



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS DE CUATRO CIÉNEGAS COAHUILA, PARA EL
DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. OSMALY VILLEDAS HERNÁNDEZ

**TUTOR DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX; JUNIO 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. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Facultad de Química, UNAM
VOCAL:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Facultad de Química, UNAM
VOCAL:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Instituto de Química, UNAM
VOCAL:	Dr. Martín González Andrade, Facultad de Medicina, UNAM
SECRETARIO:	Dr. José Alberto Rivera Chávez, 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):

- Potencial antimicrobiano de hongos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Cartel. Osmaly Villedas Hernández y Mario Figueroa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por contribuir en mi formación profesional y académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero brindado durante mis estudios de Posgrado en la UNAM (CVU/Becario: 739590/596738), 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 todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A los Dres. Valeria Souza y Luis Eguiarte del Instituto de Ecología, UNAM por proporcionar las muestras para 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 realización de los análisis de metabolómica, espectros de RMN e identificación taxonómica de las especies fúngicas de estudio.

Al Q.F.B Alejandro Camacho, por proporcionar las cepas utilizadas para el ensayo antimicrobiano.

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 las aportaciones realizadas durante la revisión de este trabajo.

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

INDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. ANTECEDENTES	
1.1 Los hongos microscópicos como fuente para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.	1
1.2 Importancia del descubrimiento de nuevos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes a fármacos.	5
1.3 Hongos extremófilos y su importancia biológica.	6
1.4 Reserva Ecológica de Cuatro Ciénegas, Coahuila (RECCC).	6
1.5 Estrategias de metabolómica para el descubrimiento de nuevas moléculas activas de origen microbiano.	8
1.6 Generalidades de las especies fúngicas.	9
1.6.1 <i>Alternaria</i> sp.	9
1.6.2 Familia Coniothyriaceae.	10
1.6.3 <i>Aspergillus</i> sp.	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	14
3.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio.	15
3.2 Identificación taxonómica de las especies objeto de estudio.	15
3.3 Preparación de cultivos en pequeña escala y preparación de los extractos orgánicos.	16
3.4 Evaluación del efecto antimicrobiano.	17
3.5 Estudios de metabolómica.	18
3.6 Preparación de extractos orgánicos en mediana escala.	19
3.7 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala.	19
3.8 Aislamiento y purificación del peróxido de ergosterol (1) y el 5,8- <i>epi</i> -	20

dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (2).	20
3.9 Aislamiento y purificación de la monocilina I (3).	22
3.10 Aislamiento y purificación de la neosartorina (4).	24
3.11 Caracterización estructural de los metabolitos aislados.	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Selección primaria y obtención de los extractos orgánicos de las especies fúngicas aisladas.	26
4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana y estudios de metabolómica de los extractos orgánicos en pequeña escala de las series CC1, CC5, CC8 y CC9.	27
4.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana.	27
4.2.2 Estudios de metabolómica.	29
4.3 Identificación taxonómica.	31
4.4 Estudio químico de las especies fúngicas seleccionadas.	32
4.4.1 Fraccionamiento preliminar y evaluación biológica.	32
4.4.2 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de la especie <i>Alternaria</i> sp (CC5-8).	34
4.4.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de la especie <i>Coniothyriaceae</i> sp. (CC5-11).	40
4.4.4 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de la especie <i>Aspergillus</i> sp. (CC5-13).	44
5. CONCLUSIONES	50
6. PERSPECTIVAS	51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8. ANEXO	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales grupos de antibióticos comercializados.	3
2	Mapa satelital de México y la RECCC.	7
3	Estrategia general de metabolómica de los extractos fúngicos (tomado de El-Elimat <i>et al.</i> , 2013).	9
4	Estrategia experimental general para el estudio químico y biológico de los organismos fúngicos objeto de estudio.	14
5	Cultivos fúngicos en pequeña escala en medio sólido de las especies objeto de estudio.	17
6	Evaluación de la actividad antimicrobiana empleando la técnica de microdilución con el colorante MTT.	18
7	Fraccionamiento primario por cromatografía tipo flash de los extractos orgánicos.	20
8	Cromatograma por cromatografía tipo flash del fraccionamiento primario del extracto CC5-8 (UV/ELSD). Fracciones resultantes del fraccionamiento primario.	21
9	Cromatogramas por HPLC analítico de la fracción CC5-8 ₅ . a) Detector UV, $\lambda = 254$ nm y b) Detector ELSD. c) Cromatograma por HPLC preparativo de la fracción CC5-8- ₅ . Condiciones de análisis: Sistema de elución: MeCN y ácido fórmico en agua (0.1%); Flujo: 21.24 mL/min. Picos: 1 t_R 15.6 min; 2 t_R 16.5 min.	22
10	Cromatograma por cromatografía tipo flash del fraccionamiento primario del extracto CC5-11 (UV/ELSD). Fracciones resultantes del fraccionamiento primario.	23
11	Cromatogramas por HPLC analítico de la fracción CC5-11 ₅ . a) Detector UV, $\lambda = 254$ nm y b) Detector ELSD.	23
12	Cromatograma por cromatografía tipo flash del fraccionamiento primario del extracto CC5-13 (UV/ELSD). Fracciones resultantes del fraccionamiento primario.	24
13	Cromatogramas por HPLC analítico de la fracción CC5-13 ₄ . a) Detector UV, $\lambda = 254$ nm y b) Detector ELSD.	25
14	Ejemplos selectos de los taxones fúngicos aislados pertenecientes	27

	a las series CC1, CC5, CC8 y CC9.	
15	Cultivos axénicos de las especies fúngicas seleccionadas para su estudio químico.	31
16	Espectro de masas del peróxido de ergosterol (1) generado por la técnica de electrospray en modo positivo (EM-ESI ⁺).	35
17	Espectro de ¹ H RMN del peróxido de ergosterol (1).	36
18	Espectro de masas generado por la técnica de electrospray en modo positivo (EM-ESI ⁺) del 5,8- <i>epi</i> -dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (2).	37
19	Espectros de RMN (A) ¹ H, (B) ¹³ C y (C) HSQC del 5,8- <i>epi</i> -dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (2).	39
20	Espectros de masas generados por la técnica de electrospray en los modos de ionización positivo (A) y negativo (B) de la monocilina I (3).	42
21	Espectros de RMN (A) ¹ H y (B) ¹³ C de la monocilina I (3).	44
22	Espectros de masas generados por la técnica de electrospray en los modos de ionización positivo (A) y negativo (B) de la neosartorina (4).	46
23	Espectros de RMN de (A) ¹ H y (B) ¹³ C de la neosartorina (4).	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ejemplos selectos de fármacos obtenidos de organismos fúngicos.	2
2	La penicilina y su derivado semisintético ceftobiprol.	3
3	Grupos más importantes de antibióticos provenientes de hongos filamentosos. ¹	4
4	Algunas micotoxinas producidas por hongos del género <i>Alternaria</i> .	10
5	Compuestos aislados de especies del género <i>Conithyrium</i> .	11
6	Ejemplos de metabolitos producidos por especies del género <i>Aspergillus</i> .	12
7	Tipo de muestra y coordenadas de muestreo en la RECCC.	15
8	Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio a partir de las muestras colectadas de la RECCC.	26
9	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos en pequeña escala.	28
10	Resultados preliminares de los estudios de metabolómica de las especies fúngicas de la serie CC5.	29
11	Resultados de la evaluación antimicrobiana de los extractos y fracciones de las especies fúngicas seleccionadas.	33
12	Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) del peróxido de ergosterol (1).	36
13	Datos espectroscópicos de RMN (¹ H 400 MHz/ ¹³ C 100 MHz; CDCl ₃) del 5,8- <i>epi</i> -dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (2).	38
14	Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) de la monocilina I (3).	43
15	Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) de la neosartorina (4).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius	MeCN	Acetonitrilo
µg	Microgramos	MeOH	Metanol
µL	Microlitros	mg	Miligramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MH	Müller Hinton
APD	Agar papa dextrosa	MHz	Megahertz
CDCl₃	Cloroformo deuterado	min	Minutos
CHCl₃	Cloroformo	mL	Mililitros
δ_C	Desplazamiento químico de carbono	mm	Milímetros
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno	MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido	nm	Nanómetros
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	OMS	Organización Mundial de la Salud
EM	Espectrometría de masas	p/v	Relación peso/volumen
ESI	Técnica de ionización por electrospray	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
g	Gramos	ppm	Partes por millón
Gram (-)	Gram negativo	psi	Libras por pulgada cuadrada
Gram (+)	Gram positivo	RECCC	Reserva Ecológica de Cuatro Ciénegas Coahuila
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
Hz	Hertz	RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
ITS	Espaciador interno de transcripción	rpm	Revoluciones por minuto
kcal	Kilocalorías	TIC	Corriente total de iones
kV	Kilovolts	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultraeficiencia
MDR	Microorganismos multifármacoresistentes	UV	Espectroscopia en el ultravioleta

		YESD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa
--	--	-------------	--

Resumen

Este proyecto de investigación se enfocó en la bioprospección de microorganismos de zonas inexploradas de nuestro país, específicamente de la Reserva Ecológica de Cuatro Ciénegas Coahuila (RECCC), con la finalidad de encontrar nuevas entidades químicas con actividad antimicrobiana.

Para ello, inicialmente se realizó el aislamiento axénico de 44 taxones fúngicos a partir de distintas muestras de suelo, placa microbiana y sedimentos de la RECCC, los cuales fueron cultivados en medio sólido en pequeña escala y posteriormente se obtuvieron sus extractos orgánicos. A continuación, se evaluó el potencial antimicrobiano de cada uno de los extractos mediante el ensayo de microdilución con el colorante MTT y, de forma paralela, se realizaron estudios de metabolómica a través la técnica UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS. Con base en los resultados de ambos ensayos, se seleccionaron cinco especies fúngicas para continuar con un estudio químico biodirigido. Dichas especies fueron identificadas con el marcador molecular ITS como *Epicoccum nigrum* (CC5-5), *Alternaria* sp. (CC5-8), *Didymellaceae* sp. (CC5-10), *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) y *Aspergillus* sp. (CC5-13).

El estudio químico biodirigido del extracto orgánico de la especie *Alternaria* sp (CC5-8) permitió el aislamiento de dos moléculas tipo esteroidal identificadas como peróxido de ergosterol (**1**) y el 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11), 22 trien-3-ol (**2**), este último descrito por primera vez para una especie en el género *Alternaria*. Por otra parte, el fraccionamiento del extracto orgánico de la especie *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) condujo al aislamiento y caracterización de la monocilina I (**3**), la cual se obtuvo por primera vez a partir de una especie perteneciente a la familia Coniothyriaceae. Finalmente, el análisis químico del extracto orgánico de la especie *Aspergillus* sp. (CC5-13) llevó a la obtención del neosartorina (**4**), un policétido aislado también por primera vez de una especie fúngica de la RECCC.

Así, los estudios químicos y biológicos realizados durante este proyecto de investigación permitieron enriquecer el conocimiento acerca de la diversidad fúngica de la RECCC, y del potencial químico de estos organismos para la producción de moléculas con actividad antimicrobiana.

Abstract

This research project is focused on the bioprospecting of microorganisms from unexplored areas of our country, specifically the Ecological Reserve of Cuatro Ciénegas Coahuila (RECCC); the purpose of this work is to find new chemical entities from fungal organisms with antimicrobial activity for the development of new drugs.

First, the axenic isolation of 44 fungal taxa from soil samples from the RECCC was performed; then, the fungi were cultured in solid media to later obtain the small-scale extracts of each of the species by maceration and solvent partitioning techniques. The antimicrobial potential of each of the extracts was evaluated by the microdilution test with the MTT dye and derreplicated by UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS. Based on the activity from the antimicrobial assay and the results of the derreplication studies, five fungal species were selected to continue with the medium-scale bioguided chemical study and were identified taxonomically by ITS analysis as *Epicoccum nigrum* (CC5-5), *Alternaria* sp. (CC5-8), *Didymellaceae* sp. (CC5-10), *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) and *Aspergillus* sp. (CC5-13).

The bioguided chemical study of the species *Alternaria* sp (CC5-8), led to the isolation and characterization of two steroidal molecules: ergosterol peroxide (**1**) and 5,8-epidioxysterosta-6,9(11), 22 trien-3-ol (**2**). The latter is reported for the first time from the *Alternaria* genus. Additionally, the fractionation of the organic extract of the species *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) led to the isolation of monocillin I (**3**), which is described for the first time in the Coniothyriaceae family. Finally, the bioguided fractionation of the organic extract of the species *Aspergillus* sp. (CC5-13) resulted in the isolation of the polyketide neosartorin (**4**), which is also isolated for the first time for a fungus from the RECCC.

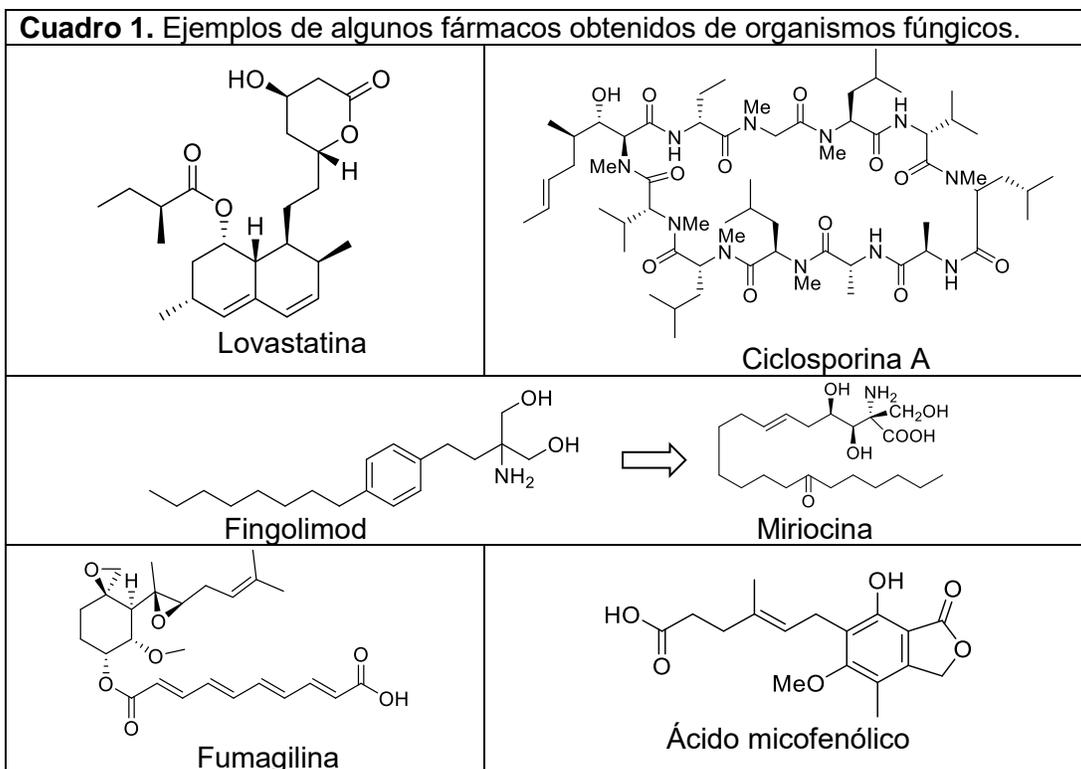
Thus, the chemical and biological studies carried out during this research project enriched the knowledge about the fungal diversity of the RECCC and the chemical potential of these organisms to produce molecules with antimicrobial activity.

1. ANTECEDENTES

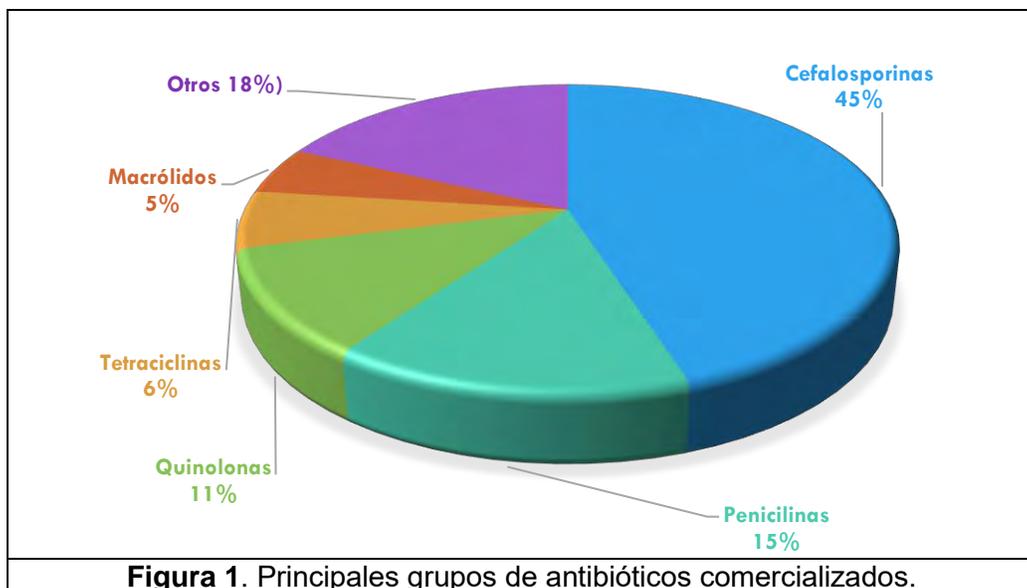
1.1 Los hongos microscópicos como fuente para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

A lo largo de la historia, los microorganismos han demostrado ser una de las fuentes más importantes de moléculas con actividad biológica y que han sido utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades. Estudios recientes sobre genomas microbianos han revelado que sólo una pequeña parte de los genes son empleados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, además se estima que cada microorganismo es capaz de producir alrededor de 50 compuestos diferentes.² Así, de los más de 23,000 compuestos bioactivos aislados a partir de microorganismos, donde el 42% provienen de hongos y el 32% de actinomicetos,² éstos representan sólo una pequeña parte del universo de posibles compuestos novedosos aún por descubrir.

