



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ASCOMICETOS SELECTOS DE MÉXICO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CARLOS ANTONIO FAJARDO HERNÁNDEZ

TUTOR: DR. MARIO A. FIGUEROA SALDÍVAR
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., ENERO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:** Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Instituto de Química, UNAM
- VOCAL:** Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, CINVESTAV, IPN
- VOCAL:** Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Facultad de Química, UNAM
- VOCAL:** Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Instituto de Química, UNAM
- SECRETARIO:** Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Instituto de Química, UNAM

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO DE TESIS:

Laboratorio 125, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química,
UNAM.

Los resultados preliminares de este proyecto se presentaron en el 52° Congreso Mexicano de Química, Puerto Vallarta, Jalisco, México (26-29 de septiembre, 2017):

- Estudio químico y biológico de organismos fúngicos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Cartel. Carlos Antonio Fajardo Hernández, Mario Figueroa.

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química por abrir sus puertas y permitirme seguir creciendo como profesional de la química.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero brindado durante mis estudios de Posgrado en la UNAM (CVU/Becario: 739587/596831), además del apoyo económico al grupo de investigación a través de los proyectos CONACYT CB 236564, DGAPA PAPIT IA205017 y PAIP FQ 5000-9145.

A mi tutor, el Dr. Mario Figueroa Saldívar por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su gran apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A los Dres. Valeria Souza y Luis Eguiarte del Instituto de Ecología, UNAM por proporcionar las muestras a partir de las cuales se llevó a cabo el aislamiento de los organismos fúngicos de estudio.

A los Dres. Nicholas H. Oberlies y Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, NC, EE.UU. por su apoyo en la identificación de las especies fúngicas y la realización de los análisis de derreplicación y espectros de RMN.

A todo el personal de la USAI, por la realización de los espectros de RMN presentados en este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado designado, por sus valiosos comentarios que sin duda enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Isabel Rivero, por su ayuda durante el desarrollo experimental de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por todos los momentos y su valiosa amistad.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Importancia de los productos naturales de origen microbiano	3
1.2 Biodiversidad de especies fúngicas en México	6
1.3 Especies fúngicas provenientes de ambientes inexplorados	7
1.3.1 Cuatro Ciénegas, Coahuila: Bioprospección	9
1.4 Género <i>Aspergillus</i>	10
1.4.1 Características taxonómicas.....	10
1.4.2 Estilo de vida	12
1.4.3 Estudios químicos del género <i>Aspergillus</i>	13
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
5.1 Aislamiento de las especies fúngicas objeto de estudio (series CC4, CC6 y CC7).....	21
5.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala.....	21
5.3 Preparación de los extractos orgánicos	23
5.4 Estudios de derreplicación	24
5.5 Ensayos biológicos	25
5.5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana	25
5.6 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala ...	26

5.6.1 Fraccionamiento secundario de CC6-4 ₄ , CC6-15 ₃ y CC6-16 ₃	29
5.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas CC6-16 ₄ y CC6-16 ₆	32
5.8 Caracterización de los productos naturales	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1 Aislamiento de los organismos fúngicos	37
6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos (series CC4, CC6 y CC7).....	38
6.3 Estudios de derreplicación	40
6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en mediana escala y fracciones primarias	43
6.5 Estudio químico de la especie <i>Aspergillus</i> sp. (CC6-16).....	46
6.5.1 Caracterización del peróxido de ergosterol (1)	47
6.5.2 Caracterización del pirofeno (2).....	51
6.5.3 Caracterización del ácido aspérico (3).....	58
7. CONCLUSIONES.....	65
8. BIBLIOGRAFÍA	66
9. ANEXO.....	74

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Muestras de estudio.	22
Cuadro 2. Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.	26
Cuadro 3. Resumen de los fraccionamientos primarios de los extractos orgánicos en mediana escala CC6-1 , CC6-4 , CC6-14 , CC6-15 y CC6-16 .	27
Cuadro 4. Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.	30
Cuadro 5. Resumen de los fraccionamientos primarios de las fracciones CC6-4 , CC6-15 ₃ y CC6-16 ₃ .	30
Cuadro 6. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala.	39
Cuadro 7. Estructura química de las micotoxinas detectadas en los estudios de derreplicación en las especies analizadas.	41
Cuadro 8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en mediana escala CC6-1 , CC6-4 , CC6-14 , CC6-15 y CC6-16 y sus respectivos conjuntos de fracciones.	44
Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 400 MHz; ¹³ C 100 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz; CDCl ₃) del peróxido de ergosterol (1).	48
Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 500 MHz; ¹³ C 125 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz; CDCl ₃) del pirofeno (2).	53
Cuadro 11. Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 500 MHz; ¹³ C 125 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz; CDCl ₃) del ácido aspérico (3).	60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplos selectos de productos naturales de origen microbiano.	5
2	Ciclo de vida de <i>Aspergillus</i> (<i>A. nidulans</i>).	11
3	Clasificación IUPAC de la diversidad de compuestos biosintetizados por el género <i>Aspergillus</i> .	13
4	Metabolitos selectos del género <i>Aspergillus</i> .	15
5	Vista aérea de la reserva ecológica de Cuatro Ciénegas donde se realizó la recolección de muestras.	22
6	Cromatogramas del fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de CC6-1 , CC6-4 y CC6-14 .	28
7	Cromatogramas del fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de CC6-15 y CC6-16 .	29
8	Cromatogramas del fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de las fracciones CC6-4₄ , CC6-15₃ y CC6-16₃ .	31
9	Perfiles cromatográficos por HPLC a nivel analítico de las fracciones activas CC6-16₄ y CC6-16₆ .	33
10	Perfiles cromatográficos por HPLC a nivel preparativo de las fracciones activas CC6-16₄ y CC6-16₆ .	34
11	Ejemplos selectos de los organismos fúngicos aislados.	37
12	Ejemplo de un cultivo fúngico en medio de arroz del taxón CC7-5 .	38
13	Cultivos axénicos seleccionados para su escalamiento.	43
14	Cromatogramas de iones totales (TIC) y en el UV-PDA de la fracción CC6-16₄ . Espectros en el UV y de masas por la técnica de electrospray en los modos negativo y positivo del peróxido de ergosterol (1).	49
15	Espectro de RMN de ¹ H del peróxido de ergosterol (1) (400 MHz, CDCl ₃).	50

Figura		Página
16	Espectro de RMN de ^{13}C del peróxido de ergosterol (1) (100 MHz, CDCl_3)	50
17	Cromatogramas de iones totales y en el UV-PDA. Espectros en el UV y de masas por la técnica de electrospray en los modos negativo y positivo del pirofeno (2).	54
18	Espectro de RMN de ^1H del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl_3).	55
19	Espectro de RMN de ^{13}C del pirofeno (2) (125 MHz, CDCl_3).	55
20	Espectro COSY del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl_3).	56
21	Espectro HSQC del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl_3).	56
22	Espectro HMBC del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl_3).	57
23	Correlaciones COSY (—) y HMBC (→) del pirofeno (2).	53
24	Cromatogramas de iones totales (TIC) y en el UV-PDA; Espectros en el UV y de masas por la técnica de electrospray en los modos negativo y positivo del ácido aspérico (3).	61
25	Espectro de RMN de ^1H del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl_3).	62
26	Espectro de RMN de ^{13}C del ácido aspérico (3) (125 MHz, CDCl_3).	62
27	Espectro HSQC del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl_3).	63
28	Espectro COSY del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl_3).	63
29	Espectro HMBC del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl_3).	64
30	Correlaciones COSY (—) y HMBC (→) del ácido aspérico (3).	60

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
MeCN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PDA	Agar papa dextrosa
HR	Alta resolución
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MH	Caldo Müller-Hinton
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración de inhibición media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
q	Cuatriplete
CC	Cuatro Ciénegas
δ	Desplazamiento químico
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
dd	Señal doble de dobles
d	Señal doble
DE ₅₀	Dosis efectiva media
ITS	Espaciadores de transcripción internos
HSQC	Espectro de coherencia cuántica heteronuclear simple
HMBC	Espectro de coherencia de enlace heteronuclear simple
COSY	Espectro de correlación homonuclear
UV	Espectro en el ultravioleta
EM, MS	Espectrometría de masas
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por electrospray
YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa
°C	Grado Celsius
g	Gramos
Hz	Hertz
GI ₅₀	Inhibición del crecimiento media
ESI	Ionización por la técnica de electrospray
km ²	Kilómetro cuadrado
kV	Kilovolts

psi	Libras por pulgada cuadrada
P388	Línea celular de leucemia linfocítica murina
T47D	Línea tumoral epitelial ductal de mama humana
λ	Longitud de onda
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
m	Multiplete
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
TIC	Total ion current
t	Señal triple
V	Volts
CV	Volúmenes por columna

RESUMEN

Como parte de un proyecto de investigación enfocado a la búsqueda de nuevas entidades químicas bioactivas a partir organismos fúngicos aislados de fuentes inexploradas, se realizó, en primer lugar, el aislamiento axénico de 46 taxa fúngicos saprótrofos a partir de muestras de suelo y de placa microbiana provenientes de la reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Posteriormente, se cultivaron en medio sólido y se obtuvieron sus correspondientes extractos orgánicos los cuales fueron evaluados paralelamente en los ensayos de actividad antimicrobiana (ensayo de microdilución con MTT) y de derreplicación (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS). Los resultados de estos análisis permitieron identificar varios taxa de las series CC6 y CC7 que inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram positivo (*B. subtilis* y *S. aureus*), Gram negativo (*E. coli* y *S. typhi*), y el de la levadura *C. albicans*, a las concentraciones de 20 y 200 µg/mL, además de detectar la producción de algunos metabolitos de naturaleza química diversa como el altenueno, la carbonarona A, la *epi*-pestalamida A, el ácido absícico, la fonsecina y algunas dicetopiperazinas, entre otros.

El fraccionamiento biodirigido de la especie *Aspergillus* sp. (CC6-16) permitió el aislamiento de los compuestos peróxido de ergosterol (**1**), el pirofeno (**2**) y el ácido aspérico (**3**), los cuales fueron caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Estos productos han mostrado actividad citotóxica y antimicrobiana en estudios previos.

Los resultados obtenidos a partir de esta investigación permitieron contribuir al conocimiento sobre la biodiversidad microbiana que existe en nuestro país, además de que el estudio químico y biológico de microorganismos aislados a partir de la reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila, es inédito.

ABSTRACT

The work presented in this thesis is part of a research project focused on finding new bioactive chemical entities from fungal organisms isolated from unexplored sources. Initially, samples from the Cuatro Ciénegas Reserve in Coahuila, Mexico, were obtained; from these, the axenic isolation of 46 saprotrophic fungal taxa from soil and microbial plate was achieved. Subsequently, the fungi were cultured in solid medium, their organic extracts obtained and then tested for their antimicrobial activity and derreplicated by ultra-performance liquid chromatography-photodiode array-high-resolution tandem mass spectrometric.

The results of these assays allowed the identification of several taxa of the CC4, CC6 and CC7 series that inhibited the growth of Gram positive (*B. subtilis* and *S. aureus*) and Gram negative bacteria (*E. coli* and *S. typhi*), and the yeast *C. albicans*, at concentrations of 20 and 200 µg/mL. Moreover, metabolites of diverse chemical nature were identified, e.g., altenuene, carbonarone A, epi-pestalamide A, abscisic acid, fonsecin, and some diketopiperazines, among others.

Bioguided fractionation of the organic extract of the taxa CC6-16, identified as *Aspergillus* sp. by ITS analysis, resulted in the isolation of ergosterol peroxide (**1**), pyrophene (**2**), and asperic acid (**3**), which were characterized by spectroscopic and spectrometric methods. These products have shown important cytotoxic and antimicrobial properties in previous studies.

This work represents an important contribution to the knowledge of the Mexican microbial biodiversity. Furthermore, this is one of the first chemical and biological studies of microorganisms isolated from the Cuatro Ciénegas Reserve, which is a location characterized by its unique ecosystems and an oligotrophic environment.

1. ANTECEDENTES

1.1 Importancia de los productos naturales de origen microbiano

Durante décadas, los metabolitos secundarios derivados de diversas fuentes naturales (microorganismos, plantas y/o animales) han sido la principal alternativa terapéutica en la terapia contra diversas patologías. Así por ejemplo, sólo una pequeña parte de estos productos y/o sus derivados representan cerca del 60% de los nuevos agentes anticancerígenos y casi el 75% de todas las nuevas moléculas descritas con propiedades antibacterianas (Carrano y Marinelli, 2015), además, los productos naturales son una fuente valiosa en la búsqueda de metabolitos con una diversidad química estructural relevante (Mishra y Tiwari, 2011).

En particular, los estudios químicos y biológicos de hongos y bacterias ha cobrado un renovado interés debido, a su gran biodiversidad, y, en especial, a los avances en las técnicas analíticas de aislamiento, evaluación biológica, separación y purificación, permitiendo a la fecha la identificación de un número mayor a 50,000 metabolitos secundarios a partir de estas fuentes naturales (Demain, 2014; Mahajan y Balachandran, 2014).

De manera general, estos metabolitos secundarios *per se* han demostrado su importancia en el cuidado primario de la salud siendo el resultado de la investigación de más de 50 años; comenzando con los antibióticos descubiertos en la *edad de oro* (las décadas de los años 40 y 50) aislados de especies del género *Streptomyces* (Schatz *et. al.*, 1944); y desde entonces, a la fecha se estima que el número de fármacos caracterizados no representa ni el 5% del total de moléculas que podrían ser aisladas a partir de fuentes microbianas (Bailly, 2009).

Así, los organismos fúngicos, así como los actinomicetos, han sido los grupos de microorganismos más investigados para la obtención de nuevas entidades

químicas (Bailly, 2009) (**Figura 1**). En este contexto, está bien documentado que la investigación de microorganismos provenientes de hábitats inexplorados garantizaría el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios biológicamente activos, no obstante, sólo una pequeña parte (0.1–1%) de estos microorganismos se han cultivado en condiciones de laboratorio (Amann *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2014). Cabe mencionar, que una de las principales ventajas de cultivar a los organismos en condiciones de laboratorio, es la posibilidad de establecer cultivos en gran escala en los medios apropiados, facilitando con ello el suministro ilimitado y permanente de principios activos, o bien, proporcionando en algunos casos las materias primas necesarias para el desarrollo de otros fármacos. Sin embargo, y a pesar de que, no todos los organismos pueden cultivarse de esta forma, el número de agentes terapéuticos eficaces de origen microbiano descubiertos y desarrollados a la fecha ha sido importante, entre los que destacan las penicilinas (*Penicillium* sp.), cefalosporinas (*Cephalosporium acremonium*), aminoglucósidos, tetraciclinas y otros poliketidos (*Actinomycetales*); agentes inmunosupresores, como las ciclosporinas (*Trichoderma* sp. y *Tolypocladium* sp.) y la rapamicina (*Streptomyces* sp.); agentes hipocolesterolemiantes, como la mevastatina (*Penicillium* sp.) y la lovastatina (*Aspergillus* sp.); agentes antihelmínticos y antiparasitarios, como las ivermectinas (*Streptomyces* sp.), entre otros (Pace, 1997; Cragg y Newman, 2013; Butler y Buss, 2006).

Desde el punto de vista químico y farmacológico, el estudio de los organismos fúngicos es complejo, ya que al ser los organismos más antiguos y de mayor importancia en los procesos involucrados en la degradación primaria en todos los ecosistemas, desempeñando papeles ecológicos críticos en el ciclo del carbono y en el reciclaje de nutrientes; son esenciales para la supervivencia de muchos grupos de organismos con los que se asocian (mutualismo) (Kusari *et al.*, 2012); además de que un gran número de especies fúngicas son patógenas en humanos, vegetales o animales; tienen un potencial herbicida de interés para la agricultura; y muestran un gran potencial para la biotecnología y la producción biológica,

empleándose como modelos genéticos, bien desarrollados, en el campo de la biología molecular (Baker *et al.*, 2008; Chambergo y Valencia, 2016).

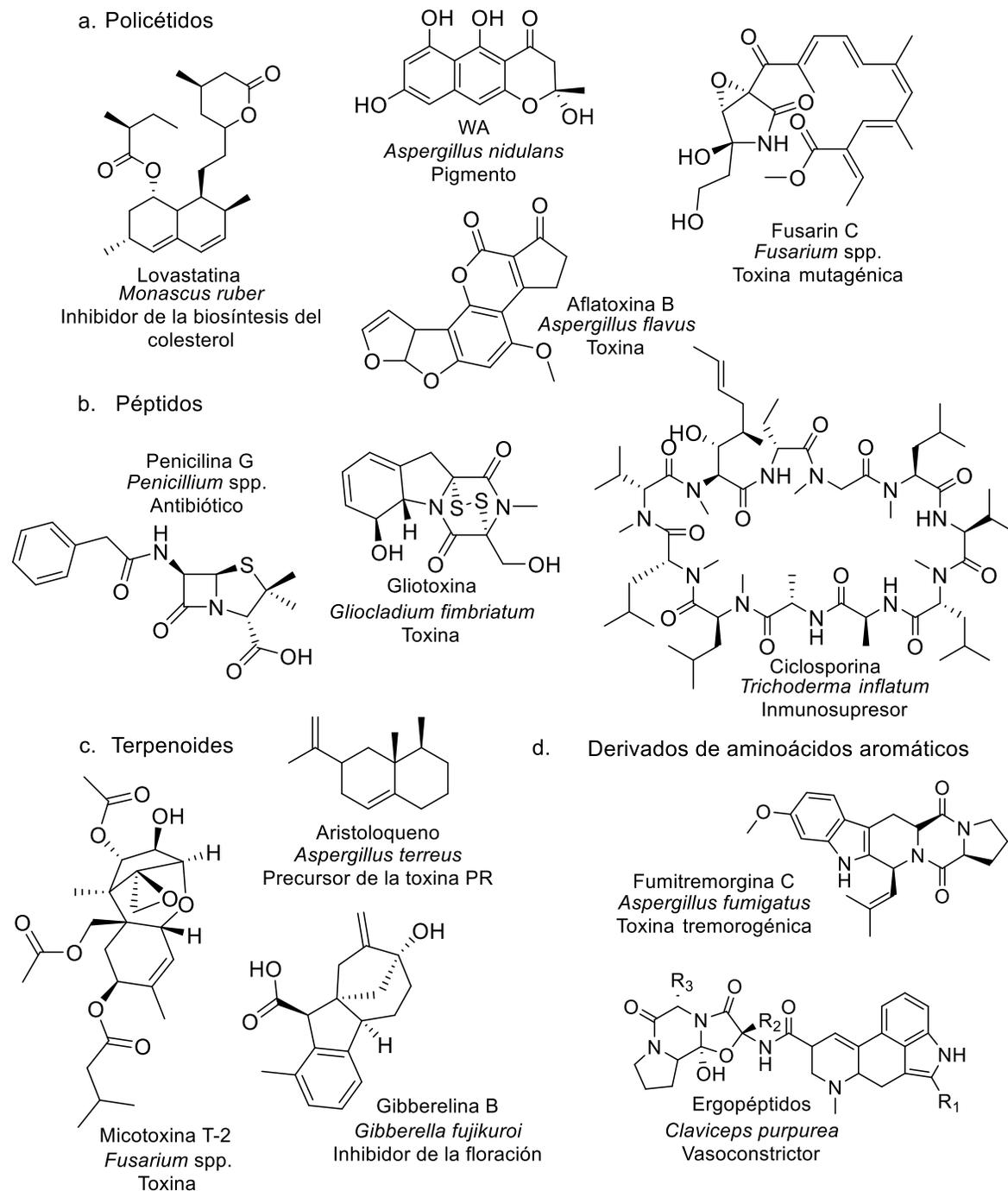


Figura 1. Ejemplos selectos de productos naturales de origen microbiano (Cragg & Newman, 2013; Keller *et al.*, 2005).

1.2 Biodiversidad de especies fúngicas en México

El reino *Fungi* agrupa a una gran variedad de organismos eucariontes, es megadiverso morfológica, fisiológica y genéticamente. De manera general, los hongos se describen como organismos filamentosos de crecimiento apical, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y/o sexual por medio de esporas, y con una pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa (Sette *et al.*, 2013; Aguirre-Acosta *et al.*, 2014; Mishra y Singh, 2014).

La ubicuidad y capacidad bien reconocida de estos microorganismos para la formación de micorrizas, sus rutas de biosíntesis complejas y de biodegradación de diversos materiales, explica el interés para su investigación como fuentes de micotoxinas y de nuevos productos naturales bioactivos (Bills *et al.*, 1985). A pesar de que algunos hongos habitan en un entorno específico, otros son capaces de crecer sobre una amplia variedad de condiciones ambientales (Blackwell, 2011), ya que están distribuidos en todos los hábitats y ecosistemas de la Tierra, y presentan la capacidad de adaptarse y crecer aún en las condiciones ambientales más extremas. Se estima que existen alrededor de 1.5 a 5 millones de especies de hongos en el planeta, y se conoce que la biodiversidad en los ambientes tropicales es mayor que en las regiones templadas; además de que existen numerosos hábitats fúngicos y localidades que siguen siendo poco estudiadas (Hawksworth, 1991; 2001; Blackwell, 2011). Estas apreciaciones son relevantes debido a que al no contar con una estimación de la biodiversidad presente, es difícil determinar el nivel de profusión de las funciones que desempeñan los hongos en los distintos ecosistemas y el impacto ecológico de éstos, el cual está muy probablemente relacionado con el total de las especies presentes en los diversos ecosistemas (Schmit y Mueller, 2007); debido a que en gran parte, la distribución de los hongos refleja la variación latitudinal en la dinámica de los nutrientes de los ecosistemas. Aunque las especies morfológicas de organismos unicelulares son usualmente cosmopolitas, cada vez se descubren un mayor número de evidencias de que la distribución de estos microorganismos se

determina a través de los procesos de ensamblaje comunitario y sus variaciones dependen de la concentración de nutrientes limitantes del crecimiento en los suelos y tejidos de las plantas simbiotas (Tedersoo *et al.*, 2014).

Por ello, la diversidad fúngica en nuestro país es mayor en los bosques tropicales y subtropicales que en los bosques de encinos y coníferas de zonas templadas, y menor en las zonas áridas (Tedersoo *et al.*, 2014). Para hacer un completo inventario de hongos en un bosque tropical, se deben de tomar en cuenta más de 30 tipos de hábitats y/o microhábitats diferentes, además de que esta actividad involucraría la participación de un gran número de especialistas de diferentes grupos de taxónomos (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

En México, si tomamos en cuenta esta información, el porcentaje de especies por describir en este tipo de ecosistemas aunado a la escasez de taxónomos especializados, es una tarea que requeriría de varias décadas y que debe de iniciarse (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014); y, en especial, si se considera que México, es un país megadiverso en cuanto a grupos de organismos, que ocupa el quinto lugar en el mundo por su biodiversidad y endemismos, albergando alrededor del 10% del total de la diversidad terrestre del planeta. Actualmente se estima que en nuestro país hay 200 000 especies de hongos, de las cuales se tiene conocimiento de aproximadamente el 5%... Adicionalmente, se conocen 4,500 especies de hongos macroscópicos lo que representa el 6.6% de la biodiversidad fúngica en el mundo (Guzmán, 1998; Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

1.3 Especies fúngicas provenientes de ambientes inexplorados

Las metodologías clásicas descritas para el descubrimiento de productos naturales provenientes de microorganismos se basan principalmente en el aislamiento de las especies fúngicas a partir de sus hábitats, en el cultivo de los organismos aislados en el laboratorio, seguido de un estudio químico convencional para la separación de los principios de interés (Fierro y Vaca, 2015).

