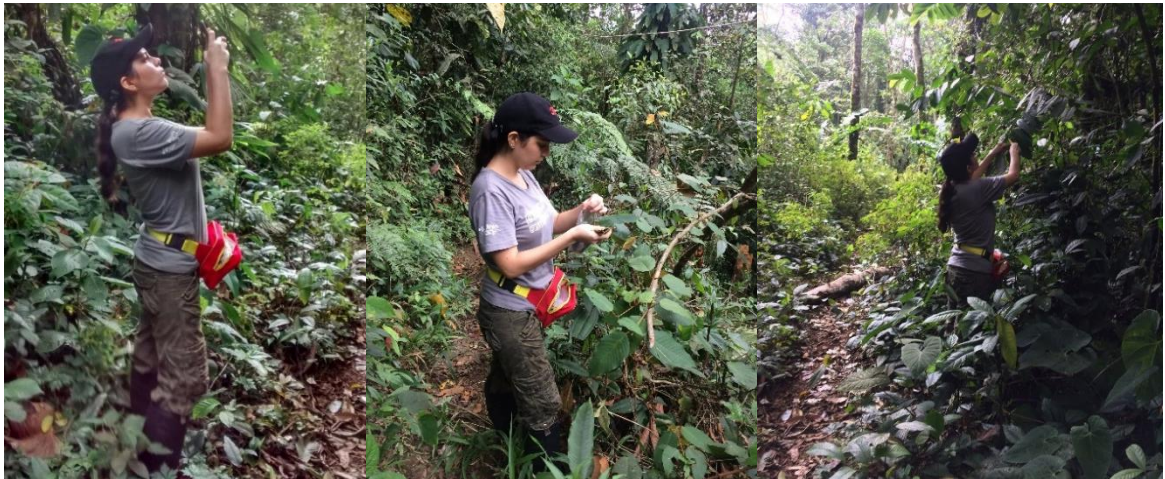


Figura 1. Recolección de muestras en el predio “La Carolina”.

Durante esta parte experimental, se observaron comportamientos anormales en los cultivos correspondientes a la corteza de yarumo blanco B. En primera instancia, se realizó una resiembra de las muestras para corroborar que no fuera un error durante el procedimiento de esterilización; no obstante, después del periodo de incubación, el control, que debía permanecer traslúcido, presentó turbidez y la caja Petri se tornó de un color naranjado (figura 2), por lo que fue pertinente concluir que se trataba de un caso de contaminación ambiental.

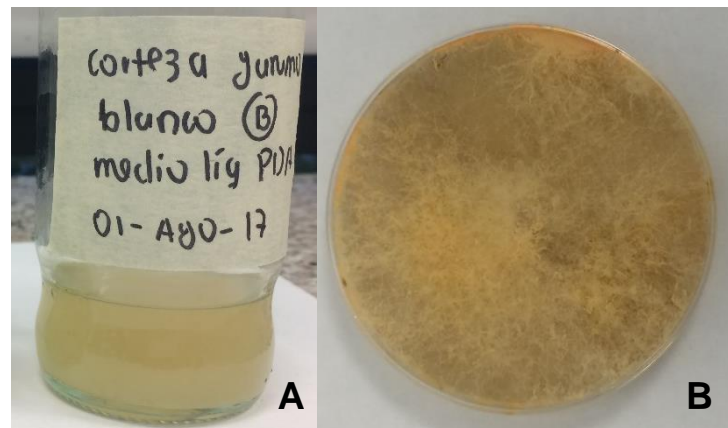


Figura 2. A. Control de corteza de yarumo blanco y B. Aislamiento fúngico contaminado para corteza yarumo blanco B.

Con base en lo anterior, a pesar de que la cepa que correspondía a las hojas de yarumo blanco no presentó el color naranjado que se asocia con contaminación, se decidió descartarla junto con sus controles con el fin de evitar errores en la etapa posterior. Esto, se ejecutó no sólo por lo que se explicó previamente, sino porque debido a que el dosel de este árbol se encuentra a aproximadamente 20 m de altura (Gómez y Lázaro, 2009), fue imposible recolectar muestras frescas; por el contrario, las muestras que fueron recolectadas se tomaron del suelo, una vez éstas han caído del árbol: estaban secas, tal como se observa en la figura 3. Así pues, de acuerdo con los protocolos de aislamiento de hongos endófitos propuestos por Prihantini y Tachibana (2017) y por Sun *et al.* (2009), las muestras deben estar totalmente frescas para asegurar que estos hongos, que están dentro de los tejidos vegetales, estén vivos; por lo que las muestras deben ser recolectadas directamente del árbol.



Figura 3. Visualización de las hojas secas de *Cecropia peltata* recolectadas en el predio “La Carolina”.

Respecto a las hojas y corteza de otobo juvenil (*O. gracilipes*), fue posible aislar dos cepas, con algunas características en común. Para las hojas, tal como se evidencia en la figura 4, se presenció un crecimiento uniforme pero no completo en toda la caja Petri, de un color amarillo pálido con algunas estructuras blancas, pero no tan predominantes como el de la cepa que corresponde a la corteza de este árbol (figura 5), pues en ésta, se evidenció un color blanco algodonado en toda la caja Petri. Es importante resaltar que el aislamiento de esta cepa fue consistente desde el primer momento que se cultivó y no presentó rastros de contaminación durante el proceso. Adicional a esto, los controles que se tenían para cada uno permanecieron traslúcidos durante toda la etapa de aislamiento, constatando que el protocolo propuesto de esterilización resultó ser óptimo para las muestras sembradas en dichas caja Petri y lo que puede dar un indicio que efectivamente, se trata de hongos endófitos.

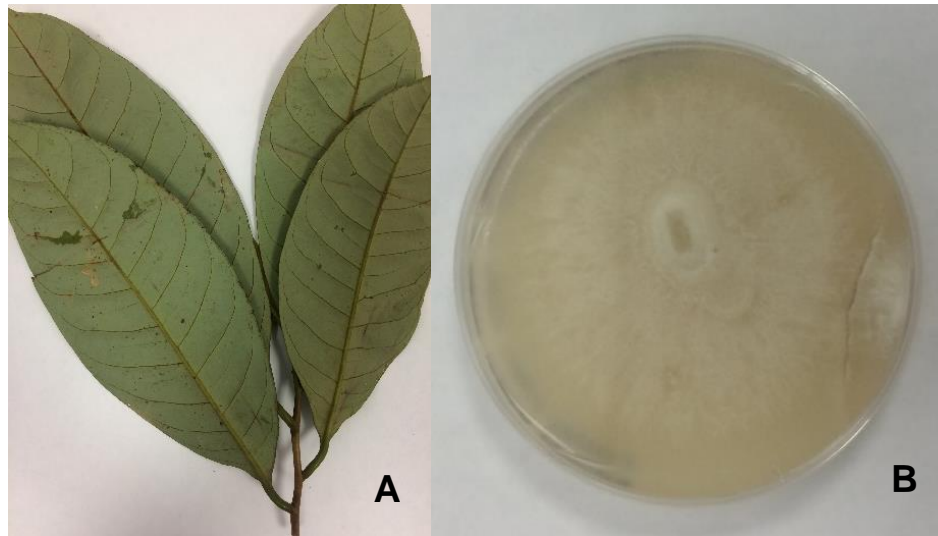


Figura 4. **A.** Muestra de las hojas de *Otoba gracilipes* recolectadas en el predio “La Carolina” y **B.** Aislamiento fúngico hojas otobo juvenil A.

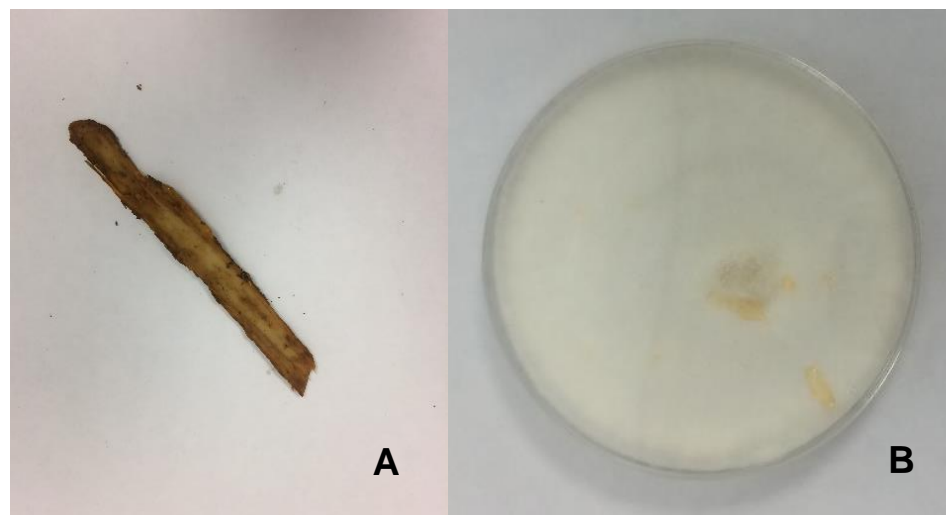


Figura 5. **A.** Muestra de la corteza de *Otoba gracilipes* recolectada en el predio “La Carolina” y **B.** Aislamiento fúngico corteza otobo juvenil B.

Por otro lado, de las hojas de *V. baccifera* fue posible aislar dos cepas, tal como se evidencia en la figura 6: una correspondiente a uno de los inóculos iniciales A, y otra, a la réplica B. Así pues, de acuerdo con las observaciones macroscópicas realizadas de estas cepas, se puede decir que la primera de ellas presentó un color café claro en el centro, del cual luego se desprende una estructura algodonada que no es uniforme en toda la caja Petri; mientras que, en la segunda, se observa un crecimiento poroso de color verde oscuro militar alrededor del inóculo y después, una estructura blanca de tipo algodonado, pero no uniforme.

