



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO DE ESPECIES DEL GÉNERO *PENICILLIUM*
AISLADAS DEL VOLCÁN DE SAN MARTÍN, SAN ANDRÉS
TUXTLA, VERACRUZ**

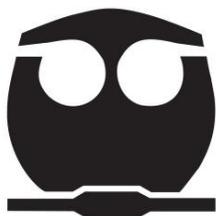
TESIS MANCOMUNADA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTAN

DIEGO ALBERTO HERNÁNDEZ ALDRETE

LUIS ENRIQUE DAMIAN MAGAÑA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
VOCAL: DRA. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ
SECRETARIO: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
1^{er} SUPLENTE: DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
2^{do} SUPLENTE: DR. ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO 125, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA,
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SUSTENTANTES:

Luis Enrique Damian Magaña

Diego Alberto Hernández Aldrete

AGRADECIMIENTOS

- Al financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación a través de los proyectos DGAPA-PAPIIT IA205017 y CONACyT CB-2014 236564, a cargo del Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, y a la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo PAIP 5000-9145.
- A la Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo otorgado a través del Subprograma 127 Formación Básica en Investigación (1 de septiembre de 2016 al 31 de agosto del 2017).
- A la Unidad de Servicios Analíticos e Instrumentales (USAI), FQ, UNAM, por su apoyo para la realización de los análisis de RMN.

ÍNDICE

Lista de figuras	iv
Lista de tablas	vii
Lista de abreviaturas	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia de los productos naturales de origen fúngico	1
1.2. Género <i>Penicillium</i>	5
2. HIPÓTESIS	8
3. OBJETIVOS	8
4. PARTE EXPERIMENTAL	9
4.1. Acondicionamiento de los microorganismos y preparación de los cultivos en mediana escala	9
4.2. Preparación de los extractos orgánicos	9
4.3. Estudios de derreplicación	10
4.4. Fraccionamiento primario y secundario de los extractos orgánicos	11
4.5. Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios	13
4.6. Caracterización de los productos naturales	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios del hongo T2-40	23
5.1.1. Caracterización estructural del <i>N</i> -deoxi-PF 1140 (1)	24
5.2. Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios del hongo T2-56	29
5.2.1. Caracterización estructural de la citrinina (2)	30
5.2.2. Caracterización estructural de la esclerotinina A (3)	36
5.2.3. Caracterización estructural de la (S)-10,11-dehidrocurvularina (4)	40
5.2.4. Caracterización estructural de la penicitrinona A (5)	45
6. CONCLUSIONES	51
7. REFERENCIAS	52

Lista de figuras

Figura		Página
1	Fármacos aprobados por la FDA durante el periodo entre 1981–2014; n = 1562.	2
2	Fármacos anticancerígenos aprobados durante el periodo 2010–2014; n = 38.	2
3	Estructura de anticancerígenos selectos aprobados por la FDA durante el periodo 2010 al 2014.	3
4	Estructura de fármacos selectos de origen fúngico de importancia en la terapéutica.	4
5	Metabolitos secundarios selectos de <i>Penicillium</i> sp. con actividad citotóxica (Koul y Singh, 2017).	6
6	Metodología general para la identificación molecular de especies fúngicas.	7
7	Ubicación geográfica de la región del volcán San Martín en Tuxtla, Veracruz (18° 33.421' N; -95° 12.538' O).	15
8	Estrategia metodológica general utilizada para la obtención de los metabolitos fúngicos.	17
9	Acondicionamiento en medio APD de los hongos seleccionados para su estudio químico.	18
10	Cultivo en medio sólido de arroz de las especies fúngicas seleccionadas.	19
11	Metodología general para el análisis de metabolómica de los extractos orgánicos.	21
12	Análisis cromatográfico por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (arriba) de T2-56. El compuesto con tiempo de retención de 3.74 y 3.78 min (PDA y TIC, respectivamente), corresponden a la (S)-10,11-dehidrocurvularina (m/z 291.1232 $[M+H]^+$; abajo).	22
13	Separación y purificación de los compuestos mayoritarios de T2-40. Cromatogramas en el UV (λ 365 nm) de las fracciones T2-40-F _V (A) y T2-40-F _{V-3} (B) a nivel analítico, y T2-40-F _{V-3} (C) a nivel preparativo.	24

14	(A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (abajo) del compuesto 1 .	25
15	Espectro de ^1H RMN del compuesto 1 (CDCl_3 , 700 MHz).	26
16	Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 1 (CDCl_3 , 175 MHz).	27
17	Espectro HSQC del compuesto 1 (CDCl_3 , 700 MHz).	27
18	Espectro HMBC del compuesto 1 (CDCl_3 , 700 MHz).	28
19	Separación y purificación de los compuestos mayoritarios de T2-56-F _{III} . Cromatogramas en el UV (λ 254 nm) de las fracciones T2-56-F _{III} (A) y T2-56-F _{III-2} (B) a nivel analítico, y (C) T2-56-F _{II-2} a nivel preparativo.	30
20	(A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (centro) y (-) (abajo) del compuesto 2 .	31
21	Espectro de ^1H RMN del compuesto 2 (CDCl_3 , 400 MHz).	32
22	Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 2 (CDCl_3 , 100 MHz).	33
23	Espectro HSQC del compuesto 2 (CDCl_3 , 400 MHz).	33
24	Espectro HMBC del compuesto 2 (CDCl_3 , 400 MHz).	34
25	(A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (centro) y (-) (abajo) del compuesto 3 .	36
26	Espectro de ^1H RMN del compuesto 3 (CDCl_3 , 500 MHz).	37
27	Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 3 (CDCl_3 , 125 MHz).	38
28	Espectro HSQC del compuesto 3 (CDCl_3 , 500 MHz).	38
29	Espectro HMBC del compuesto 3 (CDCl_3 , 500 MHz).	39
30	(A) : Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); (B) : Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (centro) y (-) (abajo) del compuesto 4 .	41
31	Espectro de ^1H RMN del compuesto 4 (CDCl_3 , 400 MHz).	42
32	Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 4 (CDCl_3 , 100 MHz).	43
33	Espectro HSQC del compuesto 4 (CDCl_3 , 400 MHz).	43

34	Espectro HMBC del compuesto 4 (CDCl ₃ , 400 MHz).	44
35	(A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (centro) y (-) (abajo) del compuesto 5 .	46
36	Espectro de ¹ H RMN del compuesto 5 (CDCl ₃ , 500 MHz).	47
37	Espectro de ¹³ C RMN del compuesto 5 (CDCl ₃ , 125 MHz).	48
38	Espectro HSQC del compuesto 5 (CDCl ₃ , 500 MHz).	48
39	Espectro HMBC del compuesto 5 (CDCl ₃ , 500 MHz).	49

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Condiciones cromatográficas utilizadas para el fraccionamiento primario o secundario de los extractos orgánicos analizados.	12
2	Evaluación de la citotoxicidad de los taxones fúngicos seleccionados (Camiña-Blando, 2016).	16
3	Rendimientos y resultados de derreplicación para los extractos orgánicos de hongos seleccionados.	20
4	Resultados de los análisis de derreplicación para el extracto del hongo T2-56.	21
5	Resultados del fraccionamiento primario y secundario realizados mediante cromatografía de tipo Flash.	23
6	Datos espectroscópicos del compuesto del compuesto <i>N</i> -deoxi-PF 1140 (1).	29
7	Datos espectroscópicos del compuesto citrinina (2).	35
8	Datos espectroscópicos del compuesto esclerotinina A (3).	40
9	Datos espectroscópicos del compuesto (S)-10,11-dehidrocurvularina (4).	45
10	Actividad citotóxica de la (S)-10,11-dehidrocurvularina (tomado de Bashyal et al., 2017).	45
11	Datos espectroscópicos del compuesto del compuesto penicitrinona A (5).	50
12	Actividad citotóxica de la penicitrinona A en líneas celulares de cáncer humano a 100 µg/mL (Wu et al., 2015).	50

Lista de abreviaturas

MeCN	Acetonitrilo	μg	Microgramo
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos	μm	Micrómetro
APD	Agar papa-dextrosa	mg	Miligramo
CHCl ₃	Cloroformo	mL	Mililitro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	mm	Milímetro
LC-HRESIMS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray	min	Minuto
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	m	Múltipleto
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia	nm	Nanómetro
q	Cuarteto	N ₂	Nitrógeno
qa	Cuarteto ancho	¹³ C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
qd	Cuarteto dobleteado	¹ H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
D	Dalton	s	Singulete
δ	Desplazamiento químico	sa	Singulete ancho
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	t	Triplete
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	V	Volts
DNP	Diccionario de Productos Naturales	CV	Volúmenes de columna
d	Doblete		
da	Doblete ancho		
dd	Doble de doble		
HRESIMS-MS/MS	Espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray		
YESD	Medio extracto de levadura-peptona de soya-dextrosa		
°C	Grado centígrado		
g	Gramo		
ESI	Ionización por electrospray		
kV	Kilovolts		
MHz	Megahertz		
MeOH	Metanol		

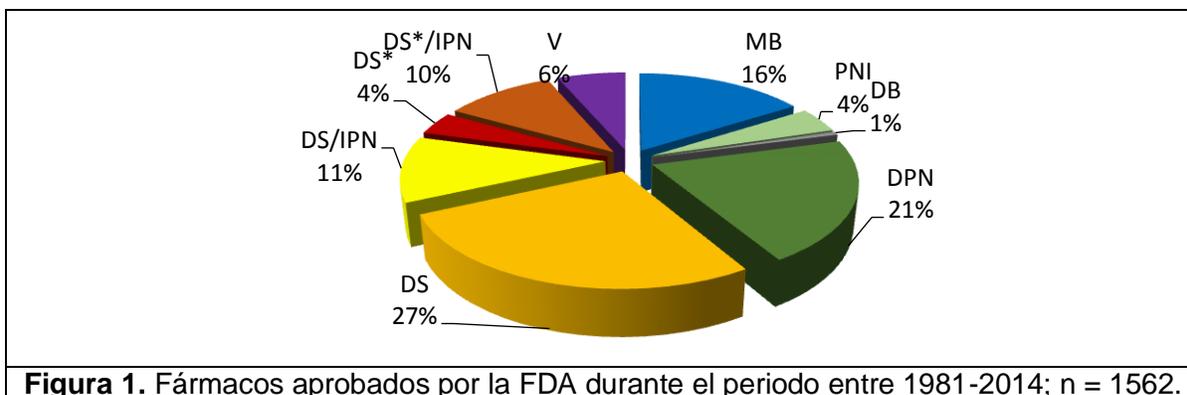
1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de los productos naturales de origen fúngico

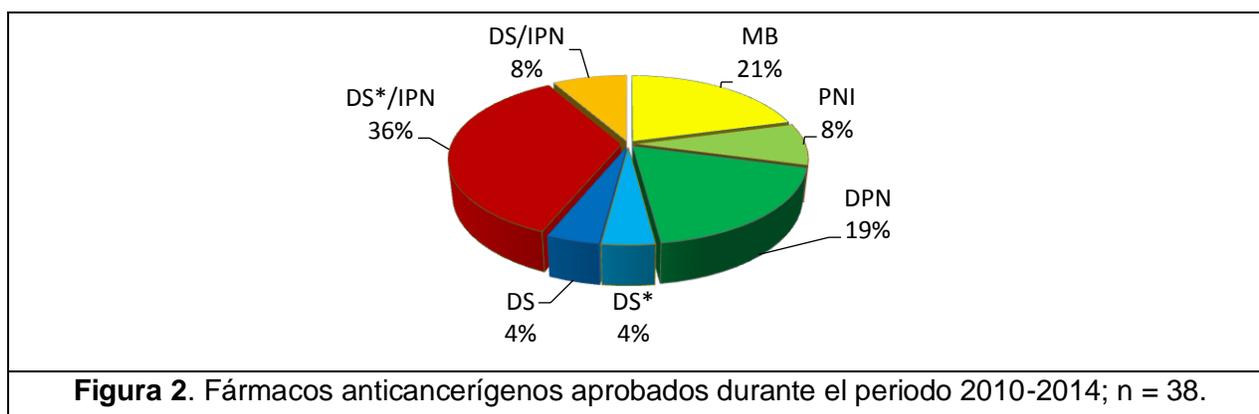
Los productos naturales obtenidos de las plantas, hongos, insectos, organismos marinos, bacterias, entre otros, han sido históricamente la fuente más importante de sustancias biológicamente activas y de medicamentos (Barreiro et al., 2012). En años recientes, la química combinatoria también ha proporcionado compuestos de importancia terapéutica, como el agente antitumoral Sorafenib (Nexavar; Bayer), aprobado por la FDA en 2005 y posteriormente en 2007 para el tratamiento de los carcinomas de células renales y hepatocelular, respectivamente (Newman y Cragg, 2016), así como el compuesto Olaparib (Lynparza, AstraZeneca), aprobado en el año 2014 por la misma dependencia para el tratamiento de cáncer de ovario (Kumar et al., 2017).

En el periodo comprendido entre 1981 y 2014, la FDA aprobó 1562 nuevos fármacos (**Figura 1**) (Newman y Cragg, 2016), los cuales pueden clasificarse con base a su origen en:

- MB = Macromolécula biológica, usualmente péptidos grandes o proteínas, aisladas de un organismo/línea celular, o bien, producida por medios biotecnológicos.
- PNI = Producto natural inalterado, semisintético o totalmente sintético.
- DB = Droga botánica (mezcla caracterizada).
- DPN = Derivado de producto natural, usualmente por modificaciones semisintéticas.
- DS = Droga totalmente sintética, obtenida por síntesis aleatoria o mediante modificaciones aleatorias de un agente con actividad comprobada.
- DS* = Droga sintética con farmacóforo derivado de un producto natural.
- V = Vacuna.
- IPN = Imitador de producto natural.



De estos fármacos, 38 fueron aprobados entre los años 2010 y 2014 para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (**Figuras 2 y 3**). Por ejemplo, las nanopartículas de paclitaxel, compuesto aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), fueron aprobadas para el tratamiento de cáncer de ovario y de mama recurrentes, además han mostrado gran eficacia en el tratamiento de otros tipos de cáncer (colon, pulmón, melanoma y linfoma) (Stull et al., 1995). El péptido romidepsina, obtenido de la bacteria *Chromobacterium violaceum*, con una potente actividad citotóxica contra carcinomas de pulmón, estómago, mama y colon (VanderMolen et al., 2011). El alcaloide homoharringtonina, obtenido de la planta *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. originario de China y *Cephalotaxus harringtonia* K. Koch. de Japón, es eficaz contra la leucemia no linfocítica primaria y aguda recurrente, y la leucemia mieloide crónica (Luo et al., 2004). Finalmente, el mebutato de ingenol, un éster diterpénico macrocíclico aislado de la planta *Euphorbia peplus*, ampliamente utilizado para tratar lesiones comunes de la piel y lesiones cancerosas como la queratosis actínica (Lebwohl et al., 2012).

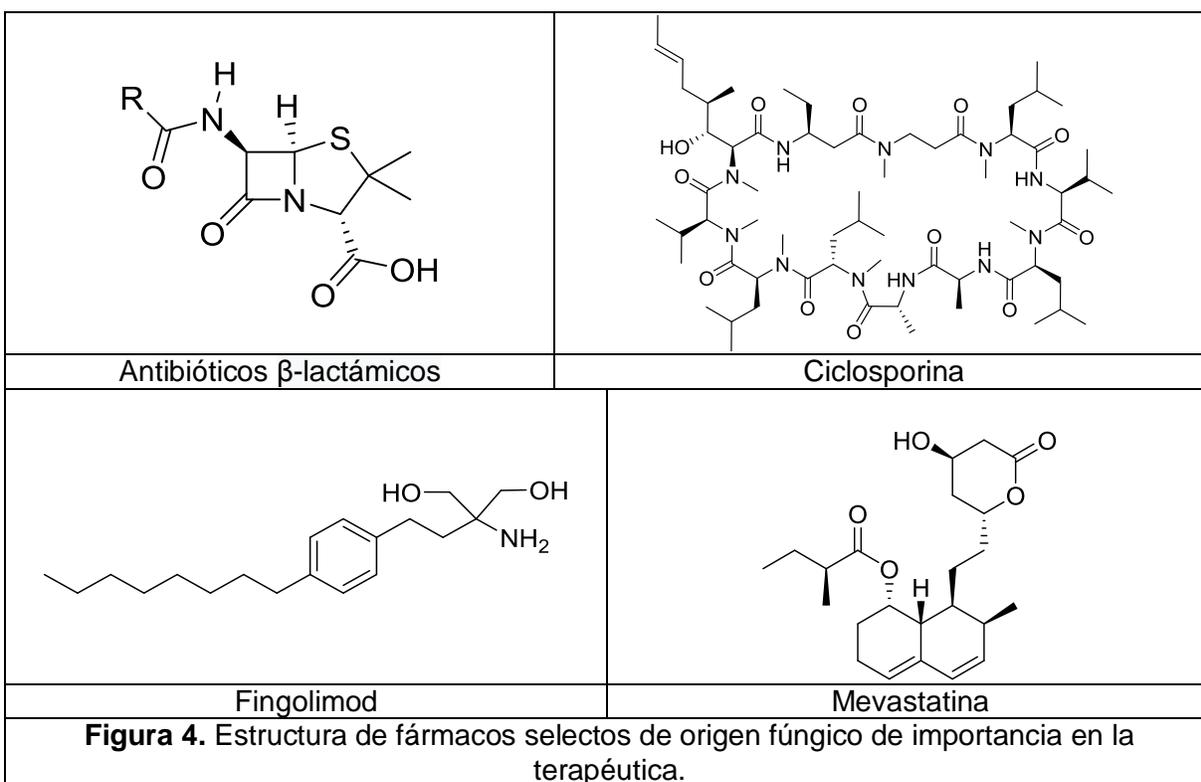


Nanopartículas de paclitaxel (PNI)	Homoharringtonina (PNI)	Mebutato de ingenol (PNI)	Romidepsina (PNI)
Acetato de abiratenona (DPN)	Cabazitaxel (DPN)	Brentuximab vedotina (DPN)	
Clorhidrato del ácido aminolevulínico (DPN)	Carfilzomib (DPN)	Eribulina (DPN)	
Mifamurtida (DPN)	Vinflunina (DPN)	Mesilato de apatinib (DPN)	
Trastuzumab emtansina (DPN)	Hidrato de miriplatino (DPN)		

Figura 3. Estructura de anticancerígenos selectos aprobados por la FDA durante el periodo 2010 al 2014.

Así, de las fuentes naturales mencionadas, los hongos son uno de los grupos más prolíficos para la obtención de moléculas bioactivas, además de que son utilizados para la obtención de otras sustancias de aplicación industrial, como son enzimas, pigmentos, vitaminas, alcoholes, ácidos orgánicos, cosméticos, etc. (Sette et al., 2013).

Algunos compuestos de origen fúngico que han sido de gran importancia médica se ilustran en la **Figura 4**. Dentro de este grupo destacan los antibióticos betalactámicos obtenidos de numerosas especies del género *Penicillium* (Wohlleben et al., 2016), los inmunosupresores de tipo ciclosporina de *Tolypocladium inflatum* (Agathos et al., 1987), el fingolimod, agente terapéutico utilizado en el tratamiento de la esclerosis múltiple, desarrollado con base en el metabolito miriocina producido por *Isaria sinclairii* (Strader et al., 2011) y los agentes hipocolesterolemiantes, lovastatina, mevastatina y pravastatina, obtenidos de cepas de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Nocardia autotrophica*, entre otras (Tobert, 2003).



El descubrimiento y desarrollo de estos compuestos sustentan la realización estudio químicos de éstos y otros microorganismos en la búsqueda de nuevos fármacos o moléculas que sirvan como prototipo para el desarrollo de otros medicamentos más eficaces y seguros (Mander, 2010). A pesar de esto, del total de compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales (aproximadamente 260,000), menos del 10% han sido obtenidos de hongos (DNP, Taylor & Francis Group). Por otra parte, el reino Fungi es tan diverso y complejo que se estima que existen entre 1.5 y 3.5 millones de especies, de las cuales solamente el 10% ha sido descritas taxonómicamente y un número aún menor ha sido estudiado químicamente (Hawksworth y Lucking, 2017). En México, se estima que existen más de 200 000 especies de hongos, y de éstas, solo el 5% ha sido descrito en la literatura especializada (Aguirre-Acosta et al., 2014).

1.2. Género *Penicillium*

Los ascomicetos del género *Penicillium* pertenecen a la orden *Eurotiales* y a la familia *Trichocomaceae*. Numerosas especies de este género han sido ampliamente estudiadas por sus aplicaciones en la terapéutica contemporánea, mismas que se remontan al descubrimiento accidental de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming. Sin embargo, además de las propiedades antibióticas bien reconocidas, muchos de los metabolitos secundarios aislados de estos hongos también han mostrado importante actividad citotóxica (**Figura 5**). Algunas de las clases de compuestos químicos más representativas del género son las dicetopiperacinas, benzodiazepinas, quinolinas, policétidos, entre otras (Zhelifonova et al., 2010).

A pesar de que las especies del género *Penicillium* son de las más abundantes dentro del reino Fungi, también son de las más difíciles para ser identificados a nivel de especie, ya sea por técnicas microbiológicas tradicionales o mediante biología molecular (Schoch et al., 2012). El análisis micro y macromorfológico de las estructuras celulares de estos hongos sigue siendo indispensable para la identificación de estas especies, además de complementar este análisis con estudios moleculares de la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS), y algunos otros genes que

codifican para proteínas como la calmodulina (CaM), la ARN polimerasa II (RPB2), entre otros (**Figura 6**) (Schoch et al., 2012, Vetrovsky et al., 2016).