Dentro de los hábitats más utilizados para el aislamiento de estos organismos, podemos mencionar al suelo, como un entorno notablemente complejo y dinámico, con diferentes factores de estrés de tipo biótico y abiótico cuya composición varía espacial y temporalmente. En el sentido estricto, el suelo no es considerado un hábitat, sino una serie de microambientes diminutos y microscópicos de naturaleza heterogénea a escalas que varían de kilómetros a micrómetros. La mayoría de la biomasa que compone a este sustrato es de tipo microbiana, y la actividad de los microorganismos que la componen desempeña un papel clave en múltiples ciclos geoquímicos, incluyendo a los ciclos del carbono y el nitrógeno. En este caso, los hongos comprenden entre un 78-90% de la biomasa encargada de descomponer materia orgánica en suelos (Bills *et al.*, 1985; Traxler y Kolter, 2015).

De manera general, los hongos saprótrofos representan la mayor población de especies de hongos en el suelo y desempeñan un papel crucial en la descomposición de polímeros estructurales de las plantas, tales como celulosa, hemicelulosa y lignina, contribuyendo de esta manera con el ciclo global del carbono. Además, estas actividades catabólicas permiten que los hongos puedan crecer en sustratos limitados en nutrientes; esta capacidad de adaptación, en conjunto con la maquinaria biosintética de estas especies para producir moléculas orgánicas o enzimas explica el constante interés en los estudios de bioprospección de estos microorganismos (Magnuson y Lasure, 2002). A la fecha se han logrado aislar especies pertenecientes a diversos grupos de taxa, como son: Saprolegniales, Pythiales, Mucorales, Eurotiales, Microascales, Hypocreales, Sordariales, Onygenales, Leotiales, Pezizales, y una variedad de hongos mitospóricos (en su mayoría anamorfos de especies de ascomicetos o basidiomicetos) (Bills *et al.*, 1985).

1.3.1 Cuatro Ciénegas, Coahuila: Bioprospección

El Valle de Cuatro Ciénegas (CC) es un único y pequeño oasis (<840 km²) que se encuentra en el desierto de Chihuahua, dentro del estado de Coahuila, México, donde convergen distintos sistemas acuáticos, los cuales dividen el valle en siete grandes sistemas de drenaje permanentes (Escalante *et al.*, 2008); éste posee ecosistemas que presentan concentraciones muy bajas de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y una variedad de endemismos similar al de Islas Galápagos (Souza *et al.*, 2012). En estos ecosistemas, la relación N:P difiere dependiendo la zona, y se observan concentraciones muy bajas de P (157:1) y cantidades muy bajas de N (1.8:1), siendo que la relación de N:P que se considera adecuada es de 16:1 (balance estequiométrico) para la vida en el océano (Redfield, 1934). Esta tasa inusual y las relaciones estequiométricas extremas en el Valle de CC generan un estrés nutricional que determina la dinámica poblacional quizá más parecida a la época precámbrica en la historia de la Tierra (Souza *et al.*, 2012).

Este hábitat es de particular interés debido a que las aguas que lo componen presentan elevadas concentraciones de minerales, que a su vez forman estructuras laminadas, que pueden ser consideradas como estromatolitos modernos (microbialitos) y cabe destacar que, a diferencia de otros lugares, esos microbialitos se forman en ausencia de metazoos debido a su elevada salinidad (Elser *et al.*, 2005). Estas características son una consecuencia de la regresión final del mar, la cual ocurrió durante el Paleoceno tardío, y el aislamiento completo del Valle de CC del Golfo de México con el levantamiento de la Sierra Madre Oriental en el Eoceno Medio (Ferrusquía Villafranca y Zárate, 1998).

Por las características geológicas descritas, este hábitat en el noreste de México ha mantenido una ancestralidad y biodiversidad como resultado prolongado de su desertificación y las consecuencias geoquímicas que promueven este endemismo. Así, el Valle de CC es un importante reservorio biológico con un valor incalculable

para el descubrimiento de nuevas especies de microorganismos y su preservación merece ser tomada en cuenta (Souza *et al.*, 2012).

1.4 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* agrupa a más de 250 especies (Geiser *et al.*, 2007), y El Centro de Información Mundial de Microorganismos (The World of Microorganisms Information Center) tiene el registro de alrededor de 590 cepas de *Aspergillus* spp. (WDCM, 2017), siendo las especies de éste género las que se encuentran entre los grupos de hongos más empleadas y que desempeñan funciones vitales en los ecosistemas naturales (Bennett, 2010). Este género incluye especies de importancia en la industria farmacéutica para la producción de fármacos y una variedad de otros productos tales como ácidos orgánicos, proteínas y enzimas (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *A. terreus*), así como cuenta con algunas especies patógenas para animales y plantas (*A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*) (Meyer *et al.*, 2011).

1.4.1 Características taxonómicas

Aspergillus (Trichocomaceae) es un género de ascomicetos que se reproducen solo por conidios (forma asexual). La complejidad del género se enfatiza por la diversidad existente de estadios reproductivos sexuales o teleomorfos; el género anamorfo *Aspergillus* está asociado a doce géneros teleomórficos en la familia Trichocomaceae (*Plectomycetes*): *Eurotium*, *Edyuillia* (*Gymnoeurotium*), *Neosartorya*, *Dichlaena*, *Hemicarpenteles*, *Warcupiella* (*Sporophormis*), *Sclerocleista*, *Emericella*, *Fennellia*, *Petromyces* (*Synclleistostroma*), *Chaetosartorya* (*Harpezomyces*) y *Hemisartorya* (Sugiyama *et al.*, 1991).

Para su caracterización morfológica se requiere de un catálogo de imágenes microscópicas, que se realiza de manera tradicional basándose en la morfología y color de las colonias y, posteriormente la micromorfología (**Figura 2**), incluyendo la caracterización de los conidios y las ascosporas por microscopía electrónica de barrido, siendo la morfología del conidióforo (cabeza aspergilar), la característica taxonómica más importante utilizada para establecer la taxonomía de *Aspergillus* (Bennett, 2010; Frisvad y Larsen, 2015). Por otra parte, el examen genético de las cepas también es de importancia en el establecimiento de la taxonomía de estas especies (Vadlapudi *et al.*, 2017).

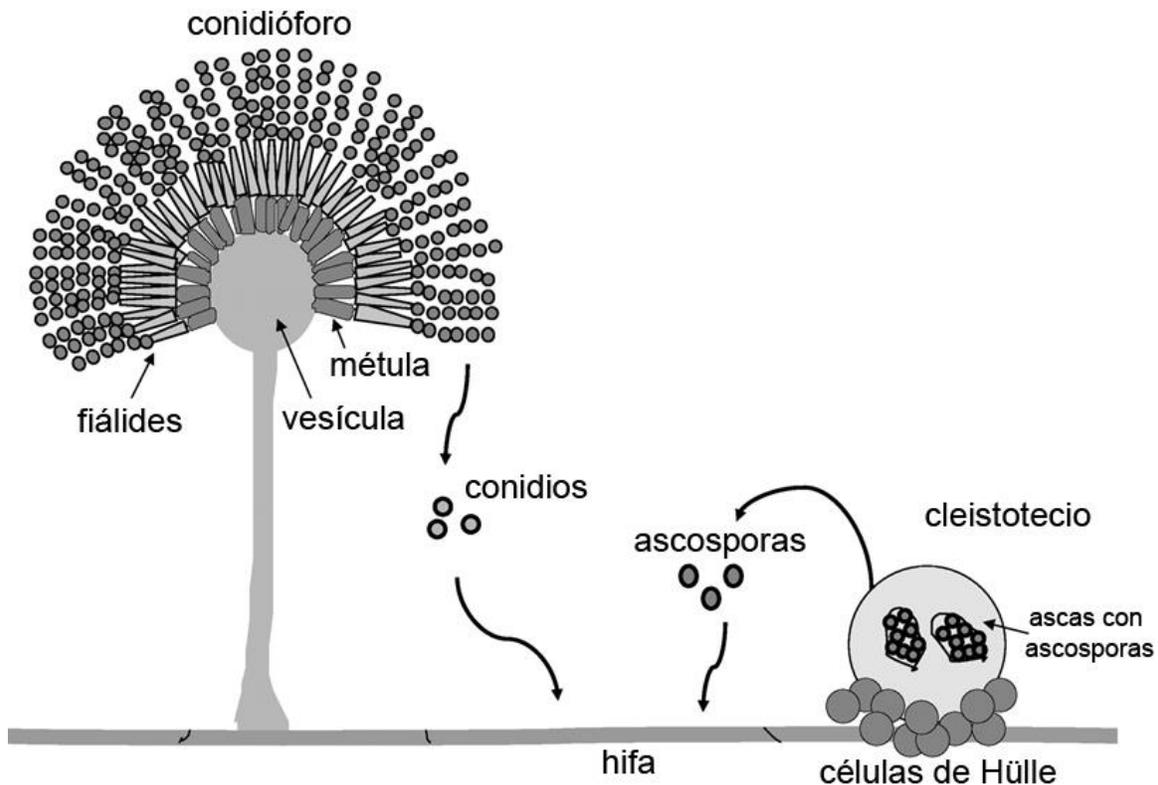


Figura 2. Ciclo de vida de *Aspergillus* (*A. nidulans*). Las esporas mitóticas (conidios) y las esporas meióticas (ascosporas) pueden germinar, producir hifas y crear una colonia madura. El cuerpo fructífero asexual llamado conidióforo lleva a los conidios en la parte superior de las células conidiógenas llamadas fiálides que surgen en las métulas (una capa de células sobre la superficie de la vesícula). El cuerpo fructífero sexual llamado cleistotecio contiene ascas con ocho ascosporas cada una y está cubierto por células de Hülle (Adaptado de Tsitsigiannis *et al.*, 2004).

1.4.2 Estilo de vida

Las especies de *Aspergillus* se aíslan a partir del suelo del desierto y suelos subtropicales y tropicales; en algunos desiertos templados y pastizales, así como en algunos suelos de bosques tropicales y representan cerca del 20% de las especies totales aisladas (Bills *et al.*, 1985). Estos organismos también se encuentran distribuidos de manera abundante como saprófitos en el material vegetal en descomposición, ya que la mayoría de las especies está adaptada para la degradación de polímeros vegetales complejos, así como en alimentos con un pH ácido, alimentos secos y aquellos con altas concentraciones de carbohidratos que normalmente no son compatibles con el crecimiento microbiano, también se hayan en sustratos diversos como estiércol, tejidos humanos y pergaminos, otros hábitats son los medios alcalinos y con bajos niveles de zinc (Amich *et al.*, 2010), agua marina (Tepšič *et al.*, 2006) y sedimentos marinos (Tian *et al.*, 2015; Aparicio-Cuevas *et al.*, 2017).

Los *Aspergillus* como organismos endófitos tienen una gran capacidad de formar simbiosis. En este microambiente, la planta hospedadora proporciona nutrientes para el crecimiento y la reproducción de la cepa; y como resultado el huésped sintetiza compuestos bioactivos que sólo se metabolizan para proteger a su planta hospedera contra factores bióticos adversos, como la invasión de patógenos, la infección por virus y la alimentación de herbívoros (Zhang *et al.*, 2015). Finalmente, los *Aspergillus* endófitos no poseen un organismo anfitrión específico, esto debido a su gran capacidad de adaptación y vitalidad, siendo *A. fumigatus* el primer organismo aislado de esta clase a partir de *Cynodon dactylon*, un césped de la familia Poaceae (Liu *et al.*, 2004), a la fecha existen reportes de 23 cepas de *Aspergillus* ya caracterizadas a partir de 20 especies vegetales (Zhang *et al.*, 2015).

1.4.3 Estudios químicos del género *Aspergillus*

Las especies de *Aspergillus* pueden producir una gran cantidad de metabolitos secundarios en forma de extrolitos (compuestos químicos secretados hacia el exterior o anclados en la pared celular o en la membrana). Los perfiles metabolómicos realizados sobre organismos de este género, son específicos de cada especie, aún así, las familias de metabolitos secundarios individuales (**Figura 3**) son descritas en diferentes especies, incluso aquellas filogenéticamente y ecológicamente no relacionadas con *Aspergillus* (Frisvad y Larsen, 2015).

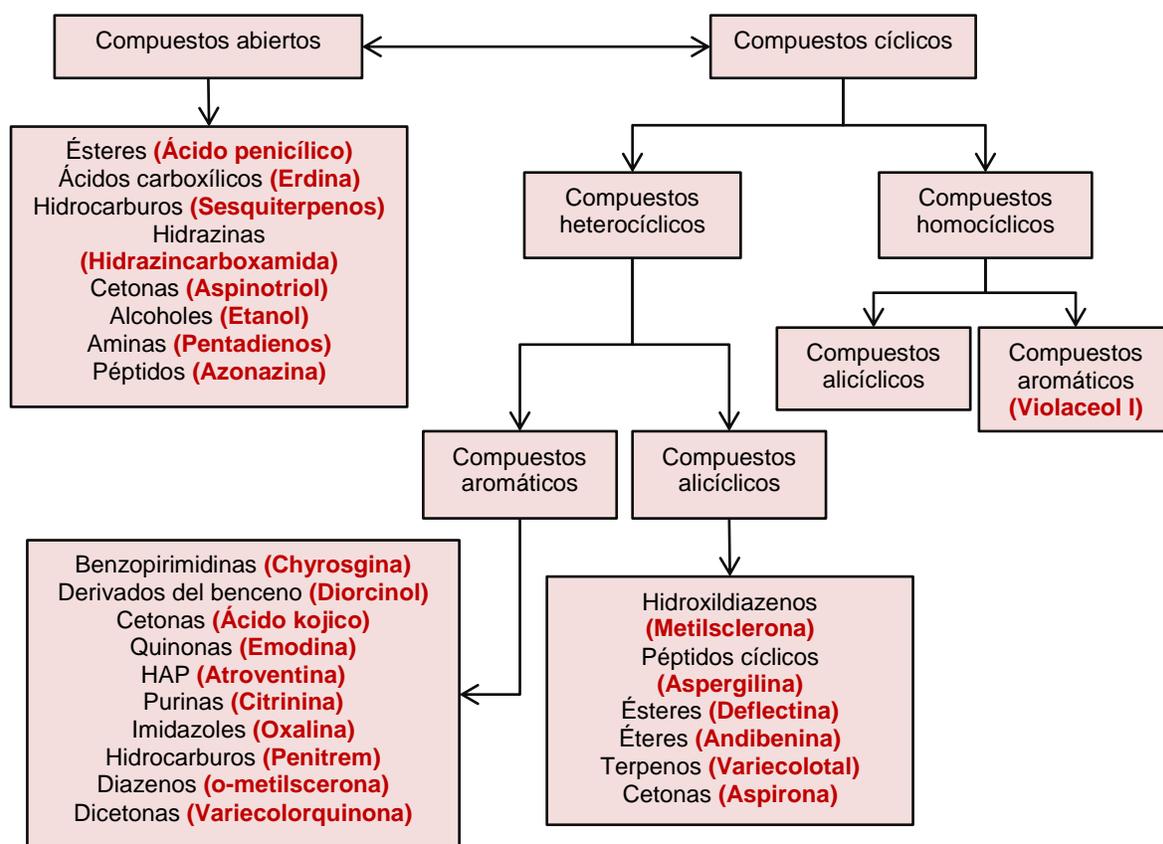


Figura 3. Clasificación IUPAC de la diversidad de compuestos biosintetizados por el género *Aspergillus* (Vadlapudi et al., 2017).

El género *Aspergillus* está dividido en cinco subgéneros: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Cremeri* y *Aspergillus*, existen organismos pertenecientes a todos los subgéneros que han sido estudiados desde el punto de vista químico, permitiendo el aislamiento de una gran diversidad de metabolitos secundarios desde el punto de vista estructural (**Figura 4**). Desde el punto de vista biológico, los metabolitos aislados presentan una gran variedad de efectos biológicos y farmacológicos como agentes antibacterianos, fúngicos, antivirales, citotóxicos, antiinflamatorios, antioxidantes, por mencionar algunos (Frisvad y Larsen, 2015).

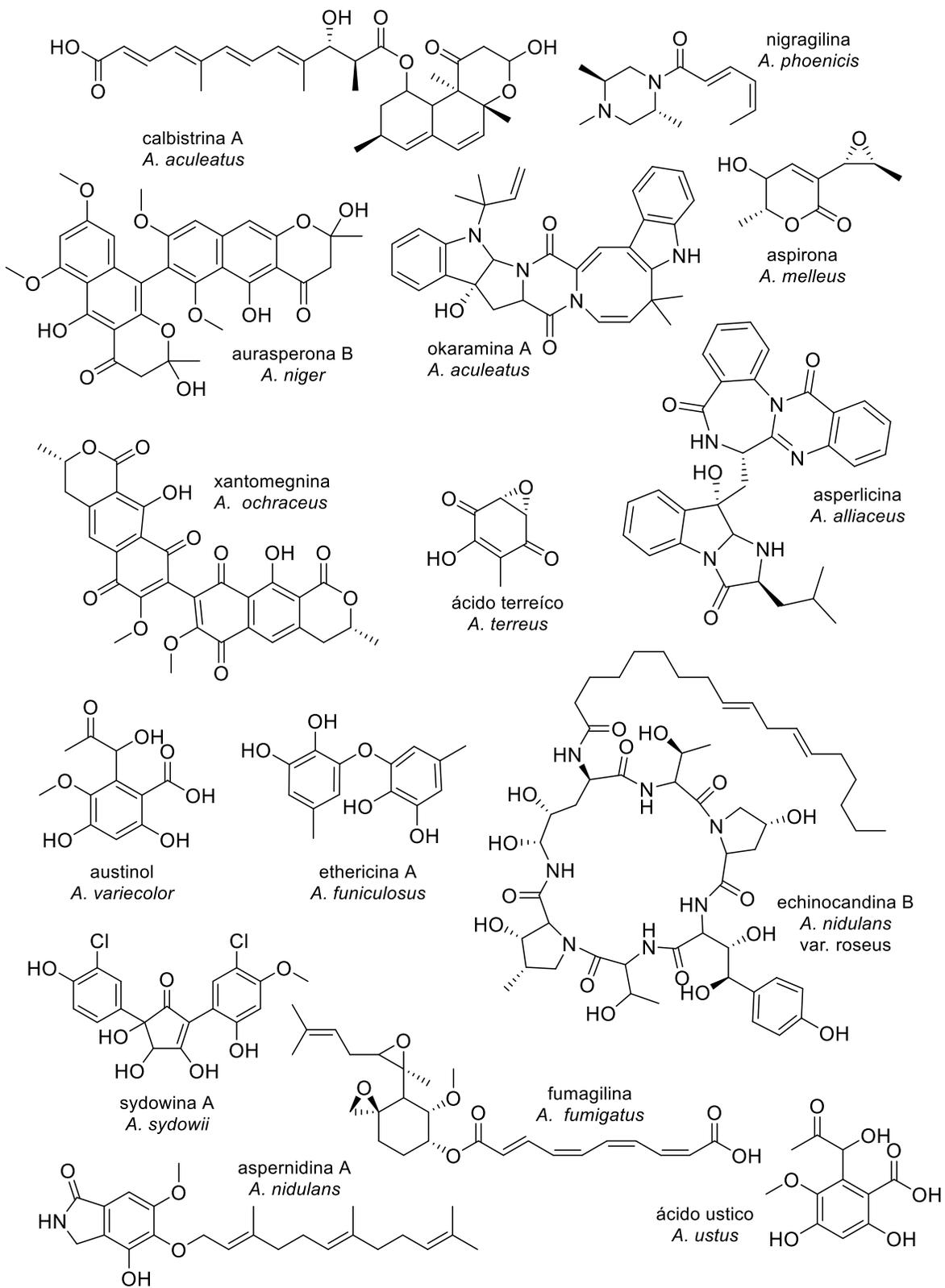


Figura 4. Metabolitos selectos del género *Aspergillus*.

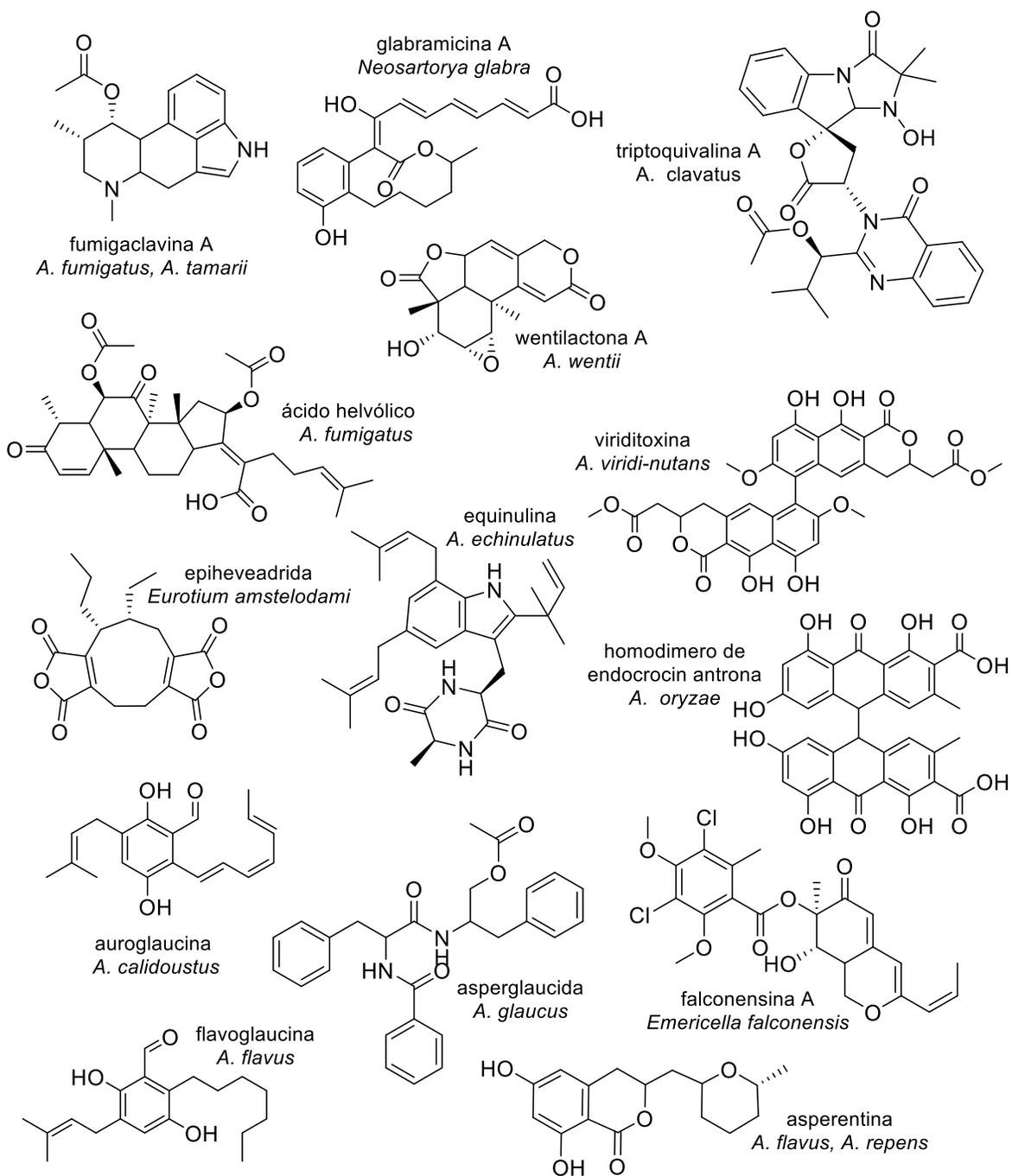


Figura 4. Metabolitos selectos del género *Aspergillus*.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la contribución que han tenido los productos naturales, en particular aquellos de origen fúngico para procurar la salud, el estudio químico de especies de hongos y/o bacterias aisladas a partir de ambientes inexplorados como fuentes de nuevas entidades químicas, se encuentra plenamente justificado.

La búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana como parte de las terapias combinatorias para el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer, o bien, como alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones por organismos multirresistentes, representa un reto de interés para los grupos de investigación en el área de los productos naturales.

Así, el presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos obtenidos a partir de microorganismos aislados en la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila, y pretende contribuir al descubrimiento de especies de hongos y/o bacterias aisladas de hábitats inexplorados, además de contribuir con el aislamiento de entidades químicas bioactivas como agentes antimicrobianos. En conjunto, los resultados obtenidos a partir de esta investigación, enriquecerán de manera indudable el conocimiento sobre la biodiversidad microbiana que existe en nuestro país.

3. HIPÓTESIS

El estudio de diversos sustratos provenientes de hábitats inexplorados de México permitirá la obtención de nuevas especies fúngicas y endémicas con características únicas para biosintetizar diferentes tipos de metabolitos que les permitirán mantener el equilibrio biológico de su ecosistema. Por otra parte, los ensayos antimicrobianos y estudios de derreplicación representan las pruebas de monitoreo adecuadas para la selección de los candidatos idóneos para la obtención de metabolitos secundarios novedosos y activos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar parte del estudio químico y biológico de los organismos fúngicos aislados a partir de diferentes muestras de suelo y placas microbianas recolectadas en la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

4.2 Objetivos particulares

Para el cumplimiento de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Realizar el aislamiento de los organismos fúngicos de interés a partir de diversas muestras recolectadas en la región de Cuatro Ciénegas Coahuila.
- 2.- Obtener los cultivos axénicos en medio sólido de cada uno de los microorganismos aislados a partir de sus hábitats naturales.
- 3.- Preparar los cultivos en pequeña escala en los medios adecuados de todas las especies de microorganismos aisladas con la finalidad de obtener los extractos orgánicos correspondientes, utilizando las técnicas de maceración y reparto.
- 4.- Realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana y los estudios de derreplicación de cada uno de los extractos orgánicos.
- 5.- Realizar la identificación molecular de los organismos objeto de estudio, mediante el análisis del código de barras correspondiente a la región del ITS.
- 6.- Preparar los cultivos en mediana escala de las especies seleccionadas con base en los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas y los análisis de derreplicación.

7.- Realizar el estudio químico de al menos uno de los extractos más activos mediante técnicas químicas convencionales.

8.- Realizar la purificación y la caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes, utilizando técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Aislamiento de las especies fúngicas objeto de estudio (series CC4, CC6 y CC7)

Los organismos fúngicos saprótrofos objeto de estudio fueron aislados a partir de muestras de suelo y de una placa microbiana de distintas regiones de la reserva ecológica de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Dunas de yeso y Pie de Montaña, Becerra). Para cada muestra, se realizó un registro digital y se anotaron las coordenadas geográficas del sitio de colecta (**Cuadro 1, Figura 5**), finalmente se asignó un código interno a cada muestra. Una muestra representativa (300-500 mg) libre de materiales extraños (restos de raíces, piedras, etc.) se suspendió en agua estéril a las concentraciones finales de 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 p/v, por triplicado. Enseguida, 500 μ L de cada dilución se vertieron por triplicado sobre la superficie de cajas de Petri estériles y posteriormente se adicionó el medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA). Una vez detectado algún crecimiento, se transfirieron las colonias en cajas de Petri estériles con medio PDA para confirmar su pureza, posteriormente se inocularon en tubos de microcentrífuga (con medio PDA) para su conservación,. Una vez obtenidos los cultivos axénicos en cajas de Petri con PDA, las colonias fúngicas fueron subcultivadas para su posterior análisis morfológico e identificación molecular.

5.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de las muestras (inciso 5.1), se realizó la preparación de los cultivos en pequeña escala en medio sólido. Para ello, cada organismo se cultivó en 15 mL de medio líquido (YESD) que contiene extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%), en agitación constante (100 rpm) por 5 días, para favorecer el crecimiento de los organismos. Posteriormente, cada cultivo líquido se vertió sobre un sustrato sólido compuesto por arroz (15 g de arroz/30 mL agua) en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El

proceso de fermentación se llevó a cabo durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas.

Cuadro 1. Muestras de estudio.

Código:	CC4 (A)
Tipo de suelo:	Tierra
Lugar de colecta:	Dunas de yeso
Coordenadas geográficas:	26°51'14" N;102°8'43" W (763 m elevación)
Código:	CC6 (B)
Tipo de suelo:	Placa microbiana en rocas
Lugar de colecta:	Pie de Montaña, Becerra
Coordenadas geográficas:	26°52'53"N;102°8'11" W (825.3 m elevación)
Código:	CC7 (C)
Tipo de suelo:	Tierra
Lugar de colecta:	Pie de Montaña, Becerra
Coordenadas geográficas:	26°52'42" N;102°8'8" W (761.7 m elevación)



Figura 5. Vista aérea de la reserva ecológica de Cuatro Ciénegas donde se realizó la recolección de muestras (A) Dunas de yeso; (B y C) Pie de Montaña, Becerra.

Los cultivos en mediana escala de los taxa seleccionados se realizaron siguiendo la estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior, brevemente, cada organismo se cultivó inicialmente en 75 mL de un medio líquido YESD en agitación constante (100 rpm) y durante 5 días. Posteriormente, los cultivos fueron vertidos sobre el sustrato sólido compuesto por una mezcla de arroz (200 g de arroz/400 mL agua) en matraces Fernbach de 2800 mL.

5.3 Preparación de los extractos orgánicos

La preparación de los extractos orgánicos en pequeña y/o mediana escala se realizó a partir de cada cultivo en medio sólido (inciso **5.2**), mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante (100 rpm) durante 24 horas, empleando como mezcla de extracción CHCl_3 -MeOH (1:1) [90 mL para los cultivos en pequeña escala y 900 mL para los cultivos en mediana escala]. Transcurrido el período de extracción, se adicionaron 60 mL de H_2O y 40 mL de CHCl_3 para los cultivos en pequeña escala, y 1800 mL de H_2O y 1200 mL de CHCl_3 para los cultivos en mediana escala, la mezcla se mantuvo en agitación constante durante 60 minutos. Enseguida se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta última se sometió a un proceso de extracción con CHCl_3 (20 y 200 mL para los cultivos en pequeña escala y mediana escala, respectivamente). La fracción soluble en cloroformo se llevó a sequedad a presión reducida. Posteriormente, esta fracción se resuspendió en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) [60 mL y 600 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente] y se sometió a un proceso de desgrase con hexano (60 mL y 600 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente), la fracción de hexano se descartó y la fracción orgánica resultante se evaporó a sequedad a presión reducida.

5.4 Estudios de derreplicación

Los estudios de derreplicación se realizaron utilizando cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS) (El-Elimat *et al.*, 2013). Para la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) se utilizó un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., MA, EEUU) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), el control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información fueron realizados utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). Todos los análisis se registraron a una temperatura de 40 °C, empleando una columna Acquity BEH C₁₈ (Waters Co., MA, EE.UU.; 1.7 μm, 2.1 × 10 mm). La elución se realizó con una mezcla binaria constituida por MeCN (**A**)-ácido fórmico 0.1% (**B**), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% **A** e incrementando la composición hasta 100% **A** durante 8 minutos, manteniendo una composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 minutos. La detección se realizó mediante un barrido desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HR) se realizaron por la técnica de electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI⁺ y ESI⁻, respectivamente) en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Inc., MA, EEUU). Las condiciones del equipo en el modo de ionización positivo fueron las siguientes: temperatura del capilar: 275 °C y 4.5 kV de voltaje para la fuente, 20 V para el voltaje del capilar y 95 V para la lente del tubo. Para el modo de ionización negativo las condiciones utilizadas fueron: temperatura del capilar: 275 °C y 3.5 kV de voltaje para la fuente, 42 V para el voltaje del capilar y 110 V para la lente del tubo. El nitrógeno fue utilizado como gas acarreador y se fijó a 25 y 20 (unidades arbitrarias) para el modo positivo y negativo, respectivamente. El control del instrumento y el análisis de datos se realizaron utilizando el programa Xcalibur 2.1 (Thermo). Para cada análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de MeOH-dioxano (1:1).

5.5 Ensayos biológicos

5.5.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos (10, 24 y 12 taxa para las series CC4, CC6 y CC7, respectivamente) se determinó empleando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Appendino *et al.*, 2008; Rivero-Cruz *et al.*, 2011) contra bacterias Gram positivo [*Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)] y Gram negativo [*Escherichia coli* (ATCC10536), *Salmonella typhi* (ATCC9992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)] y la levadura *Candida albicans*. Los microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Como medio de cultivo se utilizó caldo Müller-Hinton (MH).

Los ensayos correspondientes se efectuaron en placas de microtitulación de 96 pozos. Cada pozo contenía 100 μL de una suspensión en solución salina del microorganismo de prueba, ajustada al 0.5% (1×10^8 células/mL del estándar turbidimétrico de McFarland). Para la determinación se realizó una curva de referencia, empleando como controles a la ampicilina y la nistatina a distintas concentraciones (333, 250, 125, 75, 37.5, 18.7, 9.3, 4.6 y 2.3 $\mu\text{g/mL}$). Las determinaciones se realizaron por triplicado a las concentraciones de 20 y 200 $\mu\text{g/mL}$ y las muestras se disolvieron en una solución al 10% de DMSO en caldo MH. Todas las bacterias fueron incubadas por 24 horas a 37 °C y la levadura 48 horas a 37 °C, al término del período de incubación se adicionaron 5 μL del reactivo revelador (colorante MTT a 5 mg/mL en MeOH) y se incubó la placa por 30 minutos a 37 °C. Los resultados fueron obtenidos cualitativamente por el cambio de color del reactivo revelador de amarillo a púrpura.

5.6 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala

El fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala de los organismos más activos (Serie **CC6**: **CC6-1**, **CC6-4**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16**) se realizó mediante una cromatografía en columna de tipo Flash, en un cromatógrafo CombiFlash® Rf System (Teledyne Isco., NE, EEUU), equipado con un detector UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA) y otro evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y una bomba binaria. Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad entre hexano, CHCl₃ y MeOH. Las condiciones de estos análisis cromatográficos se resumen en el **Cuadro 2** y los resúmenes de los fraccionamientos cromatográficos se muestran en el **Cuadro 3** y **Figuras 6** y **7**.

Cuadro 2. Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.

Muestra	Peso (mg)	Cantidad de gel de sílice (g)	Volumen de equilibrio	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Tiempo de análisis (min)	Volúmenes por columna
CC6-1	1026.3	24	2.5	18	35	38.4	40
CC6-4	780.0	24	2.5	18	35	38.4	40
CC6-14	603.1	12	2.0	15	30	30.3	54
CC6-15	1072.3	24	2.5	18	35	38.4	40
CC6-16	732.5	24	2.5	18	35	38.4	40

Cuadro 3. Resumen de los fraccionamientos primarios de los extractos orgánicos en mediana escala **CC6-1**, **CC6-4**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16**.

CC6-1			CC6-4		
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1 – 12	CC6-1 ₁	4.2	1 – 12	CC6-4 ₁	2.2
13 – 16	CC6-1 ₂	13.4	13 – 17	CC6-4 ₂	16.4
17 – 29	CC6-1 ₃	594.1	18 – 21	CC6-4 ₃	22.2
30 – 43	CC6-1 ₄	23.9	22 – 38	CC6-4 ₄	394.9
44 – 49	CC6-1 ₅	19.2	39 – 45	CC6-4 ₅	14.3
50 – 54	CC6-1 ₆	102.0	46 – 58	CC6-4 ₆	73.9
55 – 59	CC6-1 ₇	13.9	59 – 65	CC6-4 ₇	20.8
60 – 65	CC6-1 ₈	13.4	66 – 76	CC6-4 ₈	32.0
66 – final	CC6-1 ₉	79.1	77 – final	CC6-4 ₉	49.1
Cantidad recuperada:		863.2	Cantidad recuperada:		625.8
% de Recobro:		89.99	% de Recobro:		85.71
CC6-15			CC6-16		
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1 – 12	CC6-15 ₁	2.2	1 – 12	CC6-16 ₁	0.0
13 – 17	CC6-15 ₂	24.4	13 – 17	CC6-16 ₂	27.8
18 – 21	CC6-15 ₃	467.1	18 – 21	CC6-16 ₃	474.4
22 – 38	CC6-15 ₄	52.8	22 – 38	CC6-16 ₄	16.0
39 – 45	CC6-15 ₅	162.7	39 – 45	CC6-16 ₅	12.4
46 – 58	CC6-15 ₆	43.9	46 – 58	CC6-16 ₆	65.6
77 – final	CC6-15 ₇	62.5	77 – final	CC6-16 ₇	45.1
Cantidad recuperada:		815.6	Cantidad recuperada:		641.3
% de Recobro:		92.46	% de Recobro:		87.54
CC6-14					
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1 – 11	CC6-14 ₁	0.0	31 - 47	CC6-14 ₆	24.1
12 – 17	CC6-14 ₂	0.0	48 – 54	CC6-14 ₇	195.6
18 – 21	CC6-14 ₃	6.6	55 – 61	CC6-14 ₈	54.9
22 – 30	CC6-14 ₄	237.1	62 – final	CC6-14 ₉	45.1
% de Recobro:		96.24	Cantidad recuperada:		563.4

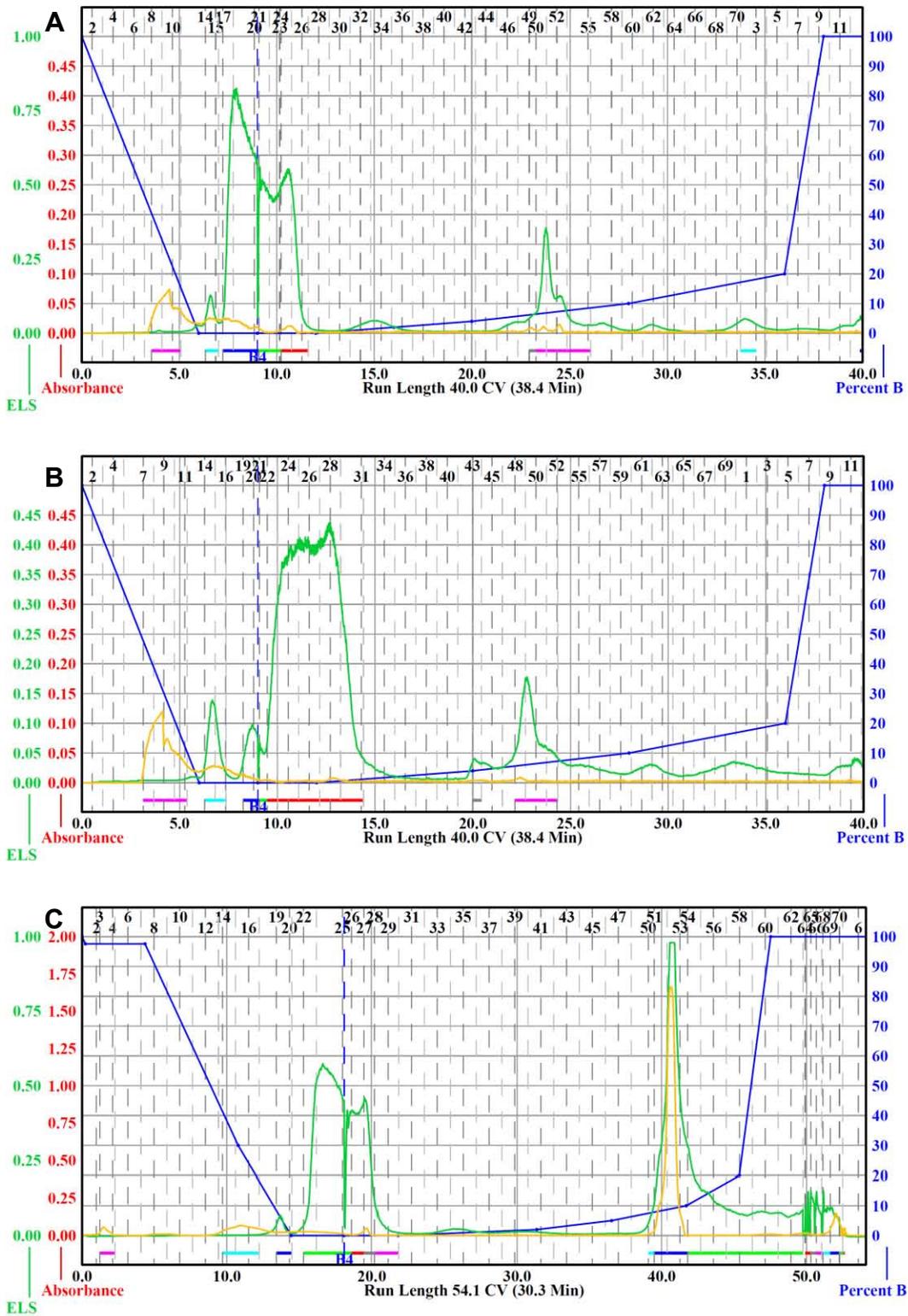


Figura 6. Cromatogramas del fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de **CC6-1 (A)**, **CC6-4 (B)** y **CC6-14 (C)**. En verde se observan las señales correspondientes al detector ELSD y en amarillo las del PDA.

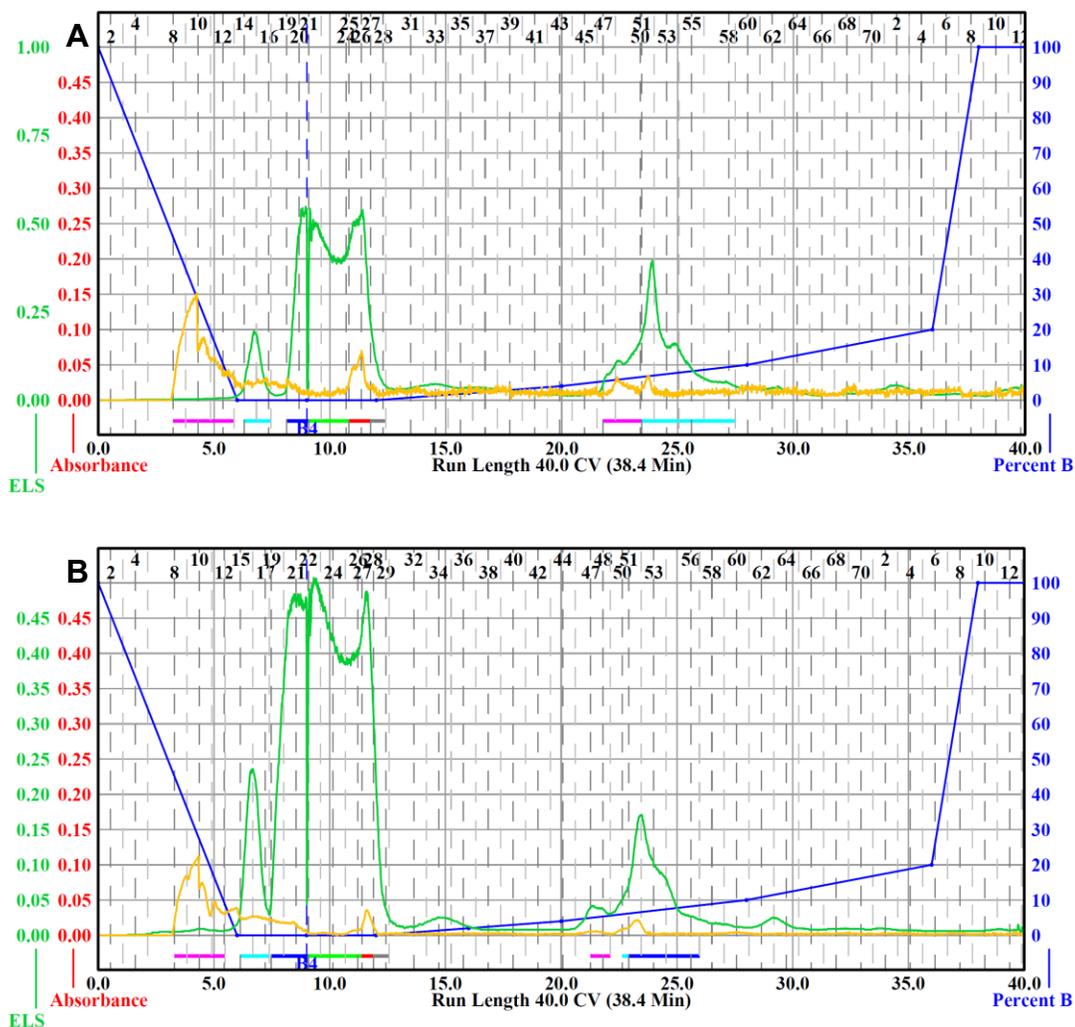


Figura 7. Cromatogramas del fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de **CC6-15** (A) y **CC6-16** (B). En verde se observan las señales correspondientes al detector ELSD y en amarillo las del PDA.

5.6.1 Fraccionamiento secundario de **CC6-4₄**, **CC6-15₃** y **CC6-16₃**.

Las fracciones **CC6-4₄**, **CC6-15₃** y **CC6-16₃** activas obtenidas en el proceso anterior, se sometieron a un posterior fraccionamiento por cromatografía en columna de tipo Flash; empleándose gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y el proceso de elución se realizó utilizando un gradiente entre hexano y AcOEt, en orden creciente de polaridad (**Cuadros 4** y **5**). En la **Figura 8** se ilustran los cromatogramas correspondientes a los fraccionamientos indicados.

Cuadro 4. Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.

Fracción	Peso (mg)	Cantidad de gel de sílice (g)	Volumen de equilibrio	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Tiempo de análisis (min)	Volúmenes por columna
CC6-4₄	394.9	12	2	15	35	48.7	87
CC6-16₃	467.1	12	2	15	35	48.7	87
CC6-15₃	474.4	12	2	15	30	56	100

Cuadro 5. Resumen de los fraccionamientos primarios de las fracciones **CC6-4₄**, **CC6-15₃** y **CC6-16₃**.