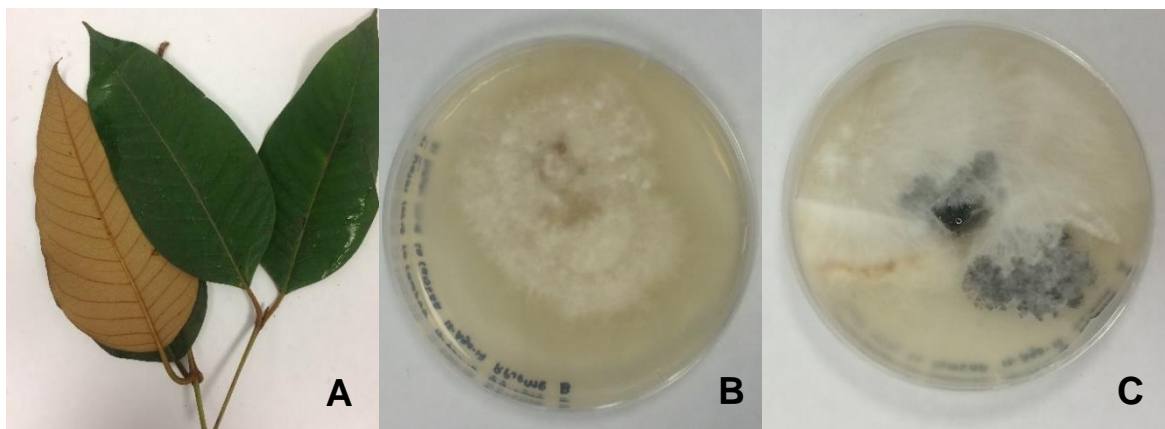


Figura 6. **A.** Muestra de las hojas de *Vismia baccifera* recolectadas en el predio “La Carolina” **B.** Aislamiento fúngico hojas lacre B y **C.** Aislamiento fúngico hojas lacre A.

De manera similar ocurrió con los aislamientos correspondientes a la muestra de corteza de lacre recolectada, pues el crecimiento del primer aislamiento (véase B en la figura 7), no fue consistente con la caja Petri inicial desde la cual se realizó el inóculo. Este primer aislamiento presentó un crecimiento alrededor del inóculo de tipo algodónado, de color blanco y posterior a esto, en lo que restaba de la caja Petri, se evidenció un crecimiento menos uniforme, incluso en alto relieve, a diferencia del segundo aislamiento. Como se aprecia en la figura 7C, el crecimiento de este aislamiento fue muy diferente al anterior, ya que alrededor del inóculo se ve verde oscuro pálido y de ahí se desprende un halo café y finalmente, otro de color naranjado. Este crecimiento puede explicarse por el látex natural que exuda de los cortes de la muestra de corteza, el cual es de color zapote intenso.

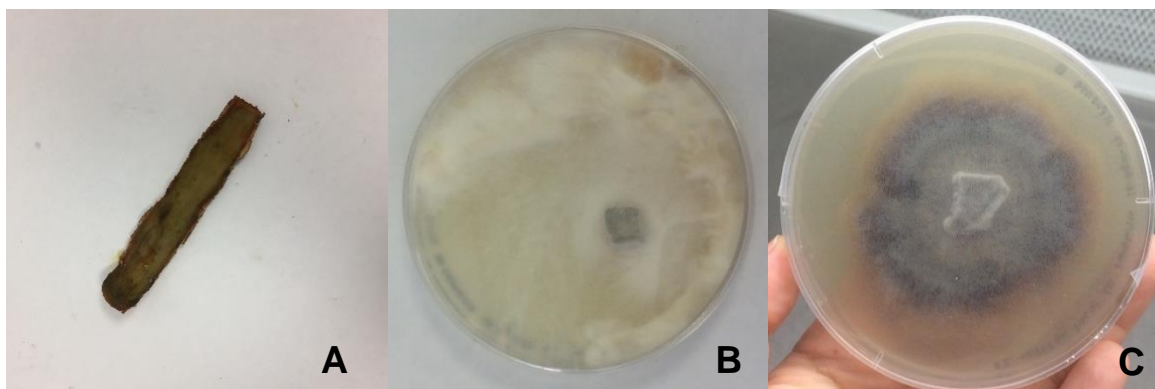


Figura 7. **A.** Muestra de la corteza de *Vismia baccifera* recolectada en el predio “La Carolina” **B.** Aislamiento fúngico corteza lacre B1 y **C.** Aislamiento fúngico corteza lacre B2.

Vale la pena destacar que aislar estas dos cepas resultó interesante debido a que el inóculo inicial desde el cual se obtuvieron no presentaba un crecimiento

uniforme, además de ser totalmente diferente a los aislamientos hallados. Lo que interesa observar aquí es que esto ocurre por el subcutivo repetido, el cual es frecuentemente utilizado como método de rutina para la preservación de hongos; empero, no es muy práctico para el almacenamiento de grandes cantidades de cultivos: es lento, propenso a la contaminación y no evita los cambios genéticos y fisiológicos durante el mantenimiento a largo plazo (Kitamoto *et al.* 2002; Homolka, 2012). Por otro lado, también tiene algunas ventajas como que es económico, poco exigente y aplicado universalmente. Actualmente, según Homolka (2012), este método se utiliza en la mayoría de las colecciones de cultivos con fondos limitados y también en muchas, incluidas las más destacadas, como segundo método además de la criopreservación o la liofilización.

Sin embargo, por las características observadas en algunos aislamientos: dificultad para aislar por presencia de contaminación constante y cambio en características morfológicas, se aplicó la metodología descrita en Ozerkaya *et al.* (2013), con lo que fue posible preservar 2 de los 6 aislamientos fúngicos haciendo uso de una solución de glicerol al 10%, criopreservante que ha probado ser uno de los más efectivos para hongos (Ohmasa *et al.* 1992; Kitamoto *et al.* 2002; Homolka *et al.* 2006; Sato *et al.* 2012). En adición, fueron rotulados con el código EBB-ET (Ecología, Bioprospección y Bioprocesos-Endófitos Tropicales), seguido por una numeración que indica la muestra o el aislamiento fúngico (ver anexo 1). Sólo fue posible preservar hasta el momento 2 aislamientos fúngicos, a pesar de que la concentración de esporas no estaba en el orden establecido en el protocolo ($\geq 10^6$ esporas/mL). Para las hojas de otobo juvenil A, se logró llegar a una solución stock de 0,5 mL con una concentración de $2,41 \times 10^4$ esporas/mL, por lo se inocularon dos crioviales (EBB-ET01 y EBB-ET02) y se completó volumen hasta 2 mL con la solución de glicerol al 10%. Finalmente, para la corteza de otobo juvenil B, se obtuvo una solución stock de 1,5 mL con una concentración de $7,78 \times 10^4$ esporas/mL, por lo que ésta fue inoculada en 4 crioviales, se completó volumen con la solución de glicerol y se rotularon con el código desde EBB-ET03 hasta EBB-ET06.

Los crioviales obtenidos fueron puestos en criocajas a -20°C y se espera realizar la prueba de viabilidad, para de esta manera, tener certeza que las esporas son viables para uso en investigaciones futuras. No obstante, la viabilidad no puede ser el único criterio para la evaluación del éxito de la criopreservación (Homolka, 2012), además que, en algunos casos, la congelación y descongelación repetida disminuye la viabilidad de los cultivos (Nakasone *et al.* 2004) así como también el tipo de criopreservante usado y la fluctuación en la temperatura durante el periodo de almacenamiento (Humber, 2012). Dicho lo anterior, no se puede garantizar que ningún tratamiento de preservación proporcione estabilidad total a la producción secundaria de metabolitos, aunque la criopreservación ha sido uno de los mejores métodos probados (Smith, 1993).

5.2. Cultivo en medio líquido de los aislamientos fúngicos y evaluación de la actividad antioxidante de sus fracciones de polisacáridos extracelulares (PSE)

Así pues, una vez obtenidos los aislamientos fúngicos en la etapa anterior, se procedió a realizar la solución de sus esporas. Con el fin de evitar contaminación cruzada, se llevó a cabo el inóculo de dicha solución en medio líquido PDA y en medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% de una cepa por día. Este procedimiento fue hecho por duplicado. Una vez pasaron exactamente 30 días, partiendo del supuesto que en dicho periodo de tiempo los aislamientos fúngicos excretarían los polisacáridos, se filtraron las muestras, dando como resultado una disminución en la cantidad de medio, el cual era inicialmente de 200 mL (tabla 1).

Tabla 1. Volumen obtenido en el medio líquido PDA y medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% para los aislamientos fúngicos.

Aislamiento fúngico	Tipo de medio			
	PDA (mL)		PDA + extracto de levadura al 0,4% (mL)	
	1	2	1	2
Hojas otobo juvenil A	172	168	158	180
Corteza otobo juvenil B	163	168	168	148
Hojas lacre A	165	175	160	170
Hojas lacre B	175	169	175	166
Corteza lacre B1	186	176	182	N/A
Corteza lacre B2	172	N/A	190	N/A

**1 y 2 hacen referencia a que el cultivo se hizo por duplicado.*

Llegados a este punto, se puede explicar dicha disminución del volumen en los medios de cultivo debido a la excreción de los polisacáridos, es decir, se podría relacionar de manera proporcional la disminución del medio con la mayor producción de polisacáridos. Otra característica para resaltar y que puede estar relacionada también con estos resultados es la coloración de los medios de cultivo, pues éstos, en comparación con el control, presentaron alto grado de turbidez, adicional al crecimiento tanto en el líquido como en la interfase de estructuras porosas, similares a los crecimientos en las cajas Petri para cada cepa en específico. Para ejemplificar, en la figura 8 se muestran las características mencionadas previamente en medio líquido PDA y en la figura 9 para medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% para la corteza de otobo juvenil B.

Para algunos aislamientos, no fue posible obtener resultados con réplica debido a que durante el proceso de excreción de los polisacáridos, la estructura que crecía en la interfase, o resultó inconsistente con los otros medios líquidos, o con el aislamiento del cual se realizó la solución de esporas. Este fue el caso para la corteza lacre tanto B1 como B2. Finalmente, durante este proceso de filtración, se

percibió una característica interesante en el aislamiento correspondiente a corteza otopo juvenil B, el cual, en una de las réplicas de medio PDA exhibía un olor a citronela, mientras que, en la otra réplica, a limoncillo; lo que podría asociarse a la producción de metabolitos secundarios por parte de la cepa. En lo que respecta a las hojas otopo juvenil A y hojas lacre B, en medio PDA se percibió un olor a masa de pan. Después de las percepciones olfativas en ambos medios, se puede concluir que, en el medio PDA con extracto de levadura, no fue posible establecer una comparación con un olor específico, pues el olor intrínseco de la levadura predominaba en la mayoría de los casos, a pesar de que la concentración fuera del 0,4%.