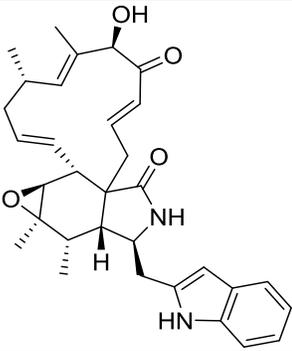
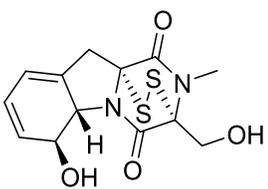
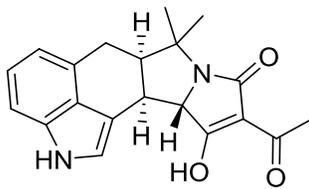
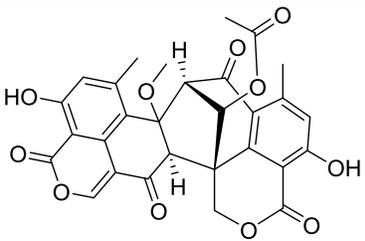
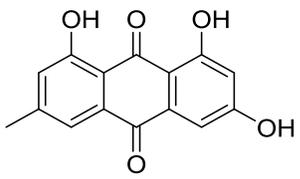
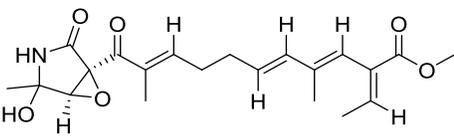
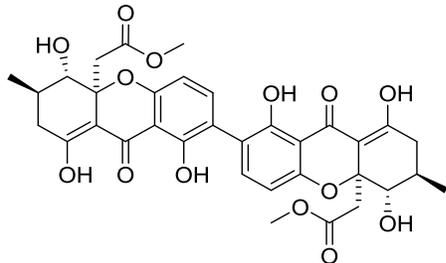
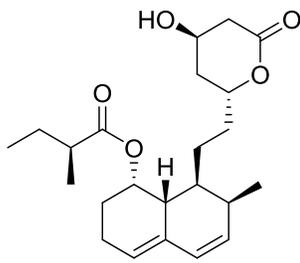
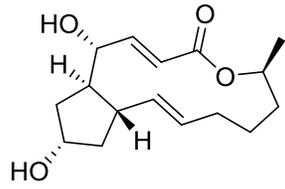
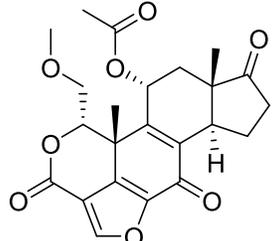
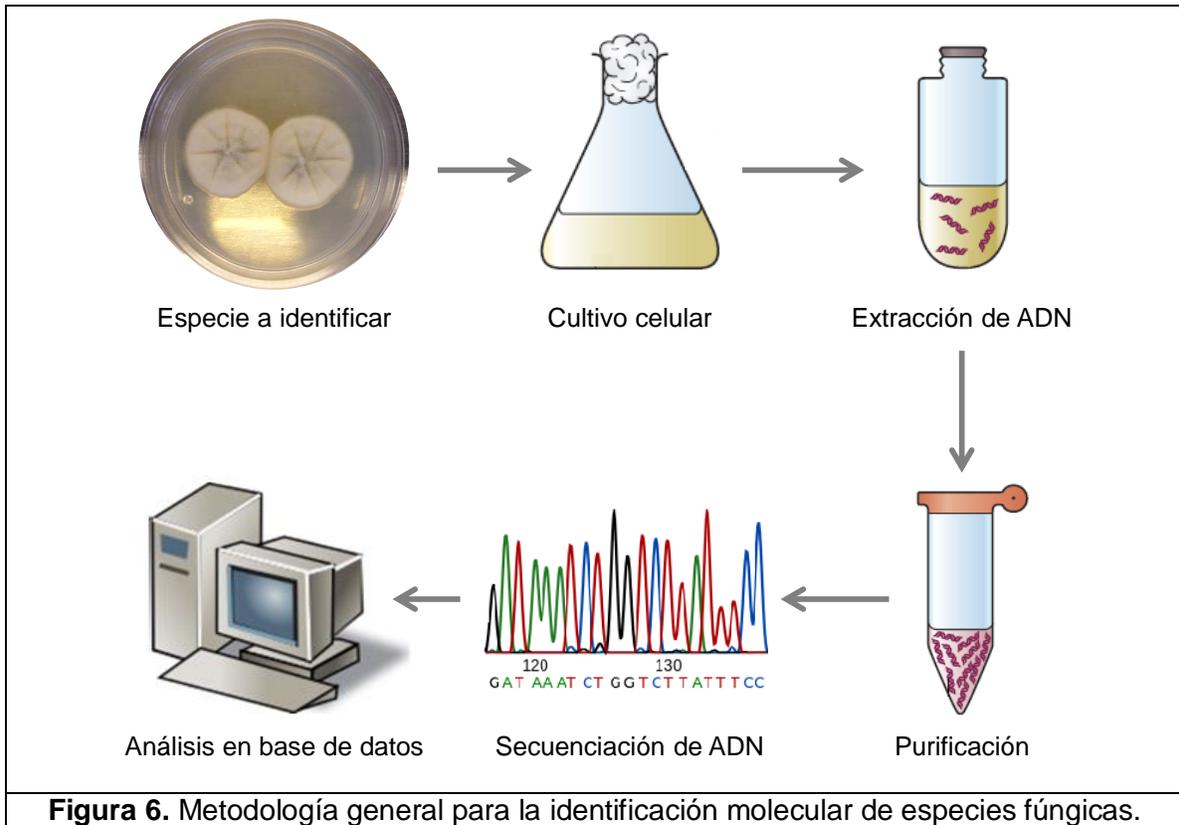
<i>Alcaloides</i>		
		
Quetoglobosinas	Gliotoxina	Ácido ciclopiazónico
<i>Policétidos</i>		
		
Duclauxina	Emodina	Epolactaeno
		
Ácido secalónico	Compactina	Brefeldina A
<i>Terpenoides</i>		
		
Wortmanina		

Figura 5. Metabolitos secundarios selectos de *Penicillium* sp. con actividad citotóxica (Koul y Singh, 2017).



2. HIPÓTESIS

El estudio químico de especies fúngicas obtenidas de hábitats inexplorados y seleccionadas con base en una actividad biológica, permitirá la obtención de moléculas bioactivas con esqueletos químicos novedosos o inusuales de interés farmacéutico.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es realizar el estudio químico de hongos saprófitos selectos provenientes de una muestra de suelo recolectada en las regiones aledañas al volcán de San Martín, en San Andrés Tuxtla, Veracruz, México, para la obtención de nuevos compuestos biodinámicos con actividad citotóxica. Para el cumplimiento de éste se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Realizar el acondicionamiento de una serie de hongos saprófitos, obtenidos de una muestra de suelo, que previamente habían mostrado una importante actividad citotóxica.
- 2.- Obtener los cultivos axénicos en mediana escala a través de fermentación en medio sólido.
- 3.- Obtener los extractos orgánicos, a partir de los cultivos en mediana escala, mediante técnicas de maceración y partición.
- 4.- Realizar los análisis de derreplicación de cada uno de los extractos orgánicos preparados.
- 5.- Realizar la identificación molecular preliminar de los organismos de estudio.
- 6.- Fraccionar los extractos orgánicos y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes mediante técnicas cromatográficas convencionales.
- 7.- Realizar la caracterización de los compuestos obtenidos utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Acondicionamiento de los microorganismos y preparación de los cultivos en mediana escala

El acondicionamiento de los organismos fúngicos obtenidos de una muestra de suelo del volcán San Martín en Tuxtla, Veracruz ($18^{\circ} 33.421' N$; $-95^{\circ} 12.538' O$), se realizó a partir de los cultivos tipo, los cuales fueron transferidos en cajas de Petri con medio APD y se incubaron por 7 días a temperatura ambiente. Una vez confirmada la viabilidad y pureza de las cepas identificadas con las claves internas T2-4, T2-14, T2-25, T2-40, T2-45, T2-52, T2-54, T2-55 y T2-56, se realizaron subcultivos de cada hongo en medio líquido YESD (15 mL), compuesto por peptona de soya (2%), extracto de levadura (1%) y dextrosa (2%), y se mantuvieron en agitación constante (100 rpm) durante 7 días a temperatura ambiente. Al término de este periodo, los inóculos fueron transferidos a un medio sólido de arroz (mediana escala: 150 g de arroz y 300 mL de agua x2), distribuidos en cinco matraces Erlenmeyer de 250 mL por cada microorganismo. El proceso de fermentación se realizó durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas.

4.2. Preparación de los extractos orgánicos

La preparación de los extractos orgánicos se realizó a partir de los cultivos en medio sólido (inciso 4.1) mediante un proceso de maceración con 500 mL de una mezcla de $CHCl_3$ -MeOH (1:1). La extracción se llevó a temperatura ambiente durante 8 horas con agitación suave (60-80 rpm). Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró al vacío utilizando un embudo Büchner, y el residuo obtenido se lavó con 50 mL de $CHCl_3$ -MeOH (1:1) por triplicado. Posteriormente, al extracto orgánico resultante se le adicionaron 500 mL de $CHCl_3$ y una cantidad de H_2O necesaria para completar un volumen final de 2000 mL, este se mantuvo en agitación constante durante 30 min. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se sometió a un proceso de extracción con $CHCl_3$ (800 mL x2). Posteriormente, todas las fases orgánicas se reunieron y

concentraron a presión reducida. Finalmente, la fracción orgánica seca fue resuspendida en 120 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se sometió a un desgrase con hexano (120 mL); la fracción de hexano se descartó y la fracción de MeCN-MeOH se evaporó a sequedad a presión reducida.

4.3. Estudios de derreplicación

Los estudios de derreplicación se realizaron con los extractos orgánicos obtenidos en el inciso anterior mediante la técnica de UPLC-HRESIMS-MS/MS (El-Elimat et al., 2013). Para los análisis por UPLC se utilizó un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., MA, EEUU) equipado con un detector de PDA. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información fueron realizados utilizando el programa Empower versión 3.0 (Waters). Todos los análisis se llevaron a cabo en una columna Acquity BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 × 10 mm; Waters) a 40 °C. La elución se realizó con una mezcla binaria de MeCN (A)-ácido fórmico acuoso (0.1%) (B), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% de A, incrementándose hasta 100% durante 8 minutos, manteniendo una composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. La detección se realizó mediante un barrido desde 190 hasta 500 nm.

Los análisis por HRMS-MS/MS se realizaron por la técnica de ionización por electrospray en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-, respectivamente), en un espectrómetro de masas Thermo Fisher Scientific Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU). Las condiciones del equipo en el modo ESI+ fueron las siguientes: temperatura del capilar: 275 °C, voltaje de la fuente: 4.5 kV, voltaje del capilar: 20 V, y voltaje del lente del tubo: 95 V. Para el modo ESI- las condiciones utilizadas fueron: temperatura del capilar: 275 °C, voltaje de la fuente: 3.5 kV, voltaje del capilar: 42 V, y voltaje del lente del tubo: 110 V. Como gas acarreador fue utilizado N₂, fijándose a 25 y 20 (unidades arbitrarias) para el modo positivo y negativo, respectivamente. El control del instrumento y el análisis de datos se llevaron a cabo

utilizando el programa Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Para cada análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de MeOH-Dioxano (1:1), el volumen inyectado fue de 5 μ L. Finalmente, los resultados obtenidos para cada análisis (tiempo de retención, patrones de fragmentación, espectros en el UV y masas) se compararon contra una base de datos de metabolitos secundarios de origen fúngico (más de 300 compuestos) registrada utilizando las mismas condiciones de análisis.

4.4. Fraccionamiento primario y secundario de los extractos orgánicos

El fraccionamiento primario de los extractos orgánicos se realizó mediante una cromatografía en columna de tipo Flash en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen (Teledyne Isco, Inc.). Como fase estacionaria se utilizó, en una columna empacada, gel de sílice (tamaño de partícula 20-40 μ m, RediSep Rf Gold Silica Gel, Teledyne Isco, Inc.), y como fase móvil se emplearon mezclas entre Hexano-CHCl₃-MeOH, en orden creciente de polaridad utilizando un gradiente de elución lineal.

Los extractos orgánicos de los hongos con las claves T2-14, T2-25, T2-40, T2-45, T2-52, T2-54 y T2-56, fueron sometidos a un fraccionamiento primario en columnas empacadas con 60 g de gel de sílice, mientras que los extractos T2-4 y T2-55 fueron fraccionados en columnas de 4 g. Las condiciones de estos análisis se resumen en la **Tabla 1**. Las fracciones primarias resultantes fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica y se llevaron a sequedad a presión reducida.

Enseguida, con la finalidad de establecer los perfiles cromatográficos preliminares de cada una de las fracciones primarias obtenidas, se realizó un análisis por HPLC, utilizando un cromatógrafo marca Waters, equipado con los detectores de PDA y ELSD; éste último se trabajó con las siguientes condiciones de análisis: ganancia 100; presión de gas (N₂) 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo: 75 \pm 10 °C. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 3.0 (Waters). El análisis de las muestras se llevó a cabo en una columna Gemini C₁₈ (5 μ m, 250 \times 4.6 mm;

Phenomenex); la elución se realizó con una mezcla binaria constituida por A: ácido fórmico acuoso (0.1%); B: MeCN; gradiente: 40% B, 5 min; 40% B a 100% B en 15 min; 100% B, 5 min; tiempo de corrida: 25 min; flujo: 1 mL/min; detectores: PDA (200-400 nm) y ELSD.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas utilizadas para el fraccionamiento primario o secundario de los extractos orgánicos analizados.

Disolvente A	Disolvente B	Tamaño de columna				%B
		4 g	12 g	24 g	60 g	
		Volumen (CV)				
		4.8 mL	16.8 mL	33.6 mL	124.8 mL	
CHCl ₃	Hexano	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	Hexano	6.0	10.0	6.0	6.5	0.0
	Hexano	6.0	4.0	3.0	2.5	0.0
	MeOH	6.0	4.0	3.0	2.5	0.0
	MeOH	8.0	10.0	4.0	6.6	2.0
	MeOH	6.0	5.0	4.0	3.5	5.0
	MeOH	6.0	5.0	8.0	3.5	10.0
	MeOH	5.0	4.0	8.0	2.5	20.0
	MeOH	2.0	2.0	2.0	1.5	100.0
	MeOH	5.0	6.0	2.0	3.0	100.0

Las fracciones seleccionadas para posteriores estudios químicos, mostraron un perfil cromatográfico complejo y una cantidad de materia relativamente alta, por lo cual fueron sometidas a un fraccionamiento secundario empleándose las siguientes columnas:

- Columnas de 12 g de gel de sílice para la fracción primaria: T2-56-F_{IV}.
- Columnas de 24 g de gel de sílice para las fracciones primarias: T2-40-F_V y T2-56-F_{III}.

Las fracciones secundarias resultantes fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica y se llevaron a sequedad a presión reducida. Finalmente, todos los conjuntos de fracciones fueron analizadas por HPLC bajo las mismas condiciones de análisis descritas en los párrafos anteriores.

4.5. Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios

Con base en los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC en el inciso anterior, se seleccionaron algunas fracciones primarias y secundarias de los extractos de T2-40 y T2-56 para el aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios presentes. Los métodos cromatográficos por HPLC para la purificación de las fracciones seleccionadas fueron optimizados hasta obtener una resolución tal que permitiera el aislamiento eficiente de los compuestos mayoritarios. Estos métodos se indican a continuación:

- T2-40-F_{II-3} y T2-56-F_{II-2}: columna Gemini C₁₈ (5 μm, 250 × 4.6 mm); fase móvil: A: ácido fórmico acuoso (0.1%); B: CH₃CN; gradiente: 40% B, 5 min; 40% B a 100% B en 15 min; 100% B, 5 min; tiempo de corrida: 25 min; flujo: 1 mL/min.
- T2-40-F_{I-2}: columna Kinetex C₁₈ (5 μm, 250 × 4.6 mm); fase móvil: A: ácido fórmico acuoso (0.1%); B: CH₃CN; gradiente: 80% B a 100% B en 10 min; 100% B, 10 min; tiempo de corrida: 20 min; flujo: 1 mL/min.
- T2-56-F_{I-2}: columna Kinetex C₁₈ (5 μm, 250 × 4.6 mm); fase móvil: A: ácido fórmico acuoso (0.1%); B: CH₃CN; gradiente: 40% B a 100% B en 15 min; 100% B, 5 min; tiempo de corrida: 20 min; flujo: 1 mL/min.

La separación y purificación de los compuestos, se efectuó mediante el escalamiento de las condiciones de análisis utilizadas a nivel analítico en las columnas preparativas Kinetex C₁₈ (5 μm, 250 × 21.2 mm) o Gemini C₁₈ (5 μm, 250 × 21.2 mm). El flujo de trabajo fue modificado a 21.24 mL/min y se emplearon tiempos de recolección de fracciones entre 13 y 15 s.

4.6. Caracterización de los productos naturales

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en los equipos JEOL ECS 400, JEOL ECA 500, o Agilent 700 MHz a 400 MHz (¹H RMN)/100 MHz (¹³C RMN), 500 MHz (¹H RMN)/125 MHz (¹³C RMN) o 700 MHz (¹H RMN)/175

MHz (^{13}C RMN), respectivamente. Los δ se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS), utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó CDCl_3 como disolvente. Los espectros de HRESIMS-MS/MS se obtuvieron por la técnica ESI+ y ESI-, y se registraron en un espectrómetro de masas Thermo Fisher Scientific Q Exactive Plus. El registro de los espectros de RMN y MS se realizó en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, C.N., EEUU.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de metabolitos secundarios novedosos con actividad citotóxica a partir de organismos fúngicos selectos. Las especies fúngicas estudiadas fueron obtenidas en un hábitat inexplorado de nuestro país (**Figura 7**). La evaluación preliminar de estas especies mediante el ensayo de citotoxicidad contra las líneas celulares HeLa (cáncer cervical) y MCF7 (cáncer de mama), permitió establecer su potencial citotóxico (**Tabla 2**). Esta actividad fue realizada previamente en el grupo de trabajo (Camiña-Blando, 2016).y permitiorealizar la selección de las especies con código interno T2-4, T2-14, T2-25, T2-40, T2-45, T2-52, T2-54, T2-55 y T2-56 para la realización de su estudio químico.

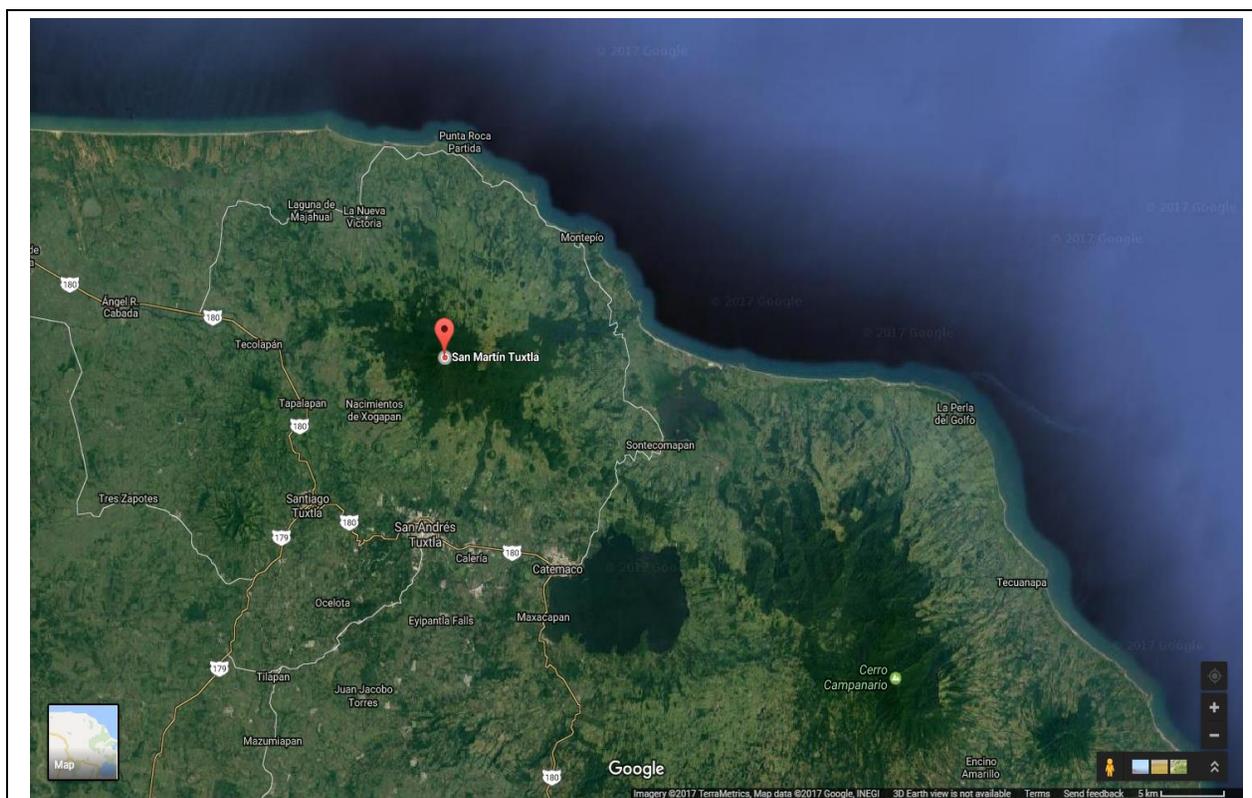


Figura 7. Ubicación geográfica de la región del volcán San Martín en Tuxtla, Veracruz ($18^{\circ} 33.421' N$; $- 95^{\circ} 12.538' O$).

Tabla 2. Evaluación de la citotoxicidad de los taxones fúngicos seleccionados (Camiña-Blando, 2016).

Clave	Fuente de obtención	% de crecimiento celular			
		HeLa		MCF-7	
		2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL
T2-4	Suelo	108	46	76	53
T2-14	Suelo	131	59	72	45
T2-25	Suelo	97	32	102	41
T2-40	Suelo	148	54	78	19
T2-45	Suelo	260	110	76	39
T2-52	Suelo	216	19	96	7
T2-54	Suelo	198	38	78	43
T2-55	Suelo	28	27	72	60
T2-56	Suelo	33	24	82	81

La estrategia metodológica utilizada para la realización de este trabajo se resume en la **Figura 8**. En primer lugar, una vez seleccionadas las especies a estudiar, se realizó el acondicionamiento de éstas (**Tabla 2**). Para ello, se verificó su viabilidad y pureza (**Figura 9**) y posteriormente, se subcultivaron en medio líquido YESD con la finalidad de incrementar la biomasa del microorganismo, y de esta manera mejorar su crecimiento en medio sólido. Una vez terminado el tiempo de fermentación, los cultivos líquidos fueron vertidos en un medio sólido de arroz y se dejaron crecer por 21 días a temperatura ambiente. Cabe destacar que cuando los microorganismos son cultivados en medios limitados en nutrientes, se induce o estimula la producción de metabolitos secundarios (Zhelifonova et al., 2010, Robinson et al., 2001, Figueroa et al., 2014, El-Elimat et al., 2015); sin embargo, no todos los microorganismos poseen la misma capacidad de adaptación. Por ejemplo, en la **Figura 10** podemos observar que las especies identificadas con las claves T2-4, T2-14, T2-45, T2-52 y T2-55 tienen un crecimiento muy limitado en comparación con los hongos T2-25, T2-40, T2-54 y T2-56.

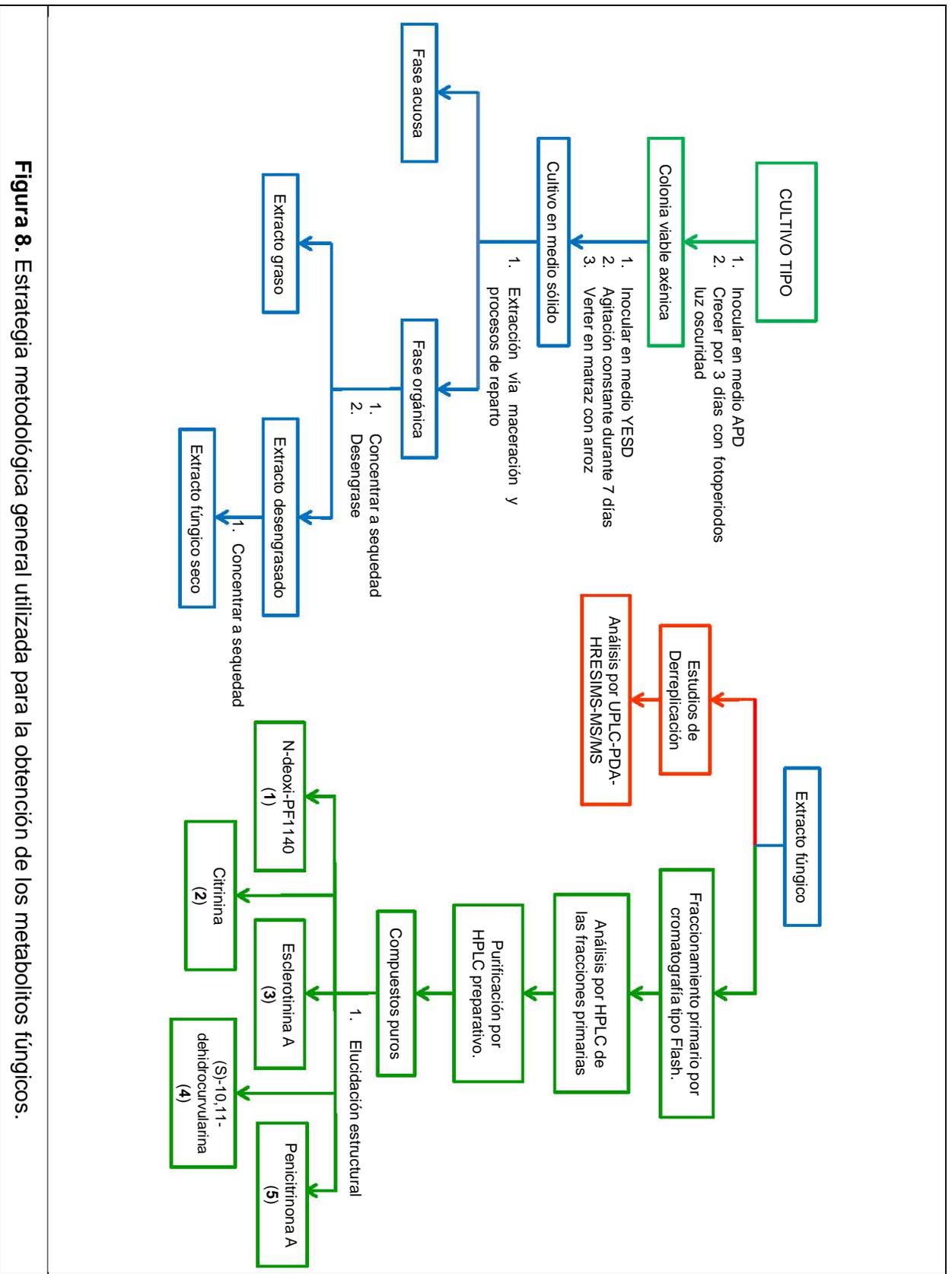


Figura 8. Estrategia metodológica general utilizada para la obtención de los metabolitos fúngicos.