CC6-4₄			CC6-16₃		
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1 – 22	CC6-4 ₄₋₁	1.9	1 – 22	CC6-16 ₃₋₁	3.0
23 – 24	CC6-4 ₄₋₂	0.3	23 – 26	CC6-16 ₃₋₂	119.1
25 – 32	CC6-4 ₄₋₃	120.5	27 – 30	CC6-16 ₃₋₃	95.0
33 – 37	CC6-4 ₄₋₄	35.0	31 – 35	CC6-16 ₃₋₄	43.4
38 – 41	CC6-4 ₄₋₅	17	36 – 42	CC6-16 ₃₋₅	14.6
42 – 44	CC6-4 ₄₋₆	6.2	43 – 49	CC6-16 ₃₋₆	21.1
45 – 53	CC6-4 ₄₋₇	3.7	50 – 69	CC6-16 ₃₋₇	68.2
54 – final	CC6-4 ₄₋₈	26.5	70 – final	CC6-16 ₃₋₈	29.4
Cantidad recuperada:		343.4	Cantidad recuperada:		396.8
% de Recobro:		92.26	% de Recobro:		93.74
CC6-15₃					
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1 – 21	CC6-15 ₃₋₁	6.9	37 – 39	CC6-15 ₃₋₄	11.4
22 – 29	CC6-15 ₃₋₂	162.2	40 – 42	CC6-15 ₃₋₅	17.0
30 – 36	CC6-15 ₃₋₃	87.6	43 – 47	CC6-15 ₃₋₆	22.4
			48 – final	CC6-15 ₃₋₇	67.9
Cantidad recuperada:			375.4		
% de Recobro:			86.56		

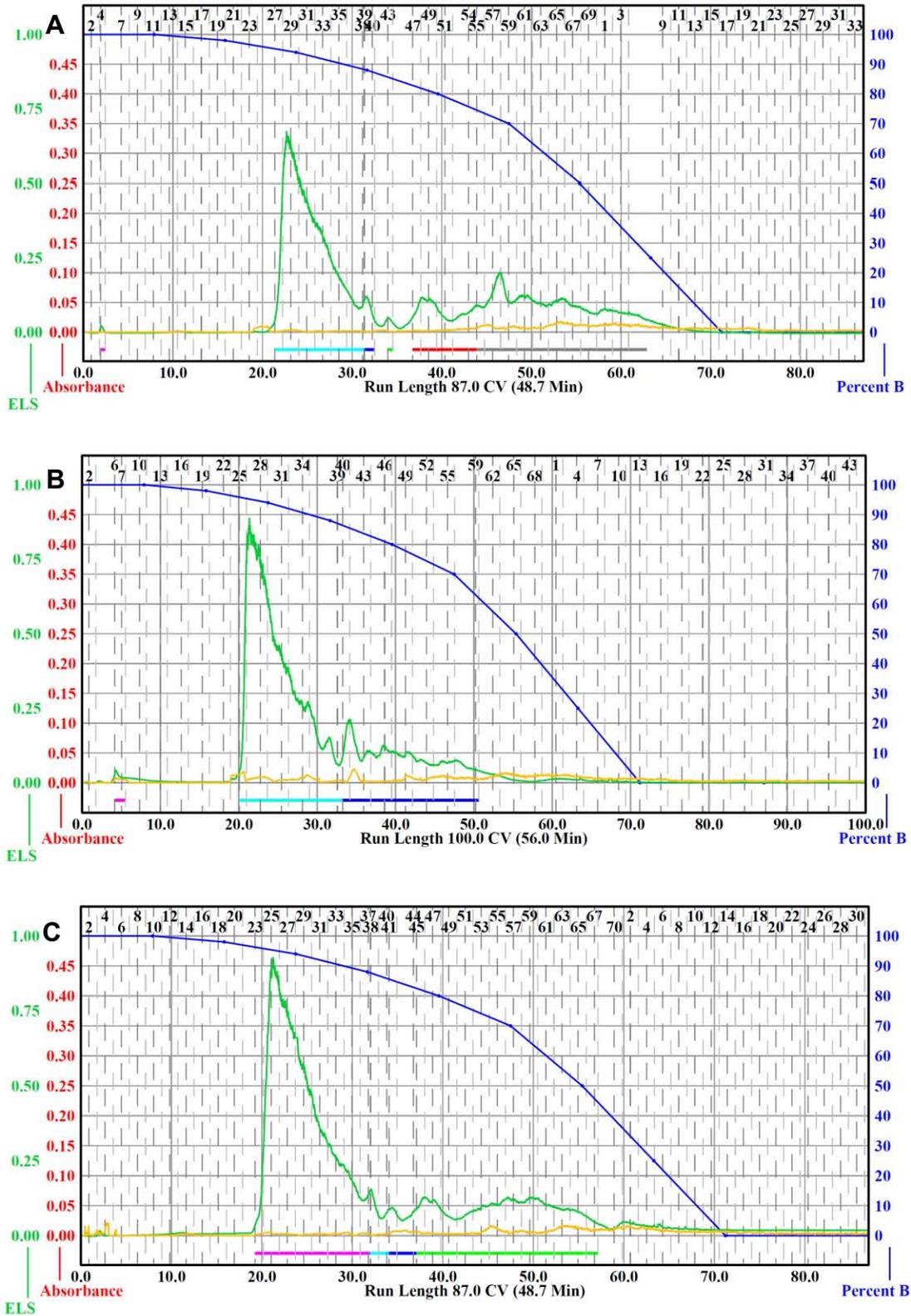


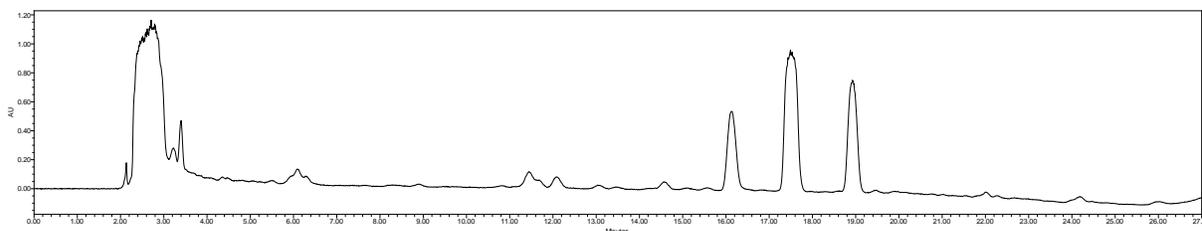
Figura 8. Cromatogramas del fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de las fracciones **CC6-4₄** (A), **CC6-15₃** (B) y **CC6-16₃**(C). En verde se observan las señales correspondientes al detector ELSD y en amarillo las del PDA.

5.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas **CC6-16₄** y **CC6-16₆**

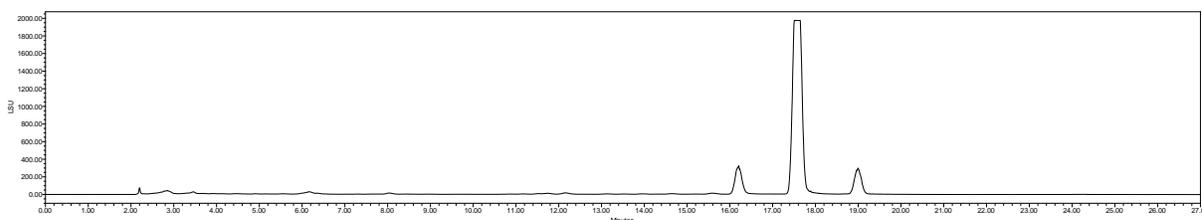
El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de las fracciones activas **CC6-16₄** y **CC6-16₆** con la finalidad de realizar la separación y purificación de los metabolitos mayoritarios presentes se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con un detector PDA y otro ELSD; este último con las siguientes condiciones de análisis: ganancia 100; presión de gas 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo $70^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 3.0 (Waters). Todos los análisis se realizaron en una columna Phenomenex Gemini C₁₈ (5 μm , 250 x 4.6 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y ácido fórmico en agua (0.1%) (**B**); gradiente: 15% \rightarrow 100% (**A**); tiempo de corrida: 32 min; flujo: 1 mL/min; longitudes de onda de detección: 190, 254 y 365 nm (**Figura 9**).

La separación de los compuestos presentes en las fracciones primarias **CC6-16₄** (16.0 mg) y **CC6-16₆** (65.6 mg), se realizó mediante el escalamiento de las condiciones de análisis utilizadas a nivel analítico como se describió anteriormente, empleando las siguientes condiciones: fase móvil ácido fórmico en agua (0.1%) (**A**) y MeCN (**B**); gradiente: 25% \rightarrow 100% (**B**) en 15 minutos; tiempo de corrida: 20 min; flujo: 21.24 mL/min; longitudes de onda de detección: 190 y 254 nm; tiempo de recolección: 9 segundos (**Figura 10**).

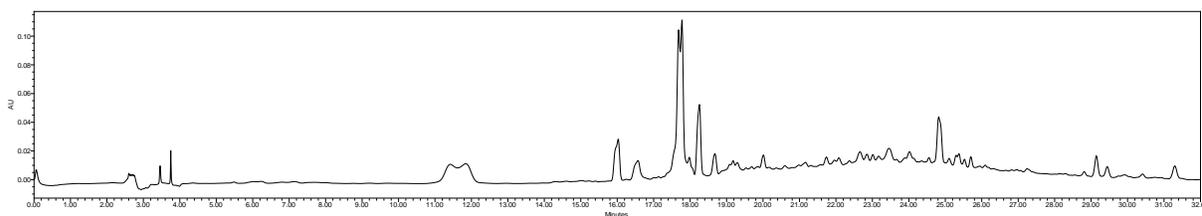
Estos procedimientos permitieron el aislamiento y la purificación de tres metabolitos secundarios caracterizados como el peróxido de ergosterol (**1**; t_{R} : 17.59 min, 3.4 mg) a partir de la fracción **CC6-16₄**, así como del pirofeno (**2**; t_{R} : 6.33 min, 2.0 mg) y del ácido aspérico (**3**; t_{R} : 8.99 min, 1.6 mg) de la fracción **CC6-16₆**.



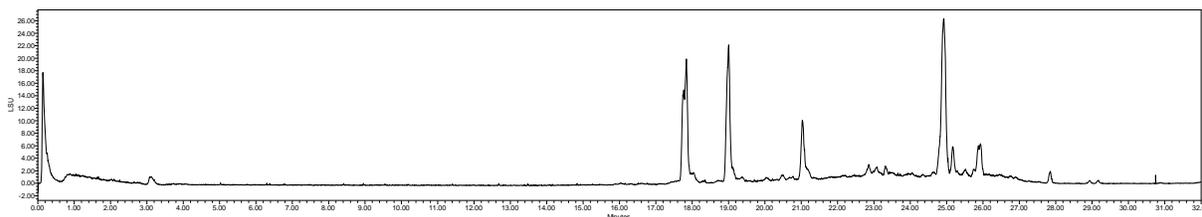
CC6-16₄ (PDA $\lambda = 254$ nm)



CC6-16₄ (ELSD)

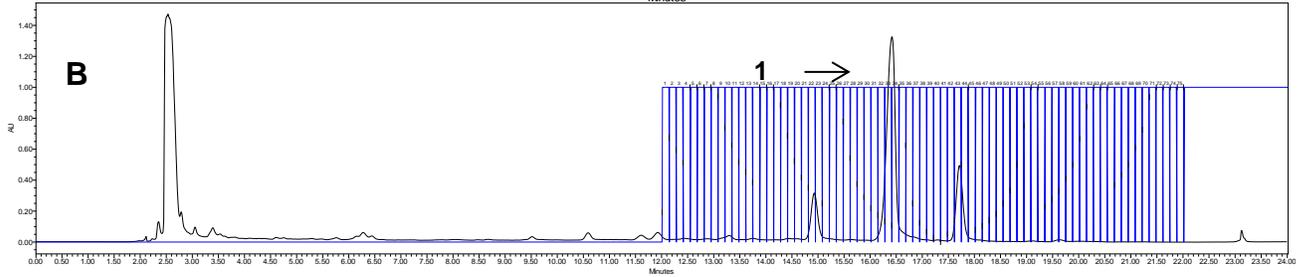
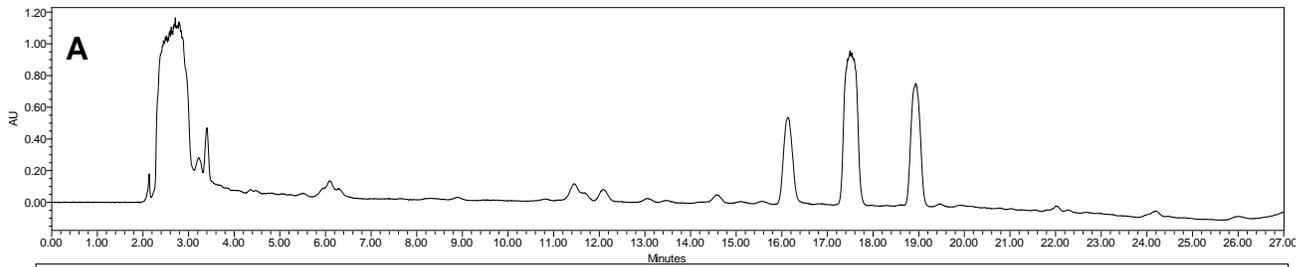


CC6-16₆ (PDA ($\lambda = 254$ nm))

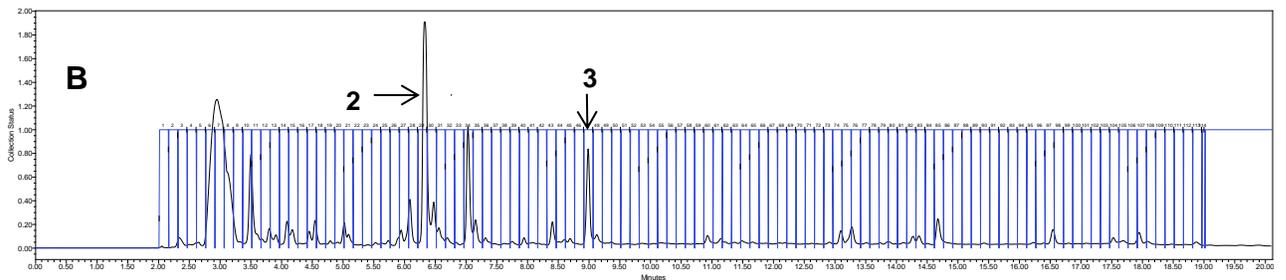
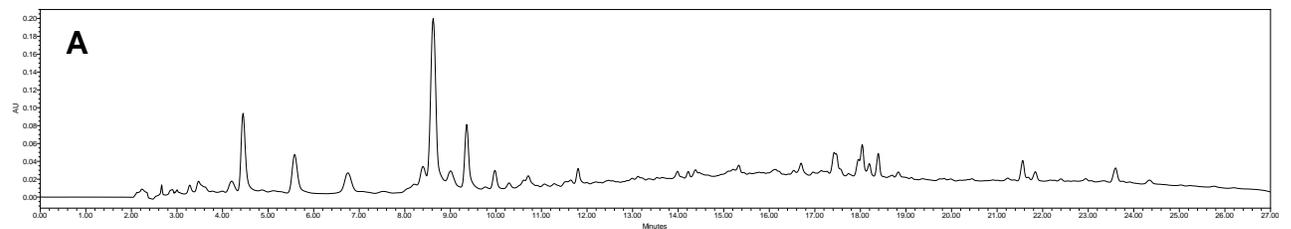


CC6-16₆ (ELSD)

Figura 9. Perfiles cromatográficos por HPLC a nivel analítico de las fracciones activas **CC6-16₄** y **CC6-16₆** ($\lambda = 254$ nm y ELSD).



CC6-16₄



CC6-16₆

Figura 10. Perfiles cromatográficos por HPLC a nivel preparativo de las fracciones activas **CC6-16₄** y **CC6-16₆** ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

5.8 Caracterización de los productos naturales

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 300 MHz (^1H)/75 MHz (^{13}C) ó 500 MHz (^1H)/125 MHz (^{13}C) se registraron en los equipos Varian VNMRS o JEOL ECA 500, respectivamente. Los desplazamientos químicos (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 masas por la técnica de ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-, respectivamente) se registraron en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL. El registro de los espectros de RMN y EM se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, así como en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, NC, EE.UU.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de origen fúngico aislados a partir de especies únicas de hábitats poco explorados de México, y tiene como objetivo central contribuir con parte del conocimiento científico sobre la biodiversidad microbiana de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila, este conocimiento se generará mediante la realización de los estudios químicos y biológicos de especies fúngicas selectas aisladas a partir de diversos sustratos (suelo y placa microbiana). Para el desarrollo de esta investigación se planteó la siguiente estrategia experimental:

En esta sección se discutirá, en primer lugar, los resultados obtenidos del aislamiento de los microorganismos fúngicos a partir de los sustratos seleccionados y la evaluación de su potencial antimicrobiano y estudios de derreplicación. En la segunda parte, se detallan todos los aspectos relacionados con la investigación química de una especie fúngica activa seleccionada con base en los resultados obtenidos en los ensayos antes mencionados.

6.1 Aislamiento de los organismos fúngicos

A partir de las muestras seleccionadas, suelo y placa microbiana, colectadas en la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila, empleando las técnicas descritas con detalle en el inciso 5.1 de la parte experimental, se realizó el aislamiento axénico de 46 taxa fúngicos saprótrofos, de los cuales 10 fueron aislados de la muestra de Dunas de Yeso, 24 de la placa microbiana depositada sobre rocas recolectada en Pie de Montaña, Bécerra y 12 son de una muestra de suelo de Pie de Montaña, Bécerra (**Figura 11**).

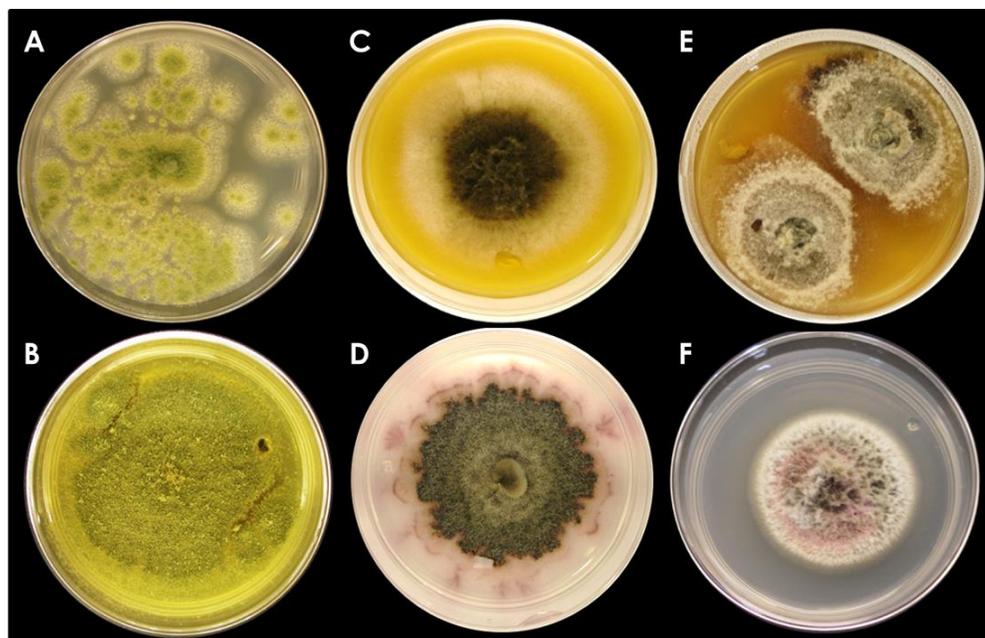


Figura 11. Ejemplos selectos de los organismos fúngicos aislados. **A. CC4-4, B. CC4-7, C. CC6-2, D. CC6-5, E. CC7-4, F. CC7-5.**

Posteriormente, a partir de cada aislamiento se realizó la fermentación de los organismos en pequeña escala. Para ello, se prepararon cultivos en sustrato sólido empleando arroz como se indica en el inciso 5.2 (**Figura 12**). Después del periodo de fermentación, se prepararon los extractos orgánicos correspondientes mediante maceración y partición (inciso 5.3, **Cuadro 6**, los rendimientos obtenidos de los extractos en pequeña escala se muestran en la segunda columna).



Figura 12. Ejemplo de un cultivo fúngico en medio de arroz del taxón **CC7-5**; **A.** Anverso; **B.** Reverso.

6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos (series CC4, CC6 y CC7).

Para determinar el efecto antibacteriano se determinó la actividad de todos los extractos orgánicos preparados en pequeña escala sobre el crecimiento de microorganismos Gram positivos y negativos y de la levadura *C. albicans*. Todos los microorganismos de prueba fueron seleccionados con base en que son los agentes causales de enfermedades infecciosas de gran relevancia en diversos organismos. Los resultados obtenidos se reportan con respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI) determinada con cada control positivo (ampicilina para *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhi*; gentamicina para *P. aeruginosa* y nistatina para *C. albicans*); también, se consideró como inhibición parcial cuando durante la evaluación, la muestra evaluada disminuyó el crecimiento microbiano con respecto al control negativo (**Cuadro 6**).

Cabe mencionar que ninguna de las muestras analizadas inhibió totalmente el crecimiento de *P. aeruginosa* a las dos concentraciones empleadas. De los resultados obtenidos las muestras con código CC6-1, CC6-4, CC6-14, CC6-15,

CC6-16, CC7-1, CC7-3, CC7-7, CC7-10 y CC7-12 presentaron la mejor actividad biológica contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*, principalmente; y también tienen una actividad importante contra *C. albicans*. Con base en estos resultados, se seleccionaron cinco taxa pertenecientes a la serie **CC6** los cuales presentaron mayor actividad para su escalamiento y fraccionamiento.

Cuadro 6. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala.

Muestra	Peso (mg)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC4-1	30.8						
CC4-2	33.1						
CC4-3	39.0						
CC4-4	36.0						
CC4-5	34.1						
CC4-6	42.0						
CC4-7	44.0						
CC4-8	30.8						
CC4-9	45.0						
CC4-10	62.4						
CC6-1	159.8						
CC6-2	207.6						
CC6-3	37.5						
CC6-4	125						
CC6-5	74.2						
CC6-6	30.8						
CC6-7	69.2						
CC6-8	45.2						
CC6-9	103.9						
CC6-10	30.1						
CC6-11	22.7						
CC6-12	90.0						
CC6-13	47.2						
CC6-14	51.6						
CC6-15	112.2						
CC6-16	261.0						
CC6-17	75.0						
CC6-18	42.8						
CC6-19	39.8						
CC6-20	22.3						
CC6-21	112.2						
CC6-22	247.4						
CC6-23	231.1						

Cuadro 6. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala.

Muestra	Peso (mg)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC6-24	29.9						
CC7-1	192.5		■	■	■		■
CC7-2	136.3						
CC7-3	154.7	■	■	■	■		■
CC7-4	72.9						
CC7-5	99.3		■				
CC7-6	41.1						
CC7-7	158.4	■	■	■	■		■
CC7-8	24.2						
CC7-9	23.8						
CC7-11	15.2						
CC7-12	285.4		■	■	■		■
Control positivo	CMI (µg/mL)	1.56	0.08	0.16	7.81	0.78	0.39

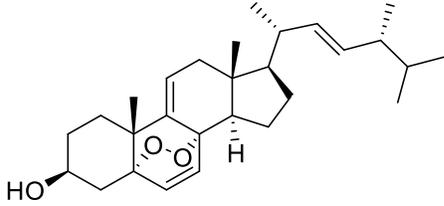
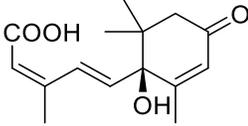
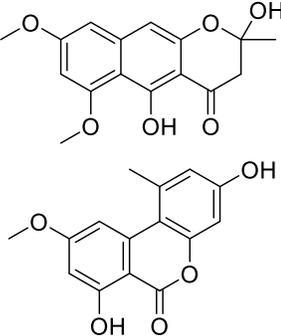
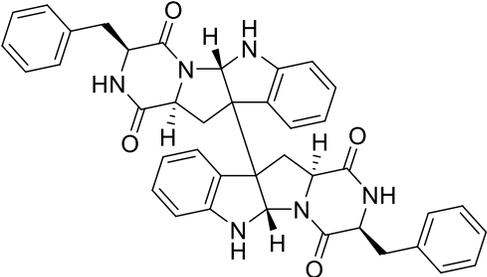
Criterios de actividad:

■	inhibición total a 200 y 20 µg/mL de extracto
■	inhibición total a 200 e inhibición parcial a 20 µg/mL de extracto
■	inhibición total a 200 µg/mL de extracto
■	inhibición parcial a 200 y 20 µg/mL de extracto
■	inhibición parcial a 200 µg/mL de extracto
■	Gentamicina
■	Ampicilina
■	Nistatina

6.3 Estudios de derreplicación

Los análisis metabólicos de los extractos en pequeña escala para establecer la presencia de micotoxinas u otros metabolitos secundarios de interés se realizaron mediante la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, como se describe en el inciso 5.4 utilizando la metodología descrita por El-Elimat y colaboradores (2013) (Cuadro 7). El análisis detallado de los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron la presencia de algunas micotoxinas incluidas en la base de datos *in house* para las muestras CC6-1, CC6-4, CC6-14, CC6-15, CC6-16 y CC6-17, sin embargo estas muestras no fueron descartadas para realizar su

Cuadro 7. Estructura química de las micotoxinas detectadas en los estudios de derreplicación en las especies analizadas (continuación).