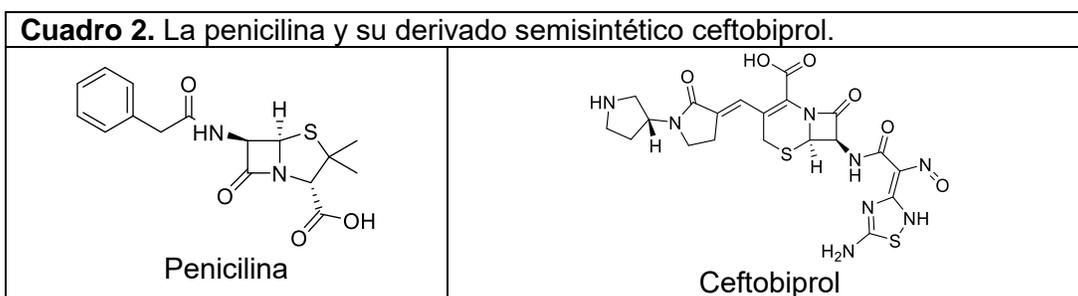
En el caso específico de los organismos fúngicos, a la fecha se han descrito taxonómicamente alrededor de 120,000 especies y se estima que podrían existir entre 2.2 y 3.8 millones en el planeta.³ Por otra parte, de los 25,000 taxones que han sido estudiados químicamente para la obtención de moléculas bioactivas, alrededor del 80% de los compuestos obtenidos presentan actividad como agentes antimicrobianos, antitumorales, antivirales, antifúngicos, inmunosupresores, y para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, algunas afecciones del corazón, depresión, diabetes, hipercolesterolemia, entre otras. Algunos de los compuestos más relevantes con aplicación terapéutica se encuentra la lovastatina, agente hipocolesteromiente aislado del hongo *Aspergillus terreus*;⁴ las ciclosporinas, inmunosupresores producidos por las especies *Trichoderma* sp. y *Tolyocladium* sp. ;⁵ la miriocina aislada de *Isaria sinclairii* y que sirvió de base para el desarrollo del fingolimod, agente inmunomodulador en el tratamiento de la esclerosis múltiple;⁶ la fumagilina, aislada de la especie *Aspergillus fumigatus* y empleada contra la microsporidiosis;² y el ácido micofenólico, producido por *Penicillium stoloniferum* y aprobado como inmunosupresor para disminuir el rechazo a trasplantes (**Cuadro 1**).² En este contexto, los metabolitos fúngicos representan una fuente persistente de novedosos prototipos de fármacos.⁷



En el caso específico de los antibióticos, en la literatura científica se encuentran reportadas más de 350 sustancias que han llegado al mercado mundial, siendo muchas de ellas moléculas obtenidas a partir de fuentes naturales.⁸ De éstas, las cefalosporinas (45%), las penicilinas (15%), las quinolonas (11%), las tetraciclinas (6%) y los macrólidos (5%) son las más utilizadas, seguido de los aminoglicósidos, las ansamicinas, los glicopéptidos, los lipopéptidos y los olienos (**Figura 1**).² Actualmente, y debido a la problemática que representa la aparición de microorganismos resistentes a fármacos (MDR), existe una necesidad por nuevos antibióticos que sean capaces de hacer frente a esta situación.

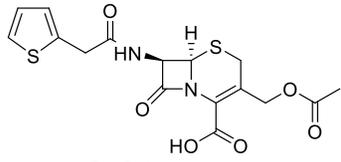
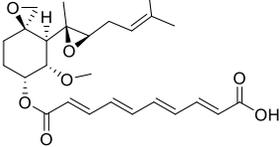
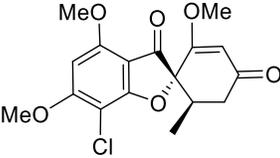
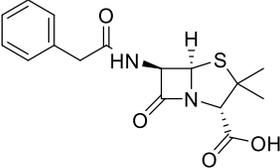
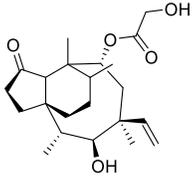
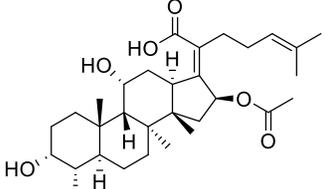


En este contexto, y a partir del descubrimiento fortuito de la penicilina en 1925 de cultivos de *Staphylococcus* contaminados con *Penicillium notatum* (**Cuadro 2**), se abrió una nueva era en la quimioterapia contra las infecciones bacterianas.⁹ Este hecho condujo, además, la intensificación en la investigación de las fuentes naturales para el descubrimiento de otros compuestos, lo que resultó en que casi todas las clases nuevas de antibióticos de origen natural hasta 1962.¹⁰ Por otra parte, se han desarrollado numerosos derivados sintéticos y semisintéticos contra los MDR.¹¹ Por ejemplo, recientemente el compuesto ceftobiprol, un derivado de cefalosporina aislado de hongos del género *Acremonium*, ha sido aprobado para su uso contra cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina (**Cuadro 2**).¹²



Los antibióticos aislados a partir de hongos presentan una amplia gama de estructuras y mecanismos de acción, lo cual reafirma la tendencia de que éstos siguen siendo un recurso natural idóneo para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. El espectro antimicrobiano de los compuestos de origen fúngico abarca

bacterias Gram (+) y (-), y algunos protistas unicelulares del género *Amoeba*.¹ Los grupos más importantes de antibióticos, su espectro de acción, blanco celular y organismos productores, se incluyen en el **Cuadro 3**:

Cuadro 3. Grupos más importantes de antibióticos provenientes de hongos filamentosos.¹			
Antibiótico	Fuente natural	Espectro de acción	Blanco celular
 <p>Cefalosporina</p>	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Amplio espectro	Pared celular
 <p>Fumagilina</p>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Microsporidiosis y amibas	Enzima metionina-aminopeptidasa 2
 <p>Griseofulvina</p>	<i>Penicillium griseofulvum</i> , <i>P. nigricans</i> , <i>P. urticae</i> .	Dermatofitos en piel, cabello y uñas	Microtúbulos en hongos
 <p>Penicilinas</p>	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Cephalosporium acremonium</i> .	Bacterias Gram (+)	Pared celular
 <p>Pleuromutilina</p>	<i>Pleurotus mutilus</i> , <i>P. passeckerianus</i>	Bacterias Gram (+)	Micoplasma
 <p>Ácido fusídico</p>	<i>Fusidium coccineum</i> , <i>Acremonium fusidioides</i>	Procariontes y eucariontes	Translocación ribosomal

Finalmente, los hongos microscópicos tienen la ventaja de que pueden producir los compuestos de interés de forma sustentable y en grandes cantidades.¹³ También, es

importante mencionar la capacidad que tienen estos microorganismos para sintetizar metabolitos secundarios con núcleos estructurales inusuales, y que además pueden ser útiles en la industria, cosmética, así como herramientas de investigación.¹⁴

1.2 Importancia del descubrimiento de nuevos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes a fármacos.

A partir de la década de los años cincuenta, la esperanza de vida de los seres humanos se ha visto favorecida debido, en gran parte, por el uso de antibióticos, los cuales han disminuido sustancialmente las amenazas asociadas con las enfermedades infecciosas que en años anteriores solían ser intratables o mortales.¹⁵ Sin embargo, la resistencia a estos agentes se ha extendido en todos los tipos de enfermedades infecciosas, como las ocasionadas por bacterias, protozoarios, hongos y virus. Se ha establecido que dicha resistencia ocurre cuando los microorganismos sufren cambios genéticos al estar expuestos continuamente a los antibióticos, y que les permiten sobrevivir aún sometidos a las más altas dosis de fármacos. Cabe mencionar que la prescripción injustificada de antibióticos, su dispensación inadecuada, y la poca regulación sobre la venta de medicamentos que permite la automedicación, son algunos de los factores por los que se incrementan el fenómeno de la resistencia cruzada o múltiple (MDR) a los antibióticos.¹⁶

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones por MDR afectan a todos los países, y los pacientes con dichas infecciones tienen un mayor riesgo de resultados clínicos negativos que conlleven a la muerte.¹⁶ Así, en 2017, esta misma organización publicó una lista de 12 familias de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.¹⁷ En este sentido, la necesidad de buscar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana a partir de fuentes naturales y que puedan servir para el tratamiento de infecciones provocadas por MDR, se encuentra plenamente justificada. Además, en nuestro país, los antibióticos se hallan entre los medicamentos de mayor consumo, y representan un mercado anual de 960 millones de dólares.¹⁸ La creciente resistencia bacteriana en patógenos causantes de infecciones comunitarias e intrahospitalarias es quizás el problema de mayor gravedad en México.¹⁹ Por ejemplo, se ha estimado que la tasa de resistencia a penicilina de *Streptococcus pneumoniae* causante de infecciones comunitarias graves como la neumonía y la meningitis, es de

alrededor del 55% en México,²⁰ porcentaje superior a los de otros países de Latinoamérica como Argentina y Brasil.²¹

1.3 Hongos extremófilos y su importancia biológica.

Los microorganismos están presentes en todos los hábitats del planeta incluso en los ambientes más extremos.²² Algunos de estos ecosistemas tienen condiciones adversas para la vida, como niveles altos o bajos de temperatura (termófilos o psicrófilos), pH (alcalófilos o acidófilos), presión (barófilos), radiación (radiófilos), concentraciones de sales (halófilos), metales pesados (metalotolerantes), entre otros, y los microorganismos adaptados para colonizar estos ambientes poseen propiedades especiales que les confieren gran interés para su bioprospección (los quimiotipos de los microorganismos de ambientes extremos pueden ser completamente diferentes a los de los que crecen en condiciones normales).^{5,22}

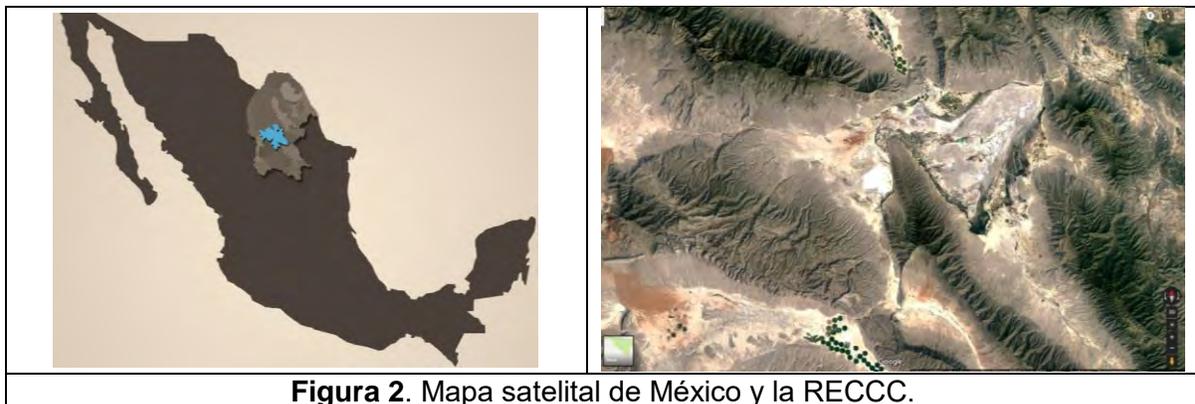
En el caso específico de los hongos microscópicos, su adaptabilidad está determinada por la gran capacidad de esporulación y la producción de sustancias (enzimas, metabolitos secundarios, etc.) necesarias para su supervivencia.^{22,23} Algunas de estas sustancias han sido caracterizadas, por ejemplo, algunos crioprotectores como azúcares y polioles que estabilizan las membranas y mantienen la presión intracelular;²⁴ compuestos osmóticamente activos de tipo polioles en los hongos xerotolerantes;²⁵ y melaninas que protegen de la congelación y la radiación UV.²⁶ Sin embargo, se requieren de esfuerzos importantes para el aislamiento de especies novedosas a partir de estos ambientes, o especies que debido a los procesos adaptativos, produzcan metabolitos secundarios únicos con aplicaciones potenciales en la terapéutica. Así, algunos hábitats inexplorados que alojan este tipo de microorganismos son los desiertos o suelos oligotróficos, el rumen de animales, las algas, los líquenes, los musgos, las plantas marinas o de manglares, los trozos de madera, las rocas, los insectos, el suelo volcánico, los residuos vegetales en descomposición, por mencionar sólo algunos ejemplos.²⁷

1.4 Reserva Ecológica de Cuatro Ciénegas, Coahuila (RECCC).

México es el sexto país a nivel mundial en biodiversidad por su gran número de especies y endemismos, y se estima que alberga aproximadamente el 10% de la diversidad terrestre del planeta.²⁸ Por otra parte, estudios preliminares han establecido que en

nuestro país existen aproximadamente 200,000 especies de hongos, de los cuales, sólo se tiene conocimiento taxonómico del 5%.²⁸

La Reserva Ecológica de Cuatro Ciénegas, Coahuila (RECCC; 27° N, 104 ° O; **Figura 2**),²⁹ es una región en el norte del país que ha llamado la atención en los últimos años por sus condiciones ambientales y endemismos. Esta región cuenta con una extensión de aproximadamente 150,000 km², una altitud promedio de 735 metros sobre el nivel de mar, a pesar de encontrarse encerrado entre altas serranías formadas principalmente por rocas calizas que alcanzan hasta 3,000 metros de altura. Por otra parte, el clima es muy seco, semicálido, con pocas lluvias en verano y ocasionalmente algunas en invierno; Sin embargo, la reserva cuenta con una gran diversidad de ambientes acuáticos, entre los que destacan los humedales tipo pantanos, complejos sistemas de corrientes subterráneas, manantiales, canales, ríos, lagos y estanques temporales.^{30,31} Una característica de la mayoría de estos sistemas es que son extremadamente oligotróficos en fósforo y se ha determinado que en estos sistemas habitan más de 70 especies endémicas de invertebrados, vertebrados y estromatolitos, lo que convierte a esta región en el oasis con el más alto nivel de biodiversidad endémica de América del Norte.^{32,33,34,35}



Las causas de esta gran diversidad han sido poco exploradas, pero se ha sugerido que el valle sirvió como refugio para la flora acuática y terrestre durante las glaciaciones, brindando las condiciones adecuadas para que se mantuviera una inmensa diversidad de organismos y microambientes. Éstos han permanecido a lo largo del tiempo debido a una gran estabilidad ambiental y a su aislamiento geográfico.³⁰ Estudios recientes han documentado la abundancia y diversidad de bacterias, arqueas y virus en las pozas de Cuatro Ciénegas.³⁴ Sin embargo, aún se sabe muy poco sobre la diversidad y distribución

de los hongos microscópicos de esta región, y mucho menos desde el punto de vista de su bioprospección.^{33,36,37} Así, los nichos inexplorados de nuestro país que presentan condiciones bióticas y abióticas particulares, como la RECCC, representan una fuente importante de especies fúngicas únicas que puedan ser estudiadas para la búsqueda de moléculas bioactivas novedosas y de utilidad terapéutica.³⁸

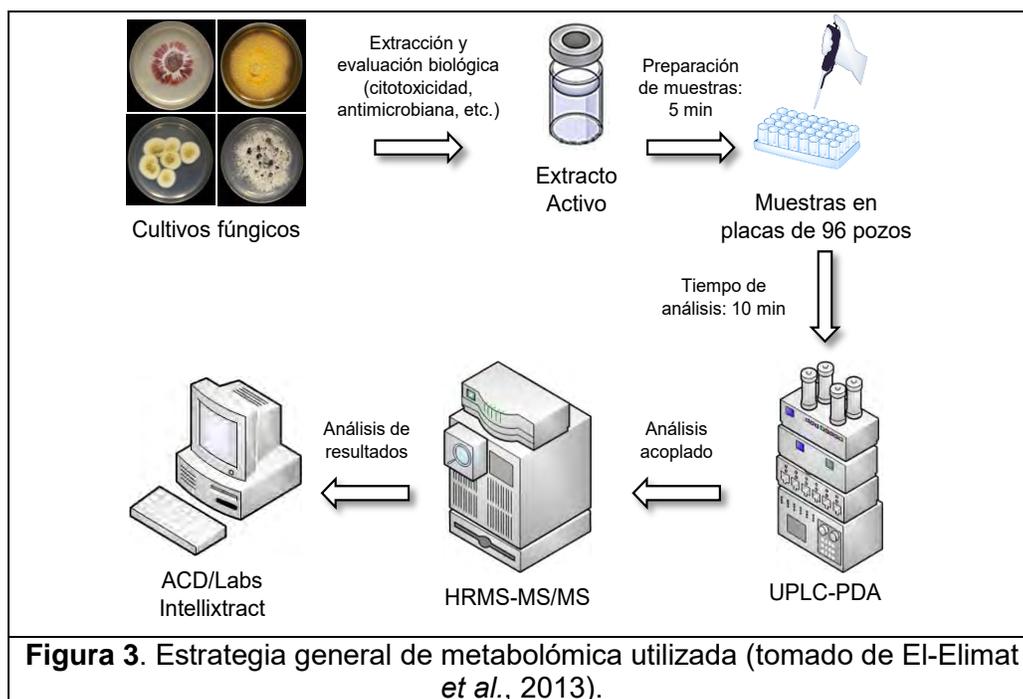
1.5 Estrategias de metabolómica para el descubrimiento de nuevas moléculas activas de origen microbiano.

La metabolómica se define como el análisis cualitativo y cuantitativo de todo el conjunto de metabolitos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico, mediante el uso de sistemas analíticos de alta resolución, estadística multivariable, herramientas de minería de datos, conocimiento químico y biológico, modelado de redes metabólicas, relaciones de función de genes o estados de un organismo, la filogenia, y las variabilidades genotípicas o fenotípicas, por mencionar algunos de los más importantes.^{39,40}

Las fuentes de metabolitos secundarios son bien conocidas por producir compuestos químicos con características estructurales únicas y propiedades altamente complejas, que han servido para el cuidado y el bienestar de la salud humana, la industria, etc., y las estrategias de metabolómica han permitido la rápida identificación de metabolitos secundarios conocidos y, de esta forma, permite el aislamiento rápido y eficaz de nuevos metabolitos secundarios de origen natural.⁴¹ Con el desarrollo de las técnicas analíticas de separación y de identificación estructural (espectroscópicas y espectrométricas), actualmente es posible identificar diversos productos naturales directamente en mezclas complejas tales como extractos de plantas, cultivos microbianos y muestras íntegras sin procesar.⁴⁰ Así, la implementación de estas estrategias han reducido significativamente el tiempo para descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos.

Recientemente se ha utilizado exitosamente una metodología analítica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS; **Figura 3**).⁴² Esta estrategia permite el análisis de extractos microbianos en un tiempo corto (10 min por muestra), y los resultados de tiempos de retención, máximos de absorción en el UV, espectros de masas de alta resolución y

patrones de fragmentación son comparados contra una base de datos de aproximadamente 350 micotoxinas, permitiendo a su vez la selección de las especies que producen compuestos conocidos de aquellas con presentan un potencial para la obtención de nuevos compuestos bioactivos.



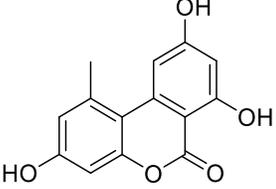
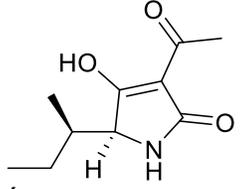
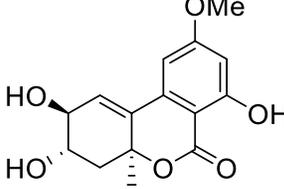
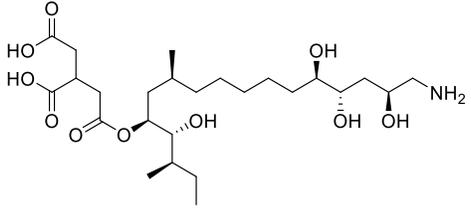
1.6 Generalidades de las especies fúngicas.

1.6.1 *Alternaria* sp.