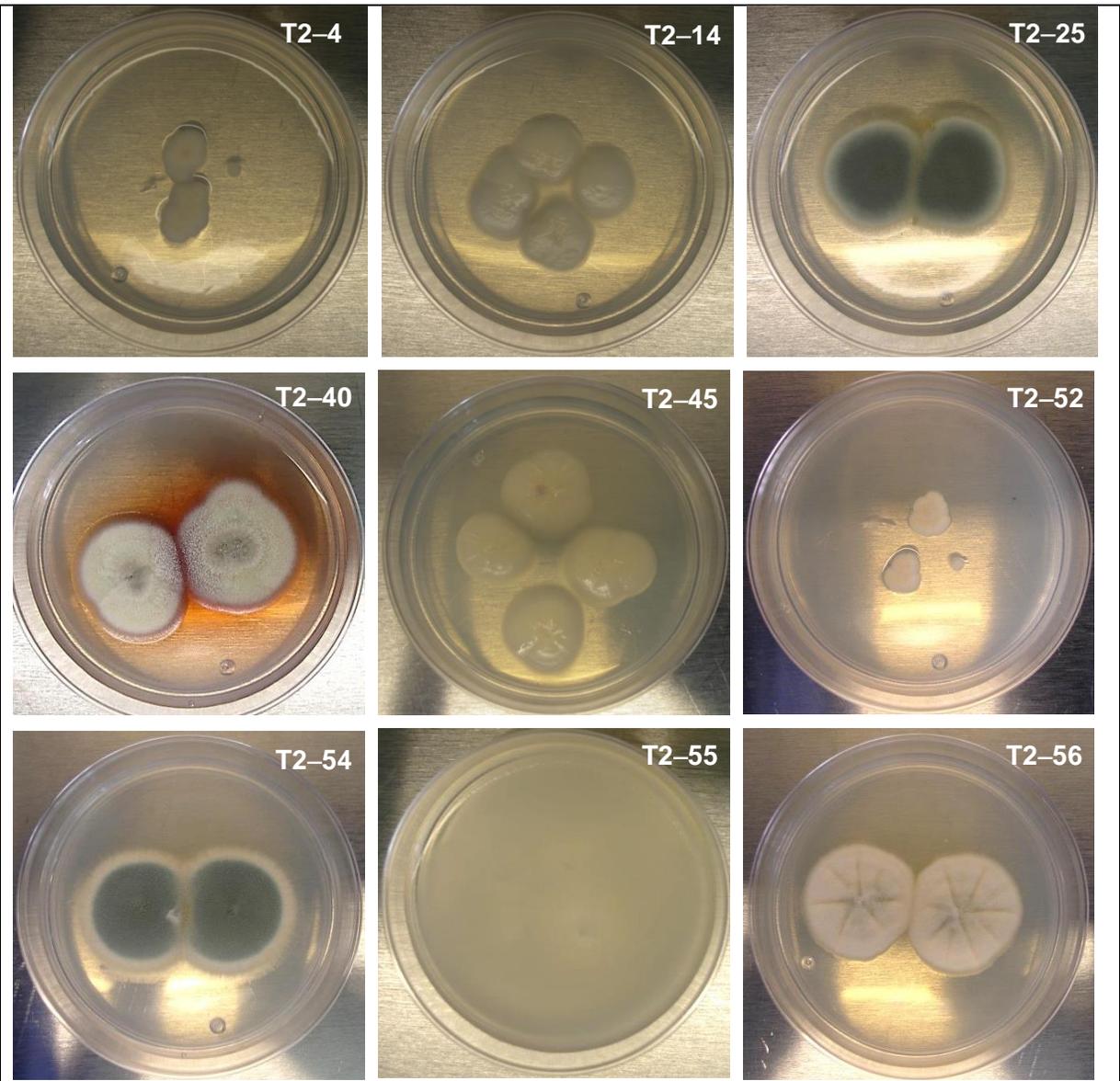


Figura 9. Acondicionamiento en medio APD de los hongos seleccionados para su estudio químico.

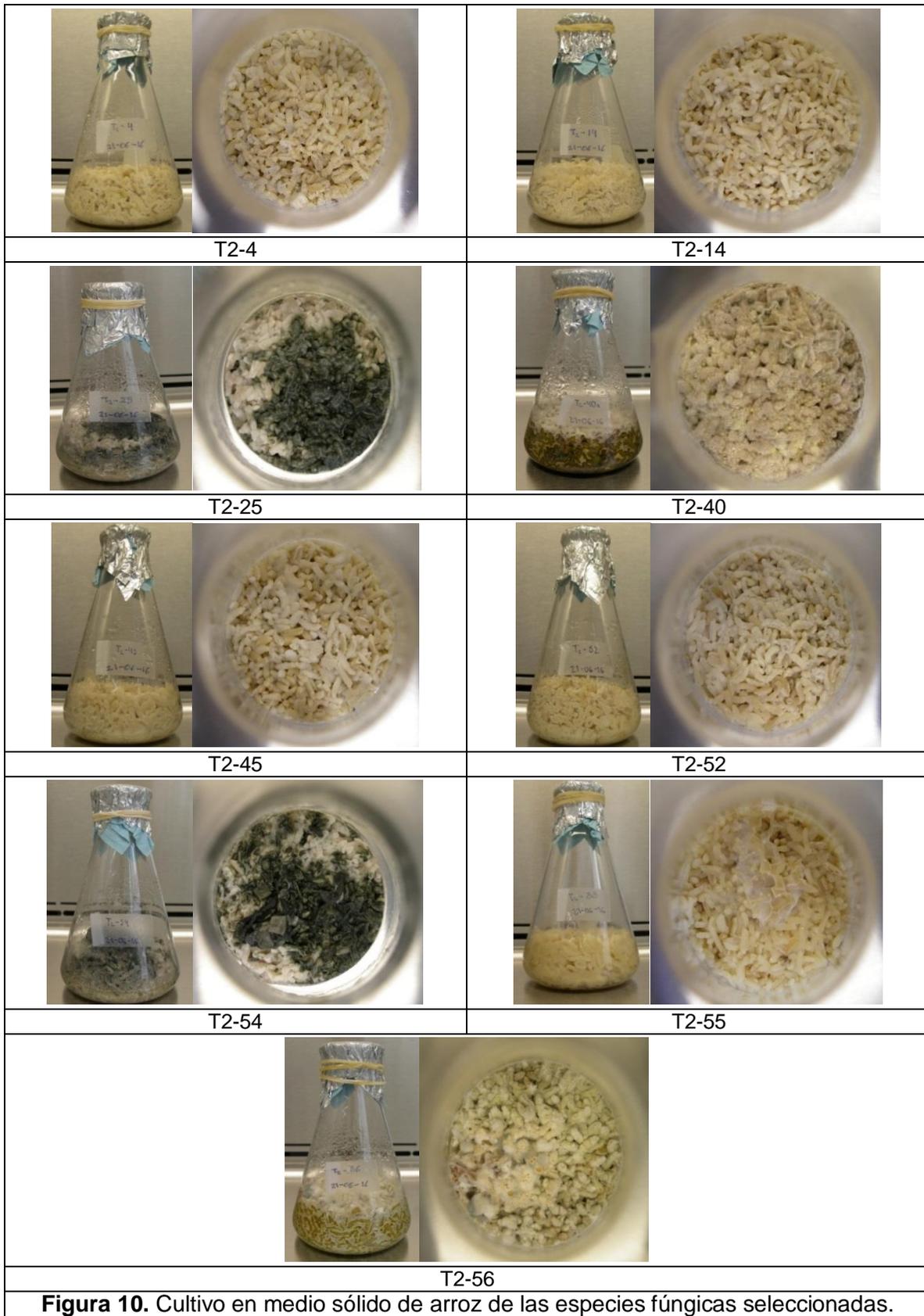


Figura 10. Cultivo en medio sólido de arroz de las especies fúngicas seleccionadas.

Al término del periodo de crecimiento, se se realizó la preparación de los extractos orgánicos utilizando las técnicas de maceración y reparto (inciso 4.2). Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 3**, y como se puede observar, los organismos que presentaron un menor crecimiento de biomasa en el medio sólido, tuvieron a su vez los menores rendimientos. Por el contrario, los hongos T2-40 y T2-56, que fueron los que produjeron mayor cantidad de extracto, presentaron un mayor crecimiento de micelio y producción de pigmentos.

Tabla 3. Rendimientos y resultados de derreplicación para los extractos orgánicos de hongos seleccionados.		
Clave	Peso (mg)	Resultados de derreplicación
T2-4	202.8	-
T2-14	140.7	-
T2-25	1067.1	-
T2-40	2415.2	-
T2-45	101.1	-
T2-52	76.6	-
T2-54	1100.9	-
T2-55	178.2	-
T2-56	1905.6	(S)-10,11-dehidrocurvularina

Por otra parte, una estrategia contemporánea que ha facilitado el descubrimiento de nuevos productos naturales es la derreplicación o análisis de metabolómica. Ésta estrategia permite realizar la preselección de los candidatos idóneos para su estudio químico. Este proceso se fundamenta en el análisis de los extractos orgánicos por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS y la comparación de los resultados obtenidos (tiempos de retención, perfiles en el UV, espectros de masas y fragmentaciones típicas de los iones moleculares) con aquellos contenidos en una base de datos de metabolitos secundarios fúngicos analizados bajo las mismas condiciones de análisis (**Figura 11**) (El-Elimat et al., 2013). Los resultados de derreplicación para los extractos fúngicos estudiados en este trabajo revelaron que sólo el extracto del hongo T2-56 presenta al metabolito identificado como (S)-10,11-dehidrocurvularina (**Tabla 4**). Cabe mencionar que a pesar de obtener este resultado, se decidió continuar con el estudio químico de esta especie ya que se observó en el cromatograma correspondiente picos adicionales

que, aunque pudiesen estar en cantidades menores, pueden ser análogos más activos y/o novedosos del policétido reportado (**Figura 12**).

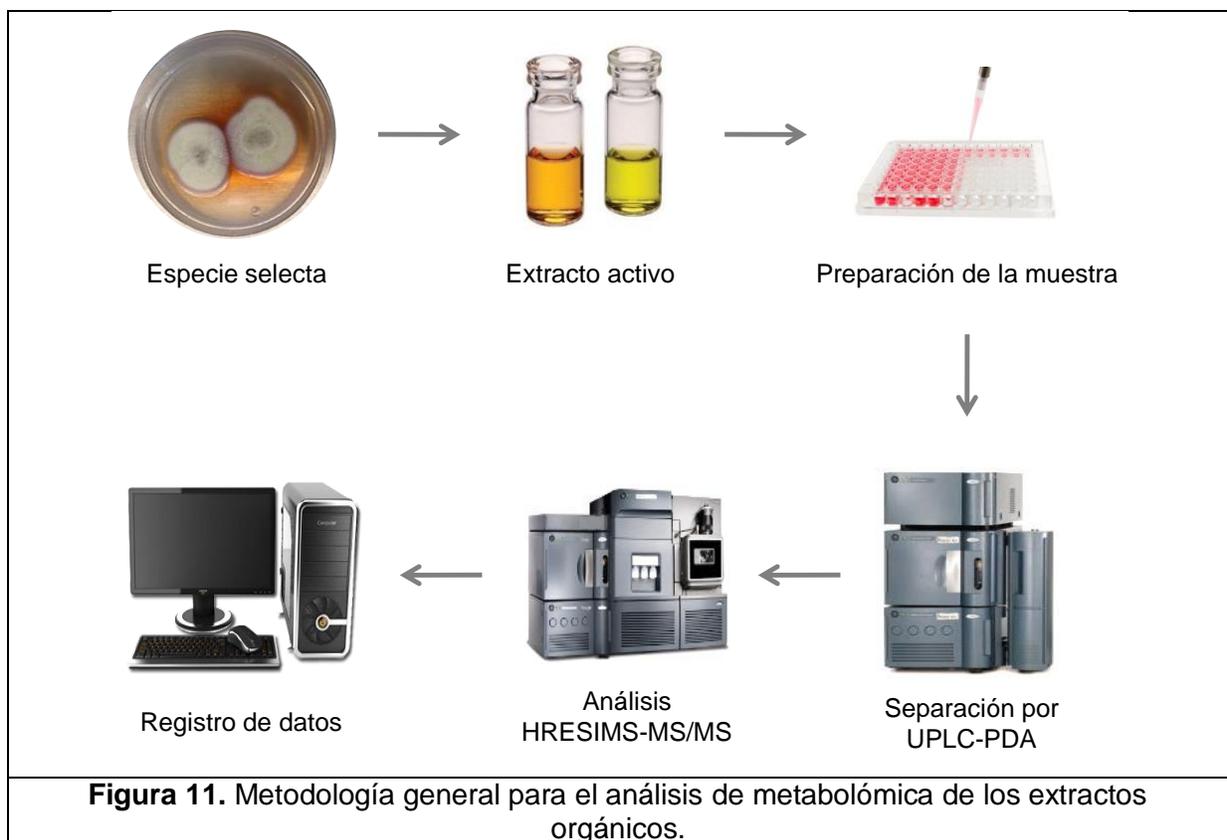
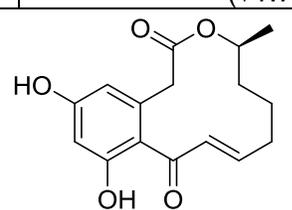
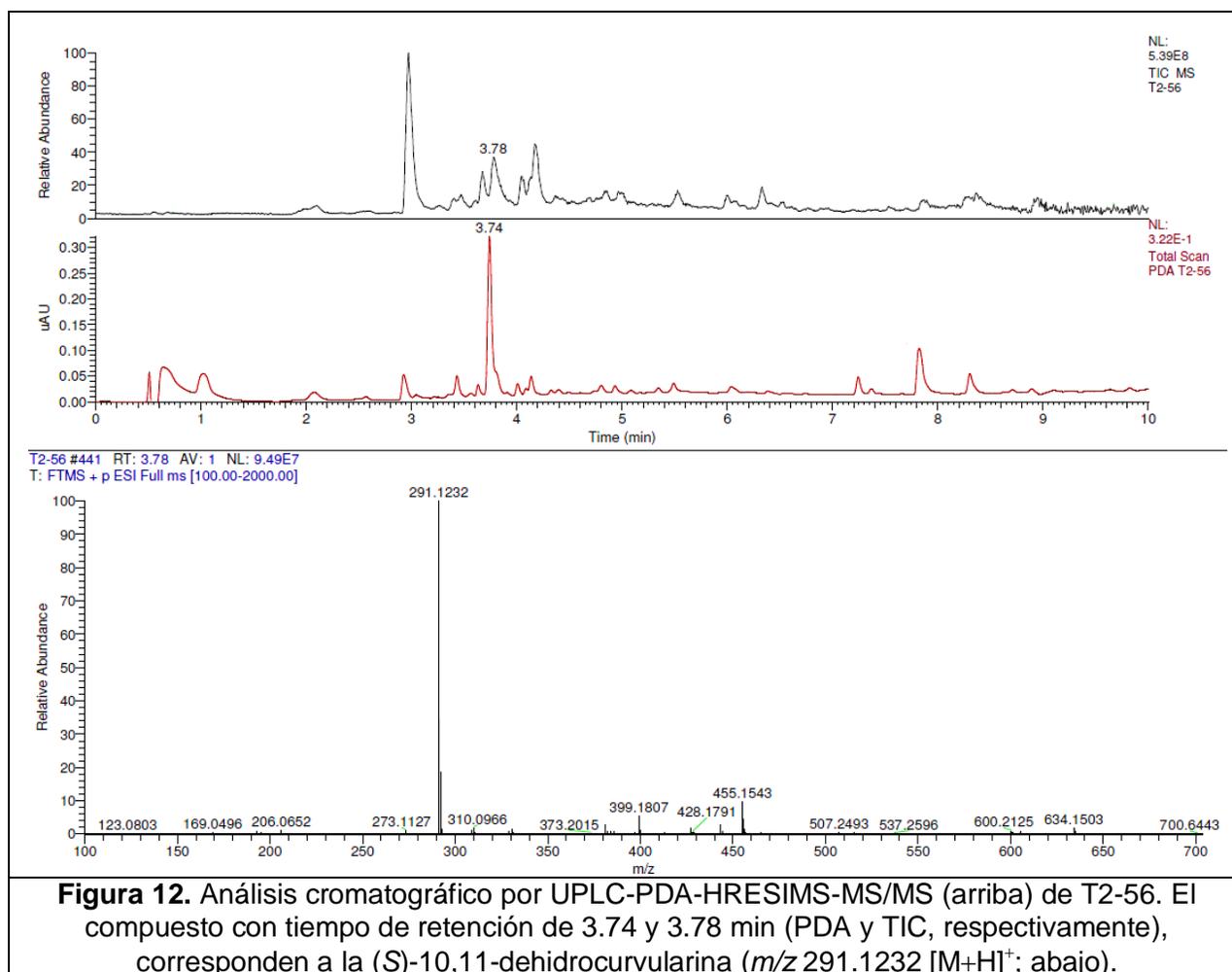


Tabla 4. Resultados de los análisis de derreplicación para el extracto del hongo T2-56.

Datos	Base de datos	T2-56
Tiempo de retención (min)	3.86	3.79
UV _{máx} (nm)	228 y 293	224 y 289
m/z [M+H] ⁺	291.1217 (-3.4 ppm)	291.1232 (+1.7 ppm)
Estructura y fórmula química	 (S)-10,11-dehidrocurvularina $C_{16}H_{18}O_5$	



A continuación se realizó el fraccionamiento primario de todos los extractos mediante una cromatografía de tipo Flash, y las fracciones obtenidas se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica (**Tabla 5**). El análisis detallado por HPLC de las fracciones primarias reveló la presencia, en algunas de éstas, de numerosos compuestos con perfiles en el UV característicos para la presencia de grupos cromóforos aromáticos y/o conjugados. Por otra parte, y con base en los rendimientos obtenidos, se seleccionaron a las especies T2-40 y T2-56 como los candidatos adecuados para el aislamiento y purificación de los componentes individuales.

Tabla 5. Resultados del fraccionamiento primario y secundario realizados mediante cromatografía de tipo Flash.					
Clave	Fracc. 1°	Fracc. 2°	Clave	Fracc. 1°	Frac. 2°
T2-4	T2-4-F _{I-V}	-	T2-52	T2-52-F _{I-IV}	-
T2-14	T2-14-F _{I-V}	-	T2-54	T2-54-F _{I-VI}	-
T2-25	T2-25-F _{I-VI}	-	T2-55	T2-55-F _{I-VII}	-
T2-40	T2-40-F _{I-VIII}	T2-40-F _V (T2-40-F _{V(1-5)})	T2-56	T2-56-F _{I-V}	T2-56-F _{III} (T2-56-F _{III(1-4)})
T2-45	T2-45-F _{I-V}	-			

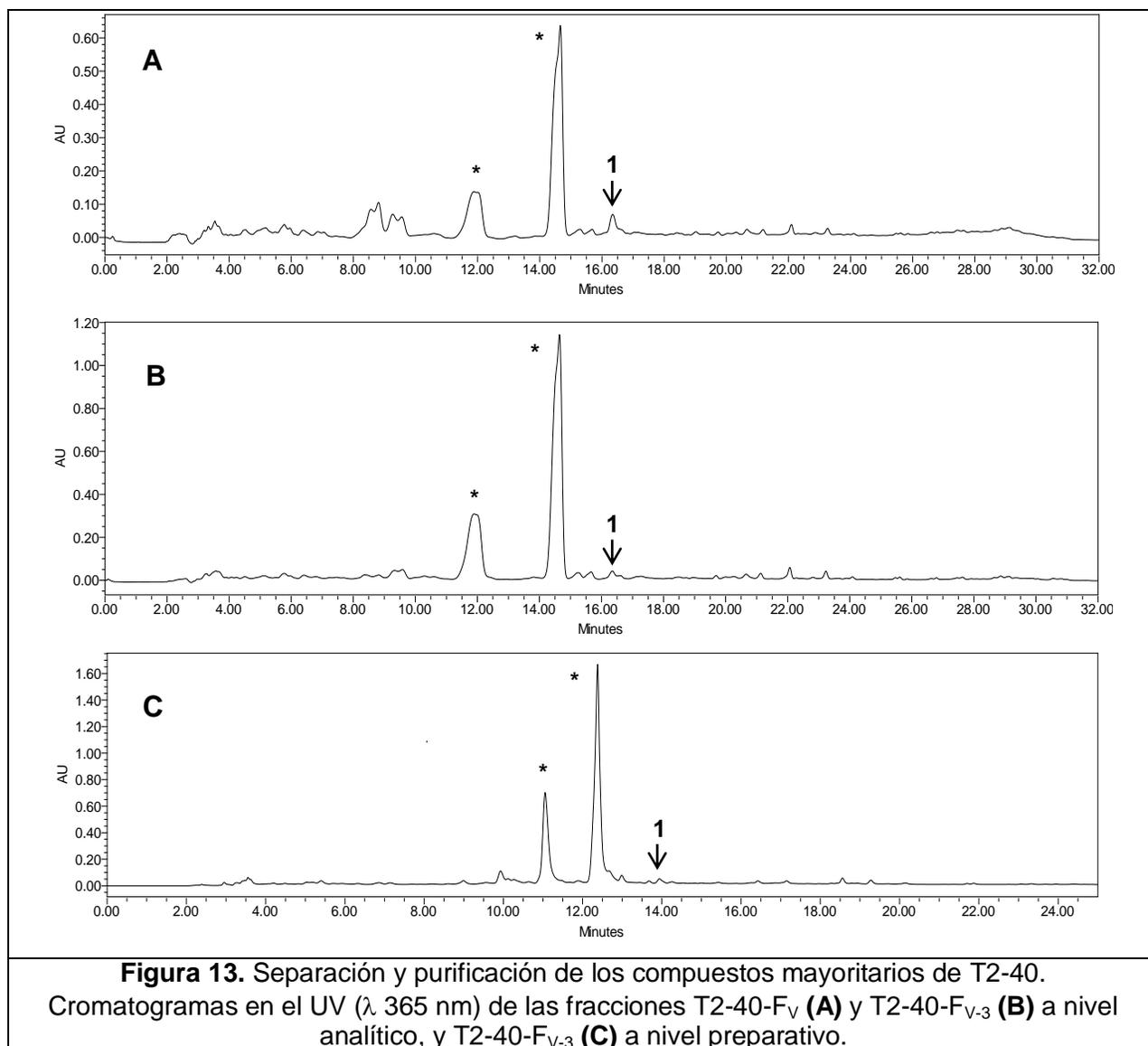
Una vez seleccionados los taxones para su estudio químico, se realizó la identificación taxonómica de los mismos mediante el análisis de sus secuencias ITS. Para este análisis, se obtuvo el ADN genómico de cada hongo a partir de cultivos axénicos frescos siguiendo las instrucciones del proveedor de los kits de extracción y purificación de ADN empleados; luego, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó el marcador molecular ITS-4. El producto puro, obtenido por PCR, se secuenció para su posterior análisis filogenético por alineamiento local (BLAST). Cabe mencionar que este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EEUU.

Los resultados de este análisis permitieron establecer que ambos taxones fúngicos pertenecen al género *Penicillium* (528 pares de bases secuenciadas, $\geq 70\%$ de cobertura y 98% de similitud con las secuencias reportadas para diversas especies el género *Penicillium*). Sin embargo, se requieren de estudios morfológicos adicionales y de la secuenciación de regiones específicas del ADN para poder establecer la taxonomía a nivel de especie de ambos organismos.

5.1. Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios del hongo T2-40

El análisis por HPLC de las fracciones secundarias resultantes de fraccionamiento por cromatografía tipo Flash de T2-40-F_V, reveló que la fracción T2-40-F_{V-3} contenía al menos tres compuestos mayoritarios, de los cuales se logró aislar únicamente al compuesto **1** (3.7 mg; **Figura 13**). Cabe mencionar que los productos

con t_R 11.9 y 14.5 min, a pesar de ser mayoritarios en la fracción, se descompusieron en los procesos de purificación subsecuentes.



5.1.1. Caracterización estructural del *N*-deoxi-PF 1140 (1)

La elucidación estructural del compuesto 1 se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros registrados por EM y RMN. El espectro generado mediante HRESIMS presentó un ion molecular en una relación masa carga (m/z) de 262.1811 $[M+H]^+$ (+3.6

ppm), correspondiente con la fórmula molecular $C_{16}H_{24}NO_2$, la cual permite 6 grados de insaturación (**Figura 14**).