Muestra	Estructura química
<p>CC6-14</p> <p>Peróxido de ergosterol C₂₈H₄₂O₃</p>	 <p>The structure shows a complex steroid nucleus with a peroxide bridge across the B and C rings, a hydroxyl group at C-3, and a long unsaturated side chain at C-17.</p>
<p>CC6-15</p> <p>Ácido absícico C₁₅H₂₀O₄</p>	 <p>The structure is a cyclohexene ring with a carboxylic acid group at C-1, a hydroxyl group at C-3, and a side chain at C-4 containing two double bonds and a methyl group.</p>
<p>CC6-16</p> <p>Fonsecina C₁₅H₁₄O₆</p> <p>Alternariol monometil éter C₁₅H₁₂O₅</p>	 <p>Two structures are shown: Fonsecina (top) is a tricyclic compound with a benzene ring fused to a pyridine ring, which is further fused to a six-membered ring containing a lactone and a hydroxyl group. Alternariol monomethyl ether (bottom) is a similar tricyclic structure with a methoxy group on the benzene ring.</p>
<p>CC6-17</p> <p>Dímero de dicetopiperazina C₄₀H₃₆N₆O₄</p>	 <p>The structure is a complex dimeric molecule consisting of two dicetopiperazine units linked together. Each unit features a piperazine ring system with two carbonyl groups and a phenylmethyl substituent.</p>

En conjunto, estos resultados permitieron seleccionar a las especies saprótrofas con código **CC6-1**, **CC6-4**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16**, como los candidatos idóneos para la realización de su estudio químico en la búsqueda de nuevos principios biodinámicos. Para ello, se realizó en primer lugar la fermentación en mediana escala de los cinco organismos seleccionados.

6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en mediana escala y fracciones primarias

Como se describió en el inciso anterior, se seleccionaron a los taxa de la serie **CC6**: **CC6-1**, **CC6-4**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16** (**Figura 13**) para su escalamiento (inciso 5.6) y subsecuente evaluación biológica y estudio químico. Una vez preparados los extractos orgánicos a partir de cada cultivo, se realizó el fraccionamiento preliminar de cada uno de éstos y, enseguida, se determinó la actividad antimicrobiana de todos los conjuntos de fracciones obtenidas a partir de cada fraccionamiento (**Cuadro 8**).

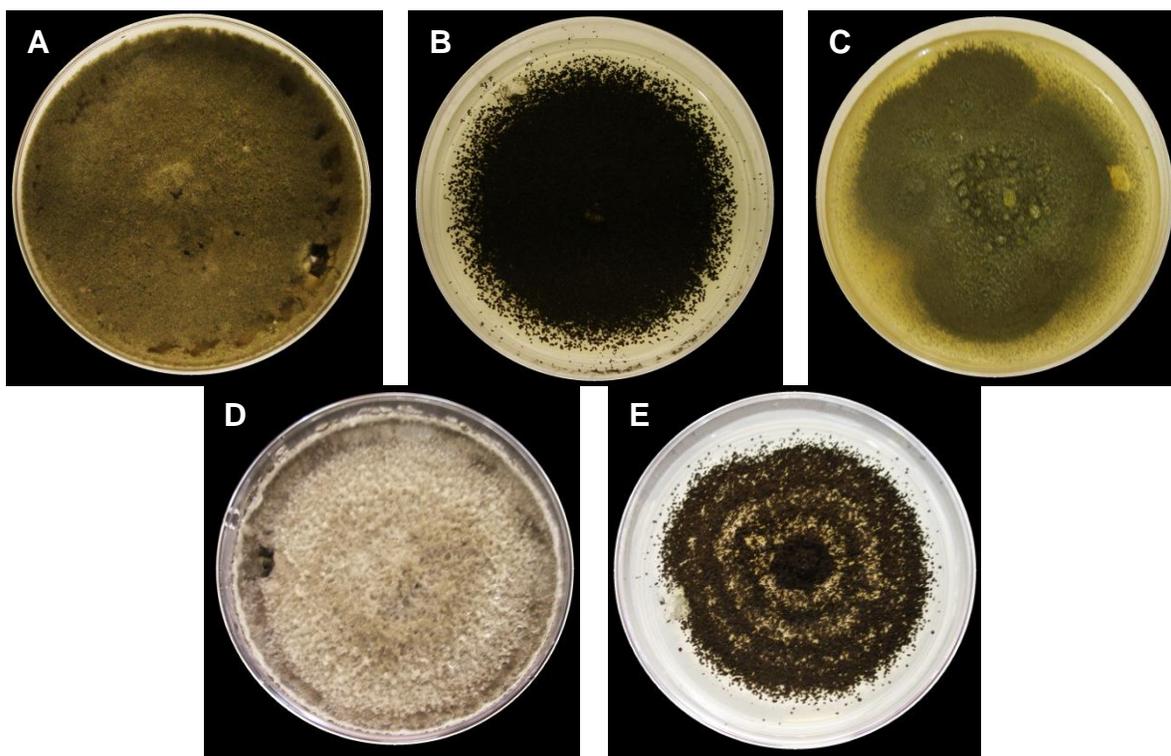


Figura 13. Cultivos axénicos seleccionados para su escalamiento. **A. CC6-1; B. CC6-4 ; C. CC6-14; D. CC6-15; E. CC6-16.**

Cuadro 8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en mediana escala **CC6-1**, **CC6-4**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16** y sus respectivos conjuntos de fracciones.

Extracto	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC6-1 ^{PE}		Orange	Yellow			
CC6-1 ^A		Yellow				Yellow
CC6-1 ₃						
CC6-1 ₄						
CC6-1 ₅		Orange				
CC6-1 ₆		Orange	Yellow			Yellow
CC6-1 ₇			Yellow			Pink
CC6-1 ₈						
CC6-1 ₉						Yellow
CC6-4 ^{PE}						Orange
CC6-4 ^A		Yellow	Yellow			
CC6-4 ₃		Yellow	Yellow			
CC6-4 ₄		Yellow	Yellow			Yellow
CC6-4 ₅		Yellow				Yellow
CC6-4 ₆						
CC6-4 ₇		Yellow				Yellow
CC6-4 ₈			Yellow			Yellow
CC6-4 ₉						Yellow
CC6-14 ^{PE}		Orange	Yellow		Yellow	
CC6-14 ^A		Yellow				
CC6-14 ₄		Orange	Orange			
CC6-14 ₅		Orange	Yellow			
CC6-14 ₆		Orange				Yellow
CC6-14 ₇			Yellow			
CC6-14 ₈		Yellow				
CC6-15 ^{PE}		Orange	Orange			
CC6-15 ^A		Orange	Yellow			
CC6-15 ₃						Yellow
CC6-15 ₄		Orange	Orange			
CC6-15 ₅		Orange	Yellow			
CC6-15 ₆						
CC6-15 ₇						

Cuadro 8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en mediana escala **CC6-1**, **CC6-4**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16** y sus respectivos conjuntos de fracciones (continuación).

Extracto	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC6-16 ^{PE}						
CC6-16 ^A						
CC6-16 ₂						
CC6-16 ₃						
CC6-16 ₄						
CC6-16 ₅						
CC6-16 ₆						
CC6-16 ₇						
CMI (µg/mL)	1.56	0.08	0.16	7.81	0.78	0.39

Criterios de actividad:

	inhibición total a 200 y 20 µg/mL de extracto
	inhibición total a 200 e inhibición parcial a 20 µg/mL de extracto
	inhibición total a 200 µg/mL de extracto
	inhibición parcial a 200 µg/mL de extracto
	Gentamicina
	Ampicilina
	Nistatina

Se seleccionó al taxón identificado con el código **CC6-16**, para la realización de su estudio químico.

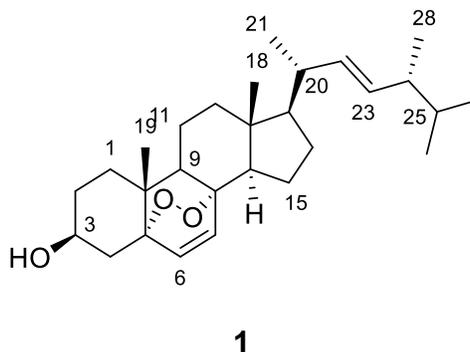
Por otra parte, de manera paralela a la realización de la evaluación biológica se llevaron a cabo los estudios conducentes a establecer la identidad taxonómica de los organismos seleccionados, mediante el análisis del código de barras correspondiente a la región del ITS (en colaboración con el Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, NC, EE.UU.), identificando al organismo con la clave **CC6-4** como la especie *Aspergillus niger*. Los taxa **CC6-1**, **CC6-14**, **CC6-15** y **CC6-16** sólo fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Alternaria* sp. (**CC6-1**), *Fusarium* sp. (**CC6-14**), *Ascomycota* sp. (**CC6-15**) y *Aspergillus* sp. (**CC6-16**) respectivamente, debido a que el análisis comparativo

de la similitud entre las secuencias obtenidas para cada taxón con aquellas de la base de datos del GenBank fue menor al 97%.

6.5 Estudio químico de la especie *Aspergillus* sp. (CC6-16).

Con la finalidad de iniciar el estudio químico de la especie *Aspergillus* sp. (CC6-16), se realizó el fraccionamiento del extracto orgánico en mediana escala (732.5 mg) mediante cromatografía en columna de tipo Flash.(inciso 5.6). Este procedimiento permitió la obtención de siete conjuntos de fracciones primarias. Todas las fracciones fueron evaluadas utilizando el mismo ensayo que permitió establecer la actividad del extracto orgánico, los resultados obtenidos permitieron establecer que la actividad biológica se concentraba en los conjuntos de fracciones **CC6-16₄** (16.0 mg) y **CC6-16₆** (65.6 mg), además de que ambos conjuntos de fracciones presentaron la menor complejidad y los mejores rendimientos. La resolución de ambas fracciones mediante diversas técnicas cromatográficas (columna de tipo Flash, HPLC, etc) condujo al aislamiento del peróxido de ergosterol (**1**) a partir de la fracción **CC6-16₄** y del pirofeno (**2**) y el ácido aspérico (**3**) a partir de la fracción **CC6-16₆**. De manera general, la elucidación de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales, y se describe brevemente a continuación.

6.5.1 Caracterización del peróxido de ergosterol (1)



El producto **1** fue obtenido como un sólido blanco. Los análisis por LC-HRESIMS permitieron establecer su fórmula molecular como $C_{28}H_{42}O_3$ mediante el análisis de la molécula protonada $[M+H]^+$ en una relación de m/z 429.3365 una y de 427.3424 una para la molécula desprotonada $[M-H]^-$ (**Figura 14**). Esta fórmula permite 7 grados de insaturación.

El análisis detallado de los espectros de RMN (**Cuadro 9; Figuras 15 y 16**) del producto **1** presentaron el perfil tipo de un derivado esteroideo muy similares al del ergosterol (Kahlos *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2002) y las evidencias más importantes observadas en los espectros de RMN se detallan a continuación:

a) En δ_H 0.82 (s) y 0.88 (s) se observan dos señales simples asignables a dos grupos metilo (H-18 y H-19). De igual manera, en δ_H 1.00 (d, $J = 6.6$ Hz) y 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz) se observan dos señales dobles correspondientes a los protones de los grupos metilo H-21 y H-28 presentes en el núcleo base. En δ_H 3.97 (sa), se observa una señal atribuible al protón de un metino base de un carbinol secundario (H-3).

b) En δ_H 6.24 (d, $J = 8.5$ Hz), 6.50 (d, $J = 8.5$ Hz), 5.22 (dd, $J = 15.2$ y 7.4 Hz) y 5.14 (dd, $J = 15.3$ y 8.1 Hz) se observan cuatro conjuntos de señales asignables a los protones vinílicos H-6, H-7, H-22 y H-23, respectivamente. Estas señales en el espectro de RMN ^{13}C correlacionan con los carbonos en δ_C 135.5 (C-6), 130.9 (C-7), 135.3 (C-22) y 132.4 (C-23).

c) Finalmente, se observa en el espectro de RMN ^{13}C las señales correspondientes a tres carbonos base oxígeno en δ_{C} 66.6 (C-3), 79.6 (C-8) y 82.3 (C-5) evidenciando la presencia de una función peróxido en el producto. Estas observaciones permitieron caracterizar al producto **1** como el peróxido de ergosterol.

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 400 MHz; ^{13}C 100 MHz; δ en ppm; J en Hz, CDCl_3) del peróxido de ergosterol (**1**).

Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (J en Hz)	δ_{C}^1	δ_{H} , mult (J en Hz) ¹
1	34.8		35.06	
2	30.2		30.47	
3	66.6	3.97, m	66.84	3.98, m
4	37.0		37.29	
5	82.3		83.10	
6	135.5	6.50, d (8.5)	135.80	6.51, d (8.6)
7	130.9	6.24, d (8.5)	131.12	6.25, d (8.6)
8	79.6		79.82	
9	51.2		51.43	
10	37.1		37.33	
11	23.5		23.77	
12	39.5		39.70	
13	44.7		44.93	
14	51.8		52.05	
15	20.8		21.01	
16	28.8		29.05	
17	56.3		56.55	
Me ₁₈	13.0	0.82, s	13.25	0.83, m
Me ₁₉	18.3	0.88, s	18.57	0.89, m
20	39.9		40.14	
Me ₂₁	21.0	1.00, d (6.6)	21.26	1.00, d, (6.6)
22	135.3	5.14, dd (15.3, 8.0)	135.58	5.15, dd (15.2, 7.7)
23	132.4	5.22, dd (15.2, 7.4)	132.40	5.22, dd (15,2, 8.2)
24	42.9		43.14	
25	33.2		33.40	
Me ₂₆	19.8	0.82, d (6.6)	20.03	0.82, d (6.7)
Me ₂₇	20.1	0.83, d (6.6)	20.34	0.83, d (6.7)
Me ₂₈	17.7	0.91, d (6.8)	17.95	0.91, d (6.7)

¹Kim *et al.*, 1997

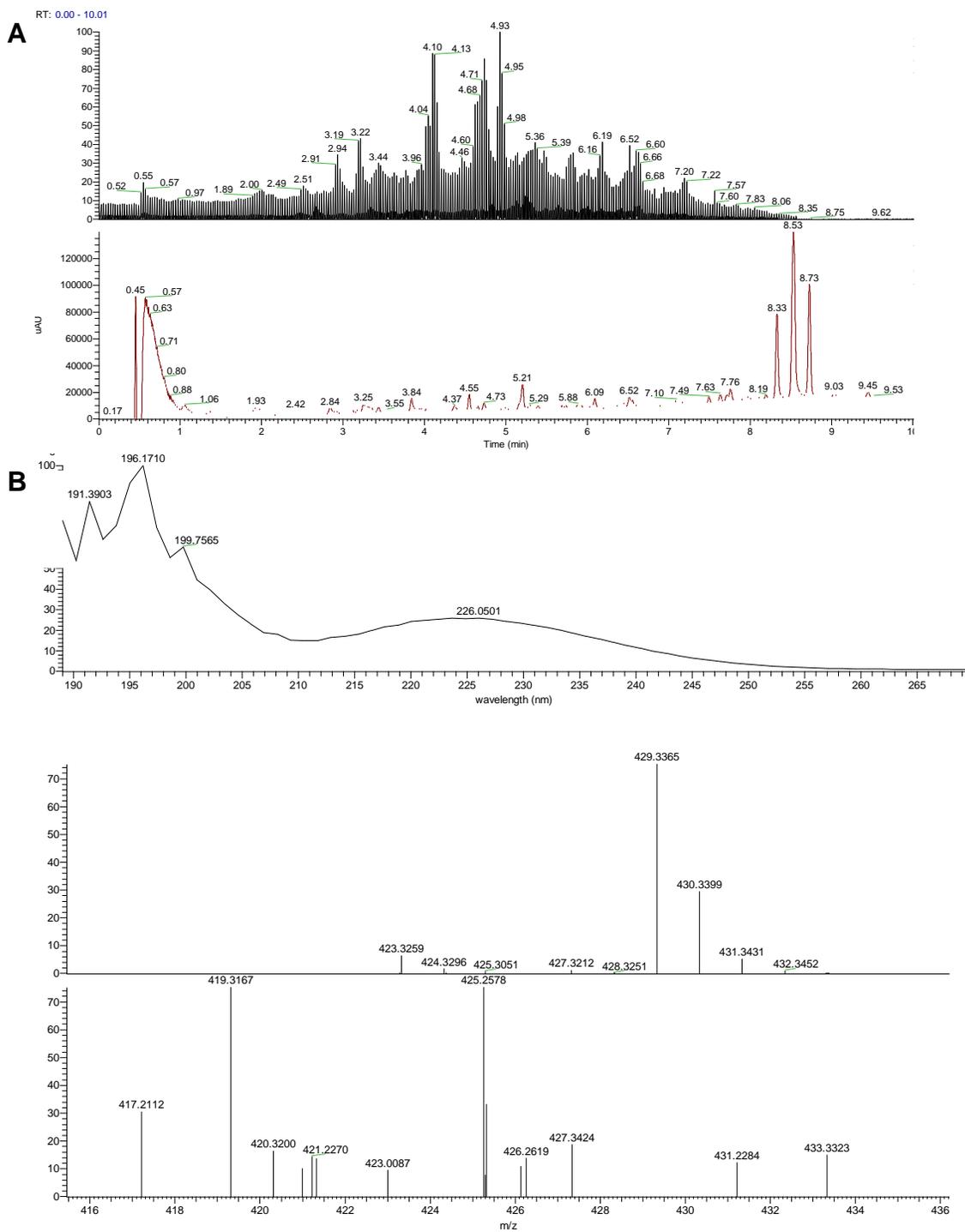


Figura 14. (A) Cromatogramas de iones totales (TIC) (arriba) y en el UV-PDA (abajo) de la fracción **CC6-16₄**; (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos negativo (centro) y positivo (abajo) del peróxido de ergosterol (1).

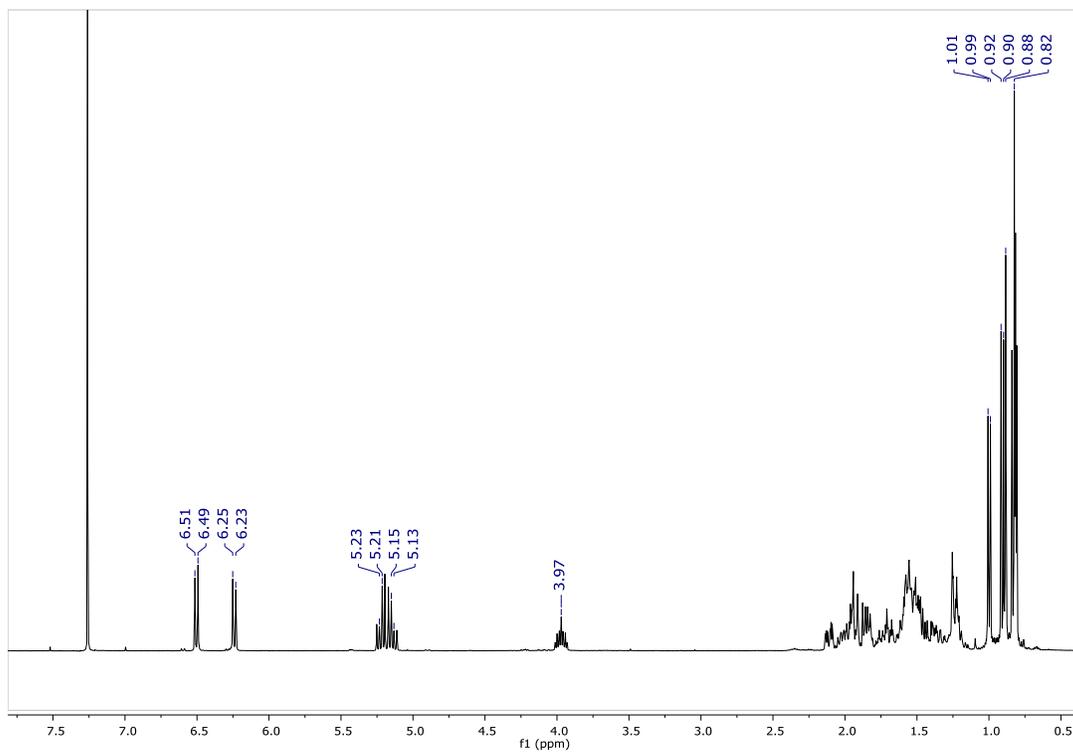


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H del peróxido de ergosterol (1) (400 MHz, CDCl₃).

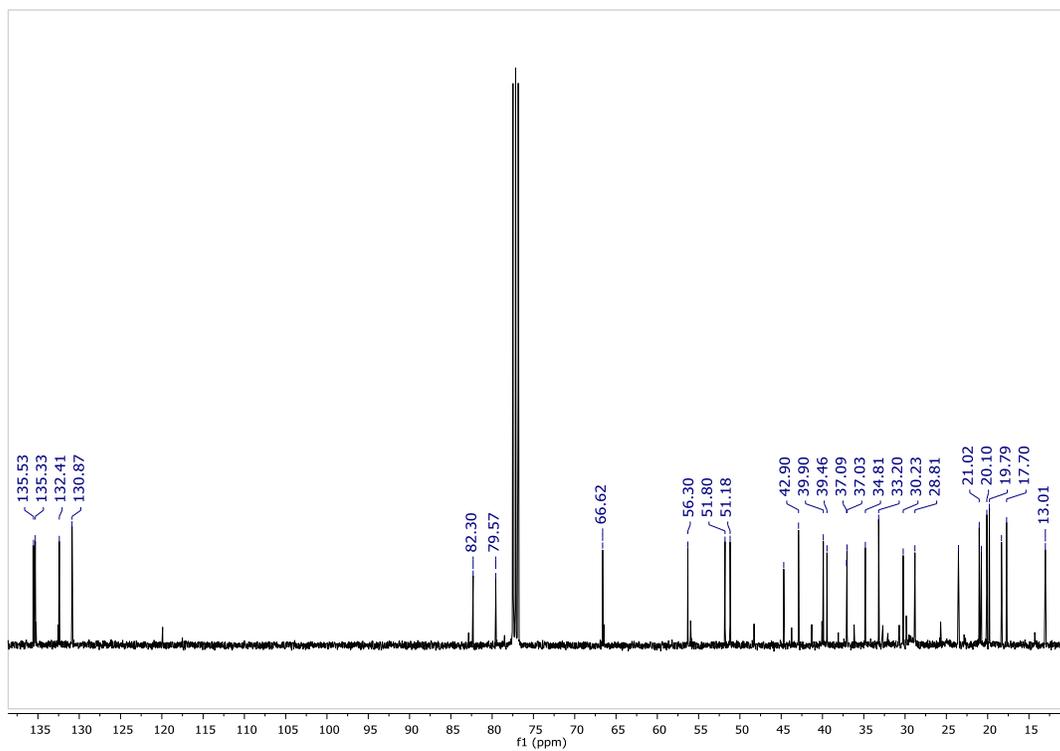
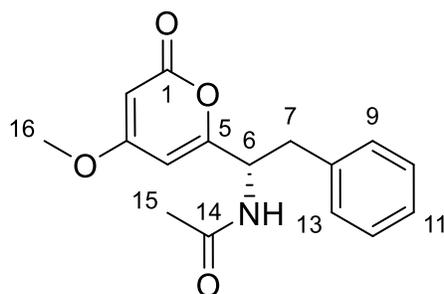


Figura 16. Espectro de RMN de ¹³C del peróxido de ergosterol (1) (100 MHz, CDCl₃).