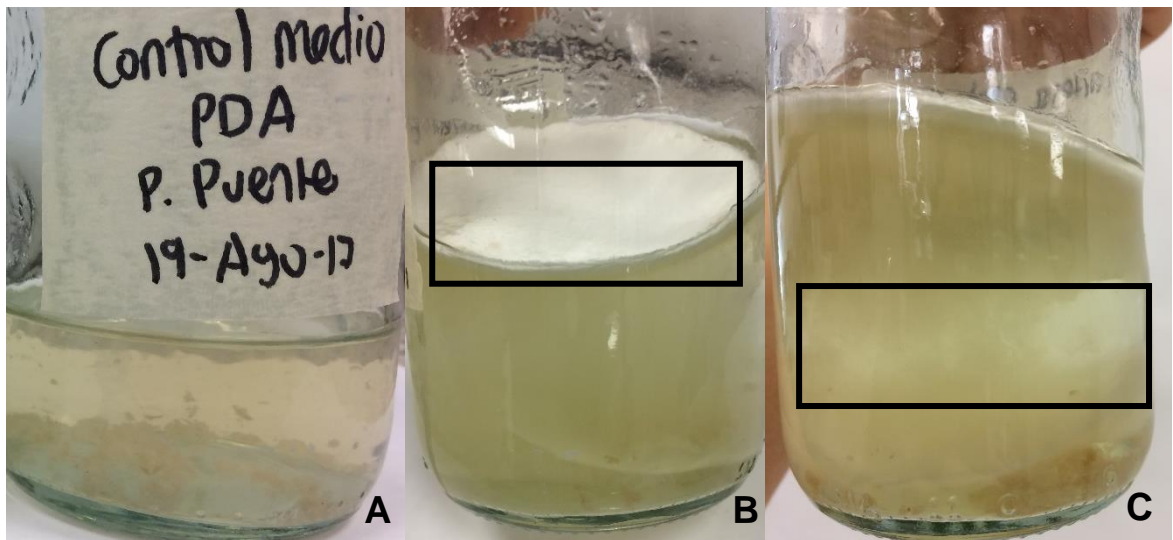


Figura 8. A. Control medio líquido PDA, B. crecimiento de la interfase consistente con el aislamiento (véase figura 5) y C. enturbiamiento del medio para corteza otopo juvenil B.

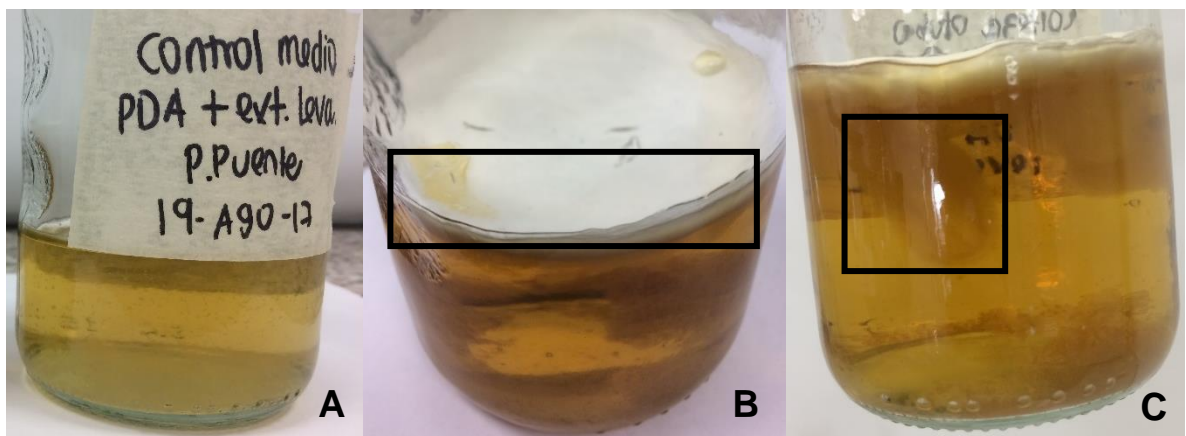


Figura 9. A. Control medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4% B. crecimiento de la interfase consistente con el aislamiento (véase figura 5) y C. cambio de coloración en el medio para corteza otopo juvenil B.

Una vez culminada esta parte, las cantidades filtradas fueron concentradas hasta un volumen que oscilaba entre los 15 y 20 mL, haciendo uso de un rotavaporador con el objetivo de separar las moléculas volátiles. Durante esta parte, se percibió que los volátiles obtenidos para la corteza de otobo juvenil B en medio PDA, siguieron presentando el olor predominante a citronela como se mencionó previamente cuando se realizaron las descripciones olfativas de los medios antes de filtrarlos. Con lo cual, se reafirma que a pesar de que este no era el objetivo de estudio, este hallazgo sugiere la probabilidad de explorar la industria de compuestos aromatizantes, pues quizá esta cepa esté sintetizando moléculas interesantes que pueden ser descubiertas en futuras investigaciones.

Posterior a esto, las muestras fueron puestas en membranas de diálisis con tamaño de poro de 3500 Da durante 72 horas con el fin de separar las moléculas pequeñas como sales provenientes del buffer, por ejemplo, y que permanecieran las moléculas grandes de interés: los polisacáridos. Es de suma importancia mencionar que, durante esta etapa, algunas de las muestras se filtraron en mayor medida que otras de la membrana, por lo que esto puede ser un indicativo que la diálisis sí funcionó, pues se esperaba que quedarán dichas moléculas de interés y salieran las de menor tamaño.

Así pues, se percibió que para las hojas de otobo juvenil A, la cantidad de extracto crudo fue significativamente menor comparada con los otros aislamientos (véase tabla 2); por lo que se podría pensar aumentar el tamaño de poro de la membrana de diálisis ya que quizá, durante el procedimiento de excreción de polisacáridos, se excretaron moléculas de tamaño similar a éstos, por lo que el extracto obtenido no resultó ser relativamente tan concentrando ni “puro”. Así, en la tabla 2 se relacionan las cantidades en miligramos obtenidas para cada aislamiento en los dos tipos de medio de cultivo, como sigue:

Tabla 2. Cantidades obtenidas de extracto crudo después de la etapa de liofilización para los aislamientos fúngicos y para los controles en medio líquido PDA y medio líquido PDA con extracto de levadura al 0,4%.

Extracto crudo	Tipo de medio			
	PDA (mg)		PDA + extracto de levadura al 0,4% (mg)	
	1	2	1	2
Hojas otobo juvenil A	46,95	38,15	60,95	N/A
Corteza otobo juvenil B	108,88	55,53	61,51	18,13
Hojas lacre A	378,52	359,49	161,92	291,90
Hojas lacre B	213,96	83,63	178,99	37,79
Corteza lacre B1	211,72	106,91	58,56	N/A
Corteza lacre B2	373,45	N/A	229,33	N/A
Controles	184,63		178,96	

Partiendo de los resultados mostrados en la tabla 2, se prepararon soluciones de 2mg/mL de extracto crudo en una proporción 3:1 de agua:metanol y se evaluaron con sus respectivos controles y con el radical DPPH, el cual se estandarizó con un R^2 de 0,975 (ver anexo 2 y 3). Para algunos extractos crudos, como los correspondientes a las hojas de otopo juvenil A, se presentó problema visible de solubilidad cuando se hizo la adecuación de la muestra para posterior lectura de la absorbancia. Por tanto, se calentó levemente (50°C) y se agitó a 1000 rpm en 3,75 mL de agua destilada con el objetivo de tener mayor poder de disolución. Pasados 30 minutos, se logró solubilizar en mayor cantidad que antes, lo que claramente pudo evidenciarse en los resultados obtenidos (véase gráfico 1). Vale la pena destacar que este problema de solubilidad presentado reafirma la hipótesis previamente dicha que con este aislamiento se obtuvo un extracto crudo más concentrado y “puro” y, por tanto, quizá, con mayor poder antioxidante.

De aquí en adelante, por motivos prácticos de discusión y análisis estadísticos, se definirá una terminología para cada extracto crudo del aislamiento fúngico correspondiente a las muestras recolectadas, así como también para los tipos de medio de cultivo, tal como se evidencia a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. Terminología propuesta para los aislamientos fúngicos y los tipos de medio de cultivo líquidos.

Aislamiento fúngico	Terminología
Hojas otopo juvenil A	Cepa 1
Corteza otopo juvenil B	Cepa 2
Hojas lacre A	Cepa 3
Hojas lacre B	Cepa 4
Corteza lacre B1	Cepa 5
Corteza lacre B2	Cepa 6
Tipo de medio de cultivo	Terminología
PDA	Medio 1
PDA + extracto levadura al 0,4%	Medio 2

Así pues, haciendo uso del software estadístico Minitab18, una vez las cantidades exactas de extractos crudos fueron leídas en un lector de microplatos a 515 nm y siguiendo una cinética de reacción de 30 minutos, se evaluó como variable de respuesta el porcentaje de inactivación (% inactivación) del radical DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL (ver anexo 7), teniendo en cuenta además la interacción entre cepas, entre medios y entre cada cepa con los medios (gráfico 1). Es importante percatar que se decidió escoger dicha variable de respuesta, porque de acuerdo con la gráfica presentada en el anexo 6, el mayor descenso de las curvas en los tratamientos respecto a la cantidad remanente de DPPH fue determinante a tiempo 5, comparándolos con los controles (complementar con anexo 4 y 5).