Los hongos del género *Alternaria* (*Pleosporaceae*) son generalmente patógenos, parásitos facultativos, saprófitos o endófitos de plantas.⁴³ Estas especies cosmopolitas causan daños pre y pos cosecha a productos agrícolas, incluidos cereales, frutas y verduras. Son componentes normales de la microbiota del suelo y también se encuentran en el aire. La exposición a las esporas puede causar alergia y síntomas graves de asma en personas susceptibles.^{44,45}

Los hongos pertenecientes a este género también son bien conocidos por su capacidad para producir un amplio espectro de metabolitos secundarios. Estos incluyen diversas toxinas relacionadas con la patogénesis vegetal y contaminantes de productos

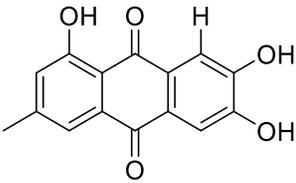
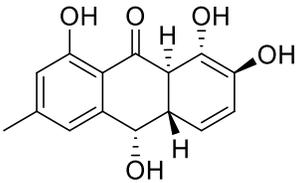
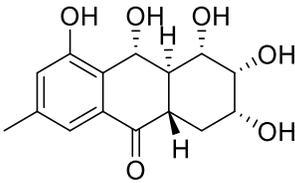
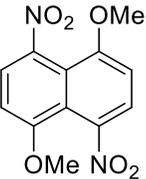
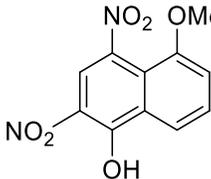
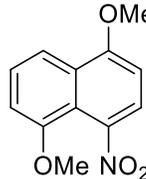
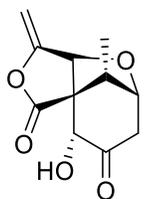
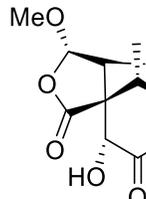
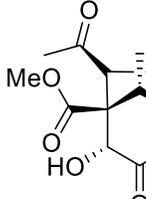
alimenticios, como el alternariol, el ácido tenoazónico, el altenueno y las toxinas AAL (Cuadro 4); siendo algunos de estos también tóxicos para el hombre.^{46 47,48}

Cuadro 4. Algunas micotoxinas producidas por hongos del género <i>Alternaria</i> .		
 <p>Alternariol</p>	 <p>Ácido tenuazónico</p>	 <p>Altenueno</p>
 <p>Toxinas AAL</p>		

1.6.2 Familia Coniothyriaceae.

La familia Coniothyriaceae fue introducida por Cooke y se considera como un sinónimo de *Leptosphaeriaceae*. Esta familia contiene numerosas especies de los géneros *Camarosporium*, *Camarosporomyces*, *Coniothyrium*, *Dimorphosporicola*, *Foliophoma*, *Hazlinszkyomyces*, *Neocamarosporium*, *Ochrocladosporium* y *Pseudoleptosphaeria* y son conocidas también por causar enfermedades en las plantas.⁴⁹

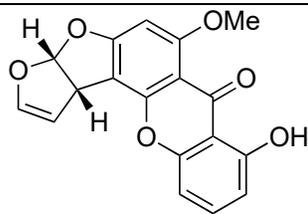
El género *Coniothyrium* es uno de los más representativos de la familia Coniothyriaceae, y algunas especies de este género han sido sujetas a diversos estudios químicos y biológicos. Por ejemplo, de la especie *Coniothyrium* sp. (73013), patógeno y endófito de *Artemisia marítima*, se aislaron los metabolitos secundarios caracterizados como massarilactonas;⁵⁰ Del endófito *Coniothyrium* sp. (7721), aislado del arbusto *Sideritis chamaedryfolia*, se obtuvieron una serie de nitronaftalenos con actividad antifúngica, antimicrobiana y antialgas;⁵¹ finalmente, de la especie endófito *Coniothyrium* sp. aislada de *Salsola appostifolia*, se obtuvieron algunas hidroxiantraquinonas con actividad antifúngica.⁵²

Cuadro 5. Compuestos aislados de especies del género <i>Conithyrium</i> .		
 <p>Paquibasina</p>	 <p>Coniotirirona A</p>	 <p>Coniotirirona B</p>
 <p>1,5-Dimetoxi-4,8-dinitronaftaleno</p>	 <p>1-Hidroxi-5-metoxi-2,4-dinitronaftaleno</p>	 <p>1,5-Dimetoxi-4-nitronaftaleno</p>
 <p>Massarilactona E</p>	 <p>Massarilactona F</p>	 <p>Massarilactona G</p>

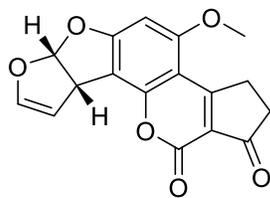
1.6.3 *Aspergillus* sp.

El género *Aspergillus* comprende más de 340 especies de hongos filamentosos.^{53,54} Las especies de este género son ubicuas y pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales para la humanidad y el ambiente.⁵³ Por otra parte, se les considera como los hongos más abundantes en el suelo y aire, y con frecuencia colonizan restos de plantas y cultivos agrícolas en descomposición.⁵⁵ Algunas especies han sido explotadas biotecnológicamente durante siglos.⁵⁶ Por ejemplo, *Aspergillus niger* se ha utilizado para la producción de ácido cítrico, enzimas extracelulares, sustancias antioxidantes y para biotransformaciones de sustancias químicas.⁵⁶ Otras especies como *A. fumigatus* y *A. flavus* pueden ser nocivas para la salud humana y generar aspergilosis invasiva o aspergilosis broncopulmonar alérgica, *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden contaminar alimentos de origen vegetal con aflatoxinas, agentes carcinógenos que provocan aflatoxicosis, necrosis hepática o cáncer de hígado (**Cuadro 6**).^{57,58} Finalmente, además de sus aplicaciones en la producción de compuestos antimicrobianos, actualmente se estudian diversas especies de *Aspergillus* para su aplicación en el tratamiento de padecimientos como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, los trastornos neuronales y fisiológicos y como fuente de antioxidantes.¹⁵

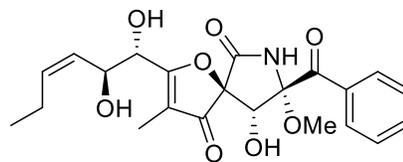
Cuadro 6. Ejemplos de metabolitos producidos por especies del género *Aspergillus*.



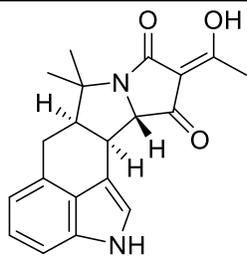
Esterigmatocistina



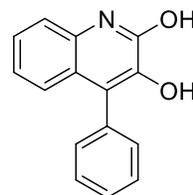
Aflatoxina B1



Pseurotina A



Ácido ciclopiazónico



Viridicatina

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido al incremento de infecciones por bacterias resistentes a múltiples fármacos, existe un gran interés por el descubrimiento de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas para el desarrollo de nuevos antibióticos. Así, las fuentes naturales de ambientes inexplorados y con condiciones ambientales extremas, como lo es la Reserva de Cuatro Ciénegas Coahuila, representan lugares idóneos para la obtención de especies fúngicas con habilidades para sintetizar compuestos biodinámicos novedosos con actividad antimicrobiana potencial para el desarrollo de nuevos fármacos.

En este contexto, el objetivo general del presente trabajo es iniciar la bioprospección de especies fúngicas aisladas de muestras de suelo de la RECCC. Para el cumplimiento de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Realizar el aislamiento de taxones fúngicos provenientes de la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila, a partir de muestras de suelo, sedimentos o placas microbianas.
- Cultivar en pequeña escala a dichos microorganismos mediante técnicas microbiológicas convencionales y obtener los extractos orgánicos utilizando técnicas de maceración y reparto.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos contra una batería de microorganismos. Simultáneamente, realizar los análisis de metabolómica mediante la técnica UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS.
- Seleccionar 5 taxones fúngicos y preparar sus cultivos en mediana escala.
- Obtener los extractos orgánicos en mediana escala y realizar su fraccionamiento primario mediante cromatografía tipo Flash.
- Realizar las pruebas antimicrobianas de cada una de las fracciones obtenidas.
- Purificar y caracterizar a los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las fracciones más activas y/o con mayor cantidad de metabolitos, mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).
- Realizar la identificación taxonómica de las especies seleccionadas mediante el análisis del espaciador transcrito interno (ITS).

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la **Figura 4** se resume la estrategia experimental general, diseñada para cumplir con los objetivos planteados para el desarrollo de la presente investigación.

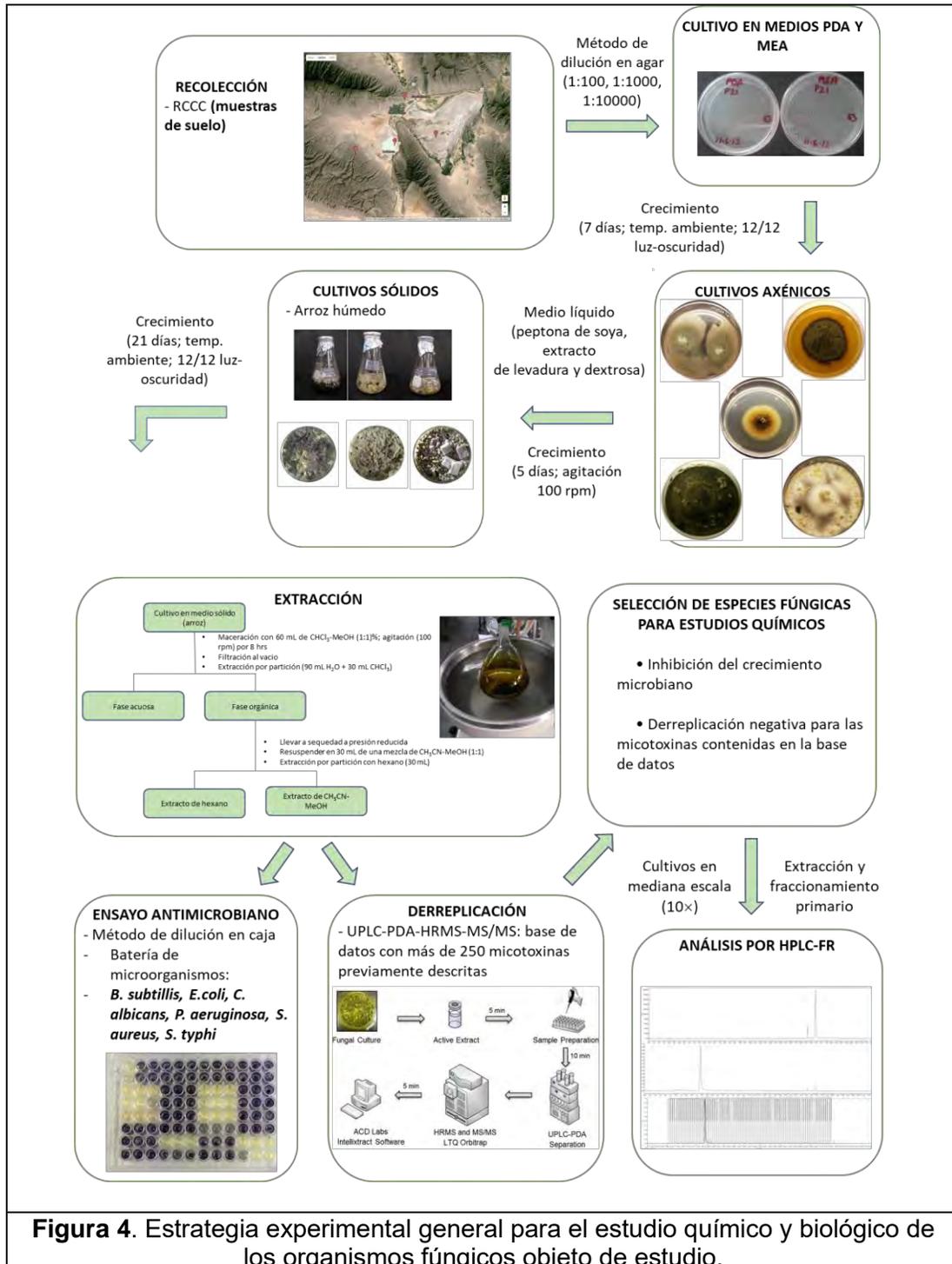


Figura 4. Estrategia experimental general para el estudio químico y biológico de los organismos fúngicos objeto de estudio.

3.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio.

Cuatro muestras de suelo (tierra, placa microbiana, sedimento.) de la RECCC, identificadas con las claves CC1, CC5, CC8 y CC9 (**Cuadro 7**), se seleccionaron para el aislamiento de las especies fúngicas objeto de estudio. El aislamiento de los hongos a partir de las muestras de suelo y de las placas microbianas seleccionadas se realizó utilizando el método de dilución. Brevemente, una muestra representativa (300-500 mg) libre de material extraño (restos de raíces, piedras, etc.) fue diluida con agua estéril a las concentraciones finales de 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 p/v, este procedimiento se realizó por triplicado. Enseguida, 500 μ L de cada dilución fueron vertidos sobre la superficie de cajas de Petri y, posteriormente, a cada caja se adicionaron 10 mL de medio de cultivo PDA suplementado con estreptomicina y el colorante rosa de bengala. Una vez detectado algún crecimiento, proceso que tarda entre 2 y 5 días, las colonias se transfirieron a cajas de Petri estériles que contenían medio PDA para verificar su pureza; Para su conservación, fueron inoculadas en tubos de microcentrífuga con medio PDA. Una vez obtenidos los cultivos axénicos en cajas de Petri con agar sólido, las colonias fúngicas fueron subcultivadas para su posterior análisis morfológico e identificación molecular.

Cuadro 7. Tipo de muestra y coordenadas de muestreo en la RECCC.			
Código	Fecha de colecta (dd/mm/año)	Lugar de colecta (coordenadas/elevación)	Tipo de muestra
CC1	06/09/2015	Churince (26°51'1"N, 102°8'54"O; 765 msnm)	Tierra
CC5	08/09/2015	Pie de Montaña "El Charro" (26°58'39"N, 102°7'2"O; 625 msnm)	Tierra
CC8	10/09/2015	Cueva del Junco (26°49'41"N, 102°16'17"O; 1051 msnm)	Placa microbiana
CC9	11/09/2015	Pozas rojas (26°52'18"N, 102°1'12"O; 704 msnm)	Sedimento

3.2 Identificación taxonómica de las especies objeto de estudio.

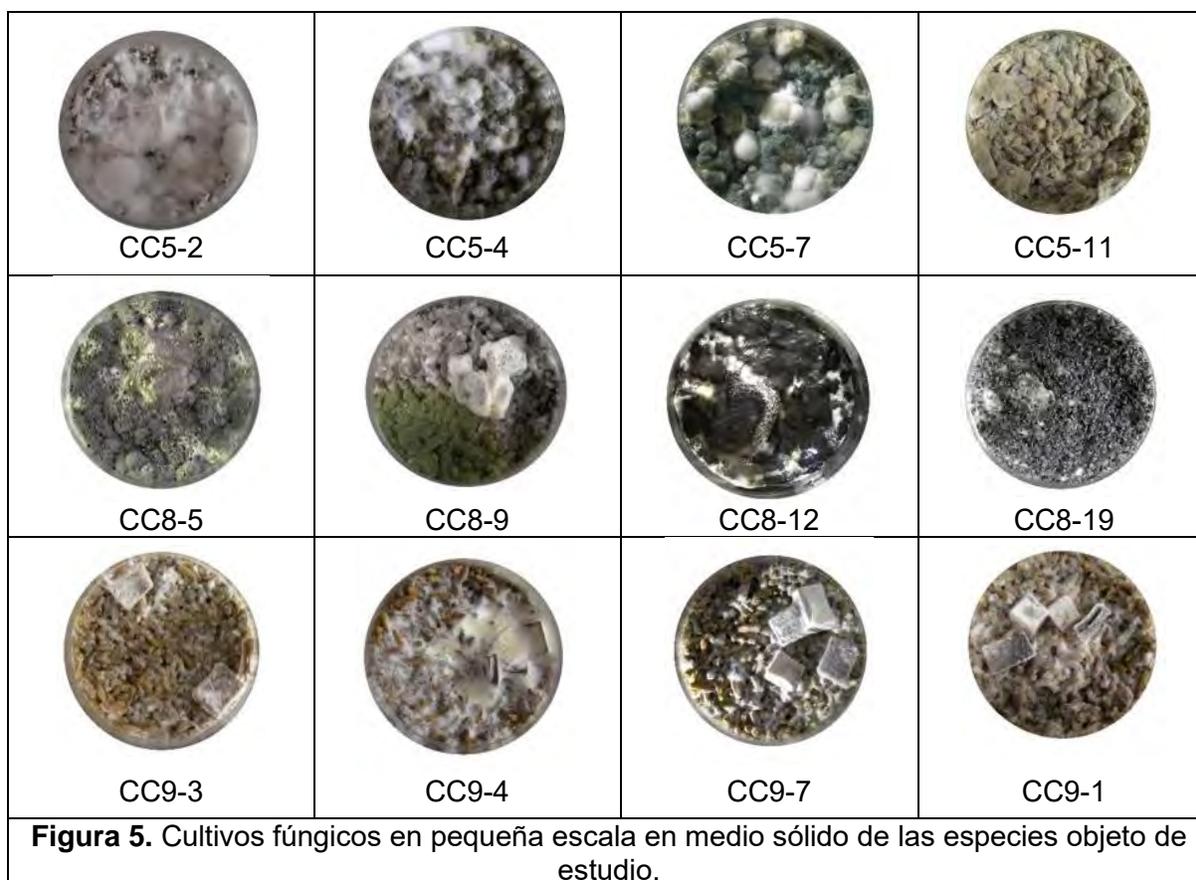
La identificación molecular de los taxones fúngicos CC5-5, CC5-8, CC5-10, CC5-11 y CC5-13 se realizó mediante el análisis de la secuencia ITS y un análisis comparativo de las secuencias obtenidas con aquellas reportadas en la base de datos del National Center

for Biotechnology Information (NCBI). En esta técnica, la región ribosomal ITS se reconoce como un marcador genético debido a su alta conservación, por lo que se utiliza con frecuencia en procesos de secuenciación.⁵⁹ Esta actividad fue realizada en colaboración con el Dr. Huzefa Raja investigador del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Greensboro en Carolina del Norte.

3.3 Preparación de cultivos en pequeña escala y preparación de los extractos orgánicos.

A partir de cultivos axénicos (**inciso 3.1**), se realizó la fermentación de los organismos fúngicos en pequeña escala en medio sólido. Para ello, cada hongo se cultivó inicialmente en 15 mL de medio líquido (YESD) compuesto por 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 incrementando la biomasa. Posteriormente, los cultivos líquidos fueron vertidos sobre un sustrato sólido (20 g de arroz/30 mL agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL (**Figura 5**); el proceso de fermentación se llevó a cabo durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas.

La preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala se realizó a partir de cada cultivo sólido, mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante (100 rpm) durante 8 horas, empleando como disolvente de extracción 90 mL de una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). Transcurrido este tiempo de extracción, el extracto obtenido se sometió a un proceso de reparto con 100 mL de una mezcla H_2O - CHCl_3 (9:3) (2×100 mL). Las fases orgánicas obtenidas se reunieron y secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a sequedad a presión reducida. Posteriormente, la fracción orgánica fue resuspendida con 60 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se sometió a un proceso de desengrase con hexano (60 mL).

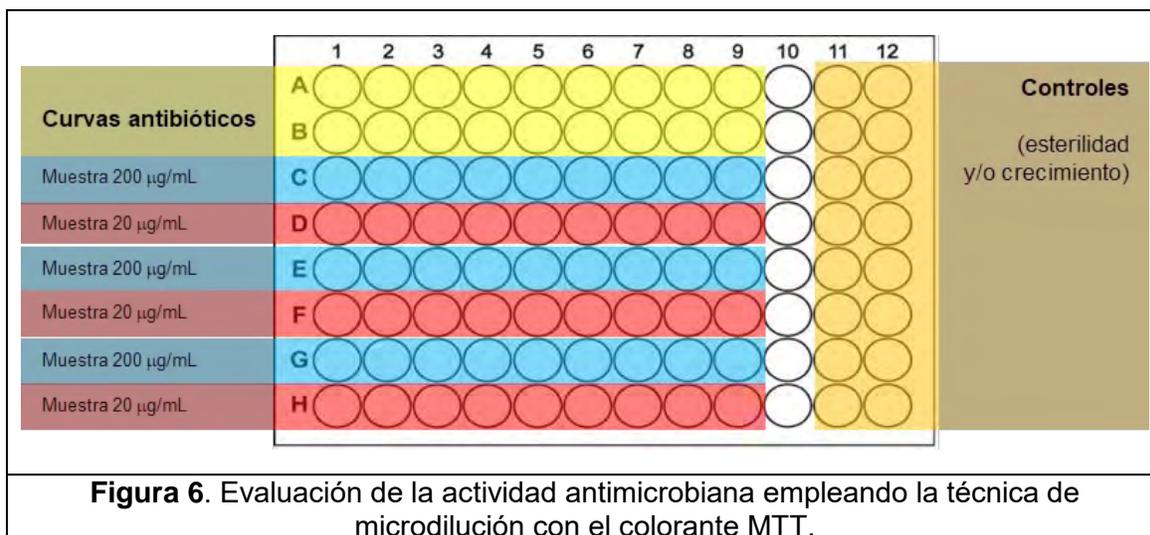


3.4 Evaluación del efecto antimicrobiano.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de todos los extractos se realizó empleando la técnica de microdilución con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT),⁶⁰ utilizando una batería de microorganismos Gram (+) [*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC6633)], Gram (-) [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Salmonella typhi* (ATCC9992)] y la levadura *Candida albicans*. Todos los microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. La ampicilina, la gentamicina y la nistatina fueron utilizados como controles positivos y como medio de cultivo se empleó caldo Müller-Hinton (MH). Todas las muestras (extractos o fracciones) fueron evaluadas por triplicado.

El ensayo correspondiente se efectuó en placas de Elisa de 96 pozos. Cada pozo contenía 100 μ L de una suspensión del microorganismo de prueba en solución salina,

ajustada al 0.5% (1×10^8 células/mL) del estándar turbidimétrico de McFarland. Los pozos C1-H8 contenían además 5 ó 50 μL del extracto a evaluar a las concentraciones de 20 y 200 $\mu\text{g/mL}$ disueltas en DMSO (10%) y el volumen de medio de cultivo de MH necesario para completar un volumen final de 250 μL . Los últimos pozos (hileras 10-12) fueron utilizadas como controles de esterilidad y crecimiento (**Figura 6**). Las cajas se incubaron por 24 (bacterias) ó 48 horas (levadura) a 37°C. Una vez terminado el período de incubación, a cada pozo se le adicionaron 5 μL de una solución del colorante MTT (5 mg/mL en MeOH) y nuevamente se incubó la placa durante 30 min a 37°C.



3.5 Estudios de metabolómica.

Los estudios de metabolómica se realizaron utilizando la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, y siguiendo la metodología descrita en la literatura.⁴²

Los análisis por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) se realizaron en un cromatógrafo Waters (Waters Corp., MA, EE.UU.) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA). El control del equipo, adquisición, procesamiento y manipulación de los datos fue realizado utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). Todos los análisis se realizaron a una temperatura de 40°C empleando una columna Acquity BEH C₁₈ (Waters Corp., MA, EE.UU.) [1.7 μm , 2.1 \times 10 mm]. La elución se realizó con una mezcla binaria constituida por MeCN (A) y ácido fórmico en agua 0.1% (B), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% de A e incrementando la

composición hasta 100% de A durante 8 minutos, manteniendo una composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 minutos, con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó mediante un barrido en el UV desde 200 hasta 400 nm, con una resolución de 4 nm.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución se realizaron mediante la técnica de electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI⁺ y ESI⁻, respectivamente) en un espectrómetro de masas Thermo Q Exactive (ThermoFisher Inc., MA, EEUU). Las condiciones del equipo en el modo de ionización positiva fueron las siguientes: temperatura y voltaje del capilar: 275°C y 20 V, respectivamente; voltaje de la fuente de ionización, 4.5 kV, y voltaje del lente del tubo 95 V. Para el modo de ionización negativo las condiciones del equipo fueron: temperatura y voltaje del capilar: 275°C y 42 V, respectivamente; voltaje de la fuente de ionización, 3.5 kV, y voltaje del lente del tubo 110 V. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 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).

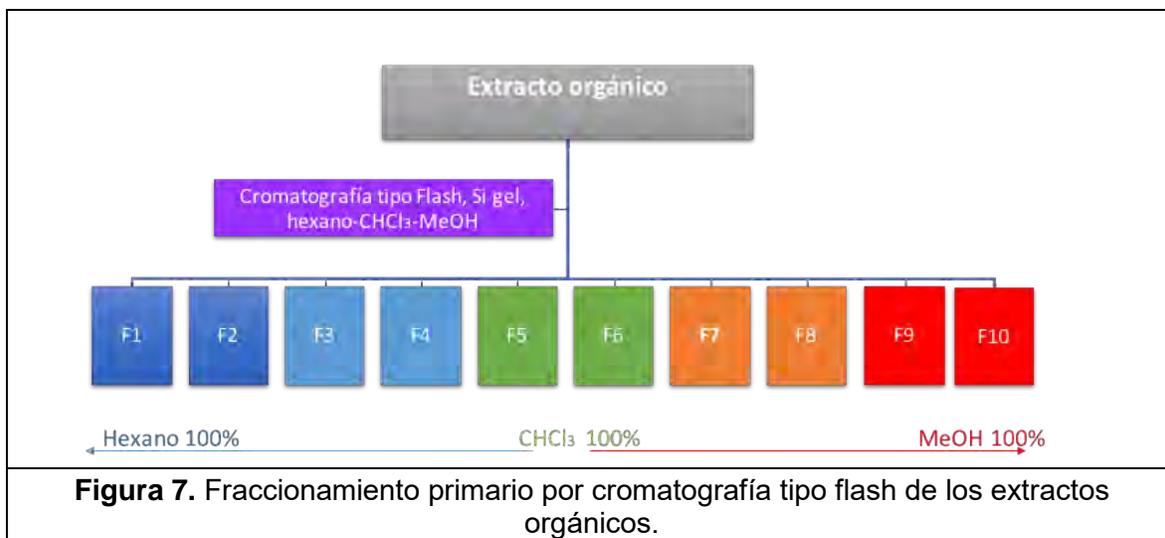
3.6 Preparación de extractos orgánicos a mediana escala.

La preparación de los extractos orgánicos a mediana escala (10×) de la serie objeto de estudio CC5 (CC5-5, CC5-8, CC5-10, CC5-11 y CC5-13) se realizó a partir de los cultivos sólidos siguiendo la misma estrategia metodológica descrita a detalle en el **inciso 3.3** de esta sección experimental, sólo se ajustaron los volúmenes de los disolventes de extracción. Cada uno de los extractos se analizó mediante cromatografía en capa fina con la finalidad de combinar aquellos extractos que fueran similares.

3.7 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos a mediana escala.

De manera general, los extractos orgánicos a mediana escala se fraccionaron mediante una cromatografía tipo flash, en un cromatógrafo CombiFlash[®] Rf system (Teledyne ISCO) acoplado a los detectores evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y de arreglo de diodos (PDA), utilizando gel de sílice (tamaño de partícula 40–63 µm) RediSepRf[®] como fase estacionaria. El proceso de elución se efectuó con hexano, mezclas hexano-

cloroformo, cloroformo, mezclas cloroformo-metanol y metanol, en diferentes proporciones con un flujo de 30 mL/min (**Figura 7**). Las fracciones obtenidas fueron analizadas y se combinaron todas aquellas que resultaron similares con base en los perfiles observados en el UV y ELSD. Debido a que sólo a partir de los extractos CC5-8, CC5-11 y CC5-13 fue posible obtener algunos compuestos en forma pura, a continuación se muestra únicamente la información resultante de sus estudios químicos.

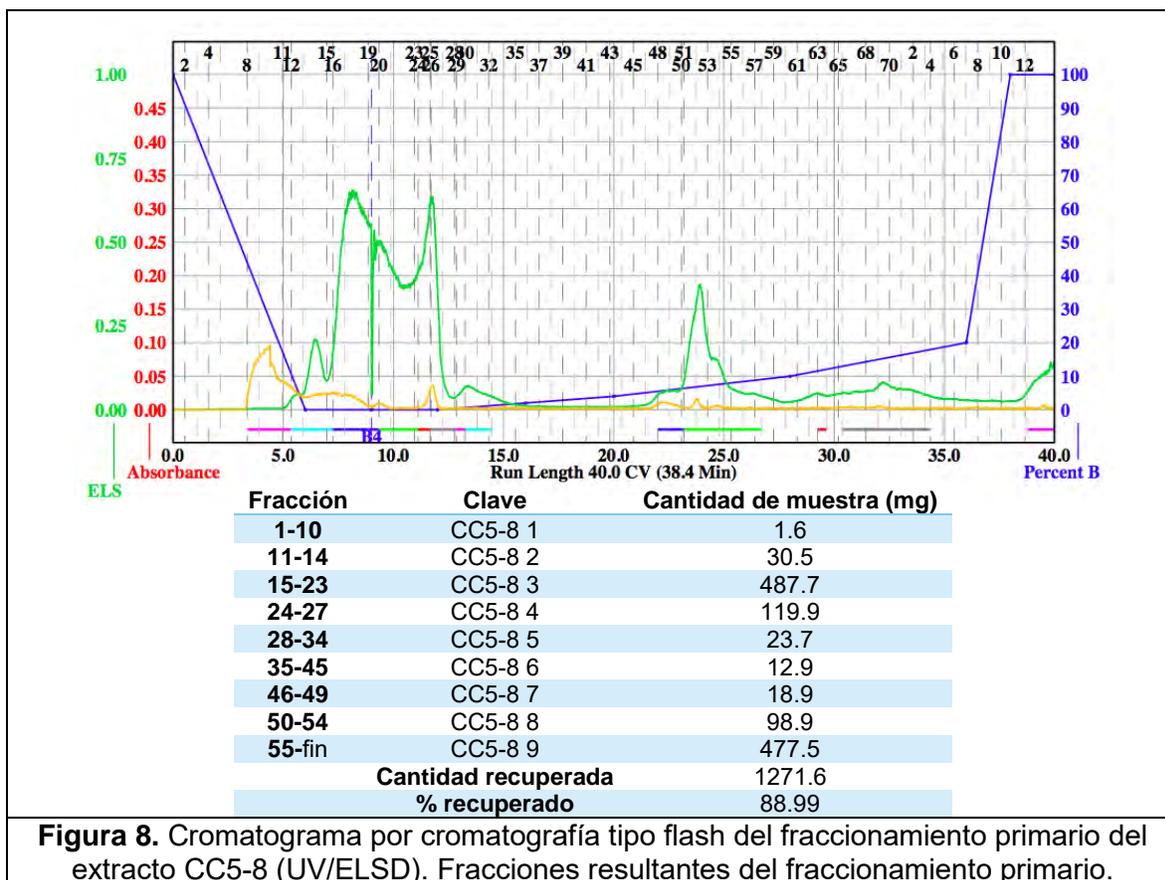


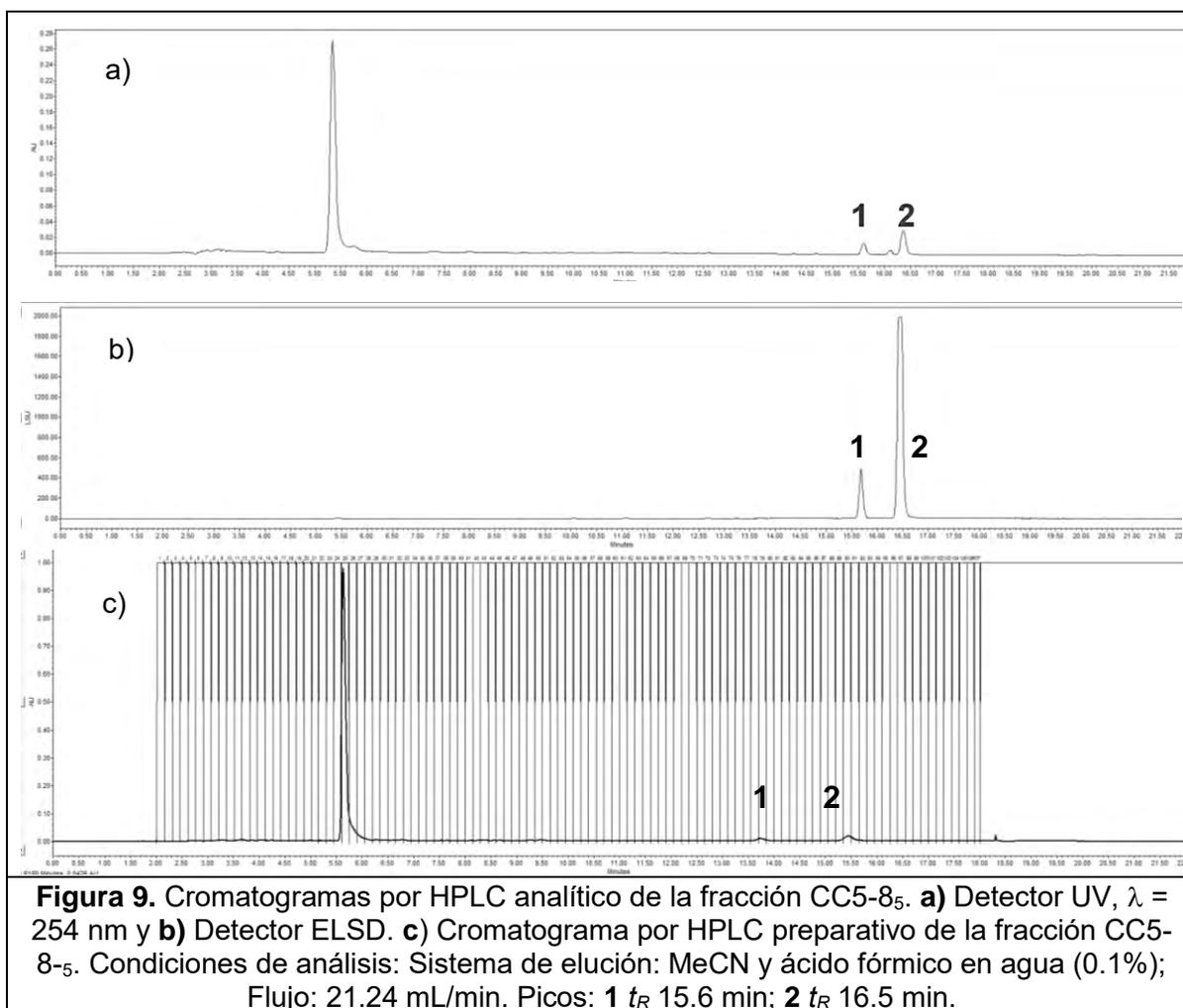
3.8 Aislamiento y purificación del peróxido de ergosterol (1) y el 5,8-epi-dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (2).

El fraccionamiento primario del extracto CC5-8 (1.43 g) se realizó mediante cromatografía tipo flash sobre gel de sílice (24 g) utilizando el gradiente de elución indicado en la **Figura 8**. Este proceso cromatográfico generó un conjunto de nueve fracciones primarias (CC5-8-₁-CC5-8-₉) reunidas con base en su similitud cromatográfica (**Figura 8**).

El aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en las fracciones secundarias (CC5-8-₁-CC5-8-₉), se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con dos detectores uno de PDA y el otro de 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°C ± 25°C. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower

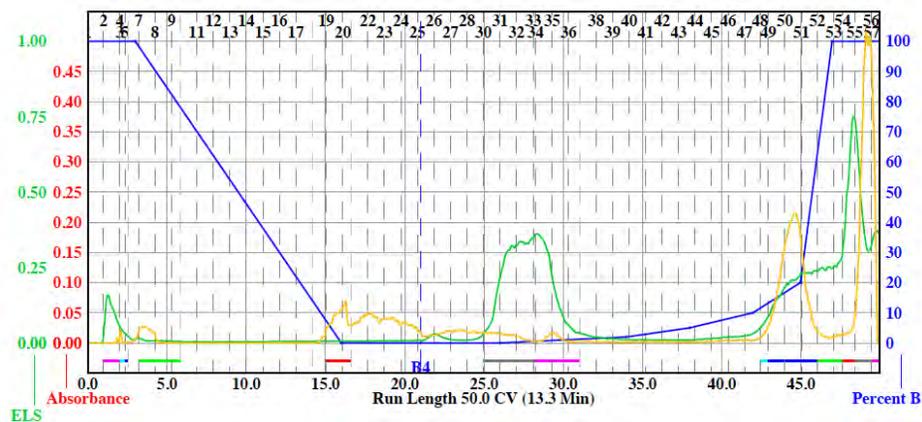
versión 3.0 (Waters). Los análisis se realizaron en una columna Phenomenex Gemini C₁₈ con un tamaño de partícula de 5 µm, con un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 250 mm. La concentración de las muestras problema utilizada en estos análisis fue de 3 mg/mL en un volumen inyectado de 15 µL. La elución se realizó utilizando un gradiente con una fase móvil MeCN **(A)** y ácido fórmico en agua (0.1%) **(B)**; gradiente: 60% → 100% **(A)**; tiempo de corrida: 22 min; flujo: 1 mL/min; longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm. Una vez determinadas las condiciones analíticas se realizó el escalamiento a una columna Phenomenex Gemini C₁₈ (5 µm, 19.1 mm × 250 mm). La resolución de fracción CC5-8-5 (23.7 mg) por HPLC a nivel preparativo, empleando las siguientes condiciones: fase móvil MeCN **(A)** y ácido fórmico en agua (0.1%) **(B)**; gradiente: 60% → 100% **(A)** en 5 minutos; tiempo de corrida: 18 min; flujo: 21.24 mL/min; longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm; tiempo de recolección: 9 segundos (**Figura 9**), permitió la separación de 8.6 mg del compuesto **1** identificado como el peróxido de ergosterol (*t_R* 13.8 min) y 2.0 mg del compuesto **2** identificado como el 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11), 22-trien-3-ol (*t_R* 15.5 min).