El peróxido de ergosterol (**1**) ha sido aislado a partir de distintas fuentes naturales (por ejemplo: *Naematoloma fasciculare*, *Pleurotus ostreatus*, *Paecilomyces tenuines*, *Armillariella mellea*, *Inonotus radiatus*), y existen descripciones en la literatura sobre su potencial como agente antioxidante (Kim *et al.*, 1999), antibacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* (Duarte *et al.*, 2007), antiparasitario (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012; Meza-Menchaca *et al.*, 2015), inmunosupresor (Yasukawa *et al.*, 1996), antitumoral (Bok *et al.*, 1999; Yasukawa *et al.*, 1996) y citotóxico (Nam *et al.*, 2001).

6.5.2 Caracterización del pirofeno (**2**)



2

El compuesto **2** se aisló en forma de agujas, y su fórmula molecular determinada con base en el análisis detallado de los espectros de RMN (**Figuras 18–21**) y de masas generado por la técnica de ionización por electrospray en los modos positivo y negativo, se estableció como C₁₆H₁₇NO₄ (286.1086 uma [M+H]⁺, 289.1229 uma [M-H]⁻) y permite 9 grados de insaturación (**Figura 17**). Las señales características que establecieron la identidad del compuesto en los espectros de RMN se detallan a continuación:

a) En el espectro de RMN ¹³C (**Figura 19**) se observan señales para 16 carbonos, de las cuales dos pertenecen a grupos carbonilo en δ_H 171.0 y 169.6. Por otra parte, las correlaciones observadas en el experimento HSQC (**Figura 21**) permitieron evidenciar la presencia de seis metinos (δ_C/δ_H 129.2/7.11, 128.9/7.27,

127.3/7.23, 101.3/5.74, 88.6/5.41 y 52.5/5.00), un metileno (δ_C/δ_H 39.1/3.09), un grupo metoxilo (δ_C/δ_H 56.1/3.75) y un grupo metilo (δ_C/δ_H 23.4/1.96).

b) En el espectro de RMN 1H (**Figura 18**) se observó en δ_H 5.00 (q, $J = 8.00$ Hz) una señal diagnóstica con la presencia de un protón base de una función con nitrógeno (H-6), así como la señal en δ_H 5.95 (d, 8.5) característica de una función NH.

c) En δ_H 7.11 (m, H-9, H-13), 7.23 (m, H-11) y 7.27 (m, H-10, H-12) se observa un conjunto de señales en armonía con la presencia de un anillo aromático monosustituido. En δ_H 3.09 (d, $J = 7.6$ Hz) se observa una señal asignable a un grupo metileno, que en el espectro COSY (**Figura 20**) correlaciona con el protón H-6 del anillo aromático.

d) Las señales del anillo de 2-pirona presente en la molécula se observan en δ_H 5.41 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2) y 5.74 (d, $J = 2.2$ Hz, H-4) y corresponden con un arreglo de dos protones en *meta* orientados considerando el valor de la constante de acoplamiento.

e) Finalmente, en el espectro de RMN 1H en δ_H 3.75 (s) y 1.96 (s) se observa dos señales simples diagnósticas para la presencia de un grupo metoxilo y un grupo metilo (H-15).

En conjunto, estas observaciones aunadas a las correlaciones observadas en los experimentos COSY y HMBC (**Cuadro 10; Figura 23**) permitieron caracterizar al producto **2** con el nombre trivial de pirofeno.

El pirofeno (**2**) se aisló por primera vez a partir de la especie relacionada *A. niger*, éste es un metabolito representativo de la biosíntesis de aminoácidos, siendo algunos de sus precursores la fenilalanina o el ácido corísmico (Barnes *et al.*, 1990).

Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 500 MHz; ^{13}C 125 MHz; δ en ppm; J en Hz; CDCl_3) del pirofeno (**2**).

Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (J en Hz)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	164.4			
2	88.6	5.41, d (2.2)	4	3, 4
3	171.0			
4	101.3	5.74, d (2.2)	2	2, 3, 5, 6
5	161.3			
6	52.5	5.00, q (8.0)	7	4, 5, 7, 8, 14
7	39.1	3.10, d (7.6)	6, 9, 13	5, 6, 8, 9, 13
8	135.9		7, Me ₁₅	
9,13	129.2	7.11, m	10, 12	7, 9, 11, 13
10,12	128.9	7.27, m	9, 13	8, 10, 12
11	127.3	7.23, m	10, 12	9, 10, 12, 13
14	169.6			
Me ₁₅	23.4	1.96, s		14
Me ₁₆	56.1	3.75, s		3
NH		5.95, d (8.5)	6	

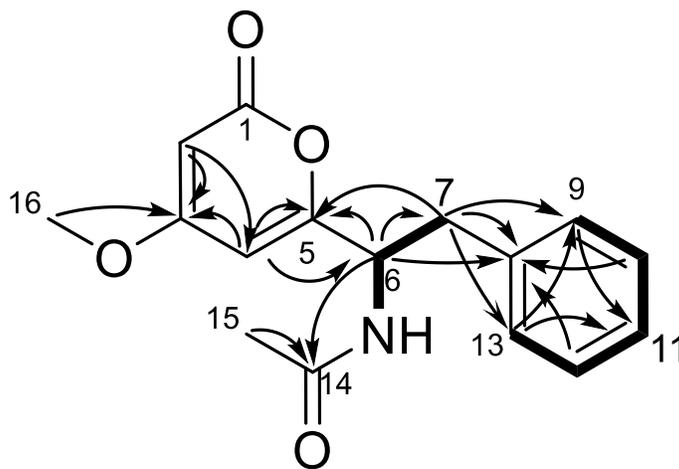


Figura 23. Correlaciones COSY (---) y HMBC (—) del pirofeno (**2**).

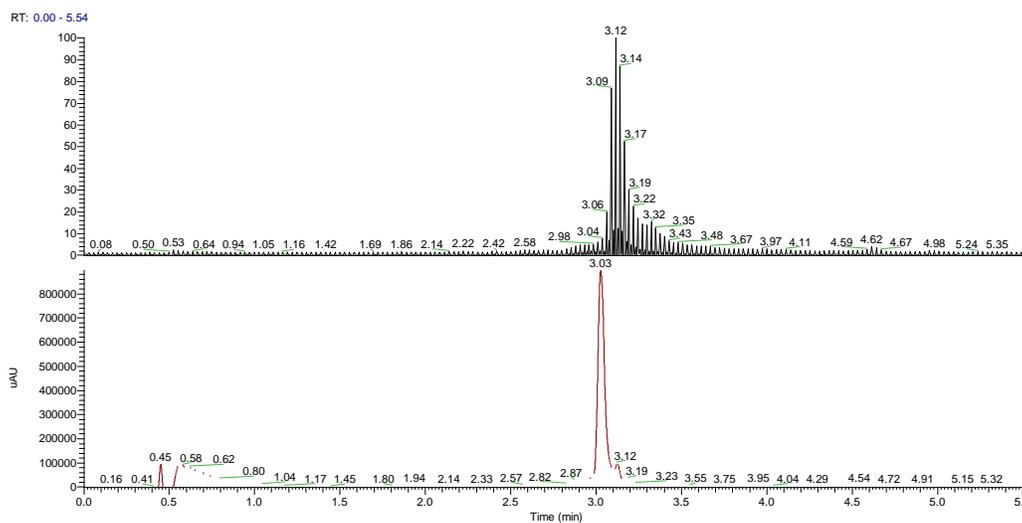
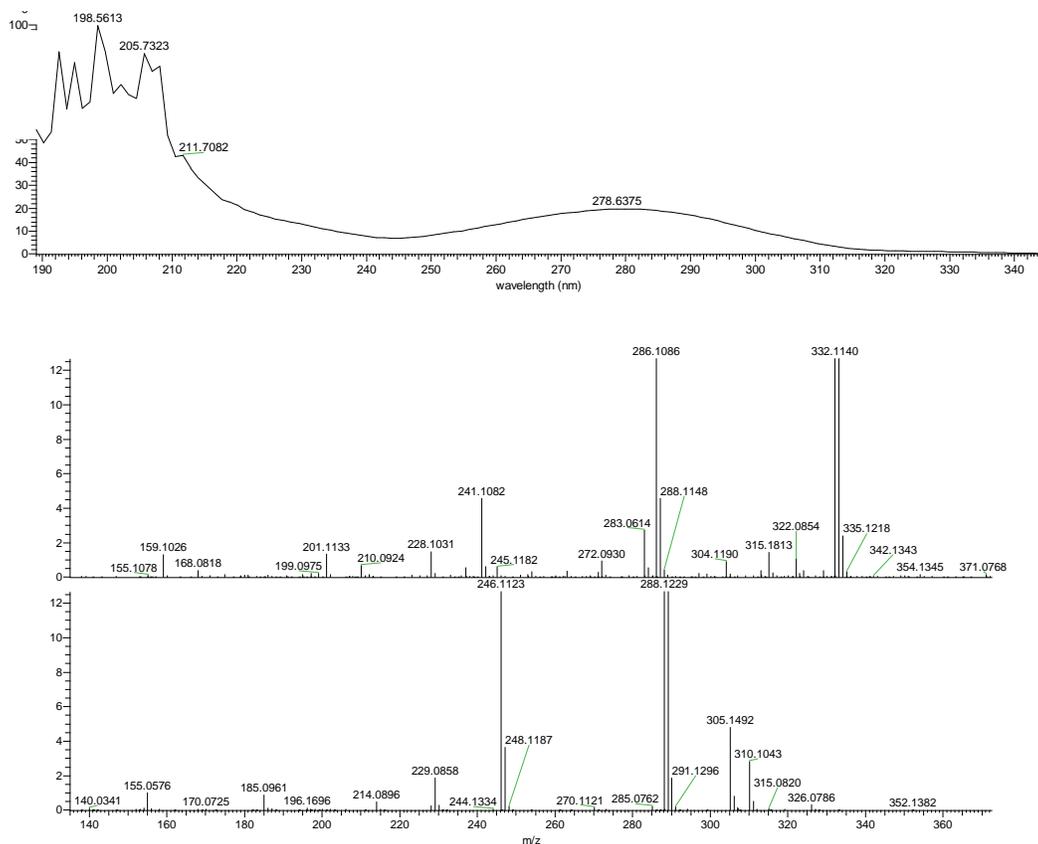
A**B**

Figura 17. (A) Cromatogramas de iones totales (TIC) (arriba) y en el UV-PDA (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) del pirofeno (**2**).

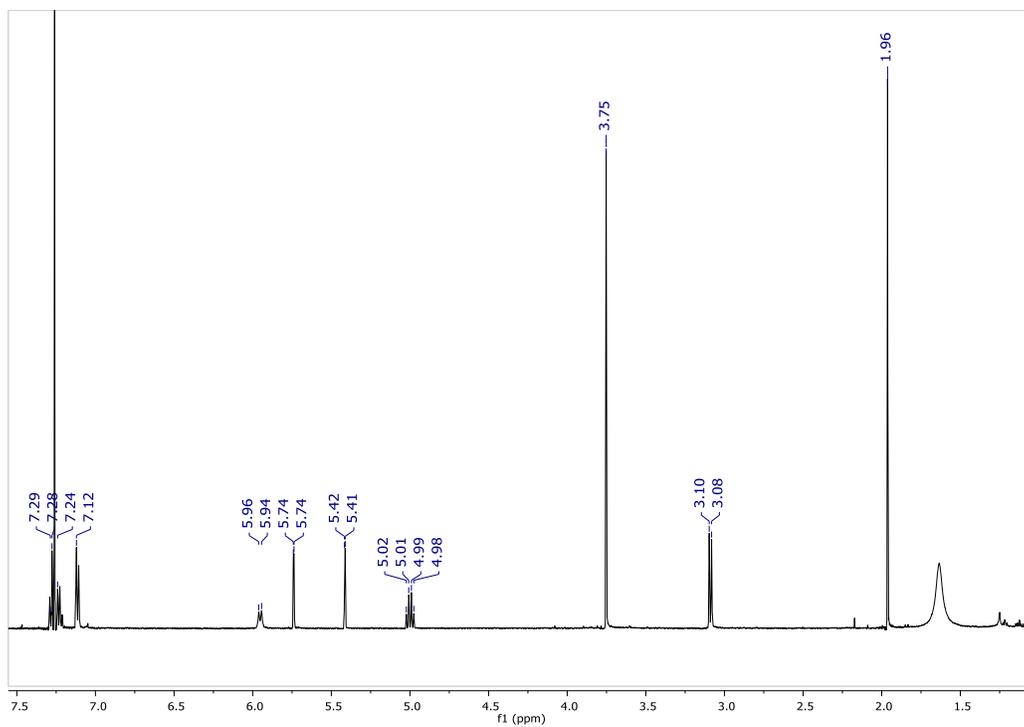


Figura 18. Espectro RMN de ¹H del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl₃).

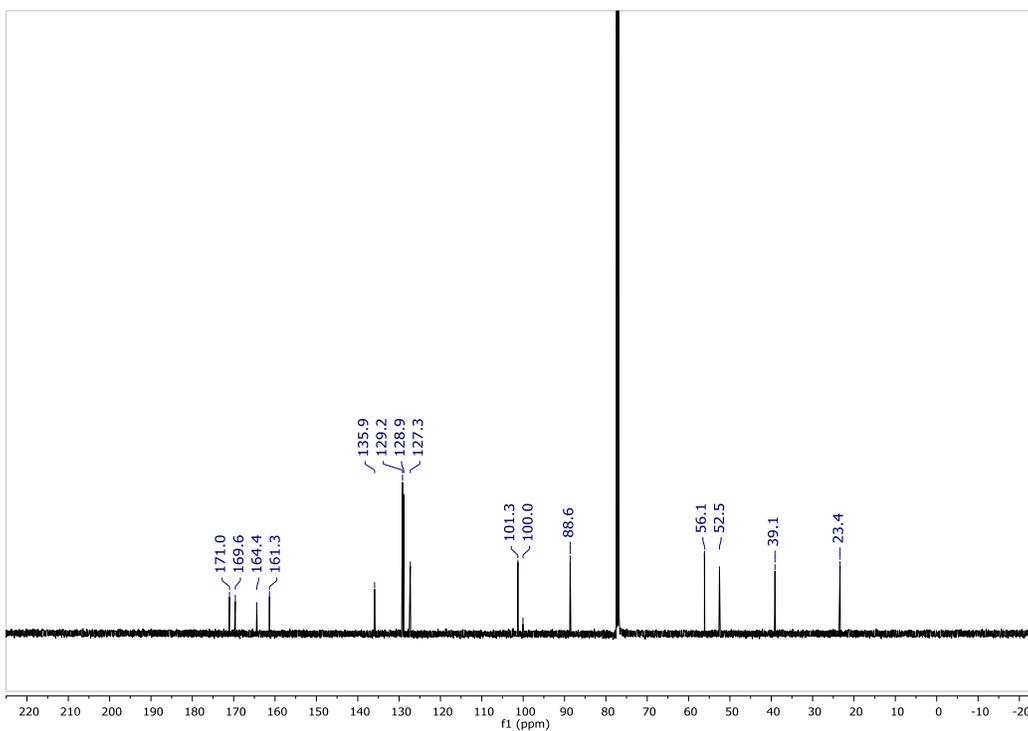


Figura 19. Espectro RMN de ¹³C del pirofeno (2) (125 MHz, CDCl₃).

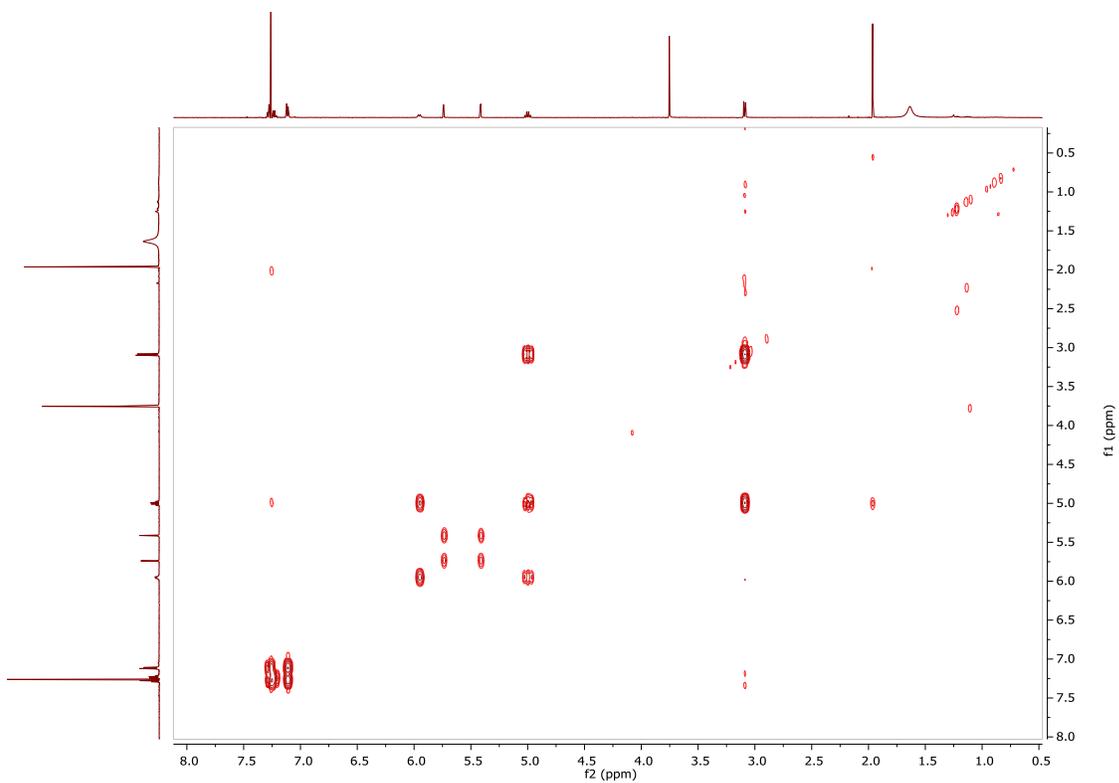


Figura 20. Espectro COSY del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl₃).

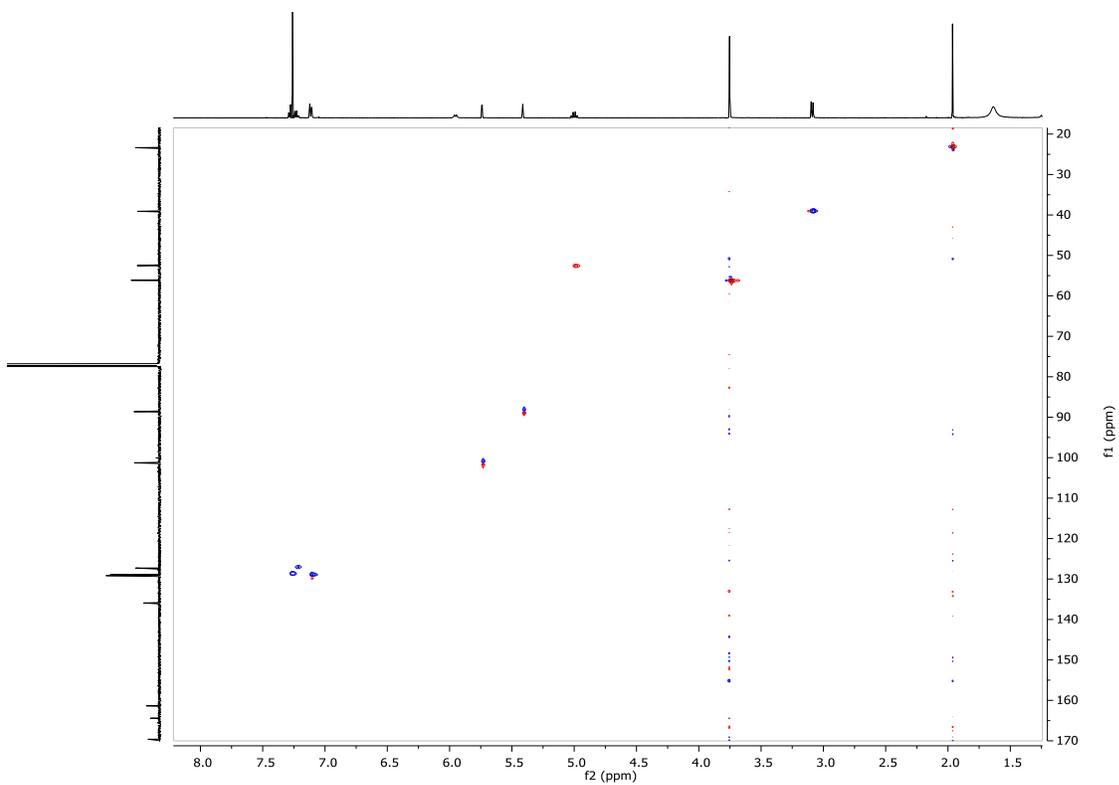


Figura 21. Espectro HSQC del pirofeno (2) (500 MHz, CDCl₃).