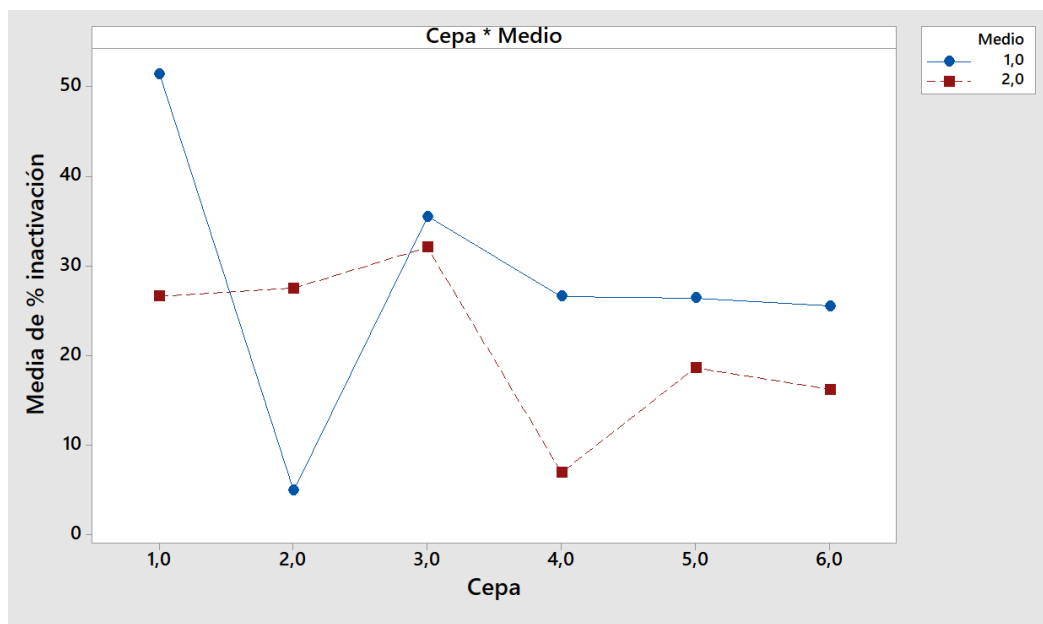


Gráfico 1. Interacción entre cada cepa y cada medio respecto al % inactivación del radical DPPH a los 5 minutos de reacción.

Por esto, siguiendo una distribución normal de los datos, se llevó a cabo un análisis de varianza (ver anexo 8), el cual sugiere que existen diferencias significativas entre cepas y entre cada cepa con los medios, pues el valor p para ambos casos resultó ser menor a 0,05; pero no existen diferencias significativas entre los medios ($p > 0,05$). Lo dicho previamente, puede evidenciarse claramente en el gráfico 1, donde se representa la interacción entre cada cepa y cada medio respecto al porcentaje de inactivación del radical DPPH a los 5 minutos de reacción. Cuando el DPPH reacciona con un compuesto antioxidante, que puede donar un hidrógeno, se reduce; lo que produce un cambio de coloración: de violeta intenso a amarillo brillante (García *et al.* 2012), por lo que entre mayor sea el porcentaje de inactivación, mayor será el poder antioxidante del extracto crudo de los aislamientos fúngicos. De esta manera, se puede concluir que la cepa 1 en el medio 1, correspondiente a las hojas otobo juvenil A en el medio PDA, es la que presenta mayor poder antioxidante (anexo 9), pues inactivó el radical DPPH 51,46%, un resultado esperado en estudios sobre actividad antioxidante.

En adición, también se puede llegar a la conclusión que la cepa 3 no presenta diferencia significativa respecto al porcentaje de inactivación del radical DPPH de acuerdo con el medio en el que esté. Es decir, el poder antioxidante de este extracto crudo no cambia significativamente en medio PDA y en medio PDA con extracto de levadura al 0,4%. Más aún, las cepas 4, 5 y 6, presentan un porcentaje de inactivación significativamente igual en medio líquido PDA y las cepas 1 y 2 en el medio líquido PDA con extracto de levadura; lo que sugiere que pueden tener información genética similar para la síntesis de compuestos antioxidantes y que la composición de dicho medio, induzca la expresión de esos genes. La cepa 2 presentó el menor porcentaje inactivación en el medio líquido PDA y la cepa 4 en

PDA con extracto de levadura, lo que sugiere que la cantidad de polisacáridos con poder antioxidante presentes no fue suficiente para inactivar el radical DPPH a los 5 minutos de reacción, pues no superó el 30% de inactivación (ver anexo 7), que es el porcentaje máximo con el cual, se espera seleccionar las cepas para establecer la colección de hongos endófitos con elevada actividad antioxidante.

A pesar de que la prueba de Tukey y el ANOVA sugieran que no existe diferencia significativa entre medios, se puede concluir con base en el gráfico 1 y con base en el valor p referente para la interacción cepa*medio, que el medio que induce la mayor producción de compuestos antioxidantes es el medio líquido PDA. Igualmente, el gráfico 2B, sirve como apoyo para dicha conclusión, pues evidencia de forma clara que el medio 1 presenta mayor porcentaje de inactivación que el medio 2. Del mismo modo, basándose en este mismo gráfico, parte A, se puede reafirmar que la cepa que presenta mayor porcentaje de inactivación corresponde a la cepa 1 y la que presenta menor porcentaje de inactivación del radical DPPH, es la cepa 2.

Estos resultados son sugestivos y prometedores, debido a que si bien, existen investigaciones direccionadas a la familia en la que se encuentra la especie de árbol que en este estudio presentó mayor actividad antioxidante, pero la mayoría son relacionadas con la actividad antimicrobiana. Es importante entonces reconocer el potencial de explotación que queda para ecosistemas tropicales no sólo del Valle del Cauca, sino en Colombia y Latinoamérica, porque la distribución de *Otoba gracilipes* se concentra en dichos sectores.

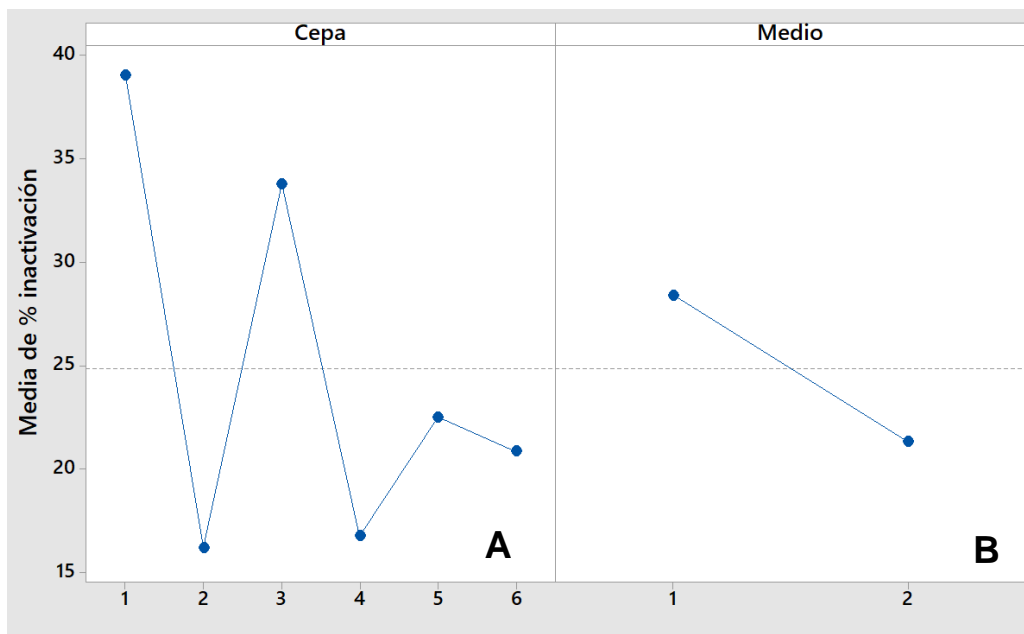


Gráfico 2. Efectos principales relacionados con **A.** la cepa y **B.** el medio para el porcentaje de inactivación del radical DPPH a los 5 minutos de reacción.

5.3. Caracterización fenotípica

Una vez se obtuvieron los aislamientos, se efectuó la identificación de las características macro y microscópicas de los mismos, basándose en literatura como *Fundamentals of the Fungi* de Moore (1972) y *Microbiología* de Prescott *et al.* (2002). Se identificaron características morfológicas presentes en 3 de los 6 aislamientos fúngicos haciendo uso del colorante azul de lactofenol y la técnica de la cinta adhesiva (impronta) a una magnificación de 40X.

Si bien, en la figura 10, se puede observar la imagen tomada desde el microscopio correspondiente al aislamiento que presentó mayor actividad antioxidante: hojas otopo juvenil A. Se lograron identificar hifas septadas, una de ellas, señalada con una flecha en la parte inferior; y en la parte superior, lo que podrían ser clamidosporas (esporas de tipo asexual) en el interior de una hifa. Como se mencionó con anterioridad (figura 4B), macroscópicamente se presencié un crecimiento uniforme pero no completo en toda la caja Petri, de un color amarillo pálido con algunas estructuras blancas.

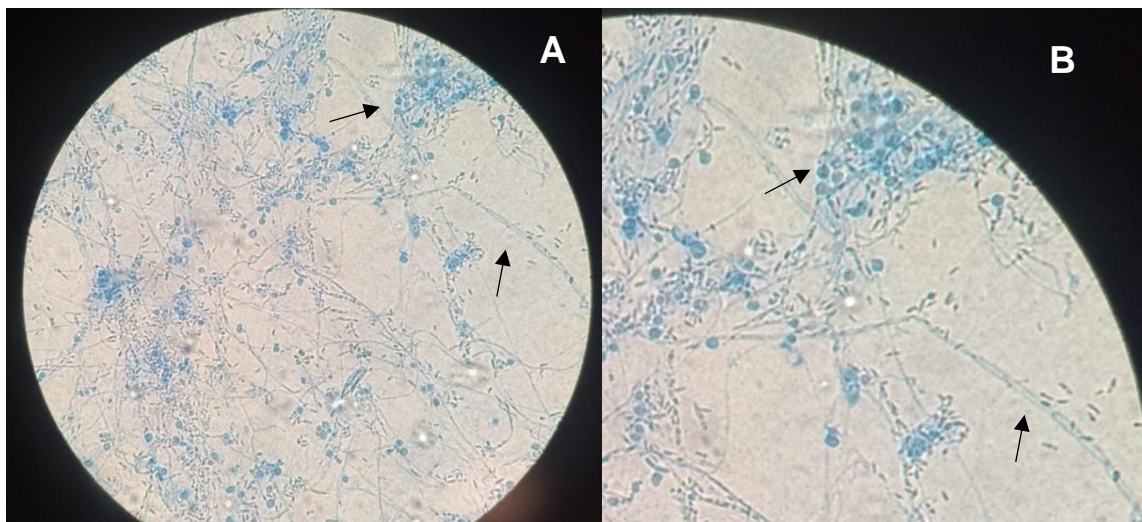


Figura 10. A. Imagen general y B. acercamiento de la micromorfología del aislamiento fúngico correspondiente a hojas otopo juvenil A bajo la luz del microscopio a una magnificación de 40X.