3.9 Aislamiento y purificación de la monocilina I (3).

El extracto orgánico a mediana escala de la especie CC5-11 (203.3 mg) se sometió a una cromatografía en columna tipo flash sobre gel de sílice (4 g). La fase móvil consistió en hexano, mezclas de hexano- CHCl_3 , mezclas de CHCl_3 -MeOH y MeOH de polaridad creciente (**Figura 10**). Este proceso generó un conjunto de seis fracciones primarias (CC5-11₁-CC5-11₆) (**Figura 10**), en una de ellas (CC5-11₅) se observó la aparición de un precipitado amarillo pálido. El análisis por HPLC (columna Phenomenex Gemini C₁₈; 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.) de la fracción primaria CC5-11₅ (23.1 mg), permitió observar la presencia de una sola señal (**Figura 11**), la cual posteriormente se identificó como la monocilina I (**3**; 23.1 mg).



Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1 al 17	CC5-11 1	1.5
18-24	CC5-11 2	0.3
25-33	CC5-11 3	26.7
34-43	CC5-11 4	22.2
44-52	CC5-11 5	23.1
53-fin	CC5-11 6	88.8
Cantidad recuperada		162.6
% recuperado		92.8

Figura 10. Cromatograma por cromatografía tipo flash del fraccionamiento primario del extracto CC5-11 (UV/ELSD). Fracciones resultantes del fraccionamiento primario.

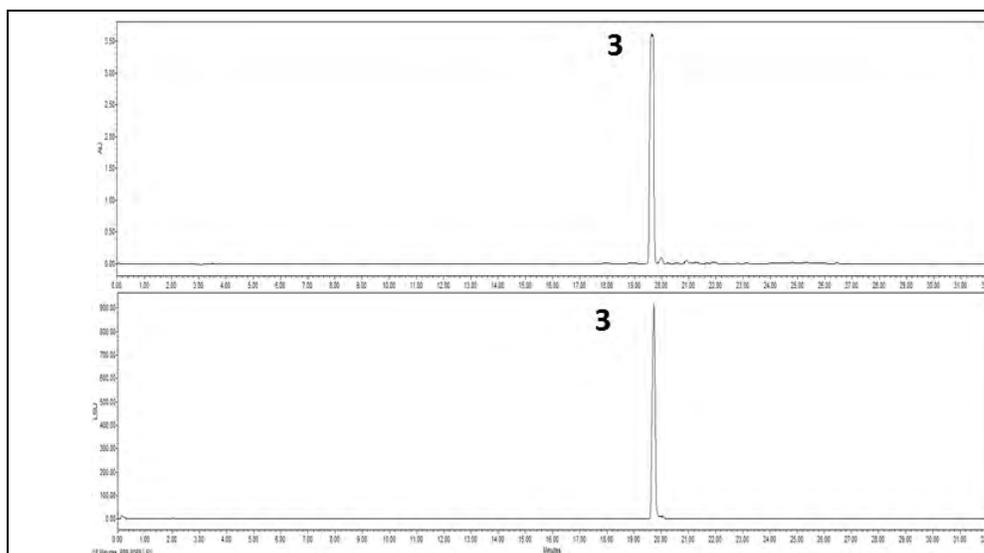


Figura 11. Cromatogramas por HPLC analítico de la fracción CC5-11₅. a) Detector UV, $\lambda = 254 \text{ nm}$ y b) Detector ELSD.

3.10 Aislamiento y purificación de la neosartorina (4).

El extracto orgánico de la especie CC5-13 (1.3 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando una cromatografía tipo flash sobre gel de sílice (24 g) y como fase móvil hexano, mezclas de hexano-CHCl₃, mezclas de CHCl₃-MeOH y MeOH de polaridad creciente, **Figura 12** obteniéndose un conjunto de diez fracciones primarias (CC5-13₁-CC5-13₁₀). En la fracción primaria CC5-13₄ (207.1 mg) se observó un precipitado amarillo intenso, cuyo análisis por HPLC (columna Phenomenex Gemini C₁₈; fase móvil MeCN **(A)** y ácido fórmico en agua (0.1%) **(B)**; gradiente: 15% → 100% **(A)**, tiempo de corrida: 32 min; flujo 1 mL/min; longitudes de onda de detección: 190, 254 y 365 nm.), reveló la presencia de un solo compuesto **(4)** identificado como la neosartorina (**Figura 13**).

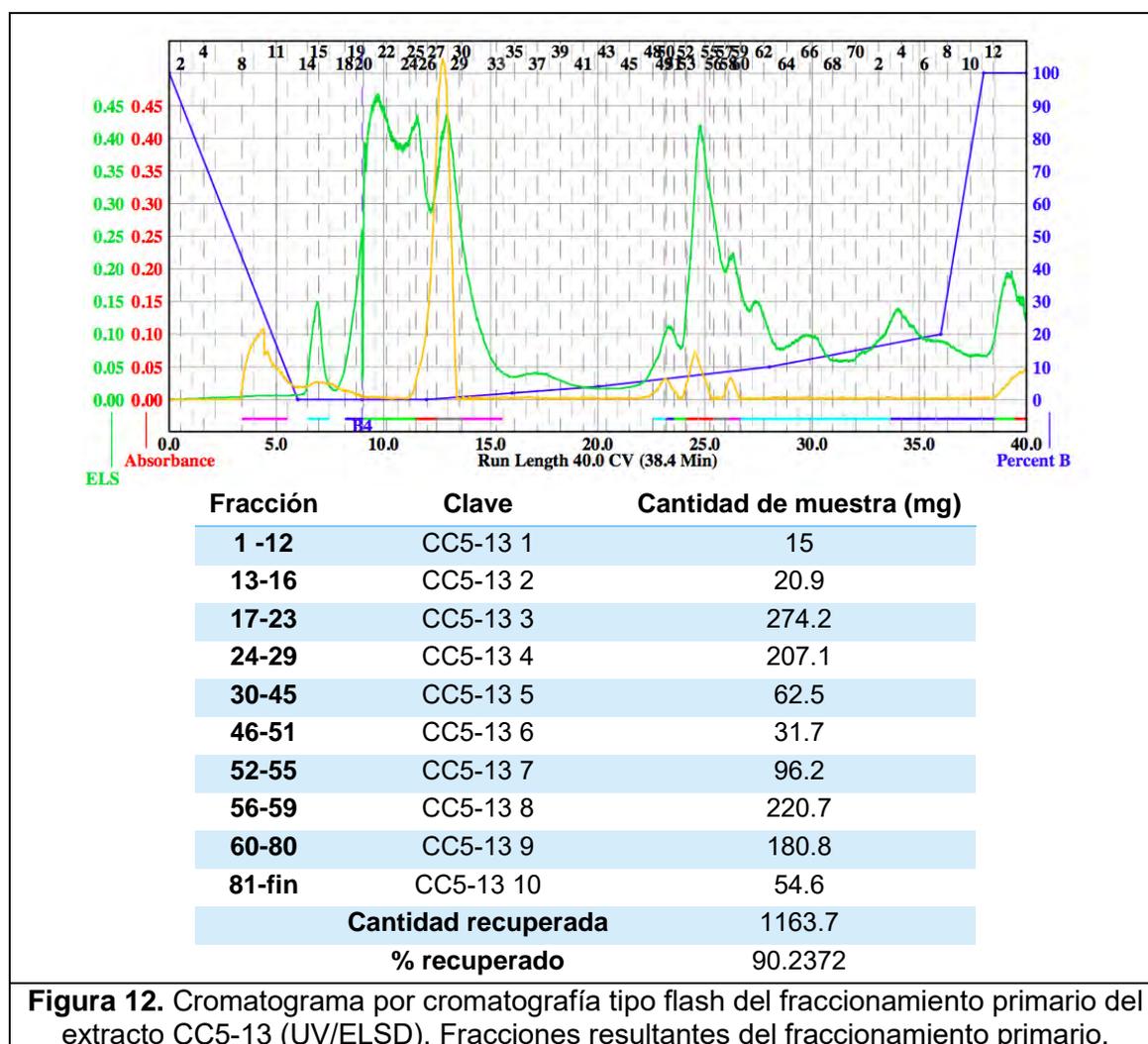


Figura 12. Cromatograma por cromatografía tipo flash del fraccionamiento primario del extracto CC5-13 (UV/ELSD). Fracciones resultantes del fraccionamiento primario.

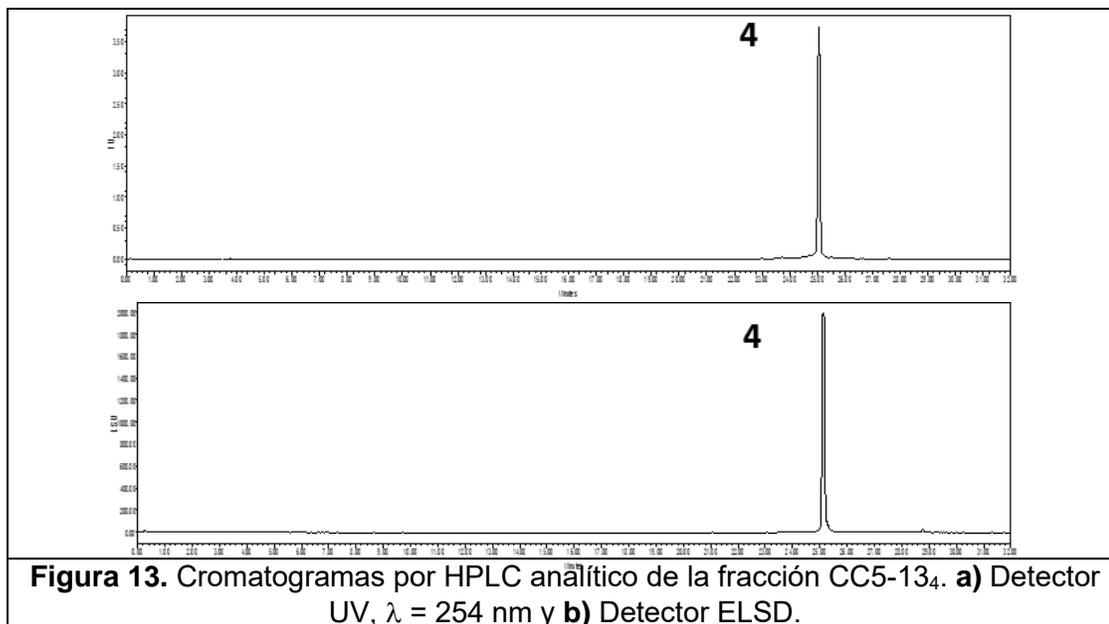


Figura 13. Cromatogramas por HPLC analítico de la fracción CC5-13₄. **a)** Detector UV, $\lambda = 254 \text{ nm}$ y **b)** Detector ELSD.

3.11 Caracterización estructural de los metabolitos aislados

La caracterización estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Los espectros de RMN se registraron en un equipo Varian VNMRS o JEOL JNM-ECS40 a 400 MHz (^1H) /100 MHz (^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se empleó CDCl_3 como disolvente. Los espectros de HRMS se obtuvieron utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas en el inciso 4.5 de esta sección. Todos los espectros de RMN y EM se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM y en colaboración con el Dr. Nicholas Oberlies, Universidad de Greensboro en Carolina del Norte, EE.UU.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

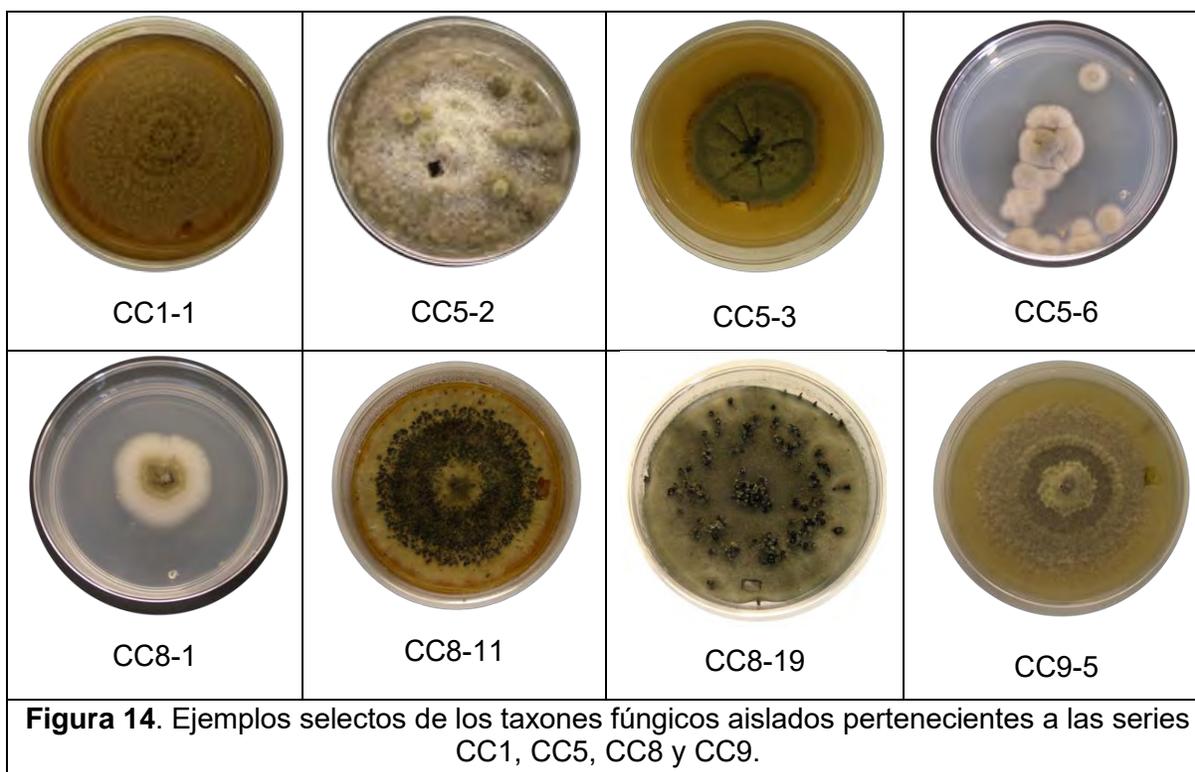
4.1 Selección primaria y obtención de los extractos orgánicos de las especies fúngicas aisladas.

El presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto de investigación enfocado al descubrimiento y aislamiento de nuevos compuestos antimicrobianos a partir especies fúngicas selectas obtenidas de la RECCC.

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de este estudio se resume a continuación. Una vez que se efectuó la selección de las muestras objeto de estudio, recolectadas en la RECCC, se realizó el aislamiento de 44 taxones fúngicos empleando técnicas microbiológicas convencionales (**Cuadro 8 y Figura 14**). Enseguida, a partir de cada cultivo axénico se realizó la fermentación de todas las especies fúngicas aisladas en pequeña escala. Una vez transcurrido los tiempos adecuados de fermentación, se prepararon los extractos orgánicos correspondientes mediante las técnicas de maceración y de reparto. Finalmente, cada extracto a pequeña escala se evaluó contra una batería de microorganismos para establecer su potencial como agentes antimicrobianos.

Así, los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran integrados en dos partes. En la primera parte, se describe la evaluación de la actividad antimicrobiana y estudios de metabolómica de todos los extractos preparados y la segunda parte abarca los aspectos relacionados con la investigación química de tres especies seleccionadas.

Cuadro 8. Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio a partir de las muestras colectadas de la RECCC.	
Clave de la muestra	Número de taxones aislados
CC1	1
CC5	15
CC8	21
CC9	7



4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana y estudios de metabolómica de los extractos orgánicos en pequeña escala de las series CC1, CC5, CC8 y CC9.

4.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

El potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos preparados se evaluó utilizando una batería de microorganismos Gram (+), Gram (-) y la levadura *C. albicans* mediante la técnica de microdilución con el colorante MTT.⁸⁷ El **Cuadro 9** resume los resultados de esta evaluación, y de manera general se puede observar que 29 extractos inhiben el crecimiento de las bacterias Gram (+) -*S. aureus* y *B. subtilis*-, presentando la mejor actividad contra *B. subtilis*. En el caso de las bacterias Gram (-) -*E. coli* y *S. typhi*-, 18 de las muestras ensayadas presentaron una actividad moderada contra *S. typhi* y una mejor actividad biológica contra *E. coli*. Ninguno de los extractos evaluados fue activo contra la especie *P. aeruginosa*, y la mitad de los extractos presentó una actividad importante de inhibición del crecimiento de la levadura *C. albicans*.

Cuadro 9. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos a pequeña escala.

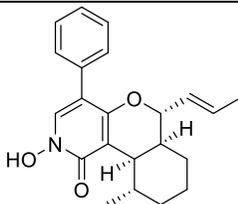
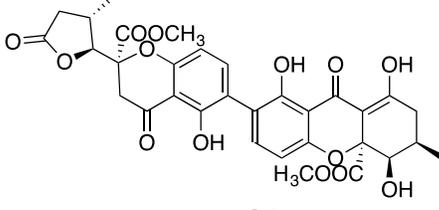
Extracto	Peso (mg)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC1-1	543.7						
CC5-1	10.7						
CC5-2	90.7						
CC5-3	391						
CC5-4	35.6						
CC5-5	21.5						
CC5-6	34.4						
CC5-7	212.9						
CC5-8	42.5						
CC5-9	152.4						
CC5-10	58.6						
CC5-11	324.3						
CC5-12	40						
CC5-13	154.6						
CC5-14	18.3						
CC5-15	244.3						
CC8-1	327.8						
CC8-2	25.5						
CC8-3	56.1						
CC8-4	128.9						
CC8-5	40.6						
CC8-6	102						
CC8-7	116.6						
CC8-8	70.2						
CC8-9	37.5						
CC8-11	52.8						
CC8-12	192.7						
CC8-13	126.6						
CC8-14	29.4						
CC8-15	44.6						
CC8-16	43.2						
CC8-17	123.7						
CC8-18	20.6						
CC8-19	73.6						
CC8-20	25.4						
CC8-21	53.3						
CC9-1	82.8						
CC9-2	65.4						
CC9-3	68.2						
CC9-4	63.9						
CC9-5	36.5						
CC9-6	74						
CC9-7	60.3						

CMI ($\mu\text{g/mL}$) *ampicilina y **nistatina	333*	125*	0.3*	4.6*	0.6*	2.3**
	Inhibición total a 200 y 20 $\mu\text{g/mL}$					
	Inhibición total a 200 $\mu\text{g/mL}$ y parcial a 20 $\mu\text{g/mL}$					
	Inhibición total a 200 $\mu\text{g/mL}$					
	Inhibición parcial a 200 y 20 $\mu\text{g/mL}$					
	Inhibición parcial a 200 $\mu\text{g/mL}$					

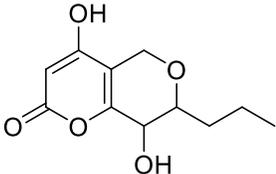
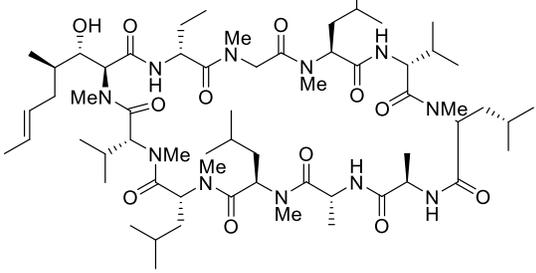
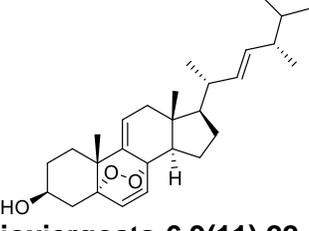
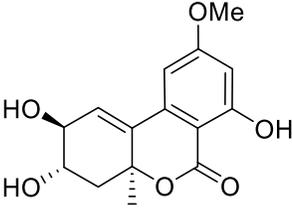
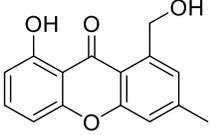
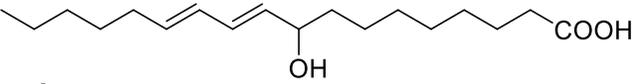
Con base en estos resultados se seleccionaron a los taxones derivados de la serie CC5 (CC5-5, CC5-8, CC5-10, CC5-11 y CC5-13) como los candidatos más adecuados para la obtención de principios antimicrobianos, al presentar una actividad biológica selectiva contra la batería de microorganismos ensayada.