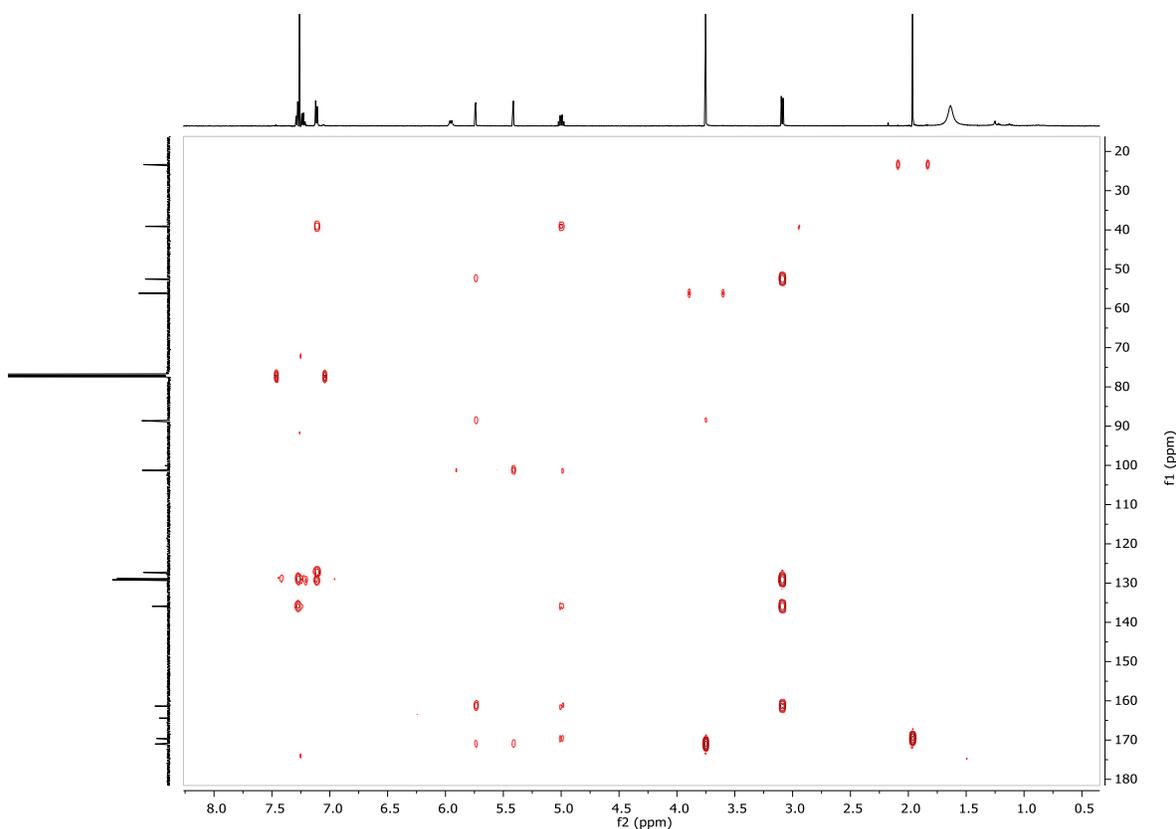
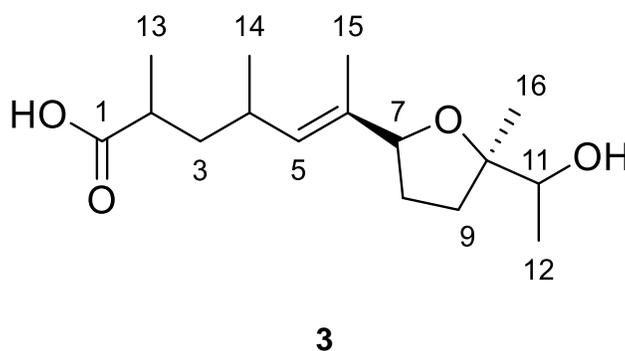


Figura 22. Espectro HMBC del pirofeno (**2**) (500 MHz, CDCl_3).

Por otra parte, también se ha descrito el aislamiento del producto **2** en fuentes diversas como *A. niger* EN-13, organismo endófito del alga marina *Colpomenia sinuosa*, recolectada en la costa de Qingdao, China (Zhang *et al.*, 2010); *Aspergillus* sp. aislado de *Piper crocatum* Ruiz & Pav (Astuti *et al.*, 2016); *Alternaria alternata* D2006, aislada de la especie de coral rojo *Denderonephthya hemprichi* recolectado en el Mar Rojo, en las costas de Safaga, Egipto (Shaaban *et al.*, 2012); *A. brasiliensis* (Varga *et al.*, 2007); *A. niger* endófito aislado de la planta medicinal *Zanthoxylum lemairei* en Kumba, Camerún (Talontsi *et al.*, 2013), *A. niger* AKRN especie asociada con las raíces de *Entandrophragma congoëense* en Yaounde, Camerún (Happi *et al.*, 2015); así como del organismo marino *A. niger* aislado a partir de la esponja *Hyrtios proteus* en el Caribe (Varoglu & Crews, 2000). Desde el punto de vista farmacológico, este compuesto presenta una actividad antimicrobiana de interés contra *Candida albicans* (Shaaban *et al.*, 2012)

y una actividad marginal contra las bacterias multirresistentes: *Enterobacter aerogenes* (CM64), *Enterobacter cloacae* (BM67), *Klebsiella pneumonia* (K2) y la bacteria de referencia *Escherichia coli* (ATCC8739 y ATCC10536) (Happi *et al.*, 2015), además de presentar una actividad citotóxica frente a las líneas celulares T47D (línea tumoral epitelial ductal de mama humana) y Vero (CI₅₀ 9.2 µg/mL y 109.0 µg/mL, respectivamente). El análisis del ciclo de las células T47D expuestas al pirofeno (**2**) a la concentración de 400 ng/mL mostró una mayor población de células en la fase S. Siendo el arresto de ésta, uno de los mecanismos que retrasa la progresión del ciclo celular como una respuesta a reguladores homeostáticos o daño en el ADN lo que implica una disminución en la tasa de replicación del ADN (Astuti *et al.*, 2016; Elledge, 2016). Finalmente, el producto **2** es poco tóxico en el ensayo de *Artemia salina* L. (10 µg/mL) (Shaaban *et al.*, 2012).

6.5.3 Caracterización del ácido aspérico (**3**)



El compuesto **3** se aisló como es un sólido amarillo de aspecto ceroso, con una fórmula C₁₆H₂₈O₄; *m/z* 285.2059 [M+H]⁺ y 283.1915 [M-H]⁻ determinada por HRESIMS, la cual permite tres grados de insaturación (**Figura 24**). El análisis detallado de los espectros de RMN uni- y bidimensionales del producto **3** se describe a continuación:

a) En el espectro de RMN ¹³C (**Figura 26**) se observan señales para 16 carbonos, asignables por las correlaciones observadas en el espectro HSQC

(**Figuras 25-30**) a un carbonilo de ácido δ_C 182.1, a cinco metinos (δ_C/δ_H 133.0/5.20, 87.4/4.34, 72.2/3.75, 39.3/2.36 y 31.2/2.49), tres metilenos (δ_C/δ_H 30.5/1.88; 41.2/1.39,1.69 y 30.3/2.22,1.54) y cinco metilos (δ_C/δ_H 25.1/1.19, 21.9/0.92, 17.9/1.14, 17.9/1.12 y 10.8/1.62).

b) En el espectro de RMN 1H (**Figura 25**) se observó una señal característica con la presencia de un protón vinílico en δ_H 5.20 (d, 9.8).

Estas observaciones (**Figura 30**), aunadas con los datos espectroscópicos descritos en la literatura permitieron caracterizar al producto **3** con el nombre trivial de ácido aspérico (**Cuadro 11**).

El ácido aspérico (**3**) fue aislado por primera vez de *A. niger* aislado de *Hyrtios proteus* (esponja marina del Caribe) (Varoglu & Crews, 2000), posteriormente se ha descrito su aislamiento a partir de *Rhizopus* sp. 2-PDA-61, proveniente del briozoo *Bugula* sp. en la bahía de Jiaozhou, China (Wang *et al.*, 2010), *A. phoenicis* (Pettit *et al.* 2009) y de *A. tubingensis* OY907 aislados de la esponja marina mediterránea *Ircinia variabilis* (Koch *et al.*, 2014). Este producto ha sido descrito como un agente citotóxico que inhibe de manera significativa el crecimiento de la línea celular P388 (leucemia linfocítica murina) con una DE_{50} de 0.18 $\mu g/mL$), así como de un panel de líneas celulares de cáncer humano (GI_{50} 1.7-2.0 $\mu g/mL$; páncreas, mama, SNC, pulmón, colon y próstata) (Pettit *et al.*, 2009).

Cuadro 11. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 500 MHz; ^{13}C 125 MHz; δ en ppm; J en Hz; CDCl_3) del ácido aspérico (**3**).

Posición	δ_{C}	δ_{H} (mult, J en Hz)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	182.1			
2	39.3	2.34, m	3, 3', Me ₁₃	1, 3, 4, Me ₁₃
3	41.2	1.39 (3), m 1.69 (3'), m	2, 3', 4, Me ₁₄ 2, 3, 4, Me ₁₄	2, 4, Me ₁₄ 1, 4, Me ₁₃
4	31.2	2.49, m	3, 3', 5, Me ₁₄	Me ₁₄
5	133.0	5.20, d (9.81)	4, Me ₁₅	7, Me ₁₅
6	134.8			
7	87.4	4.34, t (8.09)	8	8, 6, 9, Me ₁₅
8	30.5	1.88, m	7, 9, 9'	6, 7, 8, 9, 10
9	30.3	1.54 (9), dt (11.9, 4.6) 2.22 (9'), q (11.0, 10.5)	8, 9' 8, 9	7, 8, 9, 10, Me ₁₆ 8, 9, 10, 11, Me ₁₆
10	87.7			
11	72.2	3.75, q (6.4)	12	9, 10, 12, Me ₁₆
Me ₁₂	17.9	1.12, d (6.8)	11	10, 11
Me ₁₃	17.9	1.14, d (7.4)	2	1, 2
Me ₁₄	21.9	0.92, d (6.6)	3, 3', 4, 5	3, 4, 5
Me ₁₅	10.8	1.62, s	4	4, 5, 6, 7
Me ₁₆	25.1	1.19, s		9, 10, 11

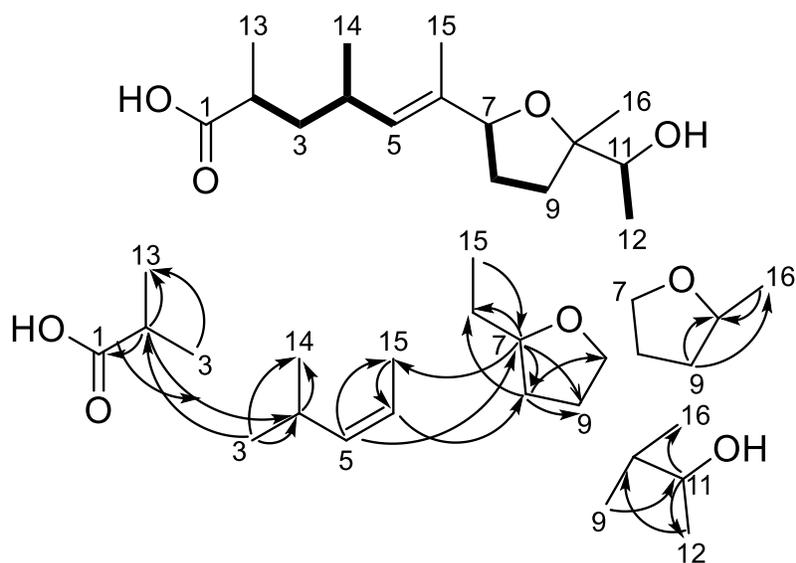


Figura 30. Correlaciones COSY (—) y HMBC (→) del ácido aspérico (**3**).

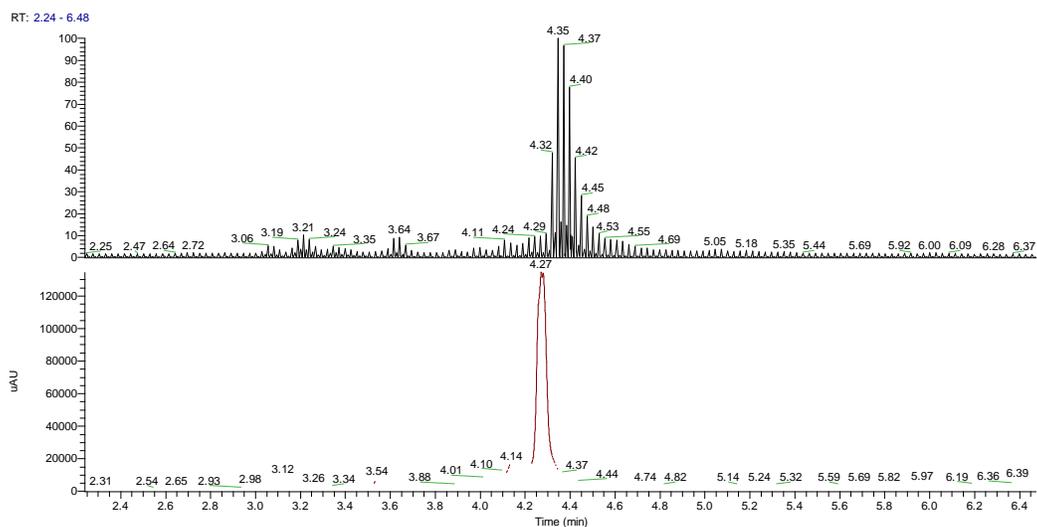
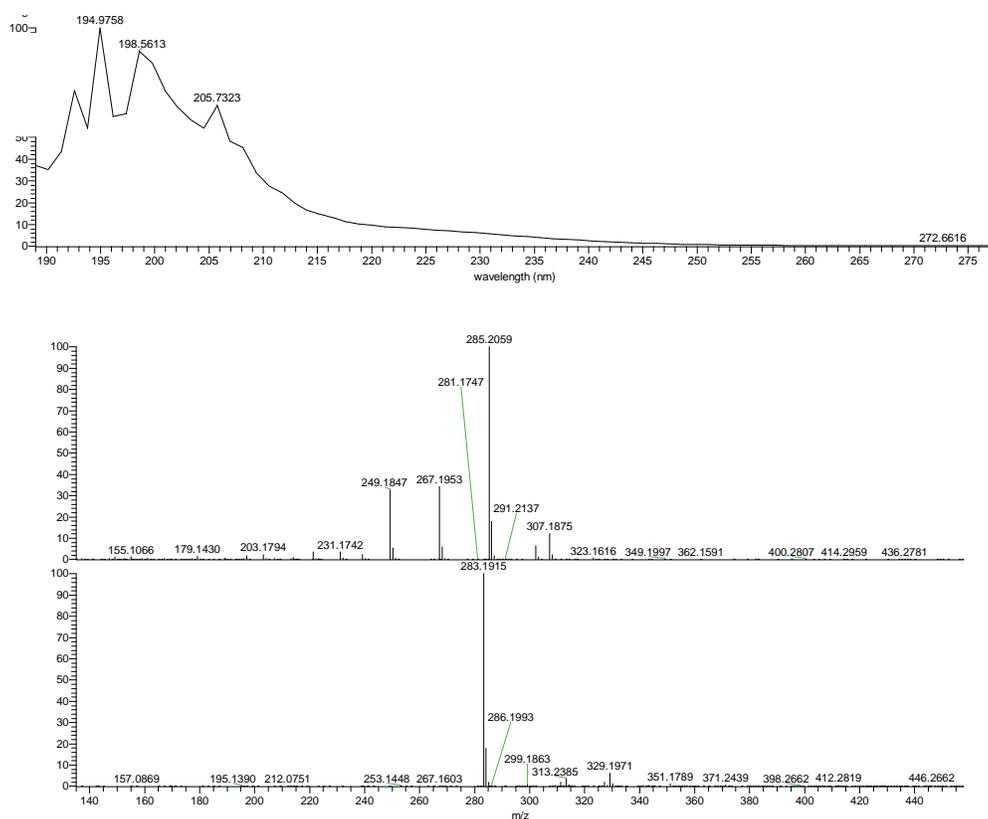
A**B**

Figura 24. (A) Cromatogramas de iones totales (TIC) (arriba) y en el UV-PDA (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) del ácido aspérico (**3**).

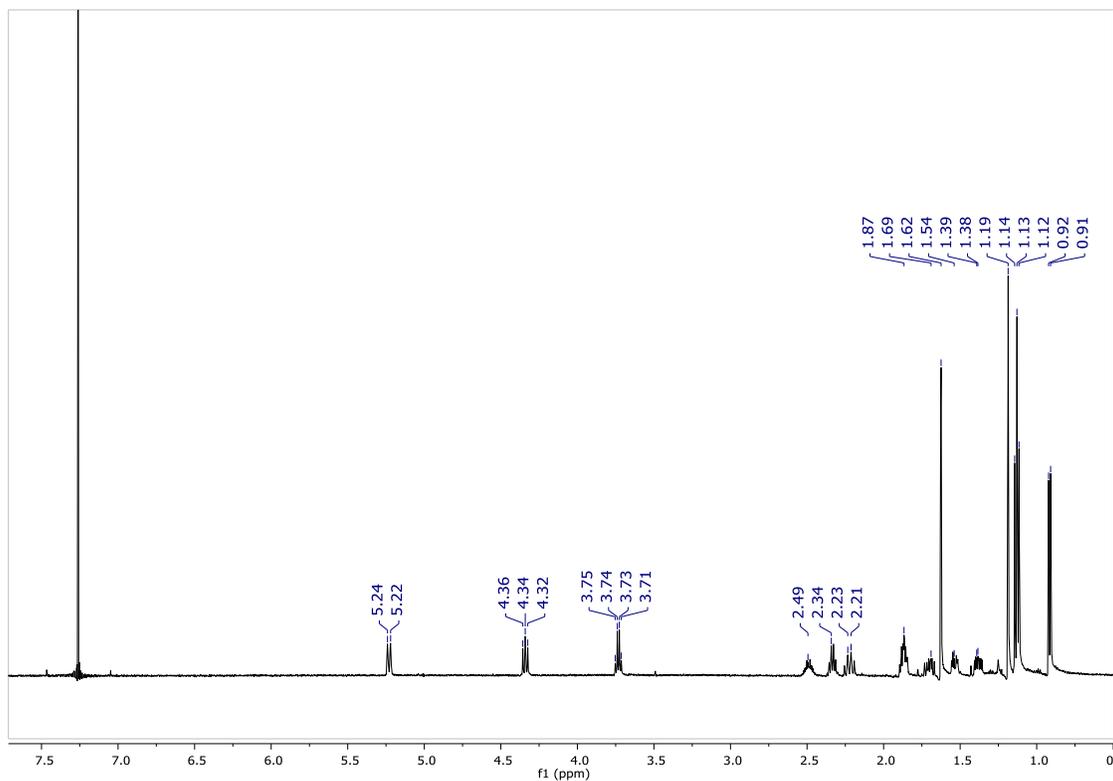


Figura 25. Espectro RMN de ^1H del ácido aspérico (**3**) (500 MHz, CDCl_3).

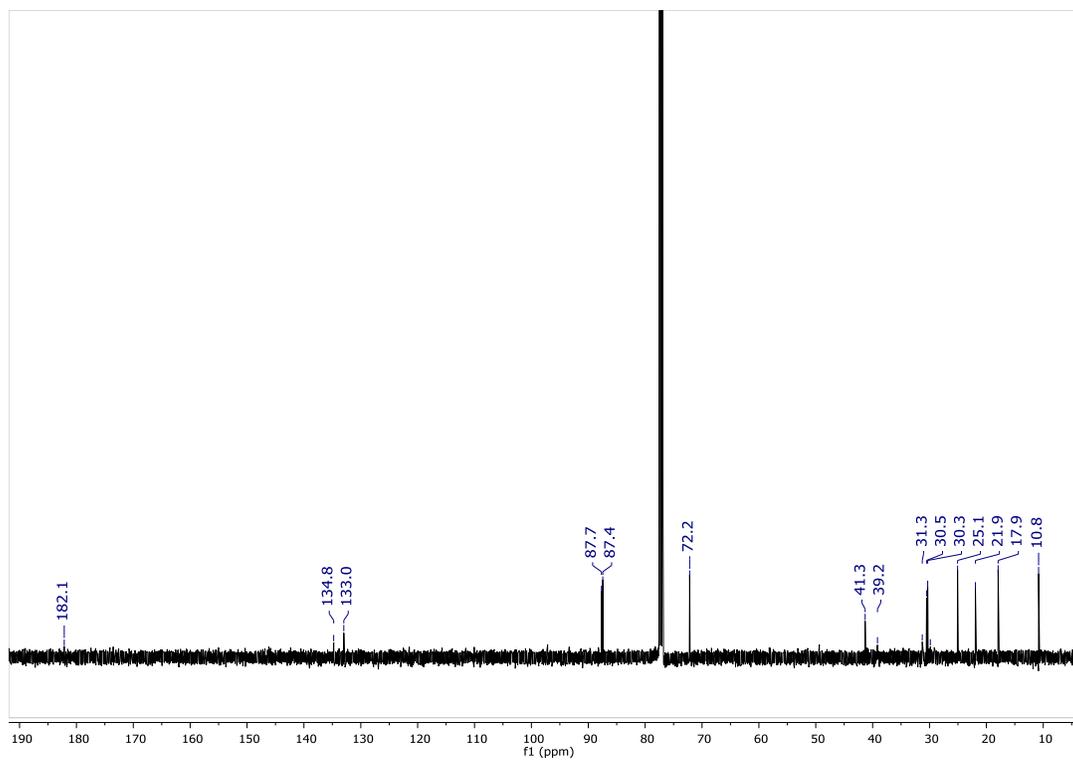


Figura 26. Espectro RMN de ^{13}C del ácido aspérico (**3**) (125 MHz, CDCl_3).

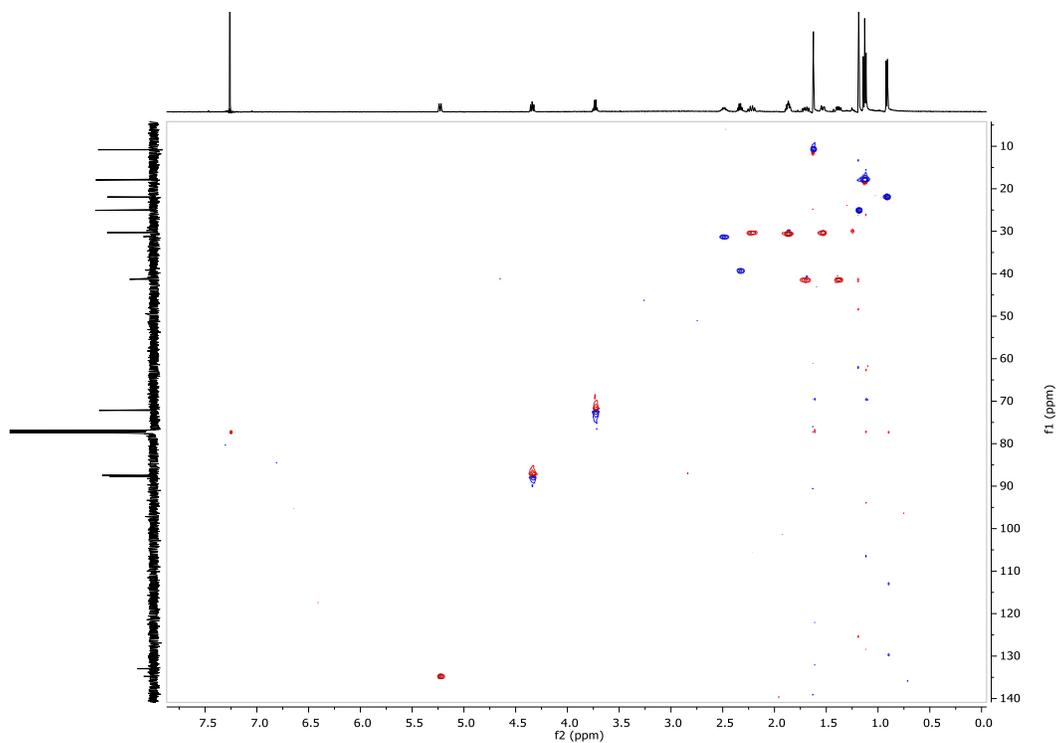


Figura 27. Espectro HSQC del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl_3).