En la figura 11 se aprecian claramente hifas septadas generativas, señaladas con una flecha en la parte inferior. En la parte superior se ve lo que podría ser un conidióforo con una fiálide, las cuales son células capaces de producir conidios; empero, en este aislamiento, todavía no se puede tener certeza de dicha identificación. Respecto a las características macroscópicas, se observó un crecimiento poroso de color verde oscuro militar alrededor del inóculo y después, una estructura blanca de tipo algodónado, pero no uniforme (véase figura 6C).

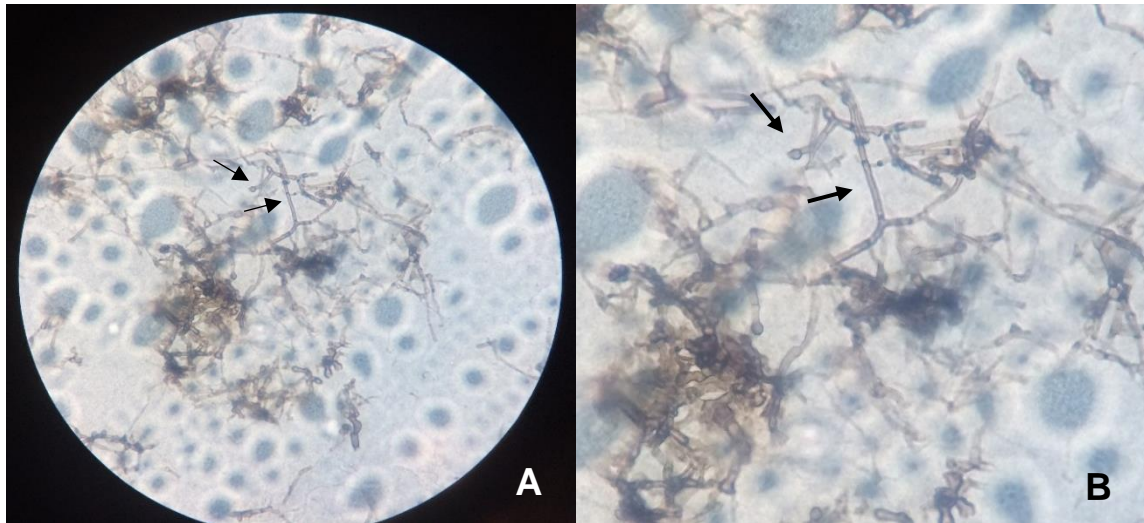


Figura 11. A. Imagen general y **B.** acercamiento de la micromorfología del aislamiento fúngico correspondiente a hojas lacre A bajo la luz del microscopio a una magnificación de 40X.

Por último, en la figura 12 se observan hifas cenocíticas, sin embargo, no es posible determinar con claridad el tipo de espora con la micromorfología presentada. Es importante destacar que las estructuras microscópicas presentaron color verde, debido a la macromorfología del aislamiento: alrededor del inóculo se ve verde oscuro pálido y de ahí se desprende un halo café y finalmente, otro de color naranja intenso (véase figura 7B).

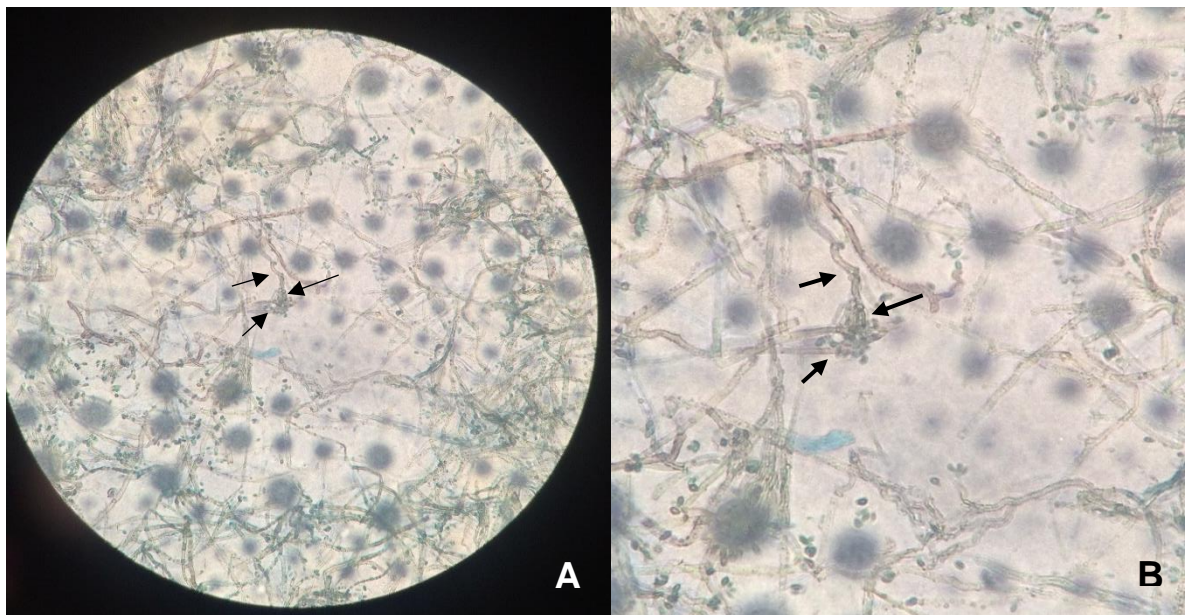


Figura 12. A. Imagen general y **B.** acercamiento de la micromorfología del aislamiento fúngico correspondiente a corteza lacre B2 bajo la luz del microscopio a una magnificación de 40X.

Sólo fue posible llegar a definir algunas de las estructuras reproductivas de estos aislamientos ya que la identificación de muchos hongos endófitos es complicada: no sólo porque no esporulan sino también porque no pueden ser equiparados con especies descritas, pues la información taxonómica es limitada (Gamboa, 2006). Empero, como la investigación continúa, se pretende ensayar con otros medios de cultivo que puedan inducir una esporulación más productiva, teniendo en cuenta el tipo de espora que presentan; asimismo, se espera seguir con el proceso de caracterización tratando de buscar las estructuras donde se están generando las esporas ya sea sexuales o asexuales.

6. CONCLUSIONES

Se lograron aislar 6 cepas de hongos endófitos obtenidas a partir de muestras de hoja y corteza de *Otoba gracilipes* y *Vismia baccifera*, recolectadas en el predio “La Carolina”: cepa 1-hojas otobo juvenil A, cepa 2-corteza otobo juvenil B, cepa3-hojas lacre A, cepa4-hojas lacre B, cepa5-corteza lacre B1 y cepa 6-corteza lacre B2. Se encontró alto potencial antioxidante en la cepa 1: hojas otobo juvenil A, debido a que redujo en más del 50% el radical DPPH a un tiempo de 5 minutos de reacción. Adicional a esto, el medio líquido que induce el mayor porcentaje de inactivación del radical DPPH con las cepas evaluadas es el medio PDA en comparación con el medio PDA con extracto de levadura al 0,4%, por lo que es conveniente afirmar que así las cepas sean diferentes, el medio puede ser un inductor sugestivo para la producción de extractos crudos con alto poder antioxidante.

Igualmente, se llevó a cabo la caracterización macroscópica de los aislamientos fúngicos, así como la identificación microscópica de algunas de sus estructuras reproductivas, pero no en su totalidad. Lo anterior, quizá a que se sabe que algunos hongos endófitos no esporulan, además de que la taxonomía para estos es limitada y compleja, lo cual disminuye la probabilidad de obtener resultados determinantes. Empero, como proceso de aprendizaje, contribuyó significativamente no sólo a la formación del investigador, sino a la posibilidad de seguir la línea de investigación, pues sí se determinó la presencia de estructuras características de algunas familias de hongos.

De esta manera, de acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que el diseño experimental propuesto para valorar la presencia de extractos crudos con potencial antioxidante a partir de hongos endófitos en muestras de especies de árboles correspondientes a ecosistemas tropicales del Valle del Cauca sí funciona como un screening. Adicional a esto, es necesario realizar investigación en ecosistemas que no han sido explorados en cuanto a las propiedades biológicas que puedan tener los microorganismos, ya que se cumplieron los resultados esperados.

Finalmente, para el establecimiento de la colección de hongos endófitos con elevada actividad antioxidante, se puede comenzar siguiendo un criterio de screening en todas aquellas cepas que arrojaron un porcentaje de inactivación del radical libre DPPH mayor a 30% como fue el caso de la cepa 1 y 3: hojas otobo juvenil A y hojas lacre A.

7. RECOMENDACIONES

Para aislar hongos endófitos, es necesario que las muestras recolectadas estén totalmente frescas, ya que de esta manera se asegura que los hongos estén vivos. Por eso, si se quiere repetir el procedimiento de aislamiento con las muestras de hojas de yarumo blanco, se debe buscar la manera de conseguirlas directamente del árbol, para evitar problemas de contaminación ambiental como fue este el caso durante el protocolo. En adición, también se sugiere la realización de más muestreos en el predio “La Carolina” durante otra temporada del año, pues la colecta para la realización de este proyecto fue ejecutada en verano; así como también, recolectar muestras de otros tipos de tejidos de los árboles, como raíces y tallos, por ejemplo.

Ahora bien, si se desea preservar las cepas aisladas durante un periodo de tiempo corto, éstas deben ser subcultivadas en nuevas cajas Petri cada mes. Por otro lado, si el objetivo es preservar las cepas por largo tiempo con un criopreservante, se debe considerar la posibilidad de realizar una solución de esporas con más de tres cajas Petri que contengan el aislamiento, pues de esta manera se asegura que la concentración de esporas/mL esté dentro del orden establecido en los protocolos (10^6 esporas/mL) y exista mayor probabilidad de que la viabilidad esté por encima del 80% cuando se haga la prueba.

Se recomienda trabajar más en la caracterización taxonómica, con el fin de definir con exactitud las estructuras reproductivas donde se generan las esporas y de igual manera, el filo al cual pertenecen los aislamientos encontrados. Adicionalmente, buscar la posibilidad de caracterización molecular para proporcionar un trabajo que ofrezca información potencial para futuras aplicaciones.