4.2.2 Estudios de metabolómica.

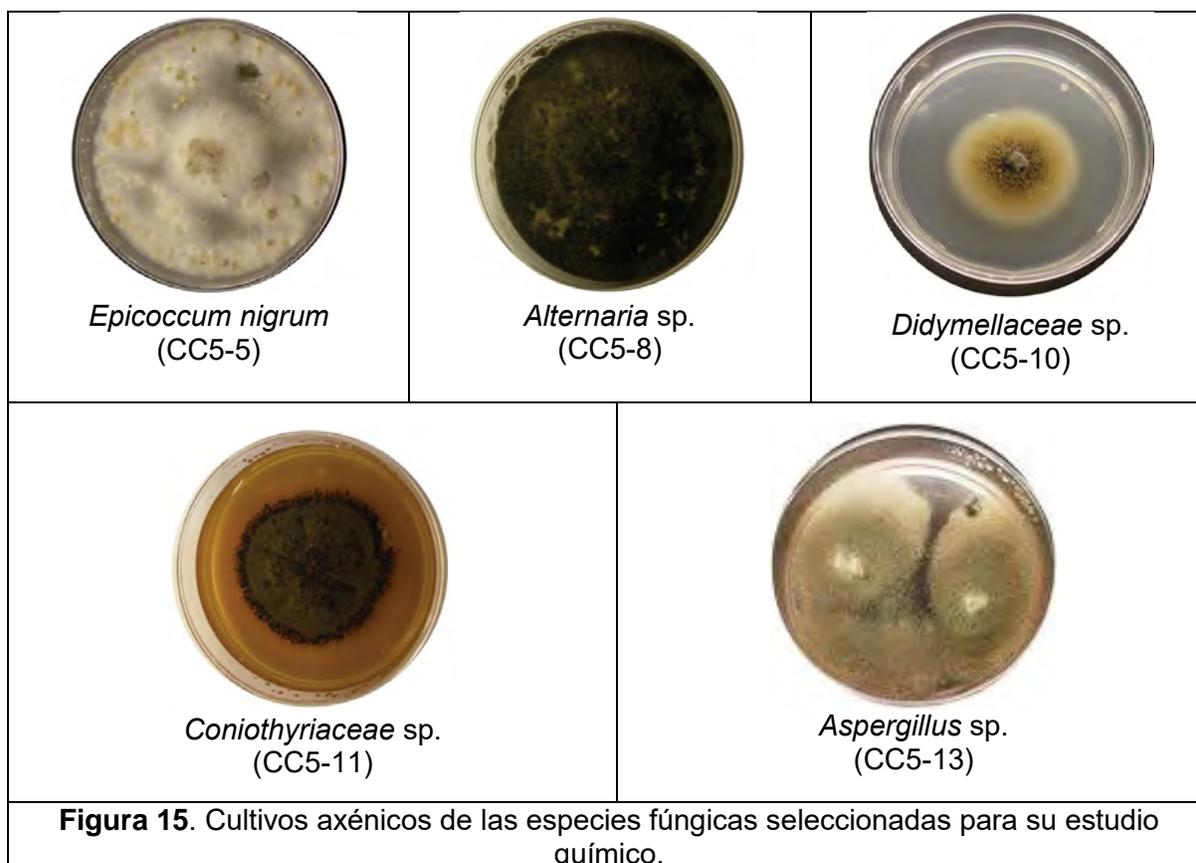
De manera simultánea a la realización de las evaluaciones biológicas previamente descritas, los extractos pertenecientes a la serie CC5 fueron analizados por la técnica UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS,⁴² con la finalidad de identificar la presencia de micotoxinas, o bien, de metabolitos previamente aislados a partir de estas fuentes naturales. Los resultados obtenidos de estos análisis se resumen en la **Cuadro 10**.

Cuadro 10. Resultados preliminares de los estudios de metabolómica de las especies fúngicas de la serie CC5 .	
Extracto	Correspondencia con la base de datos
CC5-2	 <p>Leporina B $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_3$</p>
CC5-7	 <p>ent-Blennólida G $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$</p>

Cuadro 10. Resultados preliminares de los estudios de metabolómica de las especies fúngicas de la serie **CC5** (Continuación).

<p>CC5-5</p>	 <p>Policétido novedoso [C₁₂H₁₆O₅]</p>  <p>Ciclosporina A [C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂]</p>  <p>5,8-<i>epi</i>-Dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol C₂₈H₄₂O₃</p>
<p>CC5-12</p>	 <p>Altenueno [C₁₅H₁₆O₆]</p>  <p>1-Hidroxi-6-metil-8-hidroximetilxantona C₁₅H₁₂O₄</p>
<p>CC5-13 y CC5-15</p>	 <p>Ácido (10<i>E</i>,12<i>E</i>)-9-hidroxiocetadeca-10,12-dienoico C₁₈H₃₂O₃</p>

Así, a partir del análisis comparativo de los espectros de masas y en el UV de las muestras analizadas con respecto a los reportados en la base de datos utilizada en estos estudios de metabolómica, se identificaron solo en las muestras con las claves CC5-2, CC5-5, CC5-7, CC5-12, CC5-13 y CC5-15, la presencia de micotoxinas y/o derivados de ácidos grasos. En conjunto estos resultados, permitieron seleccionar a las especies CC5-5, CC5-8, CC5-10, CC5-11 y CC5-13 para la realización de su estudio químico (**Figura 15**).



4.3 Identificación taxonómica.

Los estudios comparativos de las secuencias de nucleótidos de los genes del RNA ribosomal (rRNA) proporcionan un medio para analizar las relaciones filogenéticas en una amplia gama de niveles taxonómicos.⁶¹ Las secuencias de rDNA de la subunidad pequeña nuclear (similares a 16S) evolucionan relativamente lento y son útiles para estudiar organismos remotamente relacionados, mientras que los genes rRNA mitocondriales evolucionan más rápidamente y pueden ser útiles a nivel ordinal o familiar. La región

espaciadora transcrita interna y el espaciador intergénico de las unidades de repetición de rRNA nucleares evolucionan más rápido y pueden variar entre especies dentro de un género o entre poblaciones.⁶² Mediante esta técnica fue posible identificar taxonómicamente a las cinco especies seleccionadas para su estudio químico (**Figura 15**).

4.4 Estudio químico de las especies fúngicas seleccionadas.

4.4.1 Fraccionamiento preliminar y evaluación biológica.

Con la finalidad de obtener a los compuestos activos presentes en las 5 especies seleccionadas, se inició su estudio químico biodirigido. Para ello, en primer lugar, se realizó la preparación de los cultivos en mediana escala de las cinco especies, una vez transcurrido los tiempos de fermentación se prepararon los extractos orgánicos correspondientes, los cuales fueron fraccionados de manera preliminar mediante una cromatografía en columna tipo flash utilizando gel de sílice como fase estacionaria (**inciso 3.7** parte experimental). Este procedimiento permitió la obtención de diversos conjuntos de fracciones primarias a partir de cada extracto analizado CC5-5 [CC5-5₁–CC5-5₈]; CC5-8 [CC5-8₁–CC5-8₉]; CC5-10 [CC5-10₁–CC5-10₇]; CC5-11 [CC5-11₁–CC5-11₆] y CC5-13 [CC5-13₁–CC5-13₁₀]. Cada uno de los conjuntos de fracciones obtenidos a partir de cada extracto fue evaluado utilizando el mismo bioensayo que permitió establecer el potencial antibacteriano de los extractos orgánicos a pequeña escala (**Cuadro 11**).

El aislamiento y la purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias activas CC5-8₅, CC5-11₅ y CC5-13₄ se realizó mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución. Este proceso permitió la caracterización de cuatro metabolitos secundarios a partir de las especies *Alternaria* sp. (CC5-8), *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) y *Aspergillus* sp. (CC5-13). De manera general, la elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, comparación de las constantes físicas y espectroscópicas con aquellas descritas en la literatura.

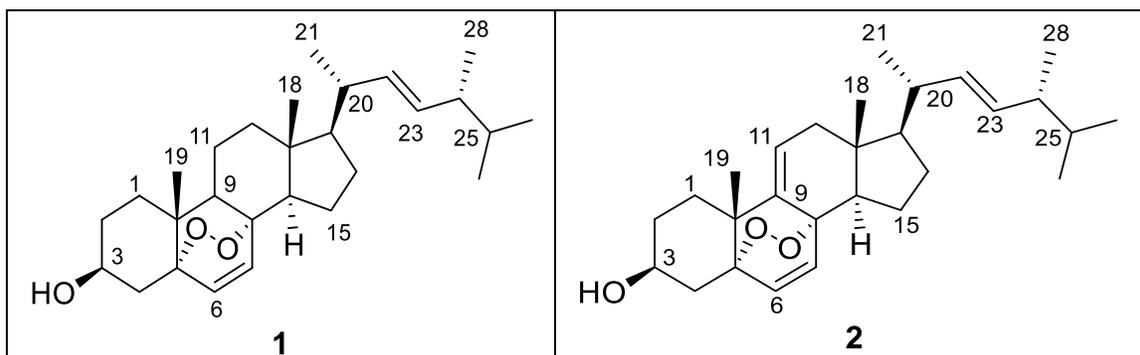
Cuadro 11. Resultados de la evaluación antimicrobiana de los extractos y fracciones de las especies fúngicas seleccionadas.

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>
CC5-5 PE	21.5						
CC5-5 ME	1005.1						
CC5-5 3	293.1						
CC5-5 4	116.0						
CC5-5 5	22.5						
CC5-5 6	30.0						
CC5-5 7	66.7						
CC5-5 8	41.6						
CC5-8 PE	42.5						
CC5-8 ME	1523.9						
CC5-8 2	30.5						
CC5-8 3	487.7						
CC5-8 4	119.9						
CC5-8 5	23.7						
CC5-8 6	12.9						
CC5-8 7	18.9						
CC5-8 8	98.9						
CC5-8 9	477.5						
CC5-10 PE	58.6						
CC5-10 ME	539.5						
CC5-10 4	332.1						
CC5-10 5	14.1						
CC5-10 6	86.4						
CC5-10 7	35.9						
CC5-11 PE	324.3						
CC5-11 ME	203.3						
CC5-11 4	22.2						
CC5-11 5	23.1						
CC5-11 6	88.8						
CC5-13 PE	154.6						
CC5-13 ME	1305.2						
CC5-13 4	207.1						
CC5-13 5	62.5						
CC5-13 6	31.7						
CC5-13 7	96.2						
CC5-13 8	220.7						
CC5-13 9	180.8						
CC5-13 10	54.6						
CMI (µg/mL) *ampicilina **gentamicina ***nistatina		1.56**	0.08*	0.16*	7.8*	0.78*	0.39***
	Inhibición total a 200 y 20 µg/mL						
	Inhibición total a 200 µg/mL y parcial a 20 µg/mL						
	Inhibición total a 200 µg/mL						
	Inhibición parcial a 200 y 20 µg/mL						
	Inhibición parcial a 200 µg/mL						

4.4.2 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de la especie *Alternaria* sp. (CC5-8).

El estudio químico de la especie *Alternaria* sp. (CC5-8), permitió el aislamiento de los compuestos **1** y **2**, caracterizados como el peróxido de ergosterol y el 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol, respectivamente. La descripción de la caracterización estructural de los compuestos se resume a continuación.

El compuesto **1** se aisló como un sólido blanco y su espectro de masas de alta resolución generado por la técnica de electrospray en modo de ionización positivo (ESI⁺) permitió establecer su fórmula como C₂₈H₄₄O₃ con base en el ion observado para la molécula protonada en una relación masa-carga (*m/z*) de 429.3363 [M + H]⁺ calculado para *m/z* 429.3363, Δ -0.1 ppm, y cuya fórmula permite un índice de deficiencia de hidrógenos de siete (**Figura 16**). El análisis detallado de los espectros de RMN del compuesto **1** (**Figura 17 y Cuadro 12**) presenta un perfil típico de un esteroide, lo cual se confirmó mediante la comparación de los desplazamientos químicos experimentales con aquellos descritos en la literatura.⁶³



En el espectro de ¹H-RMN las señales diagnósticas observadas que permitieron la identificación de **1** como el peróxido de ergosterol se detallan a continuación:

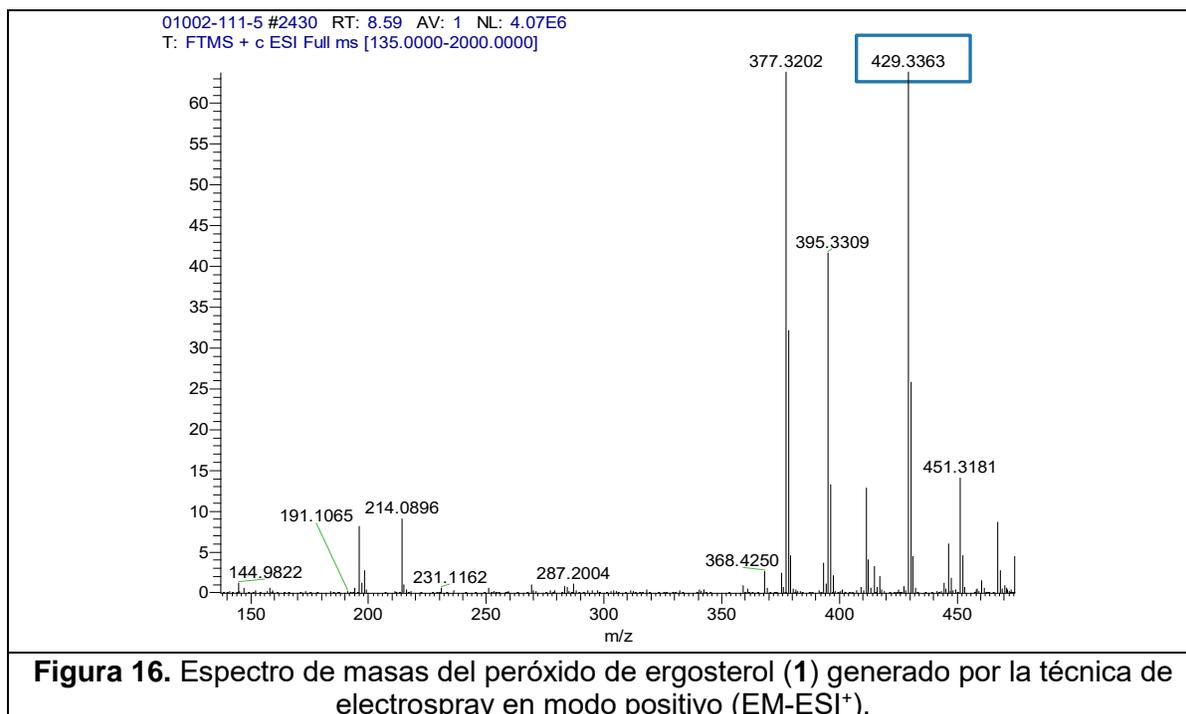
a) En δ_H 0.82 (s) y 0.88 (s) se observan dos singuletes asignables a dos grupos metilo (CH₃-18 y CH₃-19). También se aprecian dos conjuntos de señales asociadas con la

presencia de cuatro grupos metilo en δ_H 0.99 (d, $J = 6.4$ Hz) y 0.89 (d, $J = 6.9$ Hz) (CH_3 -21 y CH_3 -28) y en δ_H 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz) y 0.83 (d, $J = 6.8$ Hz) (CH_3 -26 y CH_3 -27).

b) En δ_H 6.24 (d, $J = 8.6$ Hz), 6.50 (d, $J = 8.6$ Hz), 5.20 (dd, $J = 15.4, 7.8$, Hz) y 5.15 (dd, $J = 15.4, 7.2$, Hz) se observan señales dobles asignables a los protones vinílicos H-6, H-7, H-22 y H-23, respectivamente.

c) Finalmente, se observa en δ_H 3.96 (m) una señal múltiple asignable al protón H-3 adyacente a un grupo hidroxilo. Con lo descrito anteriormente, se caracterizó al producto **1** como el peróxido de ergosterol.