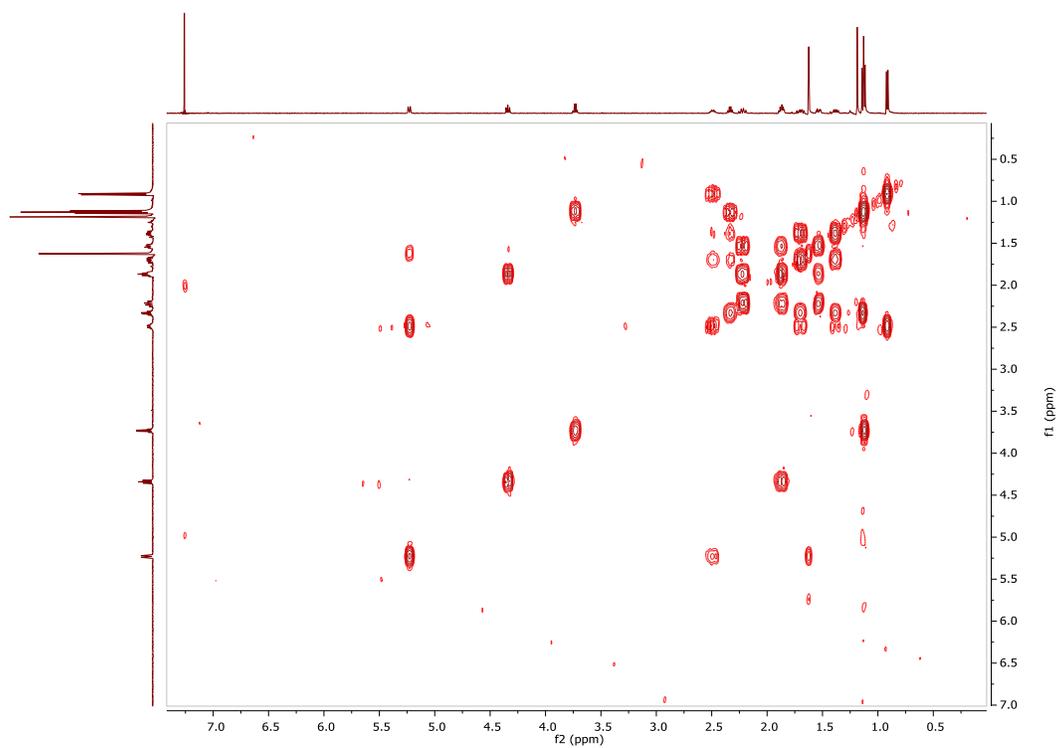


Figura 28. Espectro COSY del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl_3).

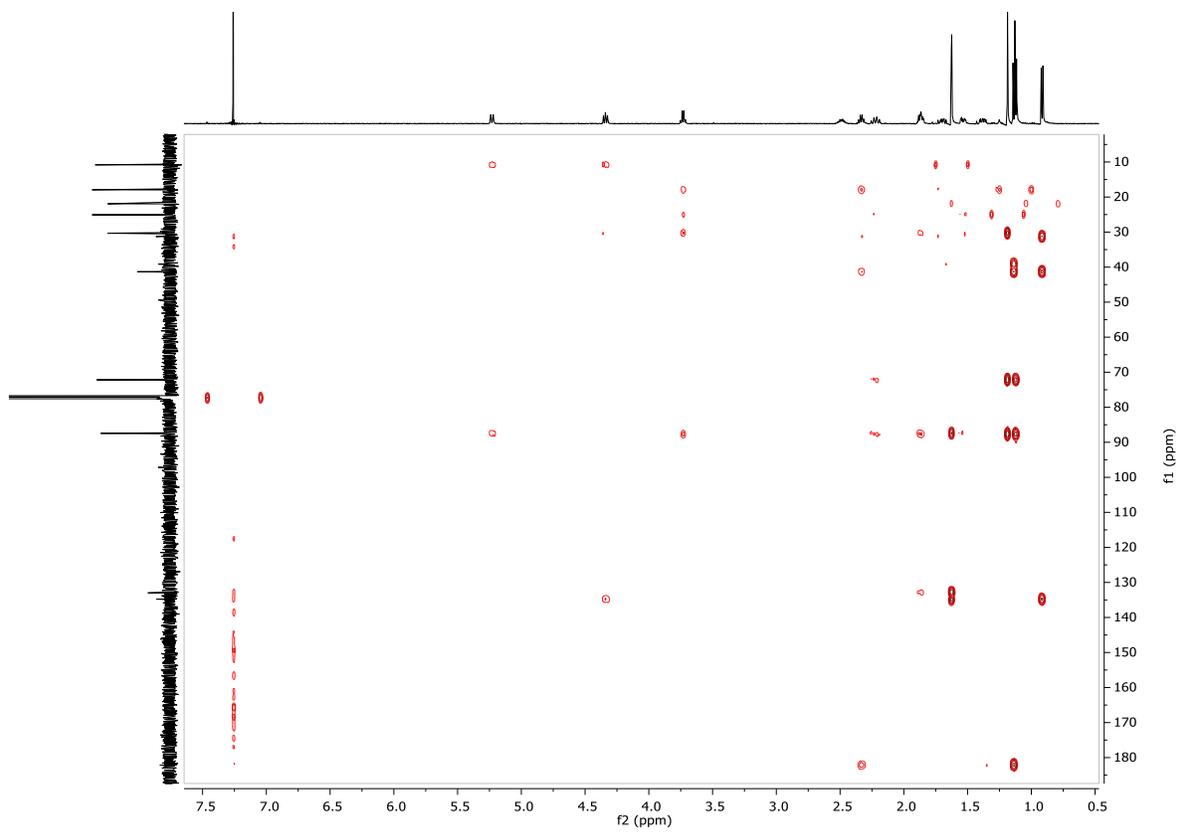


Figura 29. Espectro HMBC del ácido aspérico (3) (500 MHz, CDCl₃).

7. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento axénico de 46 taxa fúngicos saprótrofos: 10 organismos a partir de la muestra proveniente de Dunas de Yeso, 24 a partir de la muestra de placa microbiana sobre rocas recolectada en Pie de Montaña, Becerra, y 12 a partir de una muestra de suelo de Pie de Montaña Becerra.
- La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos, obtenidos a partir de los organismos fúngicos aislados, evidenció la capacidad de estos organismos para producir moléculas bioactivas, así como hizo posible la selección de una serie de taxa pertenecientes a la serie CC6 para el descubrimiento de compuestos biodinámicos.
- Los estudios de metabolómica realizados, permitieron identificar a los metabolitos producidos por cada organismo, incluyéndose las micotoxinas producidas por cada especie y otros componentes que posiblemente poseen moléculas novedosas con actividad antimicrobiana.
- El fraccionamiento del extracto orgánico obtenido a partir de la especie *Aspergillus* sp. (CC6-16) permitió el aislamiento y caracterización de tres productos naturales conocidos: el peróxido de ergosterol (1), pirofeno (2) y ácido aspérico (3) las cuales poseen actividades biológicas diversas y ya han sido estudiadas anteriormente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J. y Valenzuela, R., **2014**. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, S76-S81.
- Amann, R.I., Ludwig, W. y Schleifer, K.H., **1995**. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169..
- Amich, J., Vicentefranqueira, R., Leal, F. y Calera, J.A., **2010**. *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC* and *aspf2* genes. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 424-437.
- Aparicio-Cuevas, M.A., Rivero-Cruz, I., Sánchez-Castellanos, M., Menéndez, D., Raja, H.A., Joseph-Nathan, P., González, M.D.C. y Figueroa, M., **2017**. Dioxomorpholines and Derivatives from a Marine-Facultative *Aspergillus* Species. *Journal of Natural Products*, 80(8), 2311-2318..
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E. y Rahman, M.M., **2008**. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure– activity study. *J. Nat. Prod*, 71(8), 1427-1430.
- Astuti, P., Erden, W., Wahyono, S.W. y Hertiani, T., **2016**. Pyrophen Produced by Endophytic Fungi *Aspergillus* sp Isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pav Exhibits Cytotoxic Activity and Induces S Phase Arrest in T47D Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(2), 615-618.
- Bailly, C., **2009**. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*, 77(9), 1447–1457.
- Baker, S.E., Thykaer, J., Adney, W.S., Brettin, T.S., Brockman, F.J., D'haeseleer, P., Martinez, A.D., Miller, R.M., Rokhsar, D.S., Schadt, C.W. y Torok, T., 2008. Fungal genome sequencing and bioenergy. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 1-5.
- Barnes, C.L., Steiner, J.R., Torres, E., Pacheco, R. y Marquez, H., **1990**. Structure and absolute configuration of pyrophen, a novel pyrone derivative of L-

- phenylalanine from *Aspergillus niger*. *Chemical Biology & Drug Design*, 36(3), 292-296.
- Bennett, J.W., **2010**. *An overview of the genus Aspergillus* (1-17). Caizer Academic Press, Portland.
- Bills, G.F., Foster, M.S. y Mueller, G.M., **2004**. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods* (271-302). Academic Press.
- Blackwell, M., **2011**. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438.
- Bok, J.W., Lerner, L., Chilton, J., Klingeman, H.G. y Towers, G.N., **1999**. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51(7), 891-898.
- Butler, M.S. y Buss, A.D., **2006**. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 919–929.
- Carrano, L. y Marinelli, F., **2015**. The relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening. *Journal of Applied Bioanalysis*, 1(2), 55–67.
- Chambergo, F.S. y Valencia, E.Y., **2016**. Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2567–2577.
- Cragg, G.M. y Newman, D.J., **2013**. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695.
- Demain, A.L., **2014**. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 185–201.
- Duarte, N., Ferreira, M.J.U., Martins, M., Viveiros, M. y Amaral, L., **2007**. Antibacterial activity of ergosterol peroxide against *Mycobacterium tuberculosis*: dependence upon system and medium employed. *Phytotherapy Research*, 21(7), 601-604.
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B.M., Cech, N.B., Pearce, C.J. y Oberlies, N.H., **2013**. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural

- products. *Journal of Natural Products*, 76(9), 1709-1716.
- Elledge, S.J., **2016**. Cell Cycle Checkpoints : Preventing an Identity Crisis. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), 1664–1672.
- Elser, J.J., Schampel, J.H., Garcia-Pichel, F.E.R.R.A.N., Wade, B.D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A.N.A. y Farmer, J.D., **2005**. Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808-1825.
- Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L.J., Noguez, A.M. y Souza Saldivar, V., **2008**. Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1), 50-60.
- Ferrusquía Villafranca, I. y Zárata, S. **1998**. Geología de México: una sinopsis., *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF*, 689-713.
- Fierro, F. y Vaca, I., **2015**. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 6(9), 1–7.
- Frisvad, J.C. y Larsen, T.O., **2015**. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7859–7877.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. y Samson, R.A., **2007**. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59,1-10.
- Guzmán, G., **1998**. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 7(3), 369–384.
- Happi, G.M., Kouam, S.F., Talontsi, F.M., Nkenfou, C.N., Longo, F., Zühlke, S., Douanla-Meli, C. y Spiteller, M., **2015**. A new dimeric naphtho- γ -pyrone from an endophytic fungus *Aspergillus niger* AKRN associated with the roots of *Entandrophragma congoëse* collected in Cameroon. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 70(9), 625-630.
- Hawksworth, D.L., **1991**. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655.
- Hawksworth, D.L., **2001**. The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species

- estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432.
- Kahlos, K., Kangas, L. y Hiltunen, R., **1989**. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. *Planta Medica*, 55(4), 389-390.
- Keller, N.P., Turner, G. y Bennett, J.W., **2005**. Fungal Secondary Metabolism - From Biochemistry to Genomics. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(12), 937–947.
- Khan, A.A., Bacha, N., Ahmad, B., Lutfullah, G., Farooq, U. y Cox, R.J., **2014**. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(11), 859-870.
- Kim, D.S., Baek, N.I., Oh, S.R., Jung, K.Y., Kim, J.H. y Lee, H.K., **1997**. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Archives of Pharmacal Research*, 20(3), 201-205.
- Kim, S.W., Park, S.S., Min, T.J. y Yu, K.H., **1999**. Antioxidant activity of ergosterol peroxide (5, 8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 22E-dien-3 β -ol) in *Armillariella mellea*. *Bull Korean Chem Soc*, 20(7), 819-823.
- Koch, L., Lodin, A., Herold, I., Ilan, M., Carmeli, S. y Yarden, O., **2014**. Sensitivity of *Neurospora crassa* to a marine-derived *Aspergillus tubingensis* anhydride exhibiting antifungal activity that is mediated by the MAS1 protein. *Marine drugs*, 12(9), 4713-4731.
- Kusari, S., Hertweck, C. y Spiteller, M., **2012**. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*, 19(7), 792–798.
- Kwon, H.C., Zee, S.D., Cho, S.Y., Choi, S.U. y Lee, K.R., **2002**. Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 851-855.
- Liu, J.Y., Song, Y.C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z.J., Zou, W.X. and Tan, R.X., **2004**. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, 114(3), 279-287.

- Magnuson, J.K. y Lasure, L.L., **2002**. Fungal Diversity in Soils as Assessed by Direct Culture and Molecular Techniques. *102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City*, 19–23.
- Mahajan, G. y Balachandran, L., **2014**. Biodiversity in Production of Antibiotics and Other Bioactive Compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 147(3), 37–58.
- Meyer, V., Wu, B. y Ram, A.F.J., **2011**. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: Current status and perspectives. *Biotechnology Letters*, 33(3), 469–476.
- Meza-Menchaca, T., Suárez-Medellín, J., Ángel-Piña, D. y Trigos, Á., **2015**. The amoebicidal effect of ergosterol peroxide isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*, 29(12), 1982-1986.
- Mishra, B.B. y Tiwari, V.K., **2011**. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4769–4807.
- Mishra, Y. y Singh, A., **2014**. Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, S8(1),.2.
- Nam, K.S., Jo, Y.S., Kim, Y.H., Hyun, J.W. y Kim, H.W., **2001**. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, 69(2), 229-237.
- Pettit, G.R., Du, J., Pettit, R.K., Knight, J.C. y Doubek, D.L., 2009. Antineoplastic agents. 575. The fungus *Aspergillus phoenicis*. *Heterocycles*, 79(C), 909-916.
- Ramos-Ligonio, A., López-Monteon, A. y Trigos, Á., **2012**. Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*, 26(6), 938-943.
- Redfield, A.C., **1934**. On the proportions of organic derivatives in a sea water and their relation to the composition of plankton. *James Johnstone Memorial Volume*, 177-192.
- Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E. y Mata, R., **2011**. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *Journal of Food Science*, 76(2), 309-317.

- Schmit, J.P. y Mueller, G.M., **2007**. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 99–111.
- Sette, L.D., Pagnocca, F.C. y Rodrigues, A., **2013**. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 2–8.
- Shaaban, M., Shaaban, K.A. y Abdel-Aziz, M.S., **2012**. Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 1-8.
- Schatz, A., Bugle, E. y Waksman, S.A., **1944**. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66-69.
- Souza, V., Siefert, J.L., Escalante, A.E., Elser, J.J. y Eguiarte, L.E., **2012**. The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, 12(7), 641-647.
- Sugiyama, J., Rahayu, E.S., Chang, J.M. y Oyaizu, H., **1991**. Chemotaxonomy of *Aspergillus* and associated teleomorphs. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 32(2S), 39-60
- Talontsi, F.M., Tatong, M.D.K., Dittrich, B., Douanla-Meli, C. y Laatsch, H., **2013**. Structures and absolute configuration of three α -pyrones from an endophytic fungus *Aspergillus niger*. *Tetrahedron*, 69(34), 7147-7151.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A. y Smith, M.E., **2014**. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213), 1078.
- Tepšič, K., Gunde-Cimerman, N. y Frisvad, J.C., **2006**. Growth and mycotoxin production by *Aspergillus fumigatus* strains isolated from a saltern. *FEMS Microbiology Letters*, 157(1), 9–12.
- Tian, Y., Qin, X., Lin, X., Kaliyaperumal, K., Zhou, X., Liu, J., Ju, Z., Tu, Z. y Liu, Y., **2015**. Sydoxanthone C and Acremolin B produced by deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. *The Journal of Antibiotics*, 68(11), 703-706.

- Traxler, M.F. y Kolter, R., **2015**. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Natural Products Reports*, 32(7),956–970.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. y Keller, N.P., **2004**. Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1398-1411.
- Vadlapudi, V., Borah, N., Yellusani, K.R., Gade, S., Reddy, P., Rajamanikyam, M., Vempati, L.N.S., Gubbala, S.P., Chopra, P., Upadhyayula, S.M. y Amanchy, R., **2017**. *Aspergillus* Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of *Aspergillus* genus. *Nature Scientific Reports*, 7(1), 7325.
- Varga, J., Kocsube, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M. y Samson, R.A., **2007**. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1925-1932.
- Varoglu, M. y Crews, P., **2000**. Biosynthetically Diverse Compounds from a Saltwater Culture of Sponge-Derived *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 63, 41–43.
- Wang, F., Zhu, T., Zhang, M., Lin, A., Zhu, W. y Gu, Q., **2010**. Structural determination of aspericins A-C, new furan and pyran derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus* sp. 2-PDA-61, by 1D and 2D NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(2), 155-158.
- WDCM, 2017.
http://gcm.wfcc.info/strains.jsp?strain_number=&strain_name=Aspergillus&marklog=strainnamelist. Revisado: 29 de noviembre de 2017.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T. y Takido, M., **1996**. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(4), 573-576.
- Zhang, H., Tang, Y., Ruan, C. and Bai, X., **2016**. Bioactive secondary metabolites from the endophytic *Aspergillus* genus. *Records of Natural Products*, 10(1), 1.

Zhang, Y., Li, X.M., Feng, Y. y Wang, B.G., **2010**. Phenethyl- α -pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Natural Product Research*, 24(11), 1036-1043.

9. ANEXO

1. Cartel presentado en en el 52° Congreso Mexicano de Química, Puerto Vallarta, Jalisco, México (26-29 de septiembre, 2017):

Estudio químico y biológico de organismos fúngicos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Cartel. Carlos Antonio Fajardo Hernández, Mario Figueroa.



ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE ORGANISMOS FÚNGICOS DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA, MÉXICO

Carlos Antonio Fajardo Hernández y Mario Figueroa

Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, CDMX 04510, México.



INTRODUCCIÓN

Como parte de un proyecto de investigación enfocado a la búsqueda de nuevas entidades químicas bioactivas a partir de organismos fúngicos, se realizó la evaluación del potencial antimicrobiano (ensayo de microdilución con MTT) y los análisis de derreplicación por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS sobre una serie de hongos saprófitos aislados de la reserva de Cuatro Ciénegas (CC). Esta región representa un importante reservorio de biodiversidad dentro del desierto de Coahuila, debido a los niveles altos de endemismo y a las propiedades oligotróficas inusuales del medio ambiente (Figura 1).¹



Figura 1. Localización geográfica de la reserva de CC y vistas de la montaña Becerra.

RESULTADOS

A partir de los fermentados en medio sólido (arroz húmedo) de 24 taxa fúngicos aislados de una muestra de placa microbiana recolectada en la base de la montaña Becerra, CC (Figura 2), se prepararon los correspondientes extractos orgánicos en pequeña escala mediante maceración y procesos de partición. Todos los extractos fueron evaluados contra las bacterias Gram positivo (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), Gram negativo (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*) y la levadura *Candida albicans*,² además de ser sometidos a un proceso de derreplicación vía UPLC-PDA-HRESIMS/MS contra una base de datos construida *in house* y que contiene más de 300 micotoxinas.³ Los resultados de los ensayos se resumen en la Tabla 1 y la Figura 3. Se puede observar que la mayoría de las cepas fueron activas principalmente contra *B. subtilis* y *S. aureus*, además de que mediante la comparación de los tiempos de retención, perfiles en el UV y espectros de masas de alta resolución por electro spray (HRESIMS-MS/MS) en los modos positivo y negativo de los extractos, se identificaron una serie de metabolitos secundarios de tipo policétido, terpenos y péptidos.

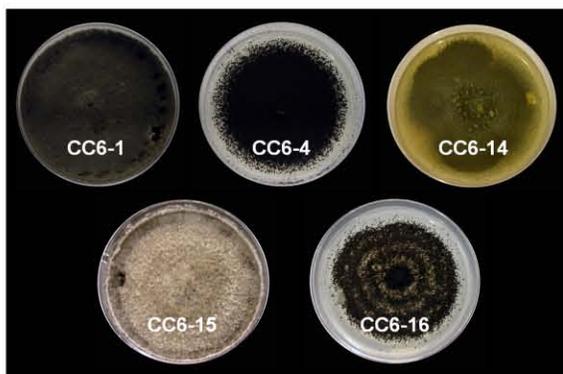


Figura 2. Ejemplos selectos de los taxones fúngicos aislados a partir de una muestra de placa microbiana recolectada en la base de la montaña Becerra.

Tabla 1. Potencial antimicrobiano y rendimiento de los extractos orgánicos de los organismos fúngicos aislados de la muestra de placa microbiana de la reserva de CC.

Extracto	Peso (mg)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC6-1	159.8					
CC6-4	125					
CC6-5	74.2					
CC6-6	30.8					
CC6-7	69.2					
CC6-8	45.2					
CC6-9	103.9					
CC6-12	90.0					
CC6-14	51.6					
CC6-15	112.2					
CC6-16	261.0					
CC6-17	75.0					
CC6-18	42.8					
CC6-21	112.2					
CC6-22	247.4					
CC6-23	231.1					
CC6-24	29.9					
Control positivo CIM (µg/mL):		0.8	0.2	3.9-7.6	1.6	12.5

Criterios de actividad:

- Inhibición total a 200 y 20 µg/mL
- Inhibición total a 200 y parcial a 20 µg/mL
- Inhibición total a 200 µg/mL
- Inhibición parcial a 200 µg/mL
- Ampicilina
- Nistatina

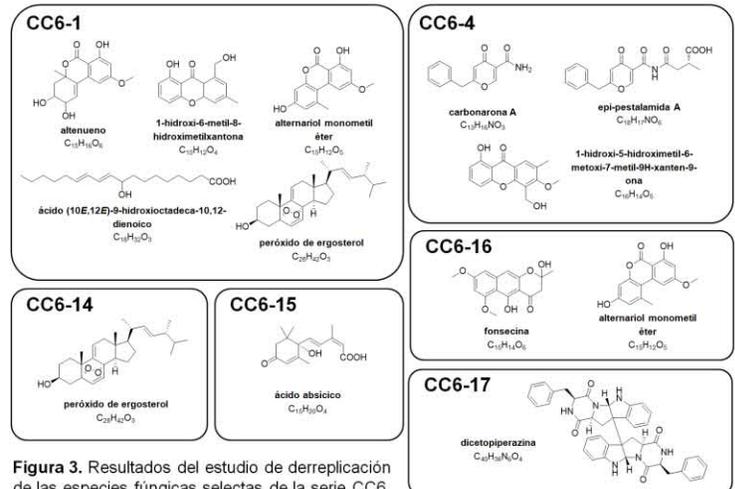


Figura 3. Resultados del estudio de derreplicación de las especies fúngicas selectas de la serie CC6.

CONCLUSIONES

Los organismos fúngicos aislados de la reserva de CC presentan actividad biológica significativa contra la serie de organismos ensayados. Además, se logró identificar mediante los estudios de derreplicación, diversos metabolitos secundarios pertenecientes a las categorías de los policétidos, terpenos y péptidos, y que pueden ser responsables parcialmente la actividad antimicrobiana. La selección de los taxones más activos nos permitirá obtener nuevas moléculas biodinámicas con potencial para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

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 Saldivar, y a la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo PAIP 5000-9145.

REFERENCIAS

- Souza, V. *et al. Astrobiology*, 2012, 12, 641–647;
- Rivero-Cruz, I. *et al. J. Food Sci.*, 2011, 76 (2), 309–317;
- El-Elmat, T. *et al., J. Nat. Prod.* 2013, 76 (9), 1709–1716.