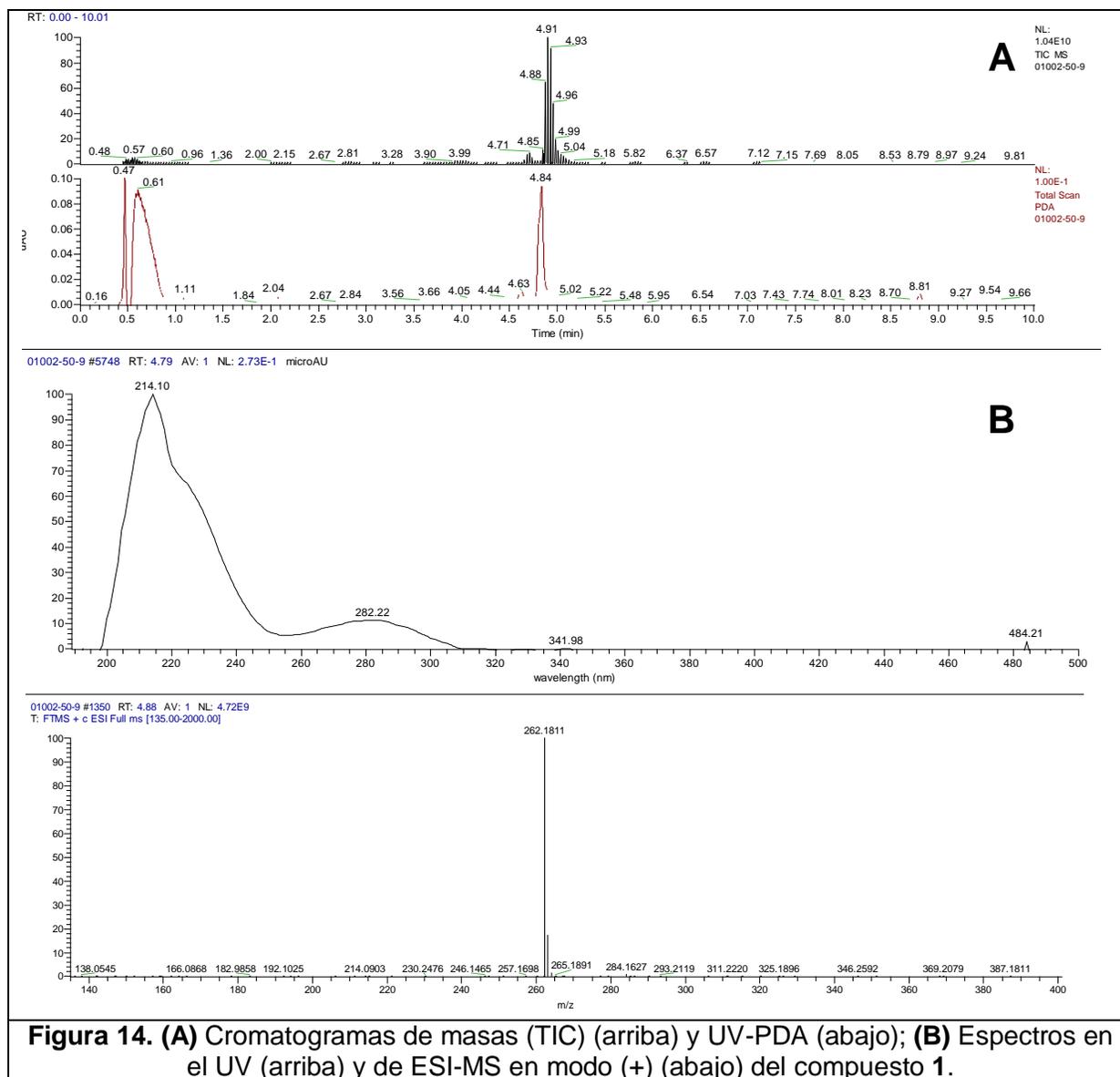


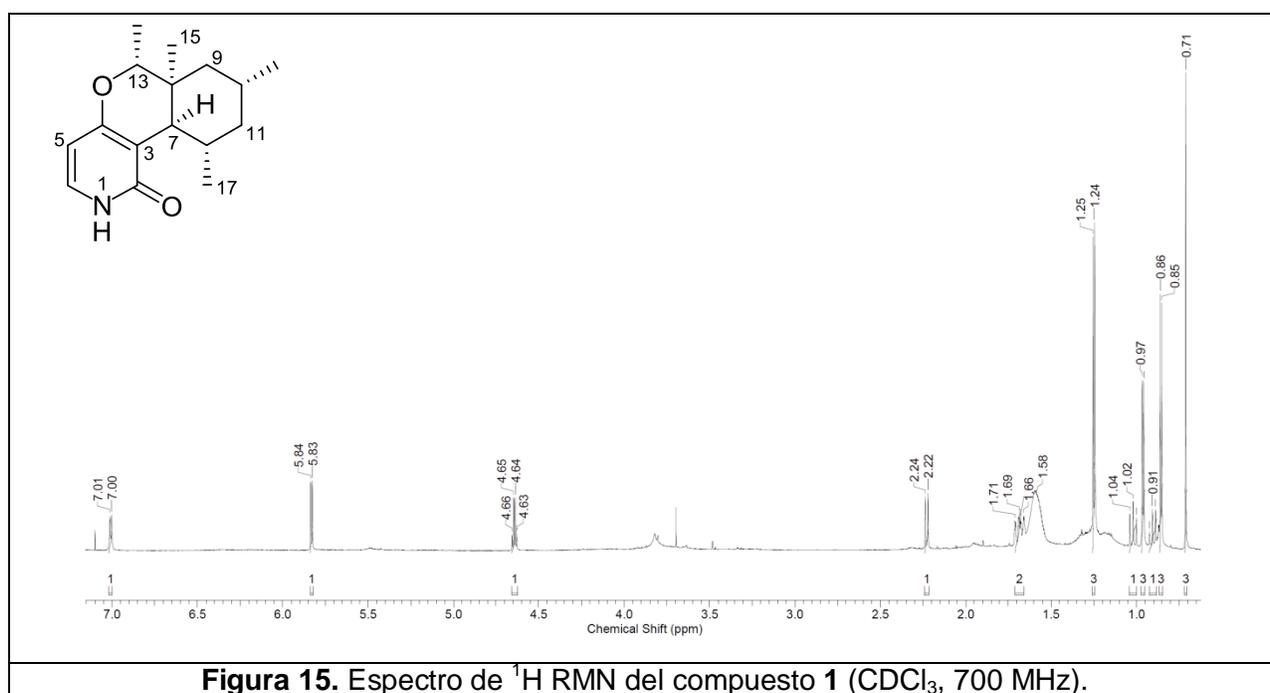
Figura 14. (A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (abajo) del compuesto 1.

Por otra parte, las características más importantes observadas en los espectros de RMN (**Figuras 15-18**) de este producto se resumen a continuación:

- En el espectro de 1H RMN se observaron cuatro señales asignables a grupos metilos en δ_H 1.25 (d, $J = 6.4$ Hz), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz), 0.86 (d, $J = 6.4$ Hz), y 0.71 (s), dos metilenos con hidrógenos diasterotópicos en δ_H 1.70 (da, $J = 13.6$ Hz) y 1.02 (dd, $J =$

13.6, 13.0 Hz), y 1.67 (da, $J = 13.3$ Hz) y 0.89 (dd, $J = 13.3, 12.0$ Hz), y seis metinos en δ_H 7.01 (d, $J = 7.1$ Hz), 5.83 (d, $J = 7.1$ Hz), 4.64 (q, $J = 6.4$ Hz), 2.23 (d, $J = 10.9$ Hz), 1.58 (m) y 1.56 (m).

- En los espectros de ^{13}C RMN se identificaron 16 señales correspondientes a cuatro metilos [δ_C 14.7 (C-14), 20.4 (C-17), 21.5 (C-15) y 22.9 (C-16)], dos metilenos [δ_C 44.2 (C-11) y 44.5 (C-9)], un carbonilo de amida [δ_C 165.3 (C-2)], un oximetino [δ_C 74.3 (C-13)], dos metinos de una doble ligadura [δ_C 131.3 (C-6) y 100.7 (C-5)], tres metinos [δ_C 44.1 (C-7), 37.8 (C-12) y 27.0 (C-10)] y tres carbonos cuaternarios [dos vinílicos en δ_C 162.4 (C-4, base de oxígeno) y 110.4 (C-3), y δ_C 33.8 (C-8)]. Todas las asignaciones fueron confirmadas mediante el análisis de las correlaciones observadas en los espectros de HSQC y HMBC.



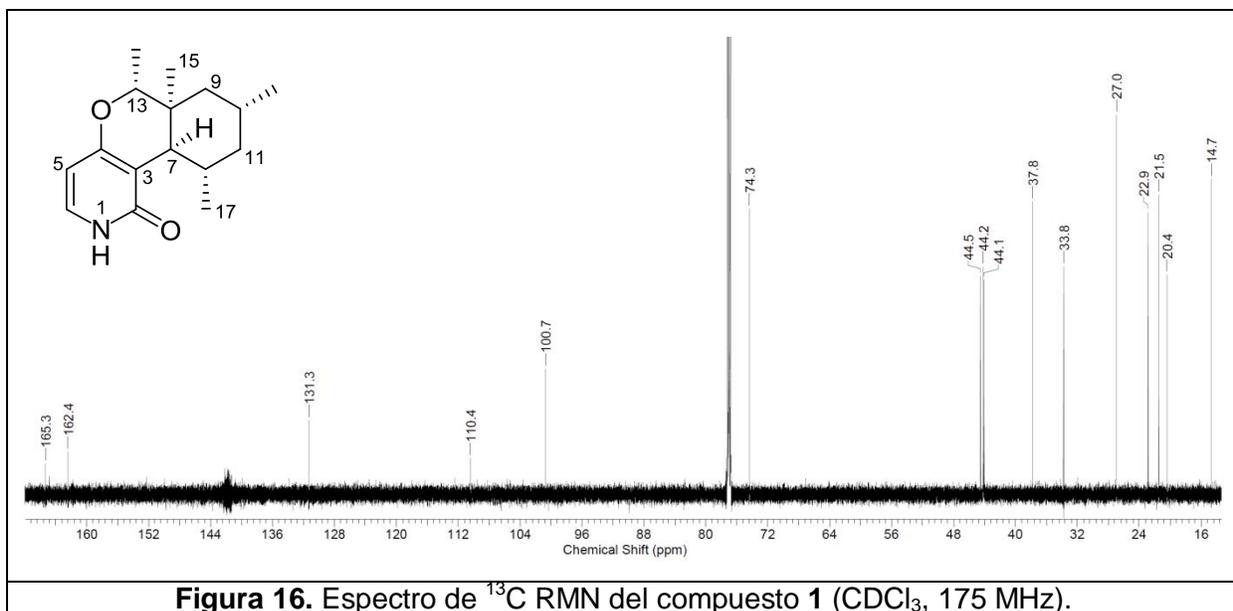


Figura 16. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 1 (CDCl_3 , 175 MHz).

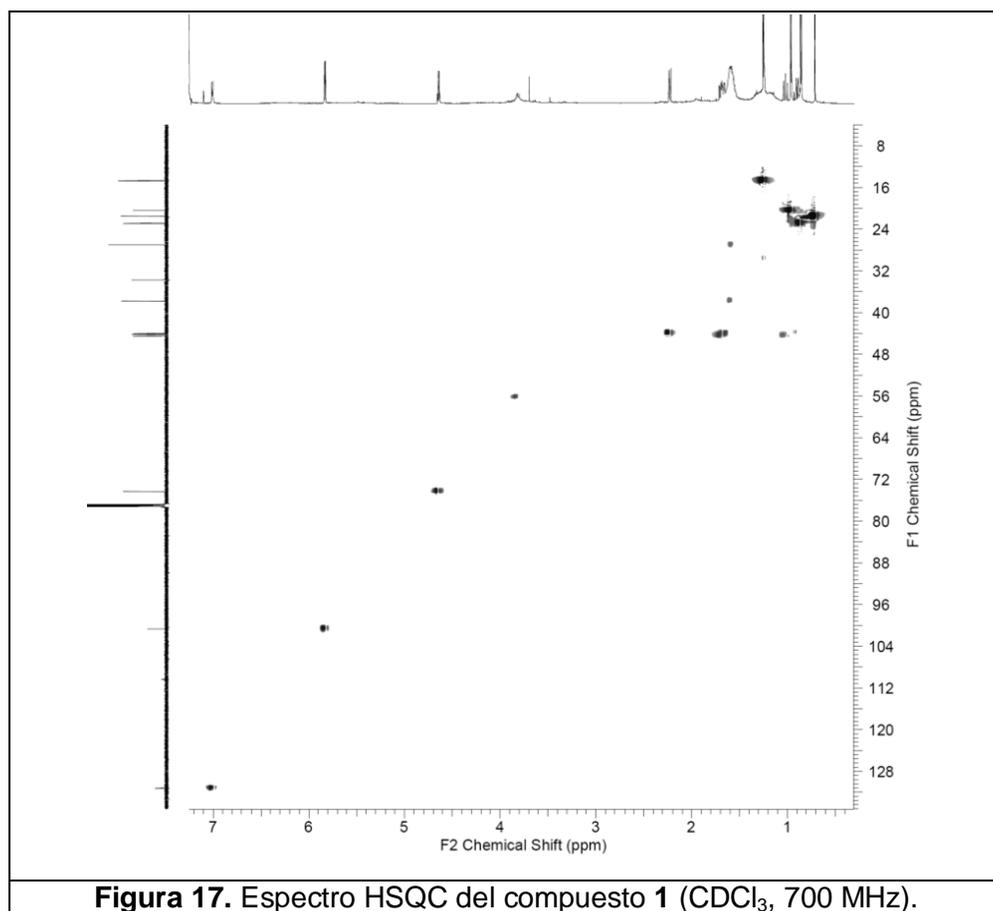
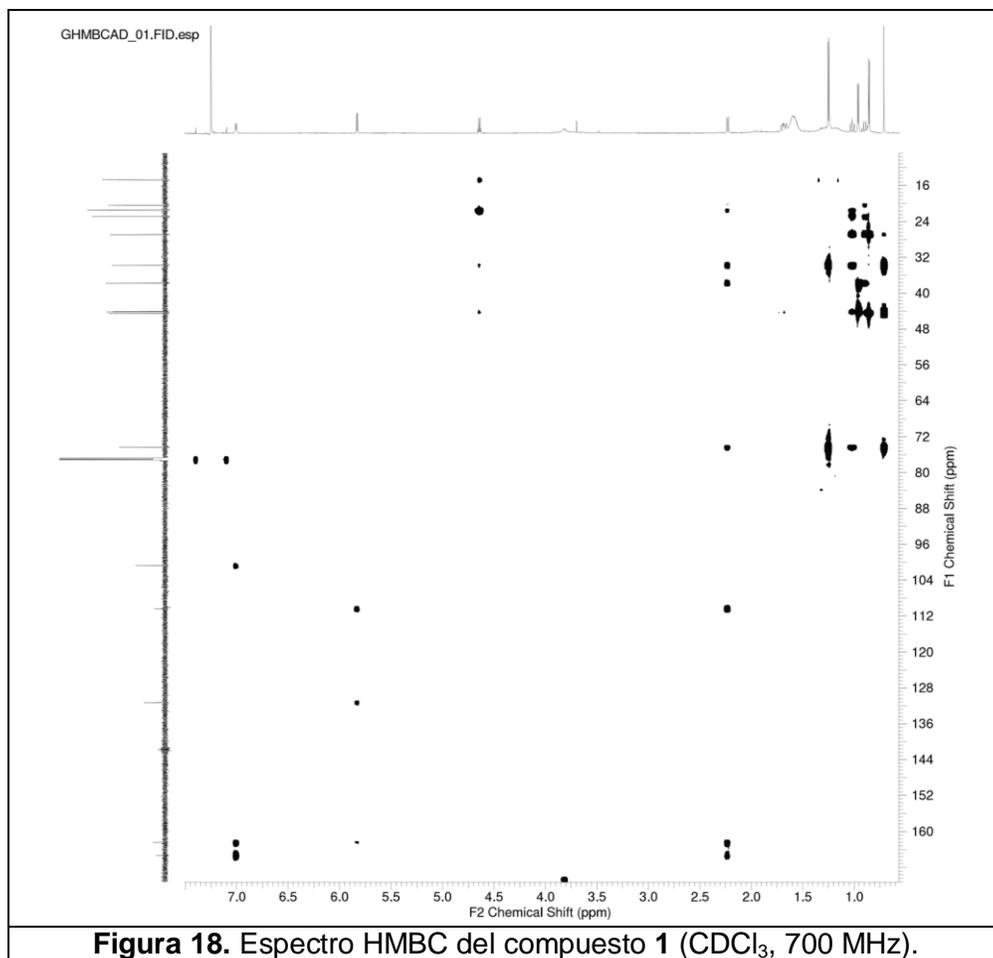


Figura 17. Espectro HSQC del compuesto 1 (CDCl_3 , 700 MHz).



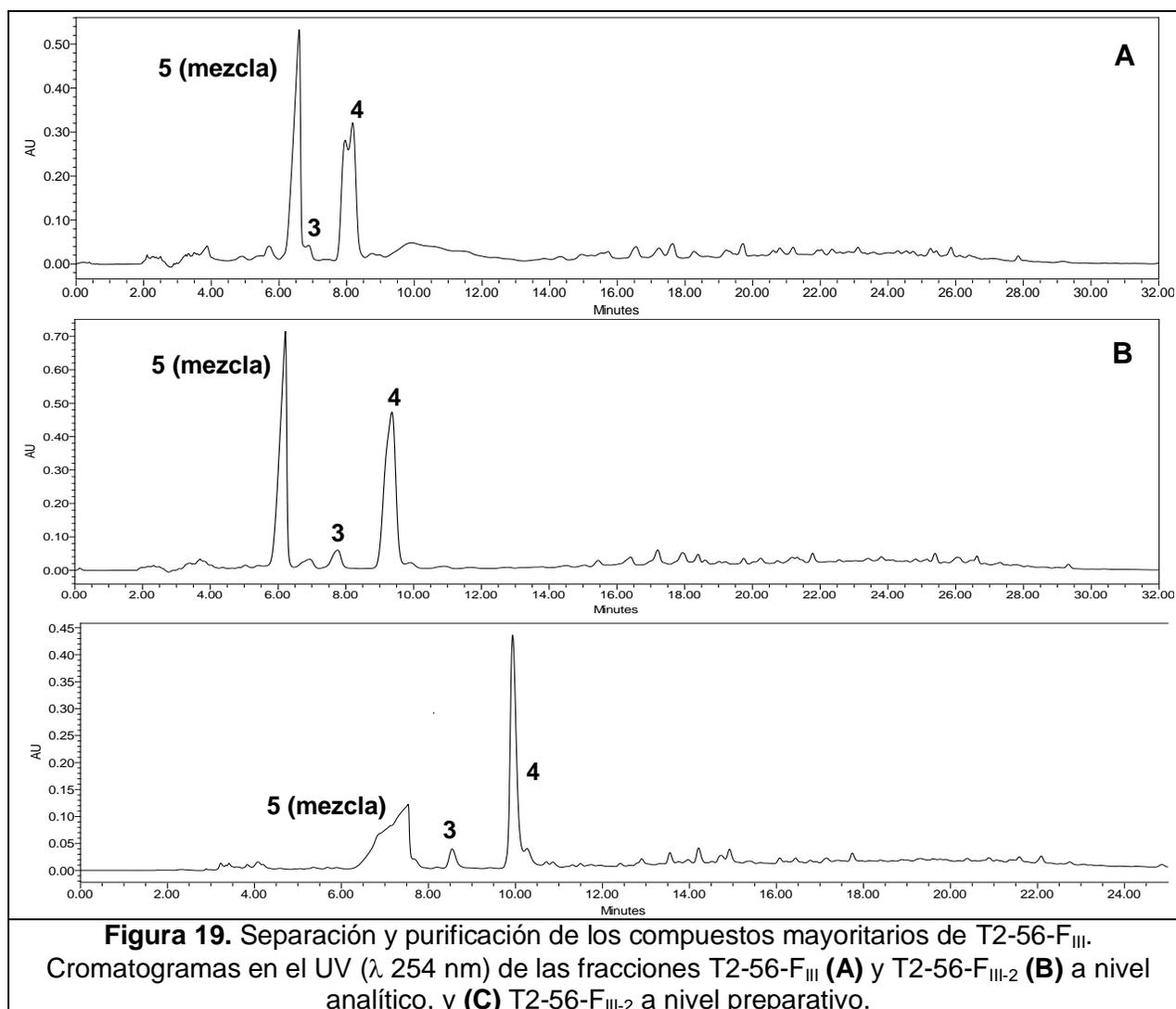
El conjunto de señales recién descrito, aunado con el análisis detallado de los desplazamientos químicos reportados en la literatura (**Tabla 6**), permitieron establecer la identidad de este compuesto como el *N*-deoxi-PF 1140 (**1**). Este producto natural fue identificado por primera vez de la especie fúngica marina *Penicillium* sp. (CANU MCPT14-1-5) aislada del alga *Xiphophora gladiata* (de Silva et al., 2009, Jessen y Gademann, 2010). Además, en ese trabajo se evaluó su actividad como agente antimicrobiano contra *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*, y en el ensayo de leucemia en ratón, en ambos experimentos el producto evaluado no presentó una actividad biológica importante.

Tabla 6. Datos espectroscópicos del compuesto *N*-deoxi-PF 1140 (**1**).