Por último, el hallazgo de una cepa con capacidad de producir compuestos volátiles aromatizantes, como lo fue la cepa 2-corteza de otopo juvenil B, abre una nueva posibilidad en la industria farmacéutica y de aromatizantes, por lo que se recomienda explorar este campo; a pesar de no haber tenido resultados promisorios en lo que respecta al potencial antioxidante.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, J.C., Bermúdez, C., Lozano, F.H. y Chacón, P. (2010). Hormigas cazadoras en un paisaje subandino de Colombia: riqueza, composición y especies indicadoras. *Revista Colombiana de Entomología*, 36 (1), 127, 134.
- Abud, M. y Torres, A. M. (2016). Caracterización florística de un bosque alto andino en el Parque Nacional Natural Puracé, Cauca, Colombia. *Boletín Científico Museo de Historia Natural Universidad de Caldas*, 20 (1), 27-39. doi: 10.17151/bccm.2016.20.1.3
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D. y Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3, 267–274.
- Arroyave, F. (2007). *Contribución de la precipitación horizontal al ciclo hidrológico de los páramos, con referencia inicial al páramo de Guerrero*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Avendaño, D. (2007). *Biomasa y capacidad de almacenamiento de agua de las epífitas en el Páramo de Guerrero (Cundinamarca, Colombia)*. (Trabajo de grado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Bandra, W., Seneviratne, G. y Kulasooroya, S. (2001). Infection among Endophytic Bacteria and Fungi: Effects and Potential. *Journal of Biosciences*, 3 (1), 645-650.
- Bhardwaj, A., Sharma, D. y Agrawal, P.K. (2014). Isolation and characterization of endophytic fungi from spikes of *Pinus roxburghii* growing in Himalayan region. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (9), 568–579.
- Bills, G.F., Giacobbe, B.A., Lee, S.H., Pelaez, F. y Tkacz, J.S. (1992). Tremorgenic Mycotoxins, Paspalitrems A and C, from a Tropical *Phomopsis*. *Mycological Research*, 96 (11), 977-983.
- Bohórquez, H., Buitrago, S.M., Cristancho, J.R., Robles, J., Mendieta, M.P. y Gutiérrez, G.L. (2016). Diversidad de coleópteros en un bosque alto andino del municipio de Santa Rosa de Viterbo (Boyacá). *Mutis*, 6 (2), 32-46.
- Brown, A. y Kapelle, M. (2001). Introducción a los Bosques Nublados del Neotrópico: una síntesis regional. En: Kapelle, M. y Brown, A. (Eds.). *Bosques Nublados del Neotrópico*. Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio.
- Brown, J. y Lomolino, M. (1998). *Biogeography*. 2ª ed. Inglaterra: Sinauer Associates Publishers.

- Brown, K.B., Hyde, K.D. y Guest, D.I. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity*, 1, 27–51.
- Bruijnzeel, L. (2004). Hydrological functions of tropical forests: not seeing the soil for the trees? *Agriculture Ecosystems and Environment*, 104 (1), 185-228.
- Camenzid, T., Homeier, J., Dietrich, K., Hempel, S., Hertel, D., Krohn, A., Leuschner, C., Oelmann, Y., Olson, P.A., Suárez, J.P. y Rilling, M. (2015). Opposing effects of nitrogen versus phosphorus additions on mycorrhizal fungal abundance along an elevational gradient in tropical montane forests. *Soil Biology & Biochemistry*, 1-11.
- Casella, T., Eparvier, V., Mandavid, H., Bendelac, A., Odonne, G., Dayan, L., Duplais, C., Espindola, L y Stien, D. (2013). Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. *Phytochemistry*, 370-377.
- Chao, L., Huang, Q., Xiong, F., Xiu-Jie, Y., Rui, H. y Li-Ju, Y. (2015). Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75 (1), 298-305.
- Congreso de Colombia. (22 de diciembre de 2015). CONVENIO MARCO DE ASOCIACIÓN SUSCRITO ENTRE EL DAGMA Y LA UNIVERSIDAD ICESI. [Ley 489 de 2015].
- Cui, J.L., Guo, T.T., Ren, Z.X., Zhang, N.L. y Wang, M.L., (2015). Diversity and Antioxidant Activity of Culturable Endophytic Fungi from Alpine Plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. *PLoS ONE*, 10 (3), 1-16.
- Díaz, P.L, Hennel, J.R y Sucher, N.J. (2012). Genomic DNA Extraction and *Barcoding of Endophytic Fungi*. En: Sucher, N.J., Hennel, J.R y Carles, M.C., *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (171-178). Nueva York: Humana Press.
- Denys, C. J. (2012). *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. USA, New York: Springer Science & Business Media.
- Elfita, Munawar, Muharni y Mastur. (2014). Identification of New Lactone Derivatives Isolated from *Trichoderma sp.*, An Endophytic Fungus of Brotowali (*Tinaspora crispa*). *HAYATI Journal of Biosciences*, 21 (1), 15-20.
- Fernandes, M., Silva, T., Pfenning, L., Costa, C., Heinrich, T., Alencar, S., Lima, M. e Ikegaki, M. (2009) Biological activities of the fermentation extract of the

- endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45 (4), 677–685.
- Fittkau, E., Illies, J., Klinge, K., Schwabe, J. y Sioli, H. (1968). *Biogeography and ecology in South America*. Paisajes bajos: Junk Publishers.
- Gamboa, M.A. (2006). Tropical Endophytic Fungi: Current Knowledge and Perspectives. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 3-20.
- Gamboa, M.A. y Bayman, P. (2001). Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*). *Biotropica*, 33 (2), 352-360.
- Gamboa, M.A., Laureano, S. y Bayman, P. (2002). Measuring diversity of endophytic in leaf fragment: does size matter? *Mycopathologia*, 156, 41-45.
- Gamboa, M.A., Laureano, S. y Bayman, P. (2005). Endophytic Phomopsis Strains from Leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Caribbean Journal of Science*, 41 (2), 215-224.
- Garazd, Y. y Garazd, M. (2016). NATURAL DIBENZO[b,d]PYRAN-6-ONES: STRUCTURAL DIVERSITY AND BIOLOGICAL ACTIVITY. *Chemistry of Natural Compounds*, 52 (1), 1-18.
- García, E. J., Oldono, T. L., Alencar, S. M., Reis, A., Loguercio, A. D. y Grande, R. H. (2012). Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23 (1), 22-27.
- Gómez, M.L. y Lázaro, J. (2009). *Boletín Técnico Biodiversidad No.4: Manejo de las semillas y la propagación de doce especies arbóreas nativas de importancia económica y ecológica*. Medellín: CORANTIOQUIA.
- Guanatilaka, A. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69 (3), 509–526.
- Guo, S., Mao, W., Li, Y., Gu, Q., Chen, Y., Zhao, C., Li, N., Wang, C., Guo, T. y Liu, X. (2013). Preparation, structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Oidiodendron truncatum* GW. *Process Biochemistry*, 48 (3), 539-544.
- Grubb, P. y Whitmore, T. (1996). A Comparison of Montane and Lowland Rain Forest in Ecuador II: The Climate and its Effects on the Distribution and Physiognomy of the Forests. *The Journal of Ecology*, 54 (2), 303-333.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*, 61, 73-101.

- Hamilton, C.E., Gundel, P.E., Helander, M. y Saikkonen, K. (2012). Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*, 54, 1-10.
- Heredia, C., Alarcón, A., Hernández, L.V., Ferrera, R. y Almaraz, J.J. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences*, 92 (3), 321-333.
- Hofstede, R. (1995). The effects of grazing and burning on soil and plant nutrient concentrations in Colombian páramo grasslands. *Plant Soil*, 173 (1), 111–32.
- Homolka, L., Lisa, L. y Nerud, F. (2006). Basidiomycetes cryopreservation on perlite: evaluation of a new method. *Cryobiology*, 52 (3), 446-453.
- Homolka, L. (2012). Preservation of live cultures of basidiomycetes e Recent methods. *Fungal Biology*, 118 (2), 107-125.
- Holdridge, L.R. (1982). *Ecología basada en zonas de vida*. San José: Centro Científico Tropical.
- Humber, R.A. (2012). Preservation of entomopathogenic fungal cultures. En: Lacey, L.A (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (367-391). California: Academic Press Inc.
- Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C. y Shang, P. (2012). Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review. *Carbohydrate Polymers*, 89 (3), 713-722.
- Kanekiyo, K., Lee, J. B., Hayashi, K., Takenaka, H., Hayakawa, Y., Endo, S. y Hayashi, T. (2005). Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *Journal of Natural Products*, 68 (7), 1037-1041.
- Khiralla, A., Mohamed, I., Thomas, J., Mignard, B., Spina, R., Yagi, S. y Laurain, D. (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8 (9), 701-704.
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S. y Yamanaka, K. (2012). A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43 (2), 143-149.
- Kuete, V., Nono, E., Mkounga, P., Marat, K., Hultin, P. y Nkengfack, A. (2011). Antimicrobial activities of the CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1) extracts and compounds from the roots and fruits of *Pycnanthus angolensis* (Myristicaceae). *Natural Product Research*, 25 (4), 432-443.

- López, R.C., Gómez, S., De la Rosa, S., Garrido, E., Oropeza, O., Heil, M. y Partida, L. (2017). The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology*, 26, 1-10.
- Luo, D. H. (2008). Identification of structure and antioxidant activity of a fraction of polysaccharide purified from *Dioscorea nipponica* Makino. *Carbohydrate Polymers*, 71, 544–549.
- Mau, J. L., Lin, H. C., y Chen, C. C. (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6072–6077.
- Meenatchi, A., Ramesh, V., Bagyalakshmi, Kuralarasi, R., Shanmugaiah V. y Rajendran A. (2016). Diversity of endophytic fungi from the ornamental plant-*Adenium obesum*. *Studies in Fungi*, 1 (1), 34–42, doi 10.5943/sif/1/1/3.
- Miles, L.A., Lopera, C.A., Gonzáles, S., Cepero de García, M.C., Franco, A.E. y Restrepo, S. (2012). Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *Journal of the International Organization for Biological Control* 57 (5), 697-710.
- Miller, J. D., Mackenzie, S., Foto, M., Adams, G. W. y Findlay, J. A. (2002) Needles of white spruce inoculated with rugulosinproducing endophytes contain rugulosin reducing spruce budworm growth rate. *Mycological Research*, 106 (4), 471–479.
- Min, Y., Park, M., Fong, J., Quan, Y., Jung, S. y Lim, Y. (2014). Diversity and Saline Resistance of Endophytic Fungi Associated with *Pinus thunbergii* in Coastal Shelterbelts of Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (3), 324-333.
- Mittermeier, R.A. (1997). *Megadiversidad. Los países biológicamente más ricos del mundo*. Ciudad de México: Cemex.
- Molina, M., Oses, R., Torrez, C., Atala, C., Núñez, M. y Armas, C. (2015). Fungal endophytes associated with roots of nurse cushion species have positive effects on native and invasive beneficiary plants in an alpine ecosystem. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17 (3), 218-226.
- Murillo, L.G., Abba, P. y García, M.C. (2016). *Manual de solicitud del contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados en Colombia*. Colombia: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.
- Myers, N., Mittermerer, R., Mittermerer, C., Fonseca, G. y Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 402 (6772), 853-858.