Este metabolito ha sido aislado previamente de diversas fuentes naturales incluyendo hongos y líquenes,⁶³ y de algunas especies de *Streptomyces* sp. y *Nodulisporium* sp. Las propiedades más notables comprobadas para el compuesto son antiviral⁶⁴, antitumoral⁶⁵, anti *M. tuberculosis*⁶⁶ y antimicrobiana.⁶⁷



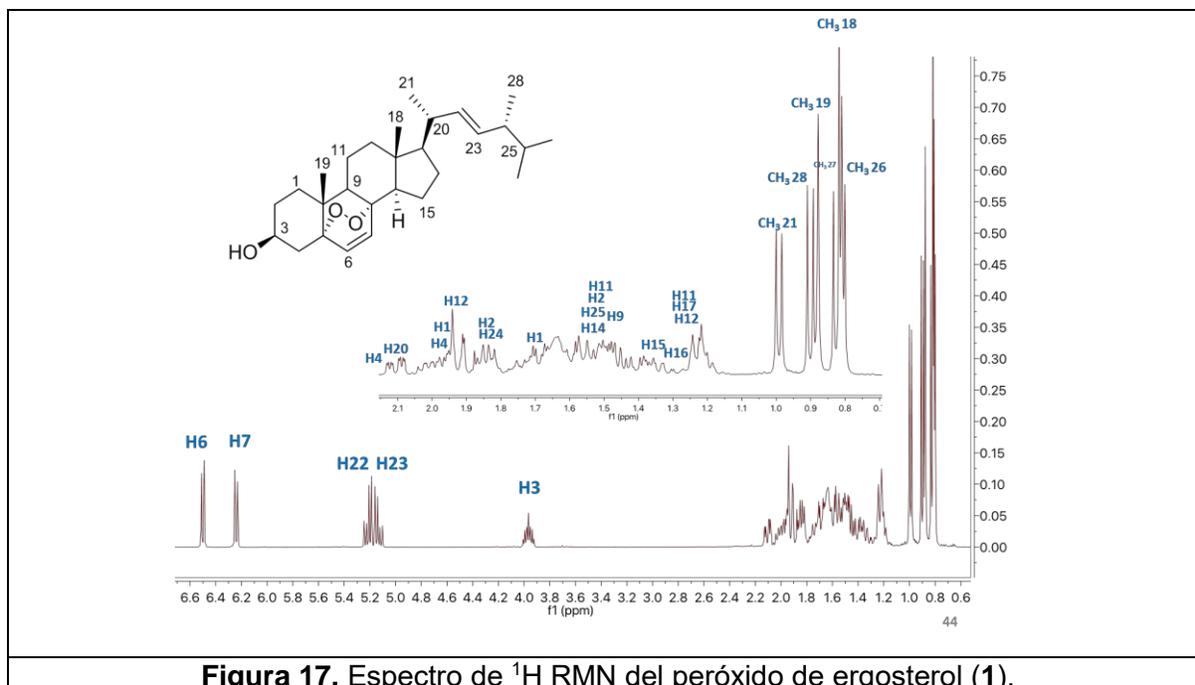


Figura 17. Espectro de ^1H RMN del peróxido de ergosterol (1).

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl_3) del peróxido de ergosterol (1).

Posición	δ_{H} , mult (J en Hz)	Tipo de H	δ_{H} , mult (J en Hz) ⁶³
1	1.71 m, 1.98 m	CH_2	1.71 dd (13.5,3.1), 1.98 dd (13.5, 3.1)
2	1.53 m, 1.84 m	CH_2	1.55 m, 1.85 m
3	3.96, m	CH	3.98, m
4	1.94 m, 2.12 m	CH_2	1.94 m, 2.11 m
6	6.50, d (8.6)	CH	6.51, d (8.6)
7	6.24, d (8.6)	CH	6.25, d (8,6)
9	1.49 m	CH	1.50 m
11	1.24 m, 1.53 m	CH_2	1.22 m, 1.53 m
12	1.24 m, 1.94 m	CH_2	1.25 m, 1.96 m
14	1.58 m	CH	1.57 m
15	1.39 m, 1.65 m	CH_2	1.40 m, 1.65 m
16	1.34 m, 1.76 m	CH_2	1.35 m, 1.80 m
17	1.24 m	CH	1.24 m
18	0.82 s	CH_3	0.83 m
19	0.88 s	CH_3	0.89 m
20	2.03 m	CH	2.03 m
21	0.99, d (6.4)	CH_3	1.0, d (6.6)
22	5.15, dd (15.4, 7.2,)	CH	5.15, dd (7.7, 15.2)
23	5.20, dd (15.4, 7.8,)	CH	5.22, dd (8.2, 15.2)
24	1.84 m	CH	1.85 m
25	1.49 m	CH	1.50 m
26	0.81, d (6.6)	CH_3	0.82, d (6.7)
27	0.83, d (6.8)	CH_3	0.84, d (6.7)
28	0.89, d (6.9)	CH_3	0.91, d (6.7)

El compuesto **2** se aisló a partir de la fracción primaria CC5-8-5 como un sólido amarillo claro. La fórmula molecular del compuesto se estableció como C₂₈H₄₂O₃ por EM de alta resolución modalidad ESI⁺ (m/z 427.3210 [M+H]⁺ calculado para m/z 427.3207, Δ +0.8 ppm), cuya fórmula permite un índice de deficiencia de hidrógenos de ocho (**Figura 18**). El análisis detallado de los espectros de RMN uni y bidimensionales permitió establecer que **2** presentaba un núcleo similar al del peróxido de ergosterol (**1**). La principal diferencia observada en el espectro del compuesto **2** respecto al de **1** radica en las absorciones para un hidrógeno vinílico adicional en δ_H 5.43 (dd, $J = 6.9, 1.9$ Hz). En el caso del compuesto **1** solo se observan cuatro conjuntos de señales asignables a cuatro protones de dobles enlaces [δ_H 6.50, 6.24, 5.20 y 5.15] (**Cuadro 13 y Figura 19**).⁶⁸ El desplazamiento químico observado para la señal vinílica en δ_H/δ_C 5.43/119.9 aunado a la diferencia de 2 uma observado en el espectro de masas del producto **2** permite proponer la ubicación de una doble ligadura entre los carbonos C-9 y C-11 del núcleo base. De manera adicional, el análisis detallado de los espectros bidimensionales, en conjunto con los datos espectroscópicos descritos en la literatura ⁶⁸ permitieron corroborar de manera inequívoca la ubicación correcta del doble enlace en el núcleo de esterol. Cabe mencionar que en la literatura científica no está caracterizada completamente la molécula, por lo que este trabajo servirá de referencia para futuros estudios de asignación de este derivado esteroide. Así, con base en las evidencias antes descritas la estructura del compuesto **2** se asignó como el 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol.

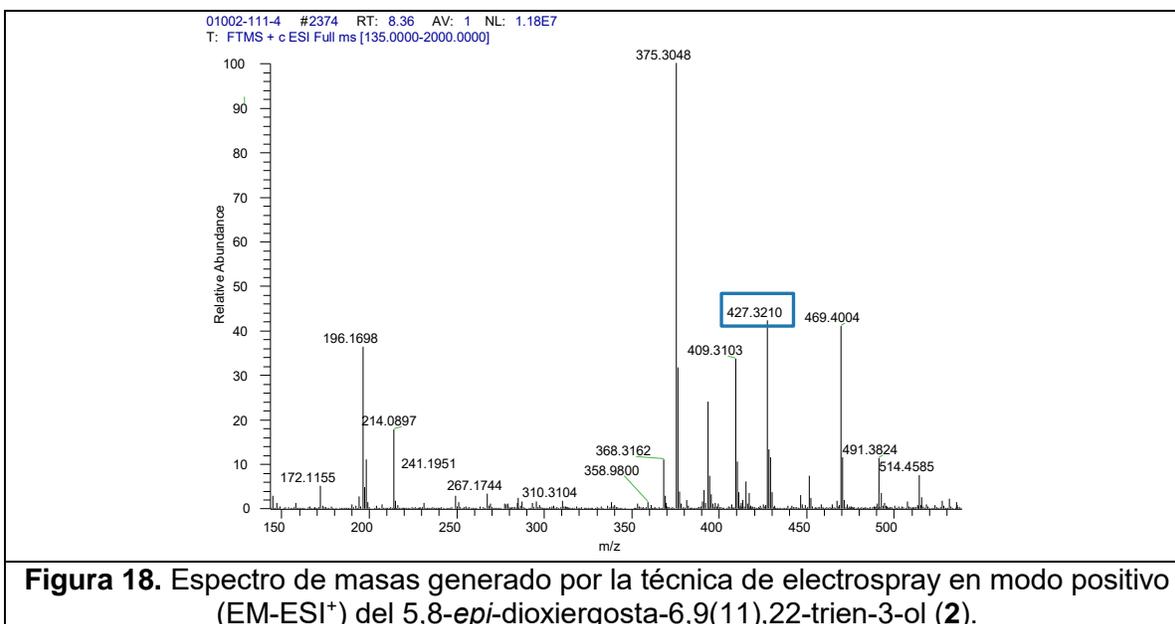
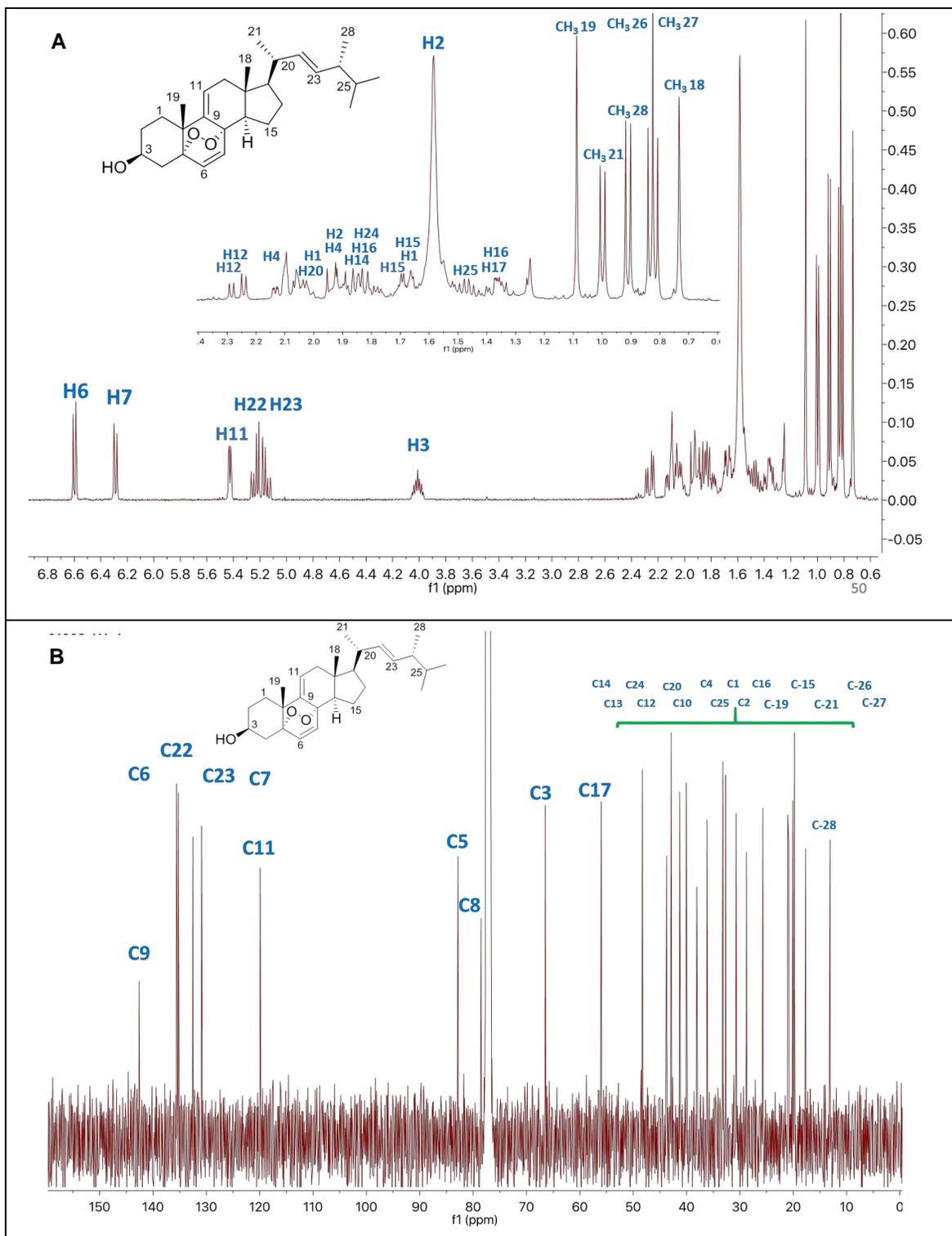
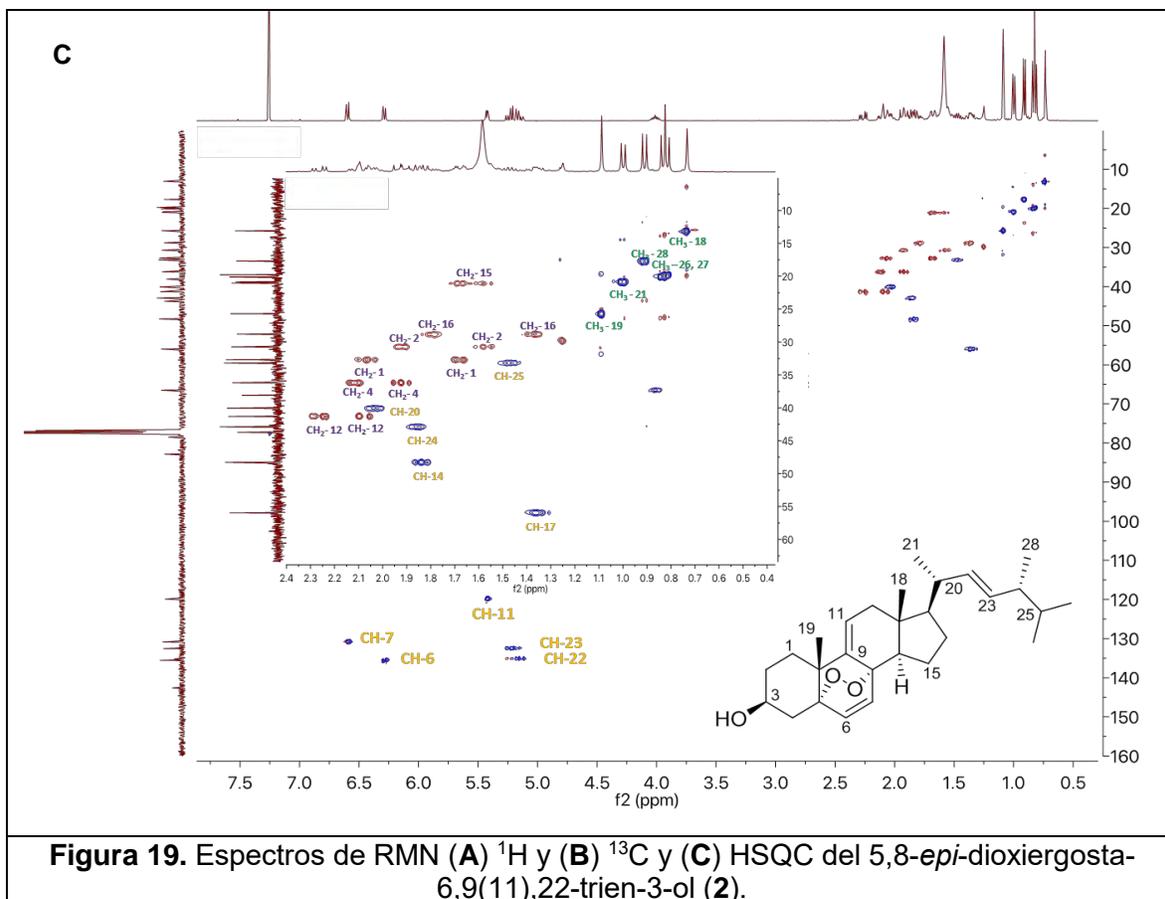


Figura 18. Espectro de masas generado por la técnica de electrospray en modo positivo (EM-ESI⁺) del 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (**2**).

Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN (^1H 400 MHz/ ^{13}C 100 MHz; CDCl_3) del 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol (**2**).

Posición	δ_{H} , mult (J en Hz)	Tipo de C	δ_{C}	δ_{H} , mult (J en Hz) ⁶⁸	δ_{C}^{68}
1	1.69 m, 2.07 m	CH ₂	32.7		34.7
2	1.58 m, 1.93 m	CH ₂	30.7		30.2
3	4.01 m	CH	66.5		66.5
4	1.93 m, 2.14 m	CH ₂	36.2		37.0
5		C	82.8		82.8
6	6.29, d (8.7)	CH	135.2	6.27, d (8.5)	135.5
7	6.60, d (8.9)	CH	130.9	6.58, d (8.5)	130.8
8		C	78.5		79.5
9		CH	142.6		142.6
10		C	38.1		37.0
11	5.43, dd (6.9, 1.9)	CH	119.9	5.40, dd (2.0, 6.0)	119.8
12	2.24, d (6.0), 2.29 d (6.1)	CH ₂	41.3		39.5
13		C	43.7		44.8
14	1.84 m	CH	48.3		51.6
15	1.58 m, 1.67 m	CH ₂	21.0		20.7
16	1.36 m, 1.79 m	CH ₂	28.8		28.3
17	1.36 m	CH	56.0		56.4
18	0.73, s	CH ₃	13.1	0.79, s	12.7
19	1.09, s	CH ₃	25.6	1.07, s	18.2
20	2.04 m	CH	40.1		36.0
21	1.0, d (6.6)	CH ₃	20.8	0.97, d (6.6)	18.7
22	5.17, dd (15.3, 7.4)	CH	135.2		135.5
23	5.24 dd (15.3, 7.4)	CH	132.5		134.4
24	1.85 m	CH	42.9		46.1
25	1.46 m	CH	33.2		29.0
26	0.83, d (6.4)	CH ₃	20.1	0.88, d (6.4)	19.0
27	0.82, d (6.4)	CH ₃	19.9	0.89, d (6.8)	19.7
28	0.91, d (6.8)	CH ₃	17.7	0.90 d, (6.7)	23.1





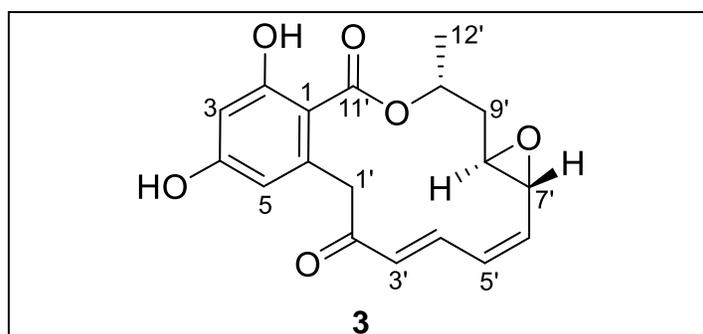
Este producto ya ha sido previamente aislado de *Ganoderma lucidum* y de la especie comestible *Sarcodon aspratus*⁶⁹ con actividad citotóxica contra distintas líneas celulares [carcinoma hepatocelular humano (Hep 3B)⁷⁰ y adenocarcinoma de mama humano MCF-7].⁷¹ También, se ha descrito su actividad inhibitoria del crecimiento de las células HT29 induciendo la expresión de CDKN1A, lo que provoca la detención del ciclo celular y generando apoptosis.⁷² El aislamiento del producto **1** se describió en la especie *Alternaria dianthicola*.⁷³ Sin embargo, ésta es la primera descripción del aislamiento del producto **2** en el género *Alternaria* y constituye una aportación original al estudio del contenido metabólico de la especie.

4.4.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de la especie *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11).

El fraccionamiento primario del extracto activo a mediana escala de la especie *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) permitió la obtención de seis conjuntos de fracciones

primarias [CC5-11₁–CC5-11₆]. La evaluación biológica de las fracciones primarias permitió establecer que la actividad se concentraba en CC5-11₄, CC5-11₅ y CC5-11₆. El aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción activa CC5-11₅ (23.1 mg) mediante el empleo de HPLC permitió la separación la monocilina I (**3**).