Posición	Datos experimentales (CDCl ₃ , 700 MHz)		Referencia (de Silva et al., 2009) (CD ₃ OD, 500 MHz)	
	δ_C , tipo	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C , tipo	δ_H , mult. (J en Hz)
2	165.3, C	-	167.2, C	-
3	110.4, C	-	111.6, C	-
4	162.4, C	-	164.9, C	-
5	100.7, CH	5.83, d (7.1)	102.6, CH	5.95, d (6.8)
6	131.3, CH	7.01, d (7.1)	133.7, CH	7.15, d (6.8)
7	44.1, CH	2.23, d (10.9)	45.99, CH	2.16, d (10.8)
8	33.8, C	-	35.3, C	-
9	44.5, CH ₂	1.70, da (13.6) 1.02, dd (13.6, 13.0)	45.99, CH ₂	1.78, brd (13.8) 1.02, t (13.3)
10	27.0, CH	1.56, m	28.4, CH	1.63, m
11	44.2, CH ₂	1.67, da (13.3) 0.89, dd (13.3, 12.0)	45.86, CH ₂	1.70, brd (13.8) 0.86, m
12	37.8, CH	1.58, m	39.2, CH	1.63, m
13	74.3, CH	4.64, q (6.4)	76.1, CH	4.72, q (6.4)
14	14.7, CH ₃	1.25, d (6.4)	15.3, CH ₃	1.26, q (6.4)
15	21.5, CH ₃	0.71, s	22.3, CH ₃	0.69, s
16	22.9, CH ₃	0.86, d (6.4)	23.5, CH ₃	0.88, d (6.4)
17	20.4, CH ₃	0.96, d (6.4)	21.3, CH ₃	0.91, d (6.6)

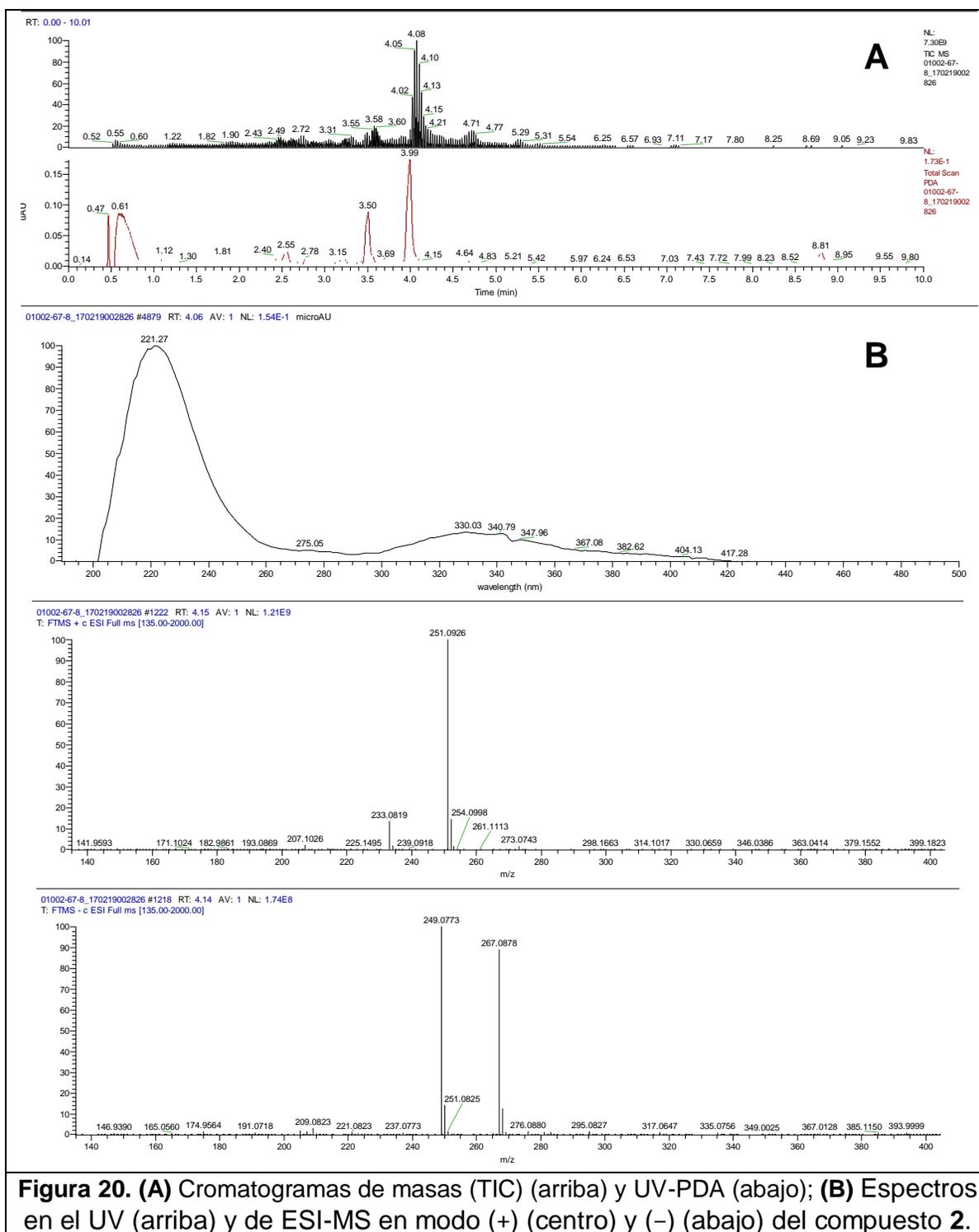
5.2. Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios del hongo T2-56

El análisis cromatográfico de las fracciones primarias T2-56 F_{I-V} permitió identificar a las fracciones T2-56-F_{II} y T2-56-F_{III} como candidatas para la obtención de los metabolitos mayoritarios. La fracción T2-56-F_{II} contenía un producto mayoritario el cual se purificó por HPLC, generando 38.8 mg del compuesto **2**. Por otra parte, la fracción T2-56-F_{III} se sometió a un fraccionamiento tipo Flash obteniéndose cuatro fracciones secundarias (T2-56-F_{III-(1-4)}). El análisis cromatográfico por HPLC de la fracción T2-56-F_{III-2} (**Figura 19**), permitió el aislamiento de los compuestos **3** (2.1 mg) y **4** (15.1 mg), además de 19.5 mg de una mezcla establecida por RMN. La purificación por HPLC de ésta permitió la obtención de 3.7 mg de **5**.



5.2.1. Caracterización estructural de la citrinina (2)

El ion molecular observado en el espectro de HRESIMS para el compuesto **2** corresponde con la fórmula $C_{13}H_{15}O_5$ (m/z 251.0926 $[M+H]^+$, + 4.8 ppm), la cual permite 7 grados de insaturación (**Figura 20**).



El análisis de los espectros de RMN mono y bidimensionales (**Figuras 21-24**) del producto **2** permitió establecer las siguientes características estructurales:

- En δ_H 4.77 (1H, dq, $J = 6.7, 0.8$ Hz) y 2.97 (1H, q, $J = 7.2$ Hz) se observan dos múltiples que correlacionan en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 81.6 (C-3) y 34.6 (C-4), respectivamente, sugiriendo la presencia de dos metinos alifáticos, uno de estos vecino a un sistema de tipo oximetino. Además, en δ_H 1.23 (3H, d, $J = 7.2$ Hz) y 1.35 (3H, d, $J = 6.7$ Hz) se observaron dos dobletes diagnósticos para grupos metilos [δ_C 18.5 (C-9) y 18.2 (C-10)].

- En δ_H/δ_C 2.02 (3H, s)/9.4 (C-11) se observa una señal asignable a un metilo sobre doble ligadura, y en δ_H/δ_C 8.23 (1H, s)/162.7 (C-1), un metino base de oxígeno y de una doble ligadura. Finalmente en el espectro de ^{13}C RMN observan dos señales correspondientes a un grupo carbonilo de ácido [δ_C 174.5 (C-12)] unido a un anillo aromático, y en δ_C 183.8 (C-6) una señal atribuible a una cetona cíclica (quinona).

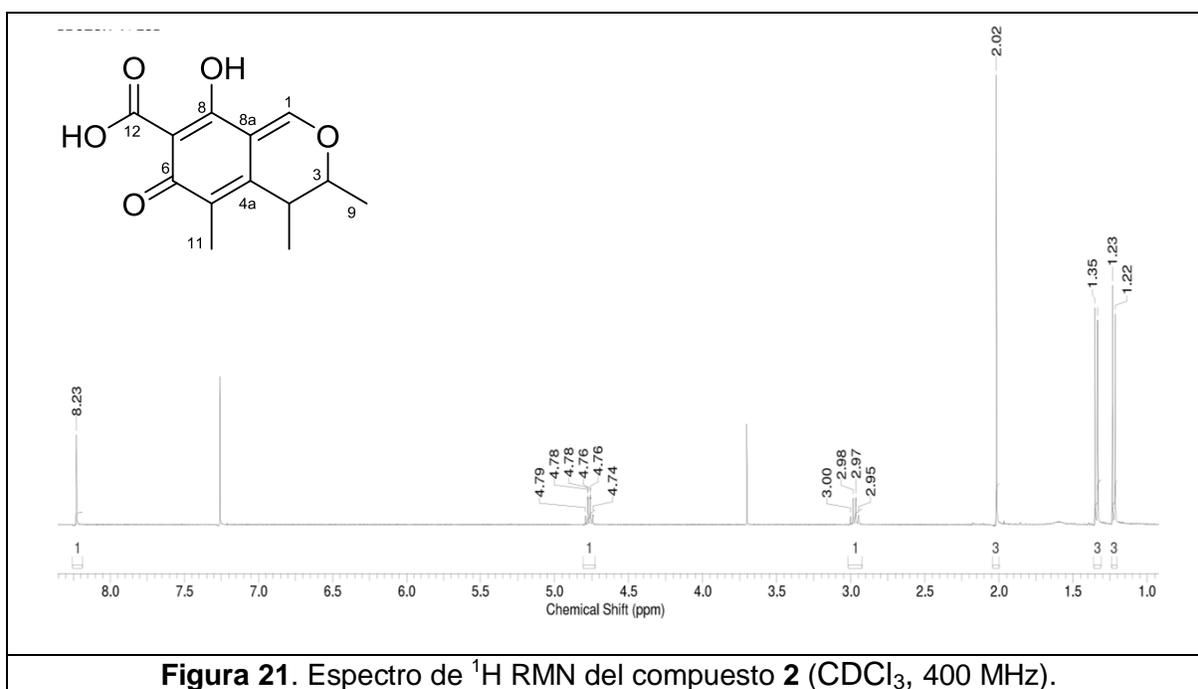
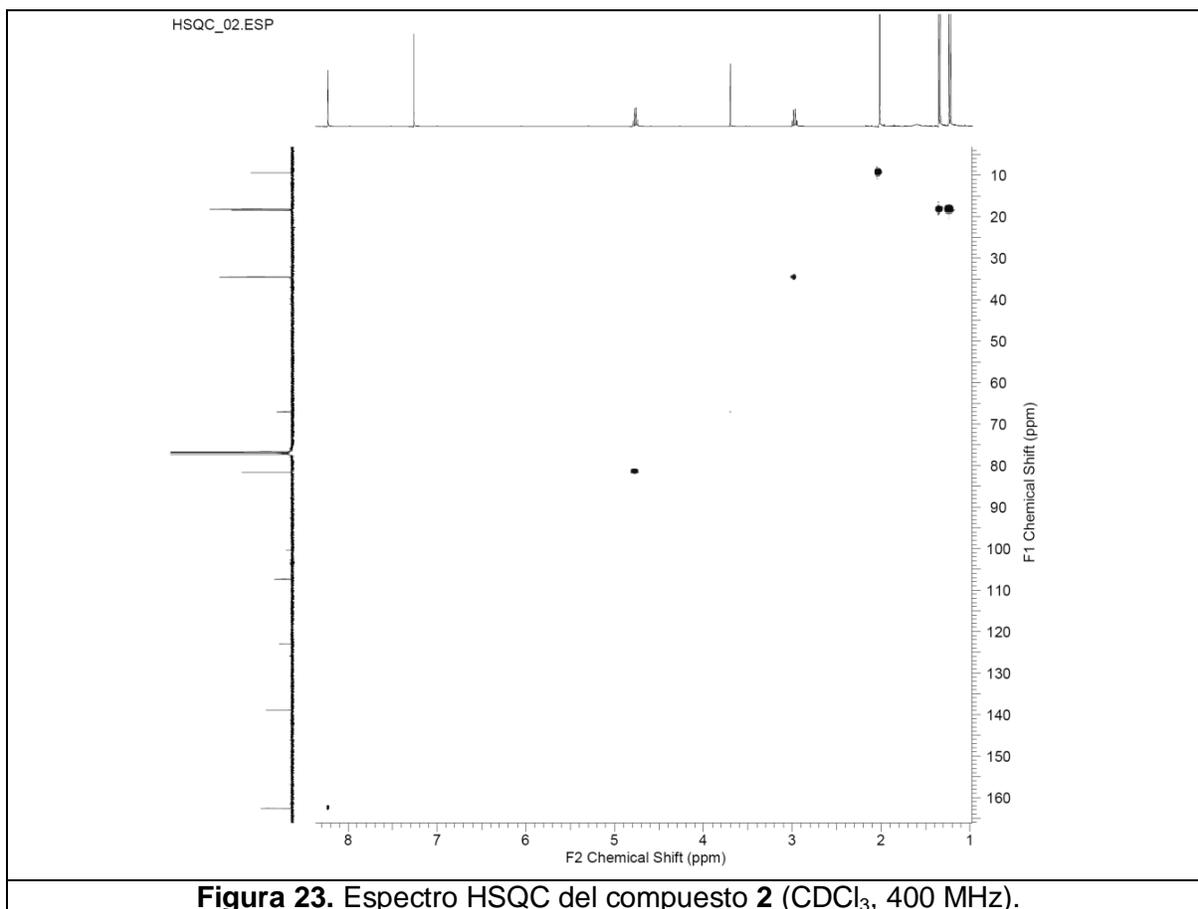
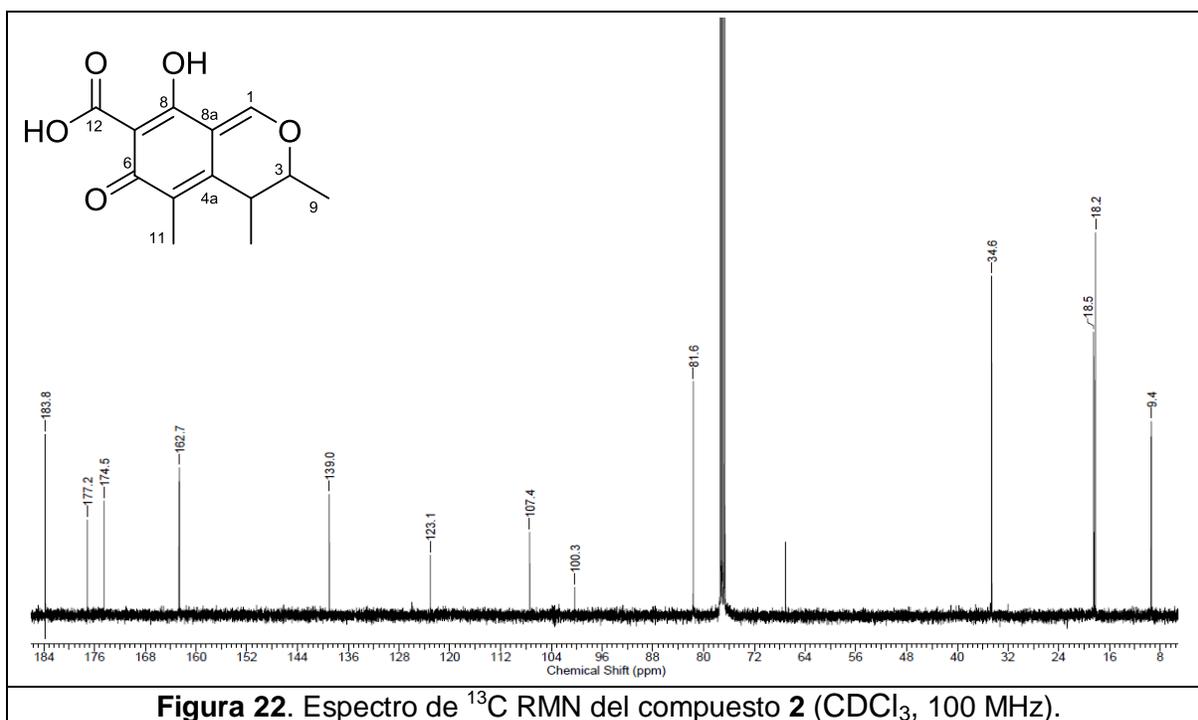
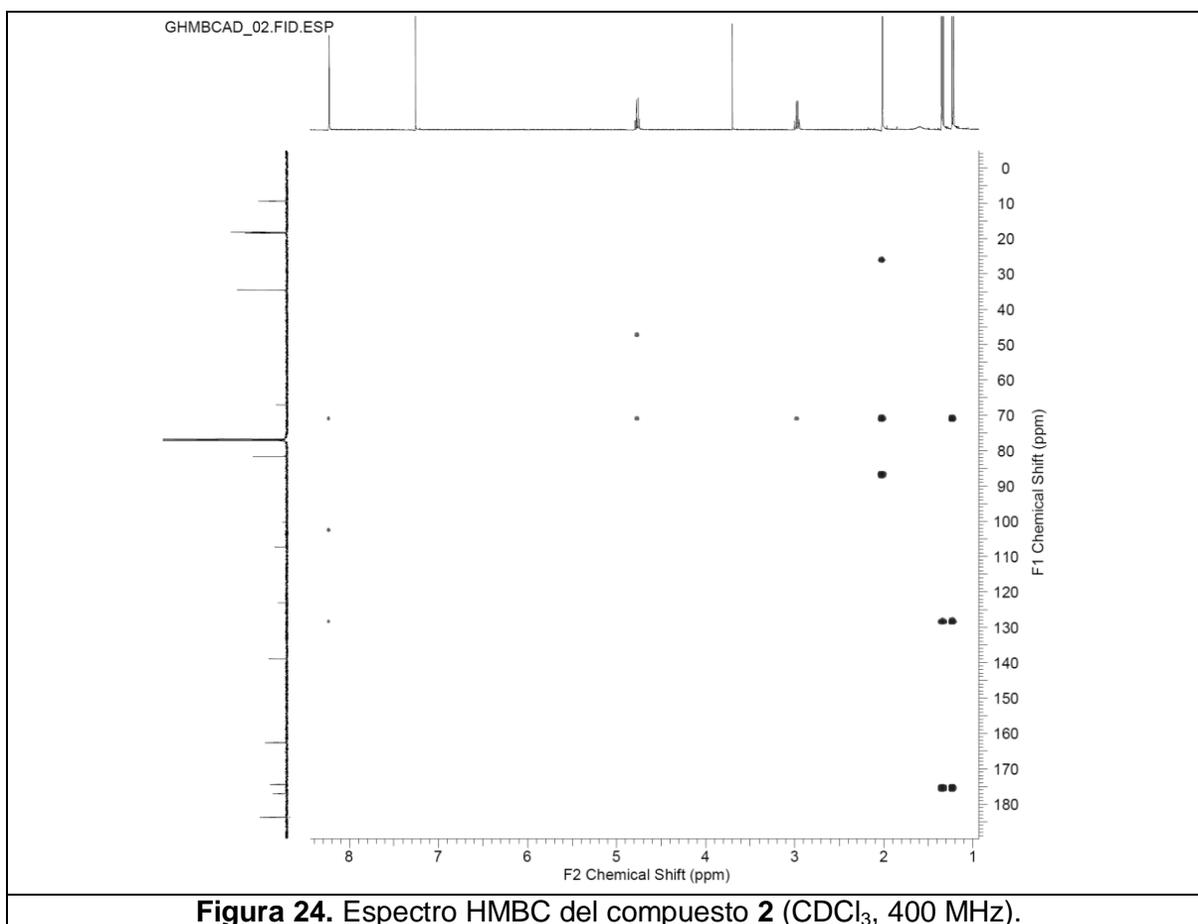


Figura 21. Espectro de 1H RMN del compuesto 2 ($CDCl_3$, 400 MHz).





Así, el conjunto de señales descritas permitieron caracterizar al producto **2** como la citrinina (**Tabla 7**) (Valente et al., 2014). Esta micotoxina fue aislada por primera vez de *Penicillium citrinum* en 1946 (Sprenger y Ruoff, 1946), y a la fecha ha sido obtenida de otras especies como *P. griseofulvum* (Liu et al., 2017) y *P. notatum* (Betina et al., 1964), además de hongos pertenecientes a los géneros *Micromonospora* (Li et al., 2006) y *Aspergillus* (Pollock, 1947).

Tabla 7. Datos espectroscópicos del compuesto citrinina (**2**).

Posición	Datos experimentales (CDCl ₃ , 400 MHz)		Referencia (Valente et al., 2014) (CDCl ₃ , 400 MHz)	
	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)
1	162.7, CH	8.23, s	162.9, CH	8.25, s
3	81.6, CH	4.77, dq, (6.7, 0.8)	81.7, CH	4.78, dq, (6.7, 0.9)
4	34.6, CH	2.97, q (7.2)	34.6, CH	2.99, q, (7.2)
4a	139.0, C	–	139.1, C	–
5	123.1, C	–	123.1, C	–
6	183.8, C	–	183.4, C	–
7	100.3, C	–	100.3, C	–
8	177.2, C	–	177.2, C	–
8a	107.4, C	–	107.1, C	–
9	18.5, CH ₃	1.35, d (6.7)	18.5, CH ₃	1.35, d (6.7)
10	18.2, CH ₃	1.23, d (7.2)	18.3, CH ₃	1.23, d (7.2)
11	9.4, CH ₃	2.02, s	9.5, CH ₃	2.02, s
12	174.5, C	–	174.6, C	–
8-OH	–	*	–	15.90, sa
12-OH	–	*	–	15.12, sa

*El espectro se registró hasta 14 ppm.

Cabe destacar que esta micotoxina ha demostrado tener una actividad contra las líneas celulares cancerígenas K562 (leucemia), HL-60 (leucemia promielocítica), HeLa (cáncer cérvico-uterino) y BGC-823 (adenocarcinoma gástrico), con valores de porcentaje de inhibición del crecimiento celular por arriba del 50% a la concentración de 100 µg/mL. Estos resultados fueron comparados con el fármaco de referencia docetaxel (Wu et al., 2015). También se encontró, que al ser un compuesto hidrofóbico de bajo peso molecular, puede penetrar las células mediante permeación de la membrana plasmática o interacción con transportadores aniónicos orgánicos unidos a las membranas (Chang et al., 2009). Además, la citrinina (**2**) induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En experimentos realizados en células madre de embrión (ESC-B5) se demostró que este producto induce apoptosis mediante la generación de ERO, el incremento de calcio libre en el citoplasma, la producción de óxido nítrico intracelular, el aumento de la relación Bax/Bcl-2, la pérdida de potencial en la membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C y por activación de las caspasas-9 y -3, la proteína cinasa activada con p21 y la cinasa que fosforila a la proteína c-Jun (Chan, 2008).

5.2.2. Caracterización estructural de la esclerotinina A (3)

Los análisis por LC-HRESIMS permitieron determinar la fórmula molecular del compuesto **3** como $C_{13}H_{17}O_5$ (m/z 253.1075 $[M+H]^+$, +1.8 ppm), la cual permite 6 grados de insaturación (**Figura 25**).

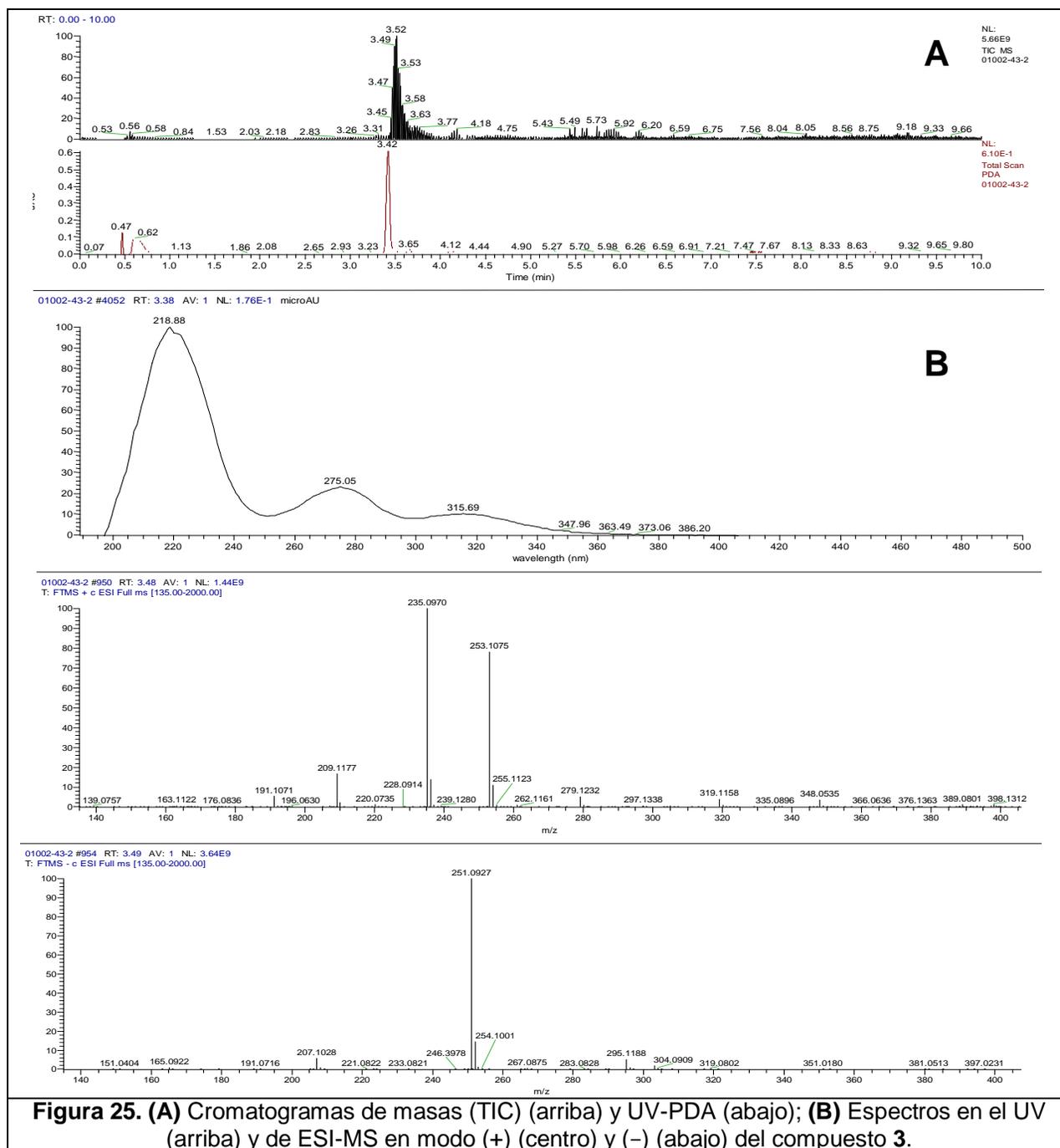


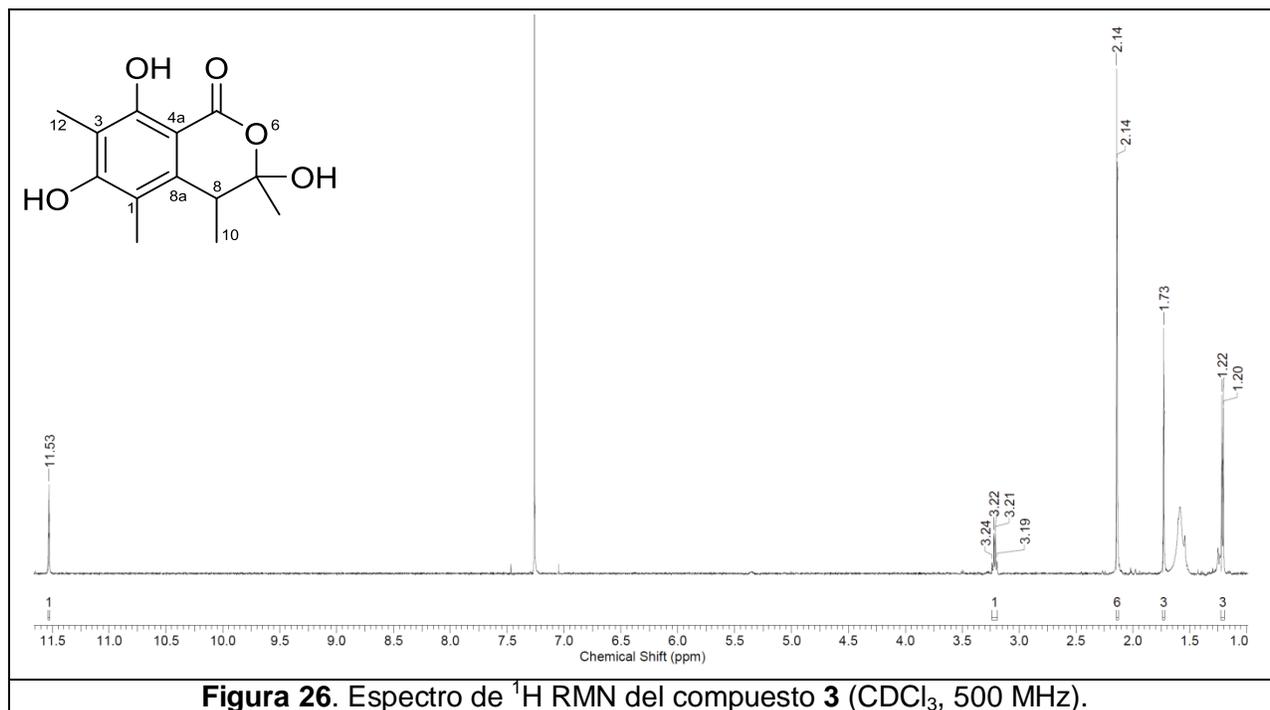
Figura 25. (A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (centro) y (-) (abajo) del compuesto **3**.