- Nalini, M.S., Sunayana, N. y Prakash, H.S. (2014). Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. *International Journal of Biodiversity* (doi.org/10.1155/2014/494213).
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W. y Jong, S.Ch. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. En: Mueller, G.M., Bills, G.F y Foster, M.S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods* (35-47). Londres: Elsevier Academic Press.
- Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. y Dunand, C (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (2), 95–204.
- Nascimento, T., Oki, Y., Lima, D., Almeida, J., Fernandes, G. y Souza, C. (2015). Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal ecology*, 14, 79-86.
- Noss, R. (1990). Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical model. *Conservation Biology*, 4 (4), 355-364.
- Ohmasa, M., Abe, Y., Babasaki, K., Hiraide, M. y Okabe, K. (1992). Preservation of cultures of mushrooms by freezing. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 33 (4), 467-479.
- Ozerskaya, S.M., Ivanushkina, N.E., Kochkina, G.A., Eremina, S.S., Vasilenko, A.N. y Chigineva, N.I. (2013). Long-Term Preservation of Fungal Cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): Protocols and Results. En: Gupta, V.K. Tuohy, M.G, Ayyachamy, M., O'Donovan, A. y Turner, K.M., *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (61-62). New York: Springer.
- Partida-Martínez, L.P. y Heil, M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science* 2, 100.
- Peay, K.G., Kennedy, P.G. y Talbot, J.M. (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (7), 434-447.
- Perottoab, S., Angelinic, P., Bianciottob, V., Bonfanteab, P., Girlandaab, M., Kulld, T. et al. (2013). Interactions of fungi with other organisms. *Plant Biosystems*, 147 (1), 208–218.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. En: Andrews, J. e Hirano, S.S. (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves* (179-197). New York: Springer Verlag.
- Pielou, E. (1979). *Biogeography*. USA: Wiley–Interscience Publishers.

- Prihantini, A. I. y Tachibana, S. (2017). Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (2), 110-115.
- Rangel, O. (2000). *Colombia Diversidad Biológica III. La región de vida paramuna*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia- Instituto de Ciencias Naturales, Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545 (1), 51-64.
- Richardson, M.D., Chapman, G.W., Hoveland, C.S. y Bacon, C.W. (1992) Sugar alcohols in endophyte-infected tall fescue. *Crop Science*, 32 (4), 1060–1061
- Rodriguez, R.J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y.O. y Redman, R.S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2 (4), 404-416.
- Rodriguez, R.J., White Jr., J.F., Arnold, A.E. y Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182 (2), 314-330.
- Rosemary, O., Sylvester, U., Benedict, A. y Okechukwu, U. (2013). Isolation and characterization of fungi associated with the spoilage of corn (*Zea mays*). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2 (3), 2278-5221.
- Royse, D. J. y May, B. (2003). Multilocus enzyme electrophoresis for the genetic analysis of edible mushrooms. En: Changs, S., Miles, P. y Buswell, J. (Ed.), *Genetics and breeding of edible mushrooms* (225-248). Switzerland: Gordon and Breach Science Publishers.
- Rubiano, K., Arcila, L.F., Jiménez, E. y Armbrech, I. (2010). PRODUCCIÓN, ACUMULACIÓN Y DESCOMPOSICIÓN DE HOJARASCA EN UN BOSQUE COLOMBIANO SUBANDINO Y ÁREAS ALEDAÑAS DE RESTAURACIÓN. *Boletín Científico Museo de Historia Natural*, 17 (2), 47-59.
- Rudas, G., Marcelo, M., Armenteras, D., Rodríguez, N., Morales, M., Delgado, L. y Sarmiento, A. (2007). *Biodiversidad y actividad humana: Relaciones en ecosistemas de bosque subandino en Colombia*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos - Alexander von Humboldt.
- Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T., y Jones, E. (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis petioles of the oil palm. *Elaeis guineensis* in Thailand. *Fungal Diversity*, 33, 139–161.

- Sanchez, A., Oki, Y., Fernandes, G.W., Ball, R.A. y Gamon, J. (2012). Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. *Trees*, 26, 291-299.
- Sato, M., Sukenobe, J. y Nakagiri, A. (2012). Cryopreservation of cryosensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. *CryoLetters*, 33 (2), 87-95.
- Schulz, B. y Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109 (6), 661-686.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S. y Rommert, A.K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106 (9), 996–1004.
- Schwarz, M., Köpcke, B., Weber, R.W., Sterner, O. y Anke, H. (2004). 3-Hydroxypropionic Acid as a Nematicidal Principle in Endophytic Fungi. *Phytochemistry*, 65 (15), 2239-2245.
- Seviour, R.J., Stasinopoulos, S.J., Auer, D. y Gibbs, P.A. (1992). Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (3), 279-298.
- Sharma, D., Pramanik, A. y Kumar, P. (2016). Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. 3 *Biotech*, 6 (2), 1-14.
- Smith, D. (1993). Tolerance to freezing and thawing. En: Jennings, D.H. (Ed.), *Stress Tolerance of Fungi* (145-171). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sosa, T., Sánchez, J. y Melgarejo, L.M. (2009). Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38 (1), 39-57.
- Srinivasan, K., Jagadish, L.K., Shenbhagaraman, R. y Muthumary, J. (2010). Antioxidant activity of endophytic fungus *Phyllosticta* sp. isolated from *Guazuma tomentosa*. *Journal of Phytology Phytochemistry*, 2 (6), 37-41.
- Strobel, G. A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (4), 315-333.
- Strobel, G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5, 535-544.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D.M., Fung, P.C. y Ming Wah Chau, R. (2002). Isopestacin, a unique isobenzofuranone

- from *Pestalotiopsis microspora* possessing antifungal and antioxidant properties. *Phytochemistry*, 60 (2), 179-183.
- Suárez, J.P., Weib, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F. y Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycrological Research*, 110 (11), 1257-1270.
- Sun, H. H., Mao, W. J., Chen., Y., Guo, Y. C., Li, H. Y., Qi, X. H., Chen, Y. L. y Xu, J. (2009). Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydrate Polymers*, 78, 117-124.
- Tanaka, A., Christensen, M.J., Takemoto, D., Pyoyun, P. y Scott, B. (2006). Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *The Plant Cell*, 18 (4), 1052-1066.
- Tanaka, A., Takemoto, D., Hyon, G.S., Park, P. y Scott, B. (2008). NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Molecular Microbiology*, 68 (5), 1165-1178.
- Tobón, C. (2009). *Los bosques andinos y el agua. Serie investigación y sistematización.* Quito: Programa Regional ECOBONA–INTERCOOPERATION, CONDESAN.
- Vaz, A., Fontenla, S., Rocha, F., Brandão, L., Vierira, M., De García, V., Góes, A. y Rosa, C. (2014). Fungal endophyte b-diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal Ecology*, 8 (4), 28-36.
- Wise, R. (2008). The worldwide threat of antimicrobial resistance. *Current Science*, 95 (2), 181-187.
- White, J.F. y Torres, M.S. (2010). Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiologia Plantarum*, 138 (4), 440-446.
- Yadav, M., Yadav, A. y Yadav, J.P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7 (Suppl1), S256-S261
- Yan, M.X., Mao, W.J., Liu, X., Wang, S.Y., Xia, Z., Cao, S.J., Li, J., Qin, L. y Xian, H.L. (2016). Extracellular polysaccharide with novel structure and antioxidant property produced by the deep-sea fungus *Aspergillus versicolor* N2bc. *Carbohydrate Polymers*, 147, 272-281.

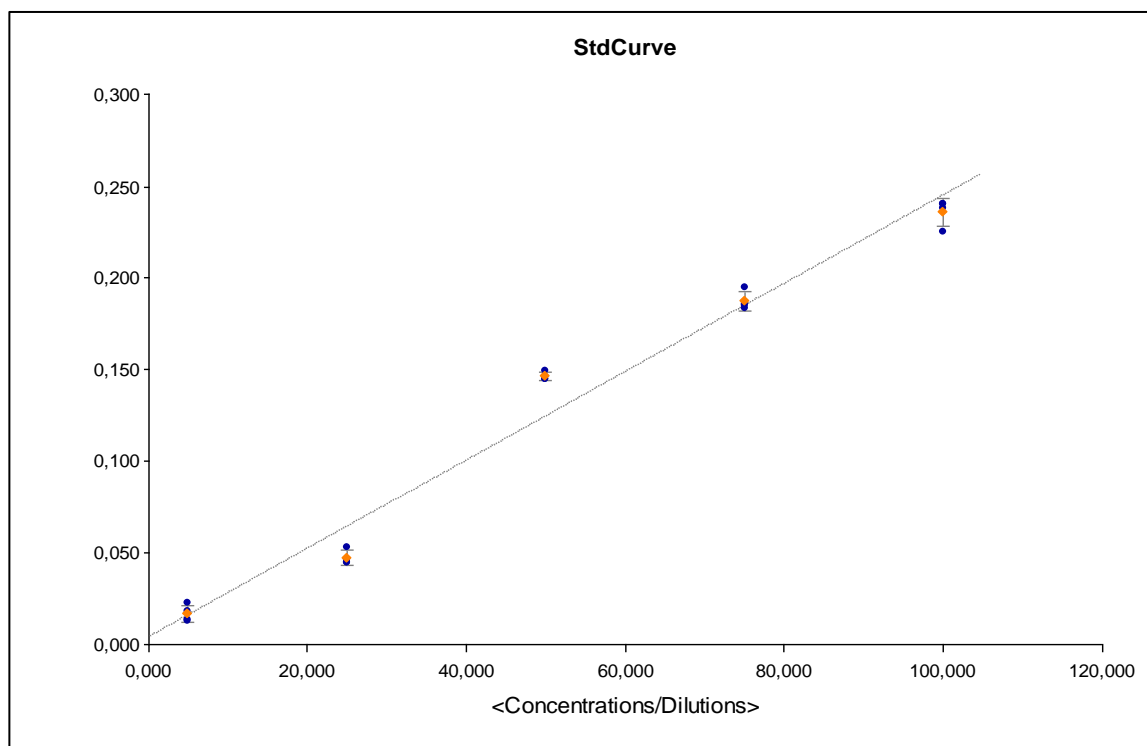
- Ye, Y., Xiao, Yu., Ma, L., Li, H., Xie, Z., Wang, M., Ma, H., Tang, H. y Liu, J. (2013). Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7131-7139.
- Yuan, J. F., Zhang, Z. Q., Fan, Z. C. y Yang, J.X. (2008). Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Carbohydrate Polymers*, 74 (4), 822–827.
- Yuanab, Z., Chena, Y. y Mac, X. (2011). Symbiotic fungi in roots of *Artemisia annua* with special reference to endophytic colonizers. *Plant Biosystems* 145 (2), 495–502.
- Zhang, H.W, Song, Y.C y Tan, R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Report*, 23(5), 753-771.
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C. y Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (1), 4-19.
- Zhang, Y., Li, T. y Zhao, Z.W. (2013). Colonization Characteristics and Composition of Dark Septate Endophytes (DSE) in a Lead and Zinc Slag Heap in Southwest China. *Soil and Sediment Contamination*, 22 (5), 532-545.
- Zong, A., Cao, H. y Wang, F. (2014). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90 (4), 1395–1410.

9. ANEXOS

Anexo 1. Relación de código de preservación con el aislamiento fúngico.

Aislamiento fúngico	Código de preservación
Hojas otobo juvenil A	EBB-ET01 EBB-ET02
Corteza otobo juvenil B	EBB-ET03 EBB-ET04 EBB-ET05 EBB-ET06

Anexo 2. Curva de calibración absorbancia (515 nm) vs. concentración del radical DPPH.



Anexo 3. Ecuación de la curva y R^2 para la curva de calibración absorbancia (515 nm) vs. concentración del radical DPPH.

Curve Name	Curve Formula	A	B	R^2
StdCurve	$Y=A*X+B$	0,00241	0,00412	0,975

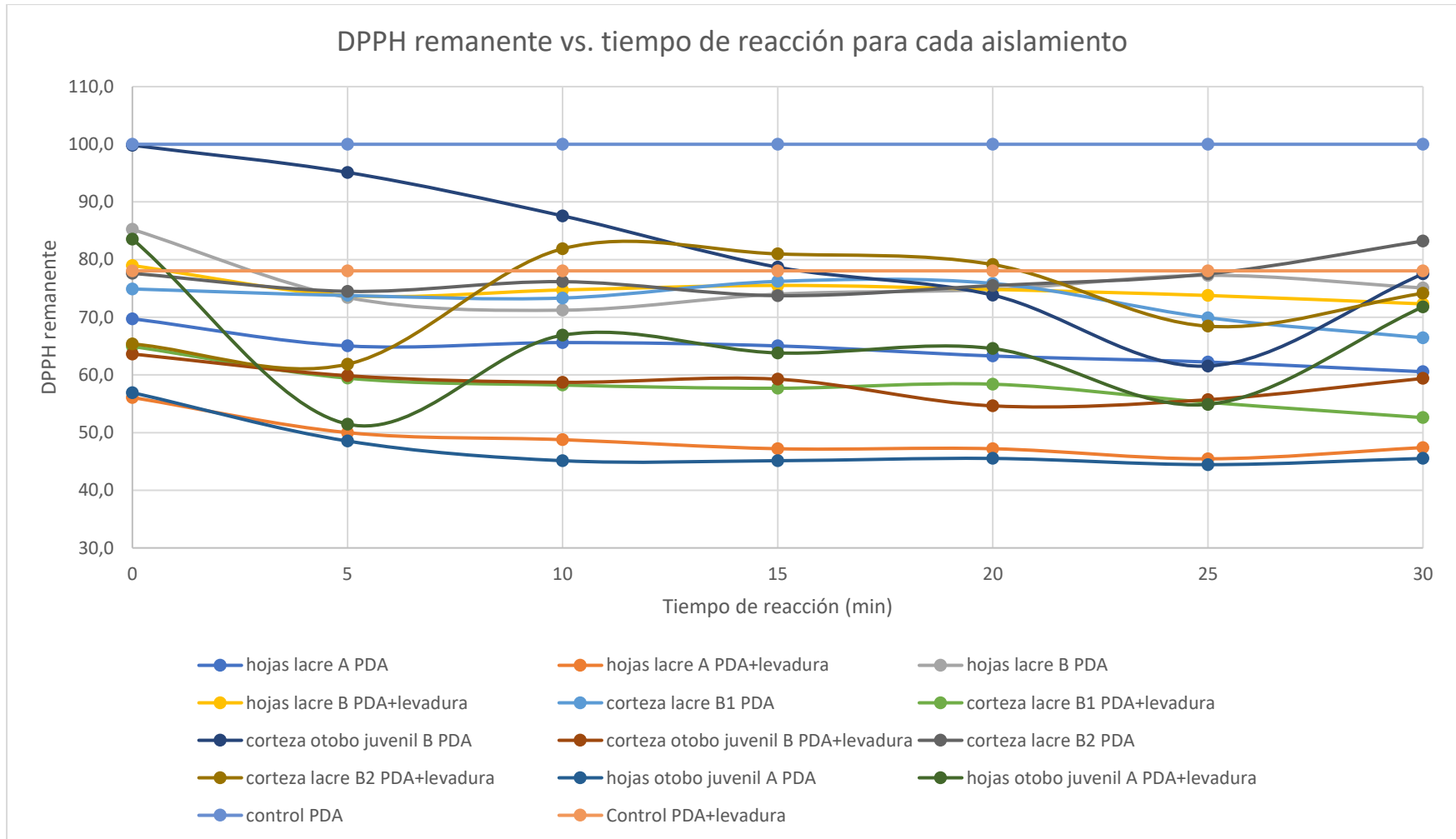
Anexo 4. Ecuación para calcular el porcentaje (%) de DPPH remanente.

$$\% \text{ DPPH remanente} = \left[\frac{[(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) - Abs_{blanco muestra}] \times 100}{(Abs_{control DPPH} - Abs_{blanco})} \right]$$

Anexo 5. Datos del porcentaje DPPH remanente para cada cepa siguiendo una cinética de reacción de 30 minutos.

Muestra	Tipo de medio	% DPPH remanente						
		Tiempo de reacción						
		0	5	10	15	20	25	30
Hojas otobo juvenil A	PDA	56,93	48,54	45,13	45,13	45,52	44,44	45,52
	PDA + extracto levadura	83,57	51,48	66,88	63,82	64,57	54,90	71,81
Corteza otobo juvenil B	PDA	99,82	95,12	87,58	78,68	73,84	61,54	77,52
	PDA + extracto levadura	63,64	59,87	58,72	59,26	54,64	55,71	59,40
Hojas lacre A	PDA	69,74	65,03	65,61	65,03	62,28	62,23	60,55
	PDA + extracto levadura	56,09	50,00	48,77	47,20	47,20	45,45	47,40
Hojas lacre B	PDA	85,24	73,42	71,23	74,01	74,82	77,27	75,09
	PDA + extracto levadura	78,97	73,77	74,74	75,52	74,83	73,78	72,32
Corteza lacre B1	PDA	74,91	73,77	73,33	76,22	75,87	69,93	66,44
	PDA + extracto levadura	64,95	59,44	58,25	57,69	58,39	55,24	52,59
Corteza lacre B2	PDA	77,62	74,50	76,17	73,74	75,52	77,52	83,22
	PDA + extracto levadura	65,38	61,86	81,88	80,99	79,14	68,46	74,16

Anexo 6. Gráfica que relaciona el % DPPH remanente respecto a cada cepa, siguiendo una cinética de reacción de 30 minutos.



Anexo 7. % de inactivación del radical DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL.

% inactivación	Cepa	Medio
51,46	1	1
4,88	2	1
34,97	3	1
36,01	3	1
26,63	4	1
26,57	4	1
26,57	5	1
26,22	5	1
25,50	6	1
26,57	1	2
36,81	2	2
18,18	2	2
28,05	3	2
36,09	3	2
4,27	4	2
9,52	4	2
18,61	5	2
16,18	6	2

Anexo 8. Análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre los resultados obtenidos del % de inactivación del DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL.

Se trabajó con un valor $p < 0,05$ para rechazar la hipótesis nula.

La hipótesis nula (**H₀**) el promedio del % de inactivación del DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL es igual y *no hay diferencias significativas entre los grupos*.

La hipótesis alternativa (**H₁**) al menos el promedio del % de inactivación del DPPH a los 5 minutos con una solución de extracto crudo de cada cepa a una concentración de 2 mg/mL es diferente en uno de los grupos y *hay diferencias significativas entre los grupos*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cepa	5	1227,9	245,59	6,69	0,019
Medio	1	200,7	200,70	5,47	0,058
Cepa*Medio	5	922,1	184,42	5,03	0,037
Error	6	220,2	36,69		

Total 17 2443,0

Como valor $p < 0,05$ entonces se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas entre los grupos correspondientes a la interacción entre cepa*medio y para las cepas, pero no para los medios ($p > 0,05$).

Anexo 9. Comparación entre la interacción cepa*medio respecto al % de inactivación del DPPH.

Cepa*Medio	N	Media	Agrupación	
1 1	1	51,4599	A	
3 1	2	35,4895	A	B
3 2	2	32,0698	A	B
2 2	2	27,4945	A	B
4 1	2	26,6026	A	B
1 2	1	26,5734	A	B
5 1	2	26,3986	A	B
6 1	1	25,4989	A	B
5 2	1	18,6082	A	B
6 2	1	16,1863	A	B
4 2	2	6,8949		B
2 1	1	4,8780		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.