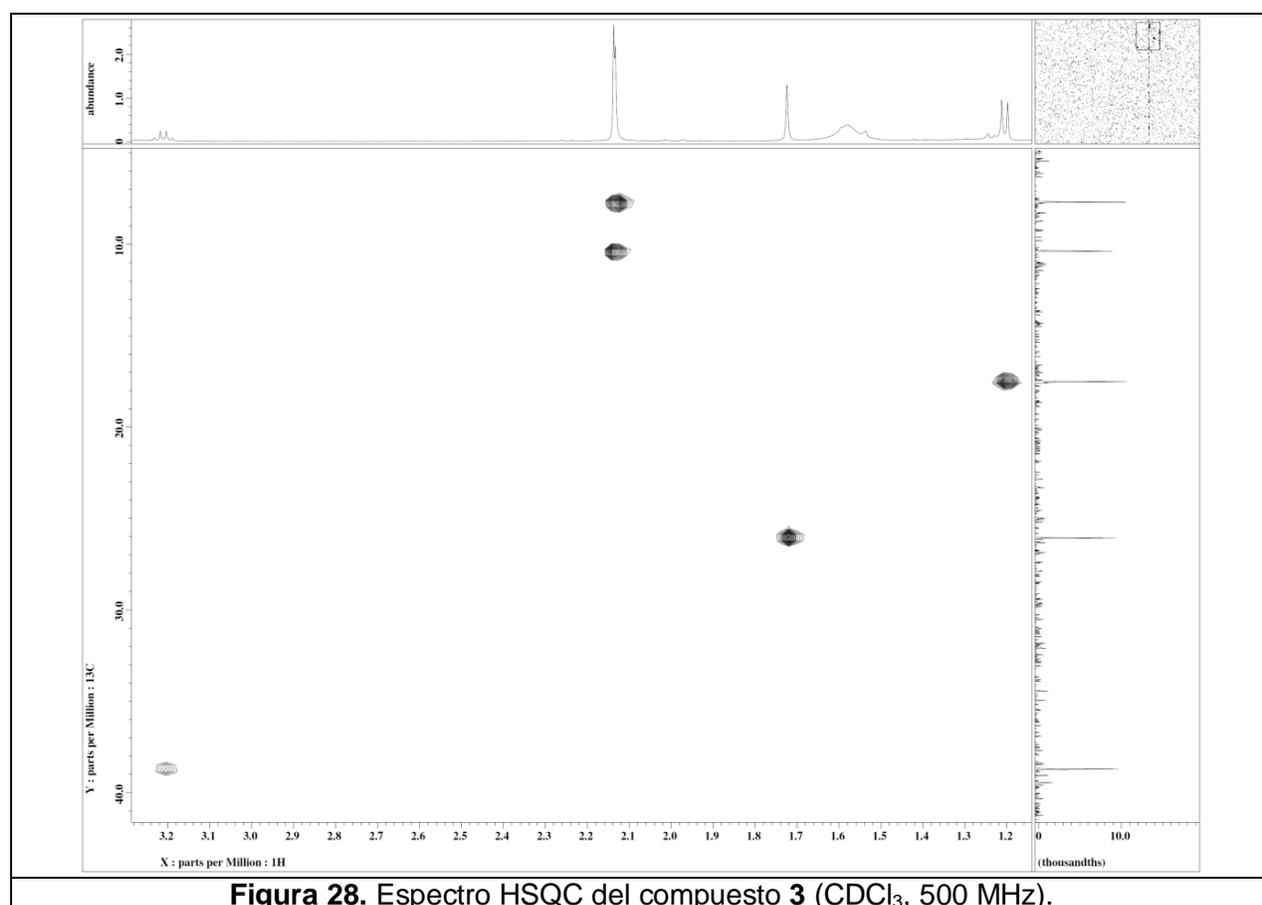
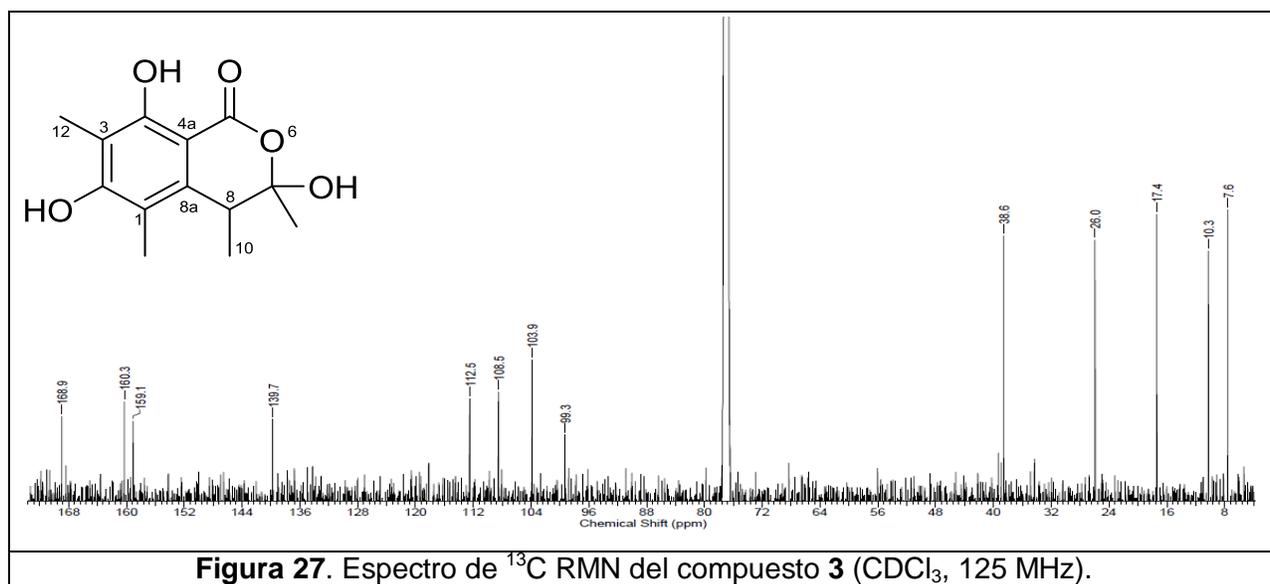
El análisis detallado de los espectros en el UV y RMN (**Figuras 26-29**) reveló la presencia de perfiles característicos de una dihidroisocumarina sustituida. Las señales más importantes observadas en los espectros de RMN para la elucidación inequívoca de este compuesto se describen a continuación.

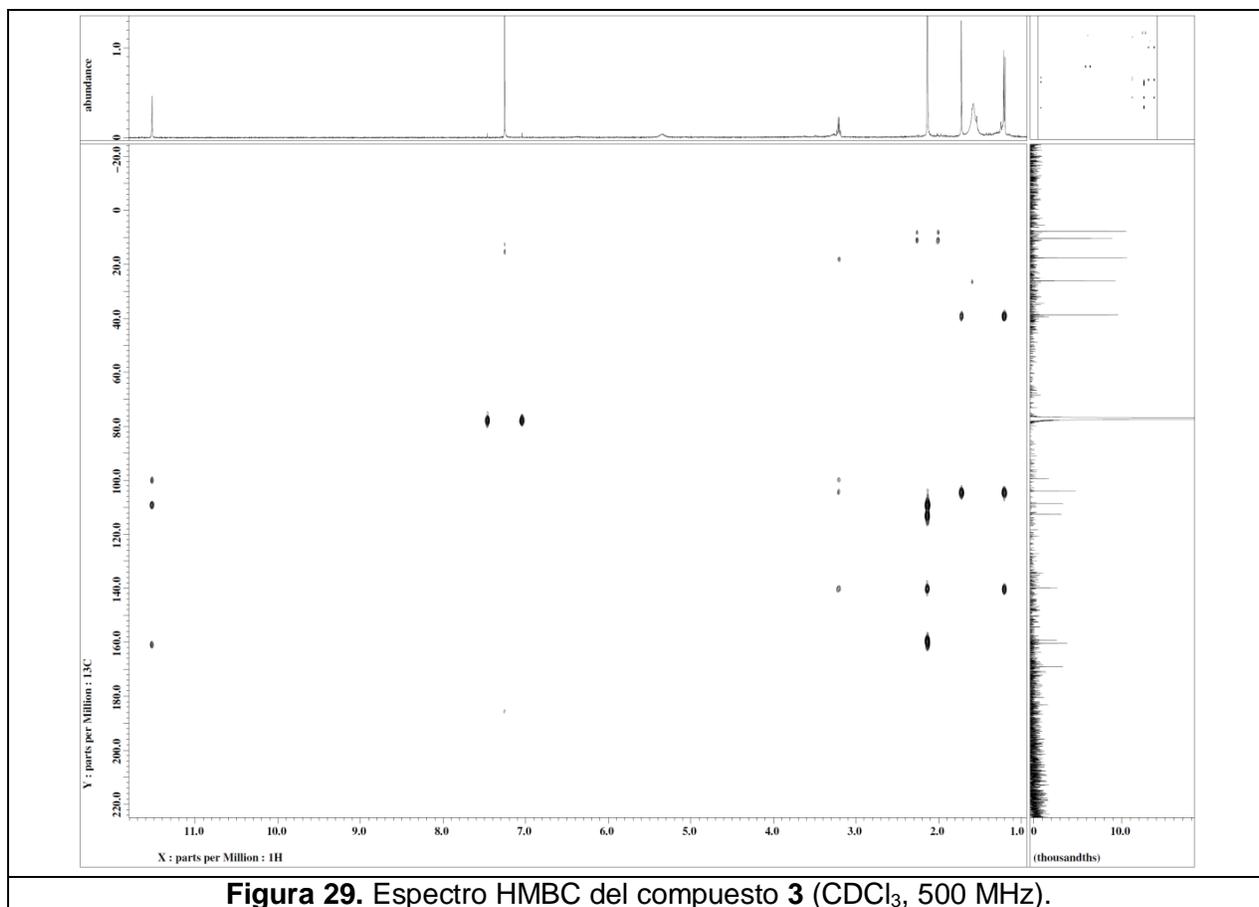
- En δ_H 2.14 (3H, s) y 2.13 (3H, s) se observan dos señales asignables a grupos metilos sobre un anillo aromático y que mostraron correlación en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 10.3 (C-11) y 7.6 (C-12), respectivamente. También se observaron otros dos grupos metilos en δ_H/δ_C 1.21 (3H, d, $J = 7.1$ Hz)/17.4 (C-10) y 1.73 (3H, s)/26.0 (C-9).

- En δ_H/δ_C 3.21 (1H, q, $J = 7.2$ Hz)/38.6 (C-8) se observa un múltiplete asignado al grupo metino en C-8 unido al metilo C-10.

- Finalmente, en δ_H 11.52 (1H, s) se observa la presencia de un hidroxilo fenólico quelatado con el carbonilo de una α -pirona en δ_C 168.9 (C-5).







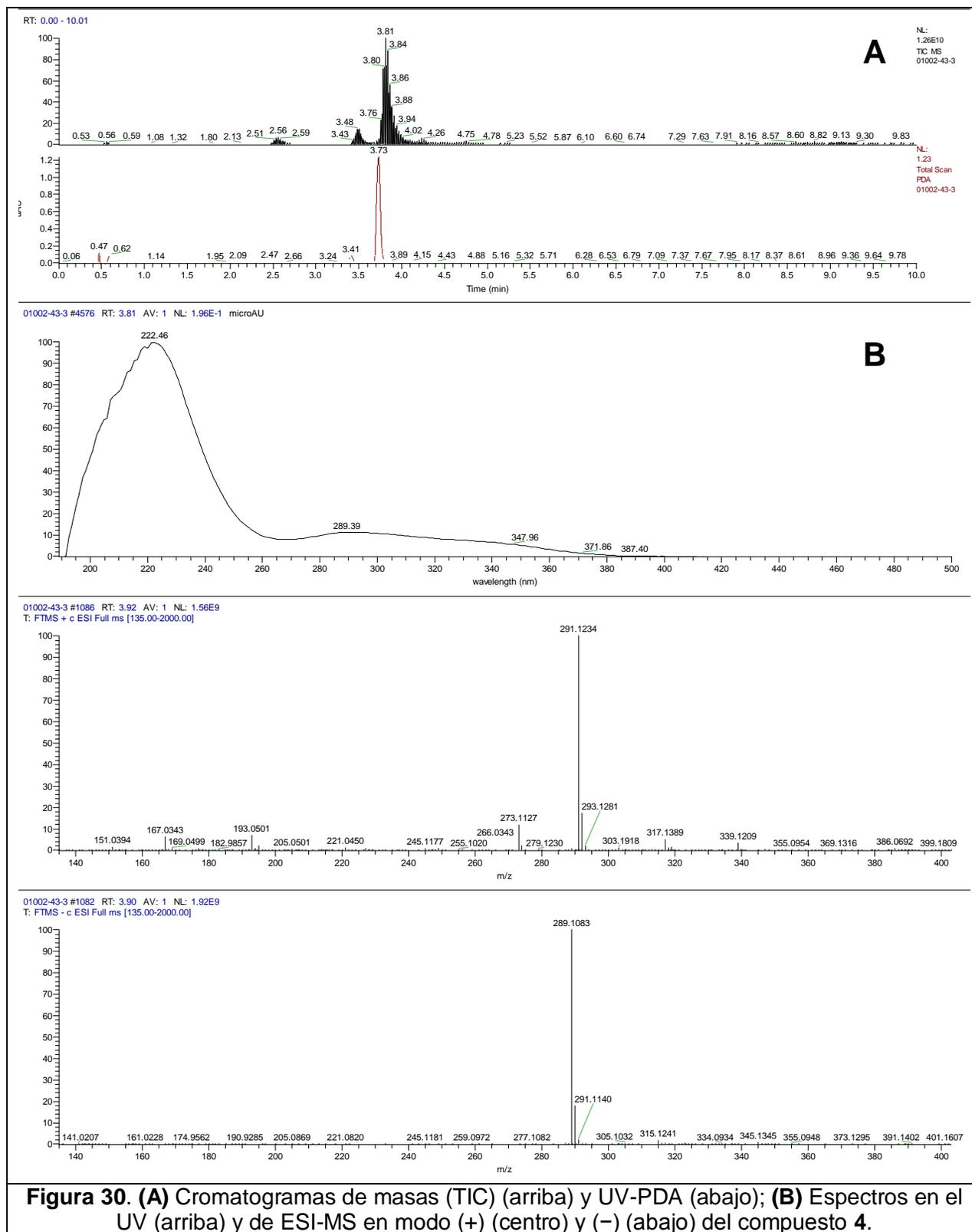
El análisis comparativo de los valores de desplazamiento químico (δ) de ¹H y ¹³C RMN para este compuesto con aquellos reportados en la literatura, son conscientes con el producto natural esclerotinina A (**3**) (**Tabla 8**). Este metabolito fue identificado por primera vez en 1968 en las especies *P. citrinum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Sassa et al., 1968, Curtis et al., 1968), y recientemente de *Astrocystis* sp. (Kornsakulkarn et al., 2014). Cabe destacar que este compuesto no mostró actividad antimicrobiana ni citotóxica importante (Lai et al., 2013).

Tabla 8. Datos espectroscópicos del compuesto esclerotina A (3).

Posición	Datos experimentales (CDCl ₃ , 500 MHz)		Referencia (Lai et al., 2013) (CD ₃ OD, 600 MHz)		Referencia (Lai et al., 2013) ((CD ₃) ₂ SO, 600 MHz)	
	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)
1	112.5, C	–	114.7, C	–	113.2, C	–
2	160.3, C	–	162.1, C	–	160.2, C	–
3	108.5, C	–	110.1, C	–	108.4, C	–
4	159.1, C	–	161.3, C	–	159.1, C	–
4a	99.3, C	–	100.0, C	–	98.6, C	–
5	168.9, C	–	171.7, C	–	169.7, C	–
7	103.9, C	–	105.6, C	–	104.6, C	–
8	38.6, CH	3.21, q (7.2)	39.8, CH	3.15, q (7.0)	38.2, CH	3.11, q (7.0)
8a	139.7, C	–	142.3, C	–	141.2, C	–
9	26.0, CH ₃	1.73, s	25.7, CH ₃	1.70, s	25.1, CH ₃	1.59, s
10	17.4, CH ₃	1.21, d (7.1)	17.5, CH ₃	1.19, s	17.1, CH ₃	1.04, d (7.1)
11	10.3, CH ₃	2.14, s	10.7, CH ₃	2.16, s	10.6, CH ₃	2.04, s
12	7.6, CH ₃	2.13, s	8.2, CH ₃	2.12, s	8.3, CH ₃	2.02, s
2-OH	–	–	–	–	–	9.33, s
4-OH	–	11.53, s	–	–	–	11.67, s
7-OH	–	–	–	–	–	7.25, s

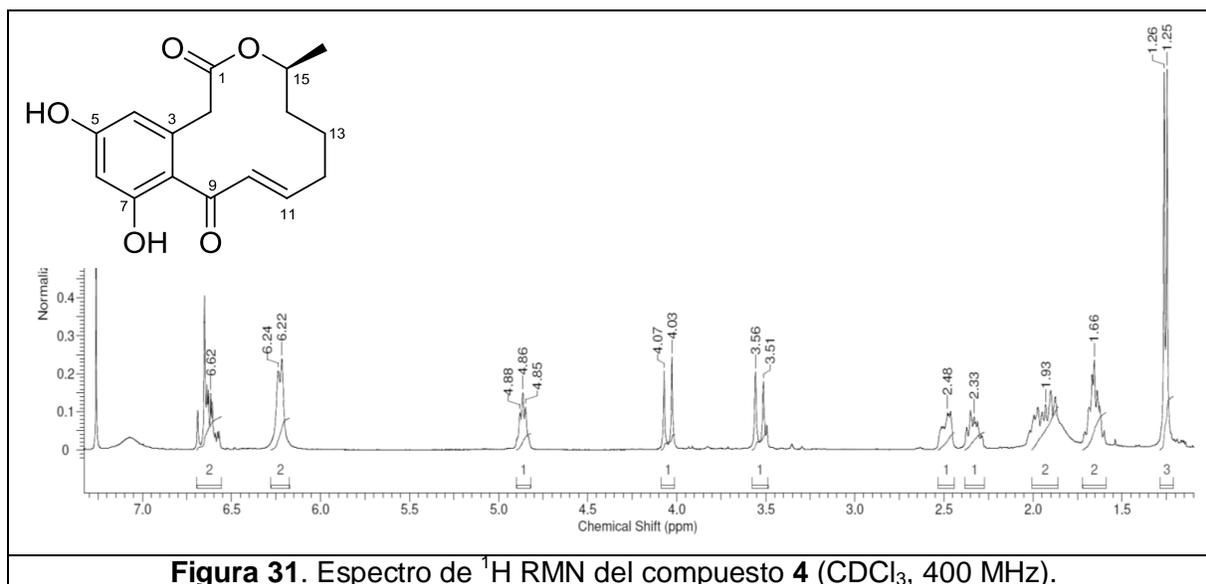
5.2.3. Caracterización estructural de la (S)-10,11-dehidrocurvularina (4)

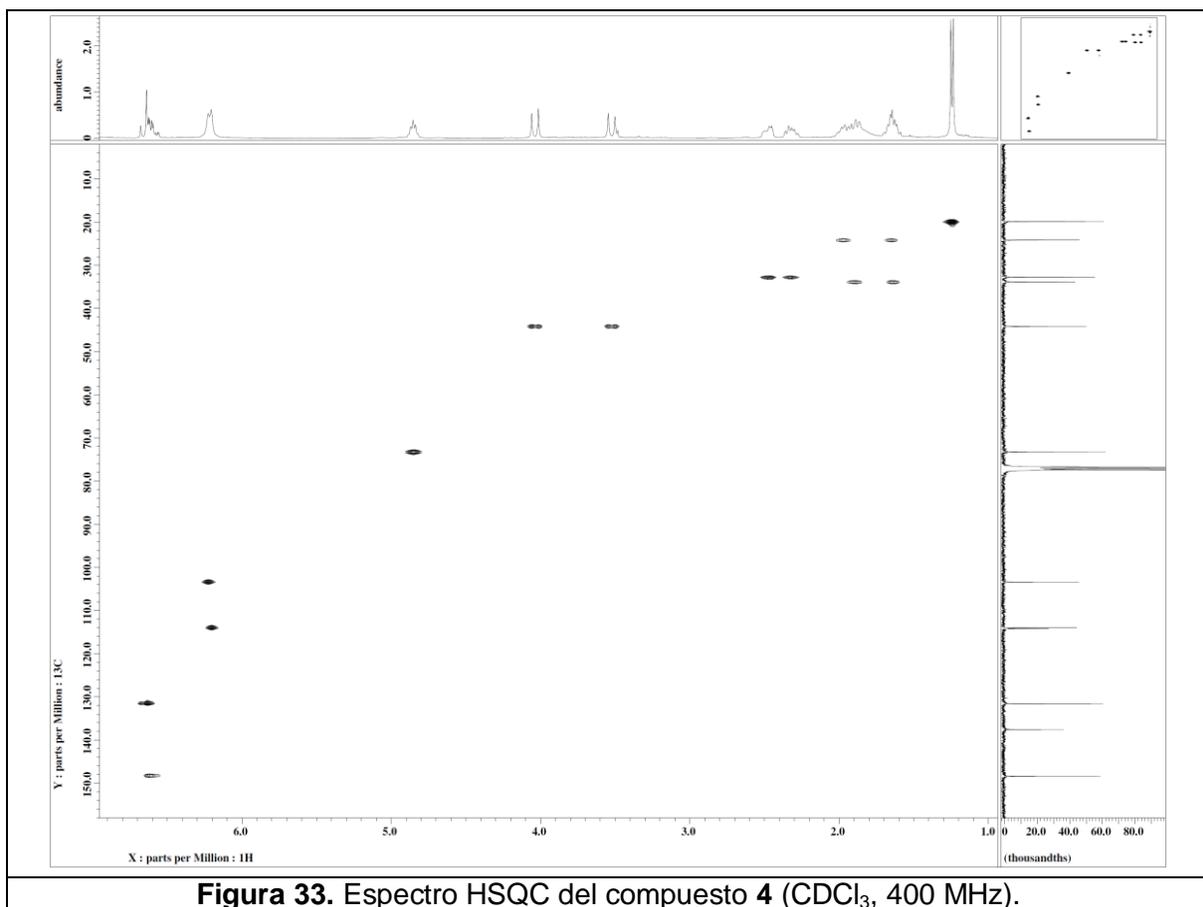
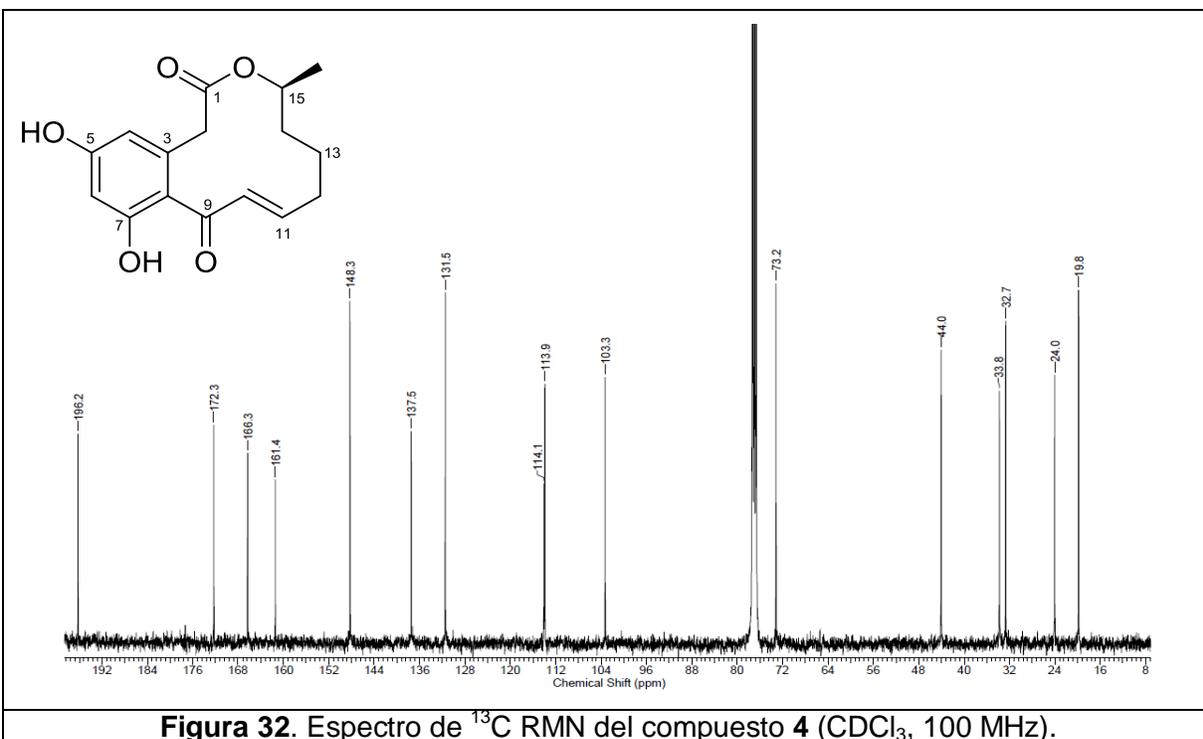
La fórmula molecular del compuesto **4**, C₁₆H₁₉O₅ (*m/z* 291.1234 [M+H]⁺, + 2.4 ppm), fue determinada mediante HRESIMS, y permite 8 grados de insaturación (**Figura 30**).

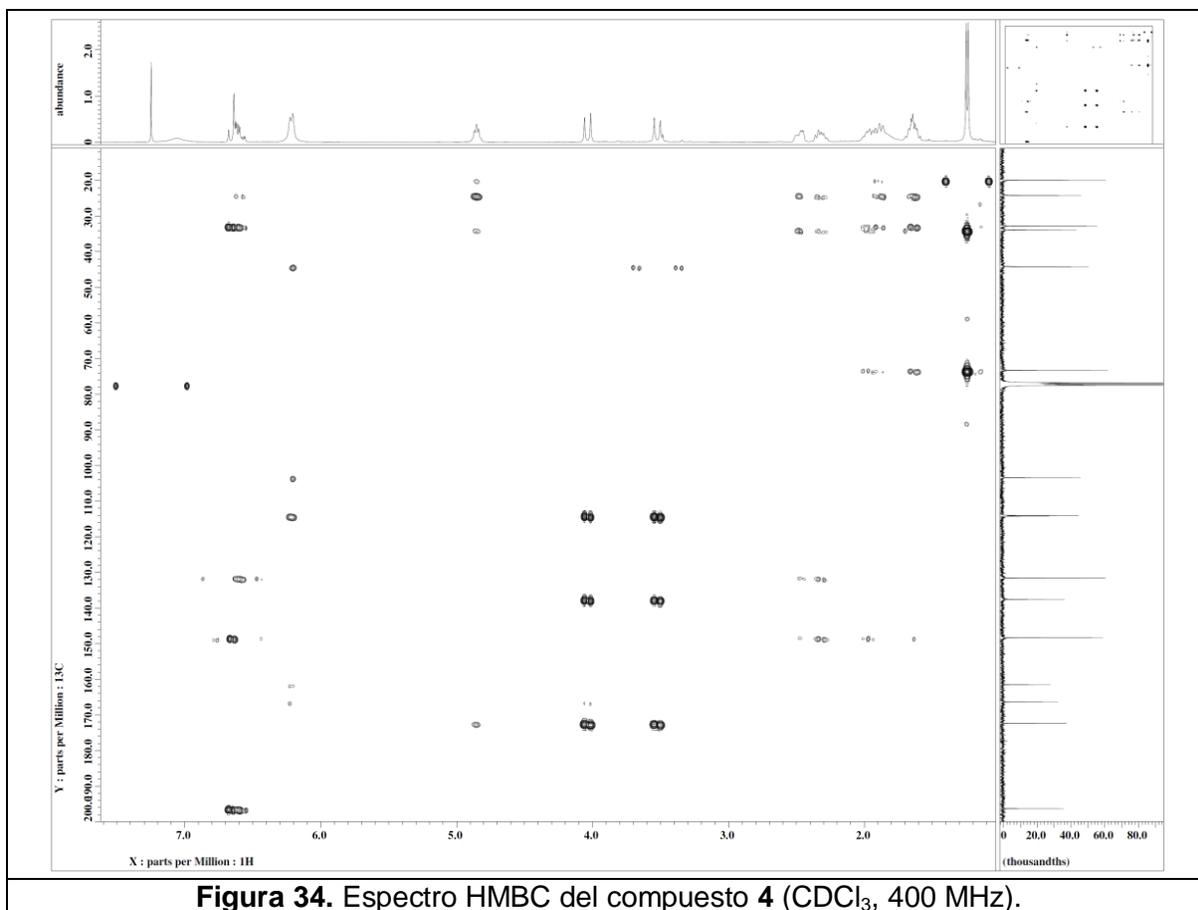


Las características más importantes observadas en los espectros de RMN mono y bidimensionales (**Figuras 31-34**) se resumen a continuación:

- En δ_C 196.2 (C-9) se observa una señal característica de una cetona cíclica α,β -insaturada. Los hidrógenos de este sistema se observan en δ_H 6.61 (1H, dq, $J = 15.6$, 3.2 Hz) y 6.66 (1H, d, $J = 15.6$ Hz) y ambas señales correlacionan en el espectro HSQC con δ_C 148.3 (C-11) y 131.5 (C-10), respectivamente.
- En δ_C 172.3 (C-1) se aprecia una señal que corresponde a un grupo carbonilo de lactona, que se encuentra unida a un anillo aromático disustituído, con dos hidrógenos en posición *meta* entre sí [δ_H 6.20 (1H, sa) y 6.23 (1H, sa)] vecinos a dos hidroxilos fenólicos [δ_C 161.4 (C-5) y 166.3 (C-7)].
- Finalmente, se observa la presencia de tres metilenos diastereotópicos unidos entre ellos en δ_H 2.33 (1H, m) y 2.48 (1H, m); δ_H 1.66 (1H, m) y 1.93 (1H, m); y δ_H 1.65 (1H, m) y 1.90 (1H, m) para CH₂-12, CH₂-13 y CH₂-14. Esta última señal correlaciona en el espectro HSQC y HMBC con un grupo oximetino en δ_H 4.86 (1H, q, $J = 6.3$ Hz). Este grupo oximetino a su vez correlaciona en los espectros bidimensionales con un grupo metilo (C-16) en δ_H 1.25 (3H, d, $J = 6.3$ Hz) .







En conjunto, todas las señales antes descritas mostraron correlaciones consistentes en los espectros de HSQC y HMBC, con aquellas descritas para la (S)-10,11-dehidrocurvularina (**4**) (**Tabla 9**). Este compuesto fue aislado por primera vez de *Curvularia* sp. (Musgrave, 1956) y otras especies de *Curvularia* (Bicalho et al., 2003), además de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* (Chen et al., 2015), *Alternaria* (Jeon et al., 2010), *Pseudonocardia* (Ye et al., 2016), *Cercospora* (Assante et al., 1977) y *Stemphylium* sp. (Grove, 1971). Por otra parte, la (S)-10,11-dehidrocurvularina (**4**) ha mostrado una importante actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer (**Tabla 10**), y es un inhibidor de la actividad de p97, una chaperona conocida por sus diversas funciones celulares (Bashyal et al., 2017).

Tabla 9. Datos espectroscópicos del compuesto (S)-10,11-dehidrocurvularina (4).

Posición	Datos experimentales (CDCl ₃ , 400 MHz)		Referencia (Zhan et al., 2004) (C ₃ D ₆ O, 500 MHz)	
	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)	δ _C , tipo	δ _H , mult. (J en Hz)
1	172.3, C	-	172.3, C	-
2	44.0, CH ₂	3.54, d (17.7) 4.05, d (17.7)	44.2, CH ₂	3.61, d (17.7) 4.08, d (17.3)
3	137.5, C	-	140.0, C	-
4	113.9, CH	6.20, sa	114.2, CH	6.36, d (2.4)
5	161.4, C	-	163.6, C	-
6	103.3, CH	6.23, sa	103.6, CH	6.31, d (2.4)
7	166.3, C	-	166.5, C	-
8	114.1, C	-	116.2, C	-
9	196.2, C	-	197.7, C	-
10	131.5, CH	6.66, d (15.6)	133.1, CH	6.78, d (15.5)
11	148.3, CH	6.61, dq (15.6, 3.2)	150.1, CH	6.57, dq (15.5, 4.8)
12	32.7, CH ₂	2.33, m 2.48, m	33.7, CH ₂	2.35, m 2.42, m
13	24.0, CH ₂	1.66, m 1.93, m	25.5, CH ₂	1.67, m 1.99, m
14	33.8, CH ₂	1.65, m 1.90, m	35.3, CH ₂	1.62, m 1.85, m
15	73.2, CH	4.86, q (6.3)	73.4, CH	4.73, m
16	19.8, CH ₃	1.25, d (6.3)	22.8, CH ₃	1.19, d (6.4)

Tabla 10. Actividad citotóxica de la (S)-10,11-dehidrocurvularina (tomado de Bashyal et al., 2017).

Compuesto	Inhibición del crecimiento celular (CI ₅₀ ± DE μM)				
	NCI-H460 ^a	SF-268 ^b	MCF-7	PC-3M ^c	MDA-MB-231 ^d
(S)-10,11-dehidrocurvularina	3.6 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.5 ± 0.4	>5.0
Doxorubicina	0.42 ± 0.03	0.62 ± 0.07	0.42 ± 0.13	0.24 ± 0.09	0.58 ± 0.23

^a Cáncer de pulmón de células grandes; ^b astrocitoma/glioma; ^c cáncer de próstata; ^d cáncer de mama hormono-independiente.

5.2.4. Caracterización estructural de la penicitrinona A (5)

Los análisis realizados por LC-HRESIMS permitieron identificar al ion pseudomolecular en una relación m/z 381.1687 [M+H]⁺ (- 2.5 ppm), del cual se deduce una fórmula molecular de C₂₃H₂₅O₅, que permite 12 grados de insaturación (**Figura 35**).

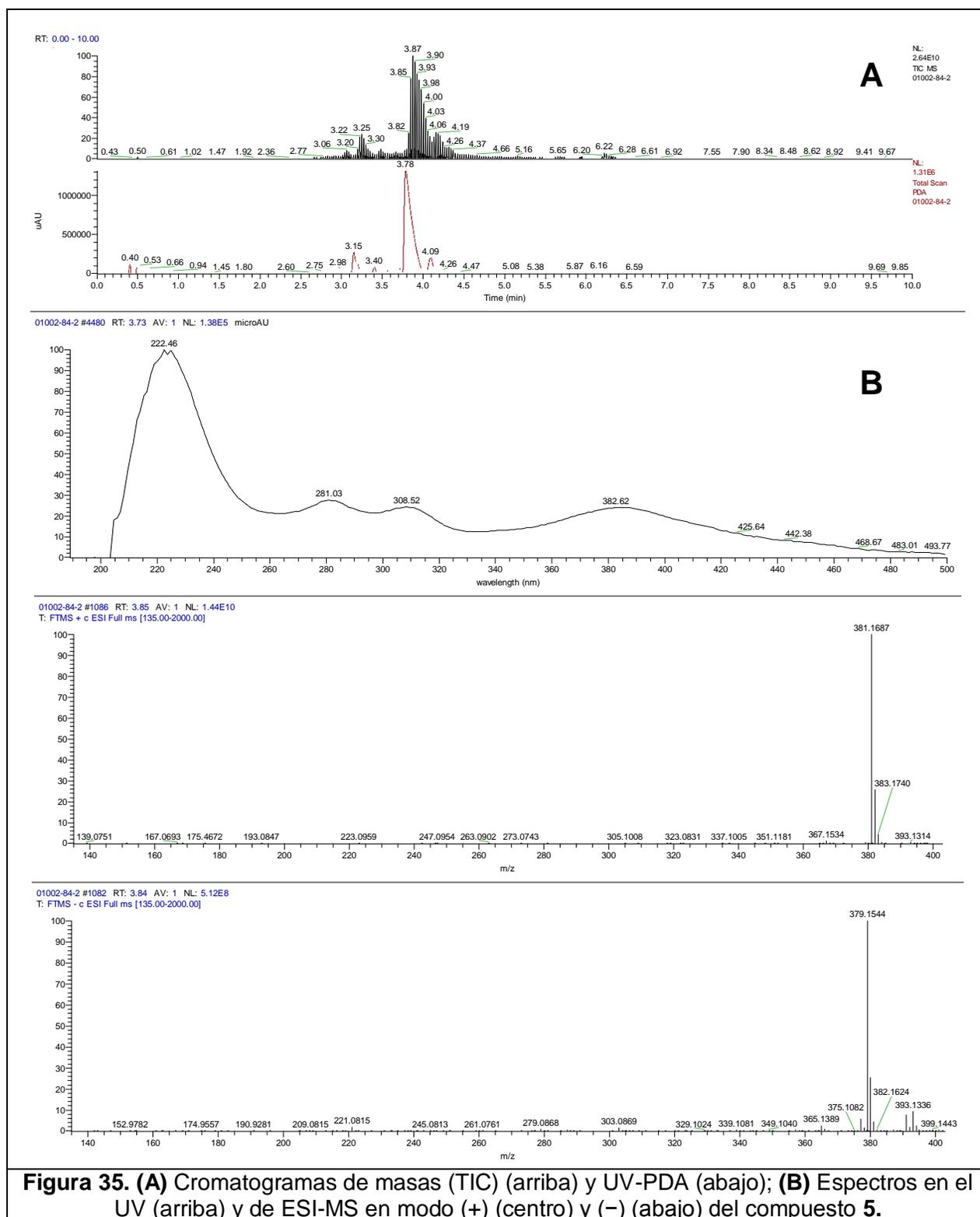


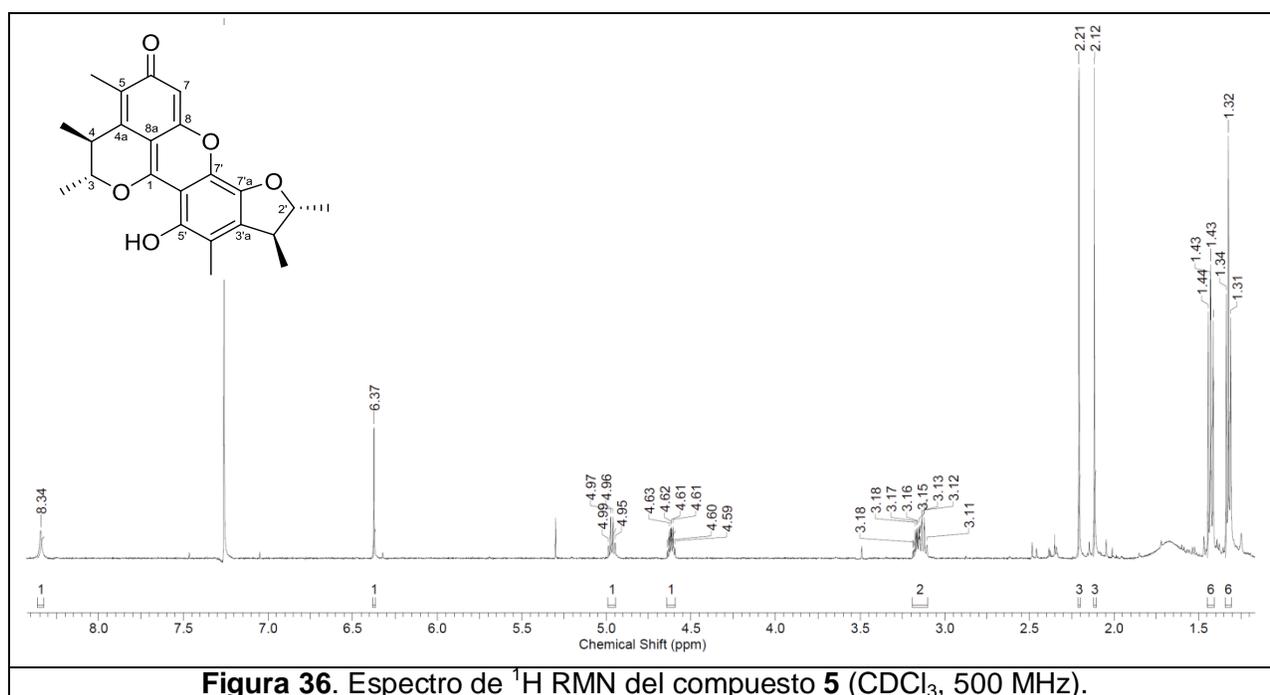
Figura 35. (A) Cromatogramas de masas (TIC) (arriba) y UV-PDA (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de ESI-MS en modo (+) (centro) y (-) (abajo) del compuesto **5**.

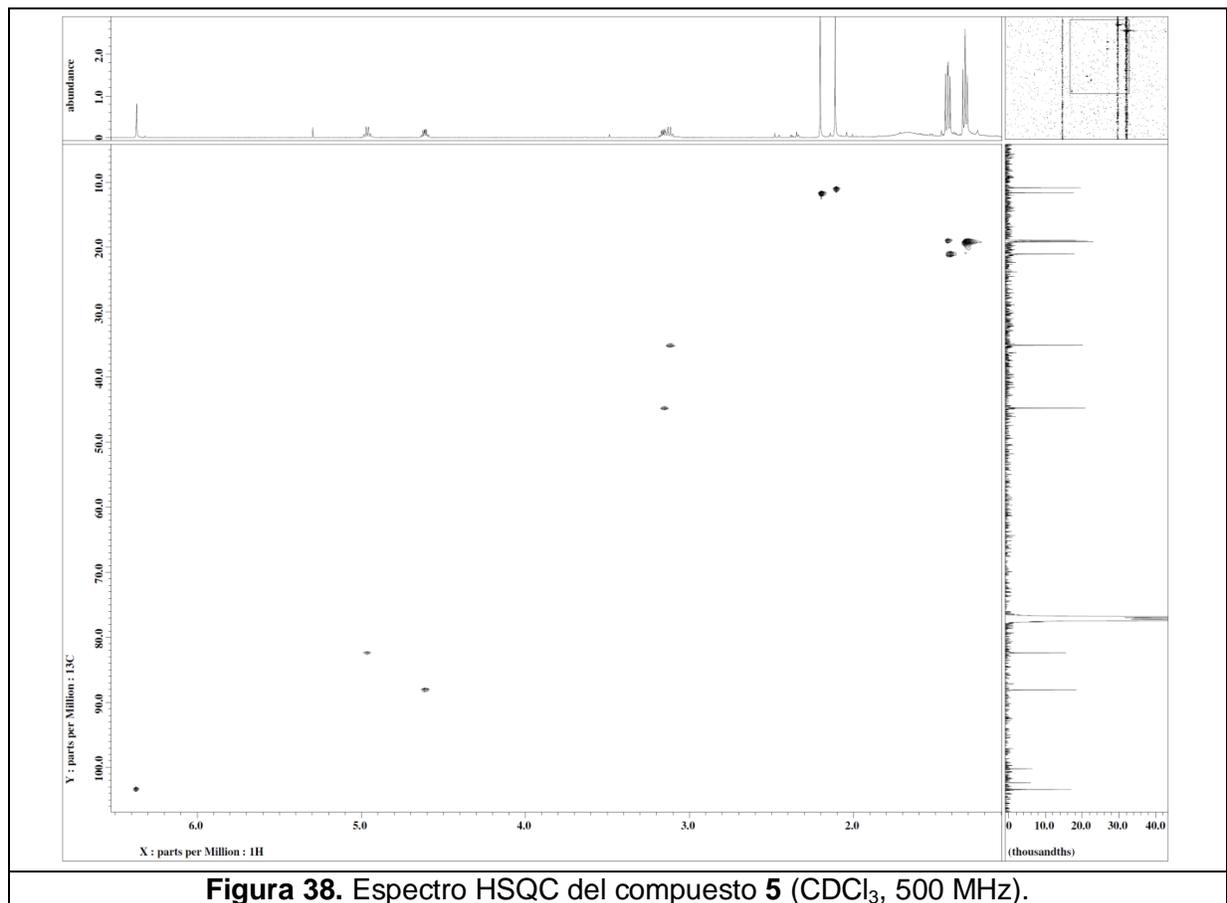
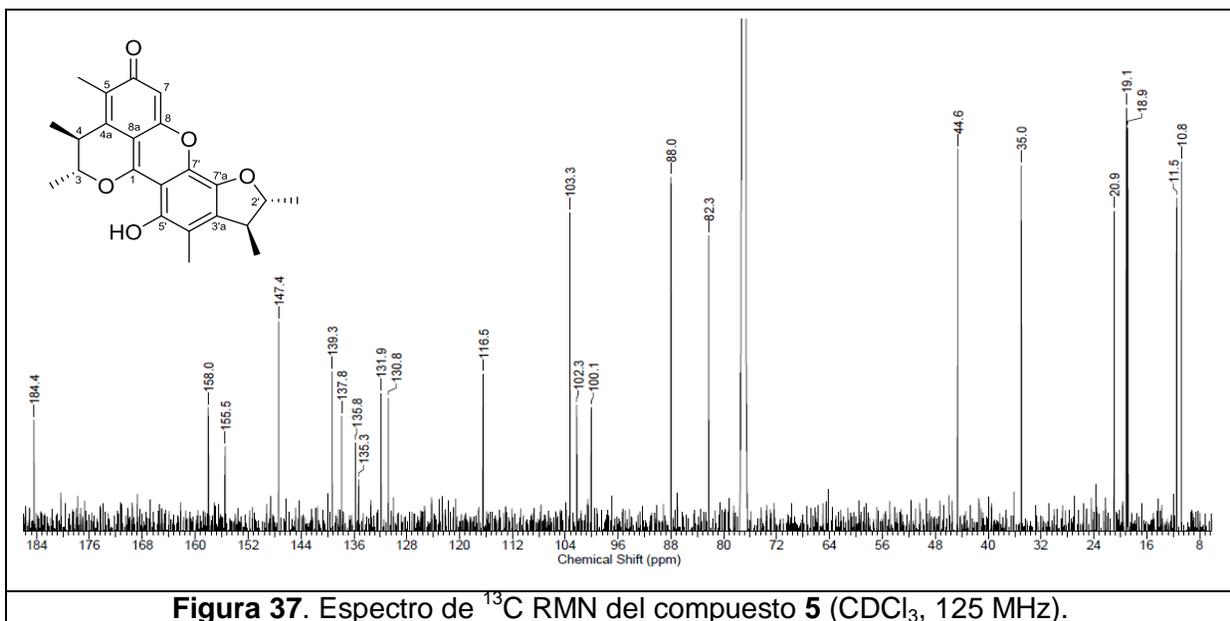
En los espectros de RMN (**Figuras 36-39**) del compuesto **5** se observaron las siguientes señales:

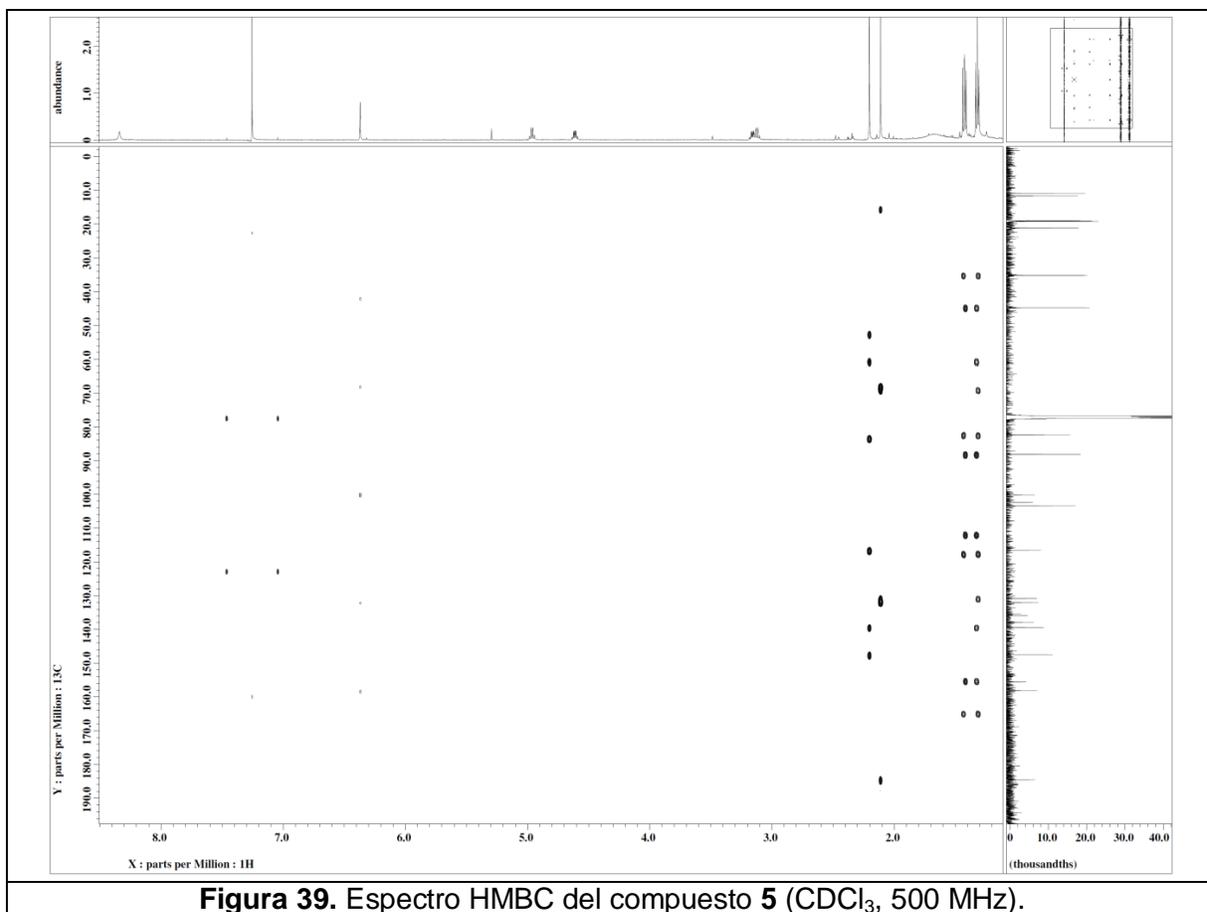
- Las señales de los protones con δ_H 2.12 (3H, s), 2.21 (3H, s), 1.42 (3H, t, $J = 8.0, 6.9$ Hz), 1.31 (3H, t, $J = 6.8$), 1.32 (3H, t, $J = 6.8$), y 1.43 (3H, t, $J = 7.6, 6.6$ Hz), fueron asignadas a grupos metilo y sus correspondientes carbonos fueron confirmados mediante el análisis de las correlaciones en el espectro de HSQC [δ_C 10.8 (5-Me), 11.5 (4'-Me), 18.9 (3'-Me), 19.2 (3-Me), 19.1 (4-Me) y 20.9 (2'-Me)].

- Las señales con δ_H de 3.12 (1H, q, $J = 7.2$), 3.16 (1H, dd, $J = 7.1, 4.2$ Hz), 4.96 (1H, q, $J = 6.7, 6.6$ Hz), 4.62 (1H, dq, $J = 13.2, 6.3, 4.0$ Hz) y 6.37 (1H, s), fueron consistentes con las señales observadas en los espectros de ^{13}C RMN y HSQC con δ_C 35.0 (C-4), 44.6 (C-3'), 82.3 (C-3), 88.0 (C-2') y 103.3 (C-7), respectivamente, para grupos metinos.

- Finalmente, en el espectro de ^{13}C RMN se observaron las señales características de un carbonilo de una *p*-quinona [δ_C 184.4 (C-6)], un carbono de hidroxilo fenólico en δ_C 147.4 (C-5') y las señales en δ_C 155.5, 88.0, 82.3, 44.6, 135.8, 137.8 y 158.0 correspondientes a los carbonos C-1, C-2', C-3, C-3', C-7', C-7'a y C-8, respectivamente.







El análisis detallado de los datos espectroscópicos (**Tabla 11**) y espectrométricos antes descrito, así como el análisis comparativo con aquellos reportados en la literatura especializada (Zhi-Hong et al., 2009), permitieron la caracterización de este compuesto como la penicitrinona A (**5**).

Tabla 11. Datos espectroscópicos del compuesto del compuesto penicitrinona A (5).

Posición	Datos experimentales (500 MHz)		Referencia (Zhi-Hong et al., 2009) (600 MHz)	
	δ_C , tipo	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C , tipo	δ_H , mult. (J en Hz)
1	155.5, C	-	155.4, C	-
3	82.3, CH	4.96, q (6.7, 6.6)	82.3, CH	4.98, q (6.8)
4	35.0, CH	3.12, q (7.2)	35.0, CH	3.13, dq (7.3)
4a	130.8, C	-	130.8, C	-
5	131.9, C	-	131.9, C	-
6	184.4, C	-	184.4, C	-
7	103.3, CH	6.37, s	103.3, CH	6.37, s
8	158.0, C	-	158.0, C	-
8a	100.1, C	-	100.1, C	-
3-Me	19.2, CH ₃	1.31, t (6.8)	18.9, CH ₃	1.45, d (6.8)
4-Me	19.1, CH ₃	1.32, t (6.8)	19.1, CH ₃	1.32, d (7.3)
5-Me	10.8, CH ₃	2.12, s	10.7, CH ₃	2.12, s
2'	88.0, CH	4.62, dq (13.2, 6.3, 4.0)	88.0, CH	4.62, dq (6.4, 4.1)
3'	44.6, CH	3.16, dq (7.1, 4.2)	44.6, CH	3.17, dq (6.9, 4.1)
3'a	139.3, C	-	139.2, C	-
4'	116.5, C	-	116.4, C	-
5'	147.4, C	-	147.4, C	-
6'	102.3, C	-	102.2, C	-
7'	135.8, C	-	135.8, C	-
7'a	137.8, C	-	137.8, C	-
2'-Me	20.9, CH ₃	1.43, t (7.6, 6.6)	20.9, CH ₃	1.42, d (6.4)
3'-Me	18.9, CH ₃	1.42, t (8.0, 6.9)	18.8, CH ₃	1.34, d (6.9)
4'-Me	11.5, CH ₃	2.21, s	11.5, CH ₃	2.21, s
5'-OH	-	8.34, s	-	8.36, s

Ésta molécula fue aislada por primera vez en 2006 de *Penicillium citrinum* (Wakana et al., 2006), y recientemente de las especies *P. griseofulvum* (Gao et al., 2016) y *P. purpurogenum* (Wu et al., 2015). Por otra parte, se ha reportado que la penicitrinona A (5) tiene un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de distintas líneas celulares (Tabla 12) (Wu et al., 2015).

Tabla 12. Actividad citotóxica de la penicitrinona A en líneas celulares de cáncer humano a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Wu et al., 2015).

Compuesto	Inhibición del crecimiento celular (%)			
	K562 ^a	HL-60 ^b	HeLa ^c	BGC-823 ^d
Penicitrinona A	77.5	82.0	84.1	79.9
Docetaxel	79.9	86.9	78.6	61.5

6. CONCLUSIONES

- Se realizó el acondicionamiento y cultivos en mediana escala de 9 taxones fúngicos obtenidos a partir de un hábitat inexplorado de nuestro país, la región del volcán San Martín en Tuxtla, Veracruz, y que previamente habían mostrado actividad citotóxica sobre las líneas celulares HeLa (cáncer cervical) y MCF7 (cáncer de mama).
- Los estudios de derreplicación, realizados con la finalidad de explorar de manera preliminar el metabolismo secundario de las especies fúngicas, permitieron identificar únicamente al compuesto (S)-10,11-dehidrocurvularina (**4**) a partir del extracto del hongo T2-56.
- El estudio químico de la especie fúngica T2-40 perteneciente al género *Penicillium* permitió el aislamiento y la caracterización del compuesto N-deoxi-PF 1140 (**1**). La identificación de este producto representa el primer reporte de su obtención a partir de una especie fúngica de nuestro país, y apenas el segundo reporte de su aislamiento. Cabe mencionar que debido a que este producto no tiene propiedades citotóxicas reportadas, es probable que existan otros metabolitos presentes en el extracto responsables de la actividad biológica mostrada por T2-40.
- El estudio químico de la especie fúngica T2-56, también perteneciente al género *Penicillium*, permitió el aislamiento y la caracterización de 4 compuestos identificados como citrinina (**2**), esclerotinina A (**3**), (S)-10,11-dehidrocurvularina (**4**) y penicitrinona A (**5**). Los policétidos **2**, **4** y **5** han sido reportados en la literatura especializada como micotoxinas contra una variedad de líneas celulares, lo cual explica la actividad observada en el extracto orgánico de este organismo. La actividad biológica de la esclerotinina A (**3**) aún queda por explorar.

7. REFERENCIAS

- AGATHOS, S. N., MADHOSINGH, C., MARSHALL, J. W., LEE, J. 1987. The fungal production of cyclosporine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506, 657-662.
- AGUIRRE-ACOSTA, C., ULLOA, M., AGUILAR, S., CIFUENTES, J., VALENZUELA, R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85.
- ASSANTE, G., LOCCI, R., CAMARDA, L., MERLINI, L., NASINI, G. 1977. Screening of genus *cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry*, 16, 243-247.
- BARREIRO, E., FRAGA, C. A. M., LIMA, L. M. 2012. *Natural products as lead compounds in medicinal chemistry. In Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives.*, John Wiley & Sons, Inc.
- BASHYAL, B. P., WIJERATNE, E. M., TILLOTSON, J., ARNOLD, A. E., CHAPMAN, E., GUNATILAKA, A. A. 2017. Chlorinated dehydrocurvularins and Alterperyleneoxide A from *Alternaria* sp. AST0039, a fungal endophyte of *Astragalus lentiginosus*. *J Nat Prod*, 80, 427-433.
- BETINA, V., NEMEC, P., KUTKOVA, M., BALAN, J., KOVAC, S. 1964. The isolation of citrinin from *Penicillium notatum*. *Chemicke Zvesti*, 18, 128-139.
- BICALHO, B., GONCALVES, R. A. C., ZIBORDI, A. P. M., MANFIO, G. P., MARSAIOLI, A. J. 2003. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp. (*Clusiaceae*) pollinating bees. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 58, 746-751.
- CAMIÑA-BLANDO, R. E. 2016. *Estudio químico de las especies fúngicas Chaetomium sp. y Penicillium sp. (T2-1)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- CHAN, W. H. 2008. Citrinin induces apoptosis in mouse embryonic stem cells. *IUBMB Life*, 60, 171-9.
- CHANG, C. H., YU, F. Y., WANG, L. T., LIN, Y. S., LIU, B. H. 2009. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 237, 281-7.
- CHEN, H. Q., AKTAS, N., KONUKLUGIL, B., MANDI, A., DALETOS, G., LIN, W. H., DAI, H. F., KURTAN, T., PROKSCH, P. 2015. A new fusarielin analogue from *Penicillium* sp. isolated from the mediterranean sponge *Ircinia oros*. *Tetrahedron Letters*, 56, 5317-5320.
- CURTIS, R. F., HASSALL, C. H., NAZAR, M. 1968. The biosynthesis of phenols .Part XV. Some metabolites of *Penicillium citrinum* related to citrinin. *Journal of the Chemical Society C-Organic*, 85-93.
- DE SILVA, E. D., GEIERMANN, A. S., MITOVA, M. I., KUEGLER, P., BLUNT, J. W., COLE, A. L., MUNRO, M. H. 2009. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species. *J Nat Prod*, 72, 477-9.
- DNP Taylor & Francis Group. United Kingdom. Version 26.1. <http://dnp.chemnetbase.com/>. Accesado el 21 de Agosto del 2017.
- EL-ELIMAT, T., FIGUEROA, M., EHRMANN, B. M., CECH, N. B., PEARCE, C. J., OBERLIES, N. H. 2013. High-Resolution MS, MS/MS, and UV database of

- fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J Nat Prod*, 76, 1709-1716.
- EL-ELIMAT, T., RAJA, H. A., FIGUEROA, M., SWANSON, S. M., FALKINHAM, J. O., LUCAS, D. M., GREVER, M. R., WANI, M. C., PEARCE, C. J., OBERLIES, N. H. 2015. Sorbicillinoid analogs with cytotoxic and selective anti-*Aspergillus* activities from *Scytalidium album*. *Journal of Antibiotics*, 68, 191-196.
- FIGUEROA, M., JARMUSCH, A. K., RAJA, H. A., EL-ELIMAT, T., KAVANAUGH, J. S., HORSWILL, A. R., COOKS, R. G., CECH, N. B., OBERLIES, N. H. 2014. Polyhydroxyanthraquinones as quorum sensing inhibitors from the guttates of *Penicillium restrictum* and their analysis by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Nat Prod*, 77, 1351-1358.
- GAO, T., CAI, S. Y., XU, L. L., CAO, F., ZHU, H. J. 2016. Citrinin derivatives from marine-derived fungus *Penicillium griseofulvum* and antibacterial activity. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 37, 1282-1286.
- GROVE, J. F. 1971. Metabolic products of *Stemphylium radicinum*. 4. Minor Products. *Journal of the Chemical Society C-Organic*, 2261-&.
- HAWKSWORTH, D. L., LUCKING, R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr*, 5.
- JEON, Y. T., RYU, K. H., KANG, M. K., PARK, S. H., YUN, H., PHAM, Q., KIM, S. U. 2010. Alternariol monomethyl ether and alpha, beta-dehydrocurvularin from endophytic fungi *Alternaria* spp. Inhibit appressorium formation of *Magnaporthe grisea*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53, 39-42.
- JESSEN, H. J., GADEMANN, K. 2010. 4-hydroxy-2-pyridone alkaloids: structures and synthetic approaches. *Nat Prod Rep*, 27, 1168-85.
- KORNSAKULKARN, J., SAEPUA, S., KOMWIJIT, S., RACHTAWEE, P., THONGPANCHANG, C. 2014. Bioactive polyketides from the fungus *Astrocytis* sp. BCC 22166. *Tetrahedron*, 70, 2129-2133.
- KOUL, M., SINGH, S. 2017. *Penicillium* spp.: prolific producer for harnessing cytotoxic secondary metabolites. *Anticancer Drugs*, 28, 11-30.
- KUMAR, C., RANI, N., VELAN LAKSHMI, P. T., ARUNACHALAM, A. 2017. A comprehensive look of poly (ADP-ribose) polymerase inhibition strategies and future directions for cancer therapy. *Future Med Chem*, 9, 37-60.
- LAI, D., BROTZ-OESTERHELT, H., MULLER, W. E., WRAY, V., PROKSCH, P. 2013. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. *Fitoterapia*, 91, 100-106.
- LEBWOHL, M., SWANSON, N., ANDERSON, L. L., MELGAARD, A., XU, Z., BERMAN, B. 2012. Ingenol mebutate gel for actinic keratosis. *N Engl J Med*, 366, 1010-9.
- LI, Y., LI, X., LEE, U., KANG, J. S., CHOI, H. D., SON, B. W. 2006. A new radical scavenging anthracene glycoside, asperflavin ribofuranoside, and polyketides from a marine isolate of the fungus *Microsporum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54, 882-883.
- LIU, F., TIAN, L., CHEN, G., ZHANG, L. H., LIU, B., ZHANG, W., BAI, J., HUA, H., WANG, H. F., PEI, Y. H. 2017. Two new compounds from a marine-derived *Penicillium griseofulvum* T21-03. *J Asian Nat Prod Res*, 19, 678-683.
- LUO, C. Y., TANG, J. Y., WANG, Y. P. 2004. Homoharringtonine: a new treatment option for myeloid leukemia. *Hematology*, 9, 259-70.

- MANDER, L. 2010. Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology Overview and Introduction. *Comprehensive natural products li: Chemistry and Biology, Vol 9: Modern Methods in Natural Products Chemistry*, 1-3.
- MUSGRAVE, O. C. 1956. Curvularin. Part I. Isolation and partial characterisation of a metabolic product from a new species of *Curvularia*. *Journal of the Chemical Society*, 4301-4305.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 79, 629-661.
- POLLOCK, A. V. 1947. Production of citrinin by five species of *Penicillium*. *Nature*, 160, 331.
- ROBINSON, T., SINGH, D., NIGAM, P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 284-9.
- SASSA, T., AOKI, H., NAMIKI, M., MUNAKATA, K. 1968. Plant growth promoting metabolites of *Sclerotinia sclerotiorum* .I. Isolation and structures of Sclerotinin A and B. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32, 1432-&.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W., BOLCHACOVA, E., VOIGT, K., CROUS, P. W., MILLER, A. N., WINGFIELD, M. J., AIME, M. C., AN, K. D., BAI, F. Y., BARRETO, R. W., BEGEROW, D., BERGERON, M. J., BLACKWELL, M., BOEKHOUT, T., BOGALE, M., BOONYUEN, N., BURGAZ, A. R., BUYCK, B., CAI, L., CAI, Q., CARDINALI, G., CHAVERRI, P., COPPINS, B. J., CRESPO, A., CUBAS, P., CUMMINGS, C., DAMM, U., DE BEER, Z. W., DE HOOG, G. S., DEL-PRADO, R., B, D., DIEGUEZ-URIBEONDO, J., DIVAKAR, P. K., DOUGLAS, B., DUENAS, M., DUONG, T. A., EBERHARDT, U., EDWARDS, J. E., ELSHAHED, M. S., FLIEGEROVA, K., FURTADO, M., GARCIA, M. A., GE, Z. W., GRIFFITH, G. W., GRIFFITHS, K., GROENEWALD, J. Z., GROENEWALD, M., GRUBE, M., GRYZENHOUT, M., GUO, L. D., HAGEN, F., HAMBLETON, S., HAMELIN, R. C., HANSEN, K., HARROLD, P., HELLER, G., HERRERA, G., HIRAYAMA, K., HIROOKA, Y., HO, H. M., HOFFMANN, K., HOFSTETTER, V., HOGNABBA, F., HOLLINGSWORTH, P. M., HONG, S. B., HOSAKA, K., HOUBRAKEN, J., HUGHES, K., HUHTINEN, S., HYDE, K. D., JAMES, T., JOHNSON, E. M., JOHNSON, J. E., JOHNSTON, P. R., JONES, E. B., KELLY, L. J., KIRK, P. M., KNAPP, D. G., KOLJALG, U., GM, K., KURTZMAN, C. P., LANDVIK, S., LEAVITT, S. D., LIGGENSTOFFER, A. S., LIIMATAINEN, K., LOMBARD, L., LUANGSA-ARD, J. J., LUMBSCH, H. T., MAGANTI, H., MAHARACHCHIKUMBURA, S. S., MARTIN, M. P., MAY, T. W., MCTAGGART, A. R., METHVEN, A. S., et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6241-6246.
- SETTE, L. D., PAGNOCCA, F. C., RODRIGUES, A. 2013. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 2-8.

- SPRENGER, R. D., RUOFF, P. M. 1946. The chemistry of citrinin; the synthesis of 2,4-dimethoxy-3-ethylbenzoic acid, and 2,6-dimethoxy-3-methylbenzoic acid. *Journal of Organic Chemistry*, 11, 189-93.
- STRADER, C. R., PEARCE, C. J., OBERLIES, N. H. 2011. Fingolimod (FTY720): a recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *J Nat Prod*, 74, 900-907.
- STULL, D. P., SCALES, T. A., DAUGHENBAUGH, R., JANS, N. A., BAILEY, D. T. 1995. Taxol(R) (Paclitaxel) - Strategies to increase the supply of a new anticancer drug. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 54, 133-140.
- TOBERT, J. A. 2003. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 517-526.
- VALENTE, A. M. M. P., BOFFO, E. F., MELO, I. S., FERREIRA, A. G. 2014. Quantification of mycophenolic acid and citrinin produced by *Penicillium* sp. Using H-1 NMR. *Applied Magnetic Resonance*, 45, 207-215.
- VANDERMOLEN, K. M., MCCULLOCH, W., PEARCE, C. J., OBERLIES, N. H. 2011. Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Antibiotics*, 64, 525-531.
- VETROVSKY, T., KOLARIK, M., ZIFCAKOVA, L., ZELENKA, T., BALDRIAN, P. 2016. The RPB2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16, 388-401.
- WAKANA, D., HOSOE, T., ITABASHI, T., OKADA, K., TAKAKI, G. M. D., YAGUCHI, T., FUKUSHIMA, K., KAWAI, K. 2006. New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. *Journal of Natural Medicines*, 60, 279-284.
- WOHLLEBEN, W., MAST, Y., STEGMANN, E., ZIEMERT, N. 2016. Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology*, 9, 541-548.
- WU, C. J., YI, L., CUI, C. B., LI, C. W., WANG, N., HAN, X. 2015. Activation of the silent secondary metabolite production by introducing neomycin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar Drugs*, 13, 2465-87.
- YE, X. W., ANJUM, K., SONG, T. F., WANG, W. L., YU, S. R., HUANG, H. C., LIAN, X. Y., ZHANG, Z. Z. 2016. A new curvularin glycoside and its cytotoxic and antibacterial analogues from marine actinomycete *Pseudonocardia* sp. HS7. *Natural Product Research*, 30, 1156-1161.
- ZHAN, J., WIJERATNE, E. M., SELIGA, C. J., ZHANG, J., PIERSON, E. E., PIERSON, L. S., 3RD, VANETTEN, H. D., GUNATILAKA, A. A. 2004. A new anthraquinone and cytotoxic curvularins of a *Penicillium* sp. from the rhizosphere of *Fallugia paradoxa* of the Sonoran desert. *J Antibiot (Tokyo)*, 57, 341-4.
- ZHELIFONOVA, V. P., ANTIPOVA, T. V., KOZLOVSKY, A. G. 2010. Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. *Microbiology*, 79, 277-286.
- ZHI-HONG, X., WEN-LIANG, W., YA-PENG, Z., HUA, X., QIAN-QUN, G., WEI-MING, Z. 2009. Pennicitrone D, a new citrin dimer from the halotolerant fungus *Penicillium notatum* B-52. *The Journal of Antibiotics*, 62, 225-227.