El producto **3** se obtuvo como un sólido amarillo pálido, la fórmula molecular se estableció como C₁₈H₁₈O₆, determinada por la técnica de electrospray en modo de ionización positivo y negativo (m/z 331.1174 [M+H]⁺ y m/z 329.1031 [M-H]⁻; calculado para m/z 331.1176, Δ +0.6 ppm), cuya fórmula permite un índice de deficiencia de hidrógenos de diez (**Figura 20**). Los espectros de RMN (**Figura 21**) resultaron similares con aquellos de metabolitos de tipo macrólido (**Cuadro 14**).⁷⁴ Las características más importantes de los espectros se resumen a continuación:



a) En δ_H 5.97-7.92 se observan seis conjuntos de señales dobles asignables a dos protones aromáticos *meta* orientados (H-3 y H-5) y a cuatro protones vinílicos (H-3'-H-6'). El conjunto de señales recién descrito en el espectro de ¹³C RMN correlacionan con los desplazamientos en δ_C 103.3 (C-3), 110.1 (C-5), 130.6 (C-3'), 142.8 (C-4'), 130.0 (C-5') y 137.3 (C-6'), respectivamente. Asimismo, el desplazamiento químico de las señales en δ_C 162.2 (C-2) y 166.1 (C-4) indica que dos de los sustituyentes presentes en el anillo aromático del producto son oxigenados.

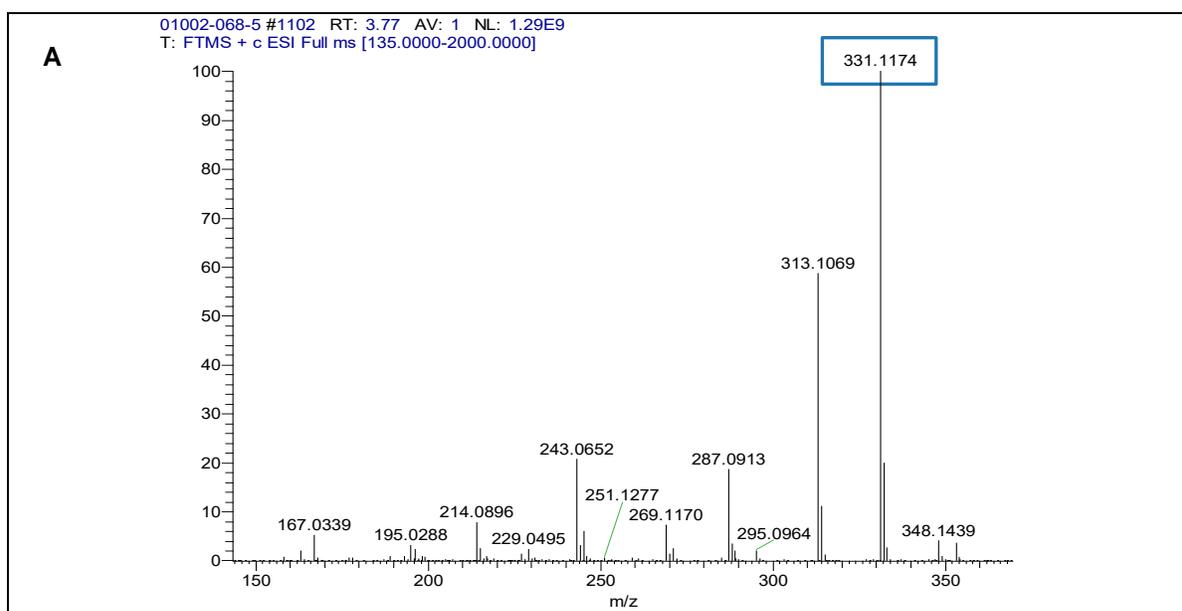
b) El espectro de ¹H RMN contiene señales diagnósticas para la presencia de una función epóxido, las absorciones correspondientes aparecen como dos señales dobles en δ_H 3.10 m y 3.28 m, y en el espectro de ¹³C RMN en δ_C 55.5 y 55.7, respectivamente. Esta función epóxido se encuentra ubicada entre C-7' y C-8'. Además, en δ_H/δ_C 5.57/71.2 se observa

una señal múltiple correspondiente al metino adyacente que esterifica a la función lactona presente (H-10').

c) Finalmente, el desplazamiento en δ_H 1.62 (d, $J = 6.9$ Hz) muestra una señal doble diagnóstica para un grupo metilo que correlaciona con la absorción en δ_C 19.0.

Con base en las evidencias presentadas este producto natural se caracterizó como la monocilina I (**3**). Este compuesto se aisló previamente de *Monocillium nordinii* y las constantes espectroscópicas se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura.⁷⁴ También, se ha relatado su aislamiento a partir de *Neophaeosphaeria quadrisepata*, hongo que habita la rizósfera del cactus de navidad (*Opuntia leptocaulis*),⁷⁵ de la especie endófito *N. quadrisepata* y a partir de la rizósfera de las plantas jóvenes de maíz en Brasil.⁷⁶ Sin embargo, no se ha mencionado el aislamiento de este producto en ningún género perteneciente a la familia Coniothyriaceae.

Existen varios informes sobre la actividad antifúngica de **3** contra los patógenos más comunes del maíz (*Fusarium graminearum*, *Nigrospora oryzae*, *Stenocarpella maydis*, *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris zeicola*, *Curvularia lunata*, *Acremonium zeae*, *F. verticillioides* y *Aspergillus flavus*)^{74, 77}



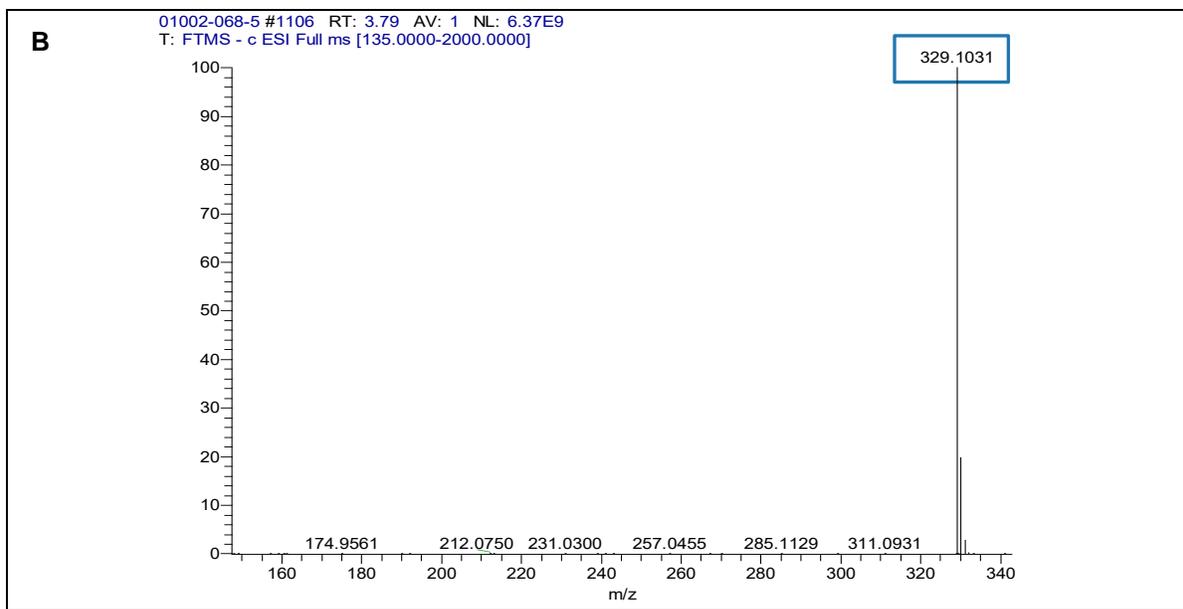
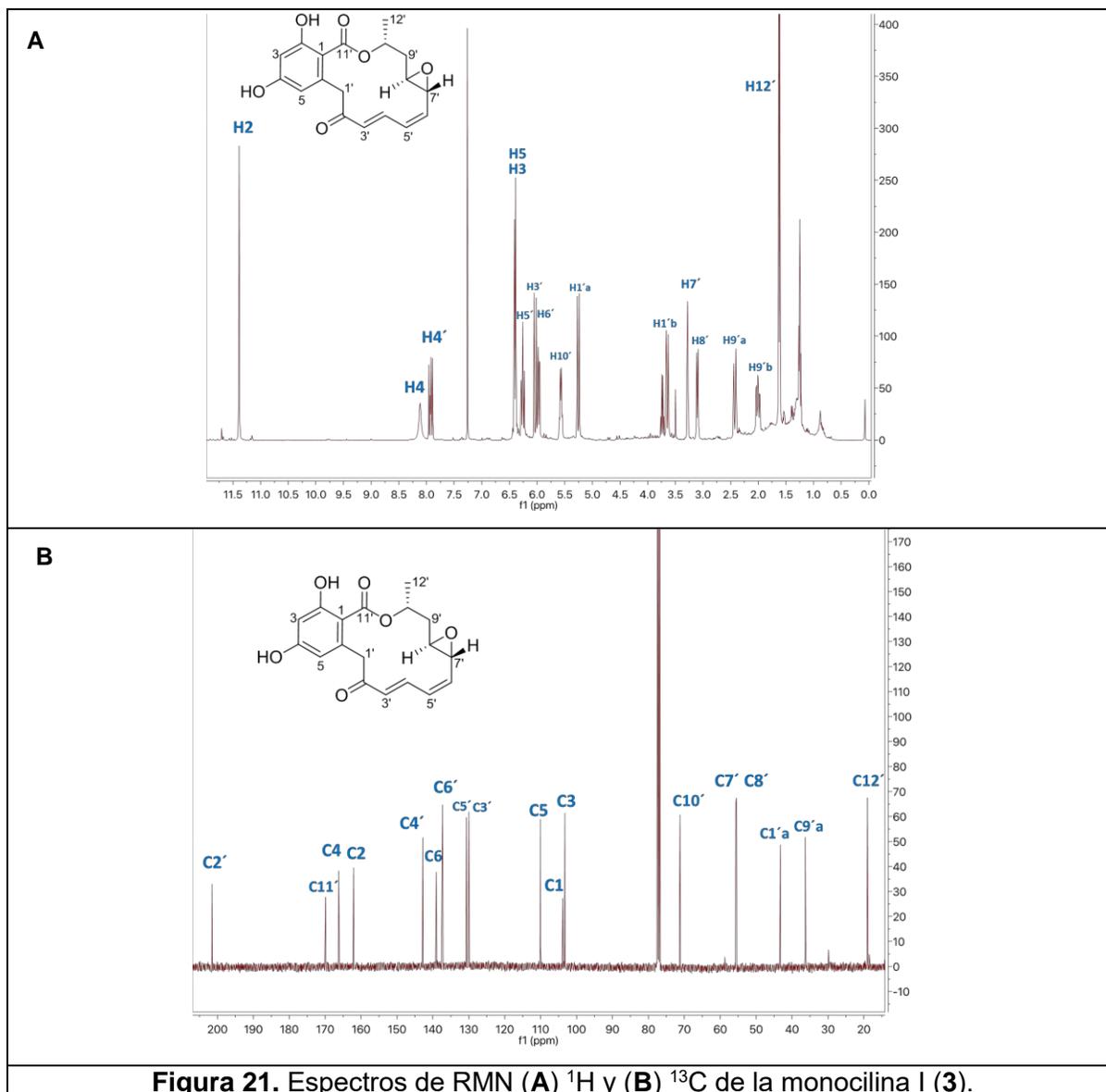


Figura 20. Espectros de masas generados por la técnica de electrospray en los modos de ionización positivo (A) y negativo (B) de la monocilina I (3).

Cuadro 14. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) de la monocilina I (3).

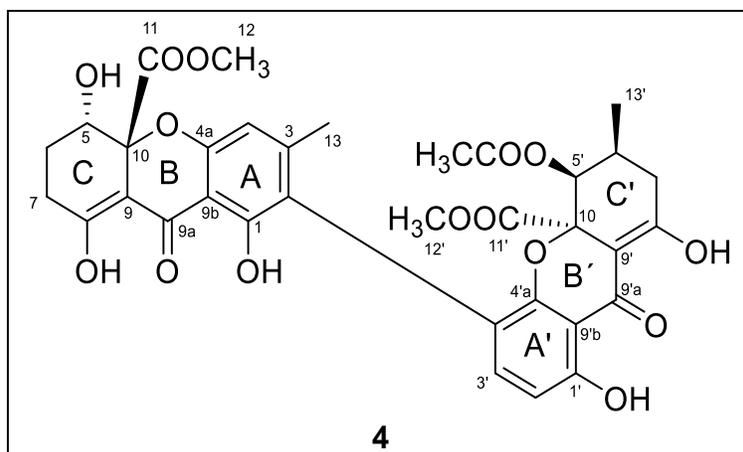
Posición	δ_H , mult (J en Hz)	Tipo de C	δ_C	δ_H , mult (J en Hz) ⁷⁸	δ_C ⁷⁸
1		C	103.9		103.9
1'b	3.64 d, (13.8)	CH ₂		3.62 d, (13.9)	
1'a	5.26 d, (13.8)	CH ₂	43.3	5.21 d, (13.9)	43.3
2	11.38 s	C	162.2	11.38 s	162.3
2'		C	201.5		201.8
3	6.41 d, (2.5)	CH	103.3	6.36 d, (2.3)	103.4
3'	6.03 d, (15.9)	CH	130.7	5.99 d, (15.9)	130.7
4	8.11 s	C	166.1	6.01 s	166.4
4'	7.92 dd, (15.9, 11.5)	CH	142.8	7.85 dd, (15.9, 11.4)	143
5	6.39 d, (2.5)	CH	110.1	6.33 d, (2.3)	110.2
5'	6.26 dd, (12.4, 10.2)	CH	130.0	6.27 dd, (13.1, 10.4),	130.1
6		C	139.0		139.1
6'	5.97 dd, (10.3, 3.1)	CH	137.3	5.94 dd, (10.3, 2.7)	137.5
7'	3.28 m	CH	55.5	3.3 m	55.6
8'	3.10 m	CH	55.7	3.1 m	55.8
9'b	2.01 m	CH ₂		1.99 m	
9'a	2.42 dt, (15.1, 3.1)	CH ₂	36.3	2.42 dt, (15.1, 3.0)	36.4
10'	5.57 m	CH	71.2	5.58 m	71.3
11'		C	169.9		170.0
12'	1.62 d, (6.9)	CH ₃	19.0	1.62 d (6.8)	19.1



4.4.4 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de la especie *Aspergillus* sp. (CC5-13)

La neosartorina (4) se obtuvo mediante el fraccionamiento primario por cromatografía tipo flash del extracto orgánico en mediana escala, este compuesto se aisló en la fracción primaria activa CC5-13₄ (207.1 mg) (**inciso 3.10 de la sección experimental**). Las constantes espectrosópicas y espectrométricas del producto natural se describen a continuación.

La molécula protonada se identificó mediante el ion de m/z 681.1817 $[M + H]^+$ y la desprotonada por el ion m/z 679.1671 $[M-H]^-$ observados en el espectro (**Figura 22**) del producto natural y corresponde con la fórmula $C_{34}H_{32}O_{15}$, calculado para m/z 681.1814, Δ +0.4 ppm, cuya fórmula permite diecinueve insaturaciones. La información proporcionada por el espectro de masas y el análisis de los espectros de ^{13}C RMN permitieron comprobar que el producto **4** es una estructura dimérica (**Cuadro 15**).⁷⁹

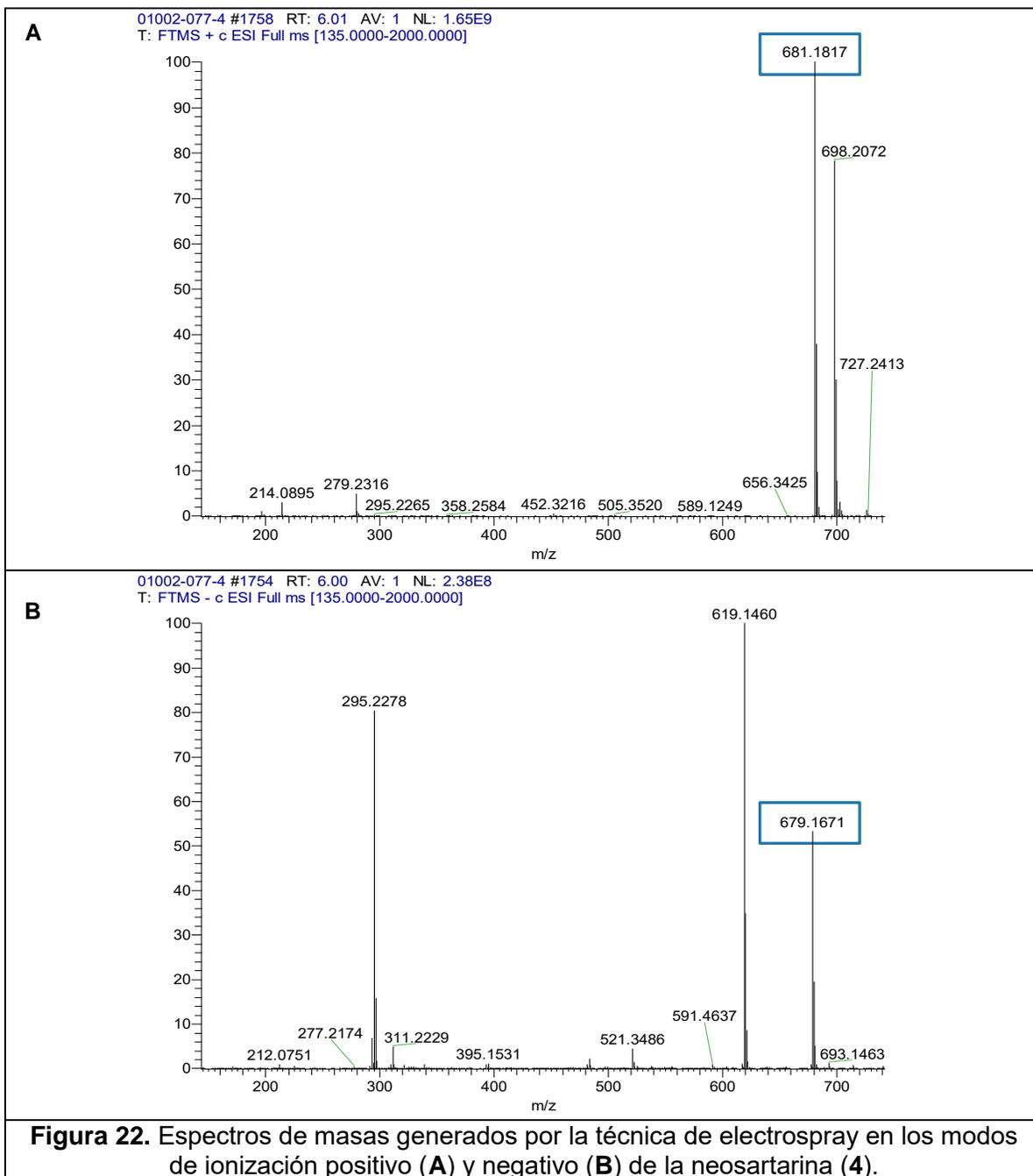


Los espectros de RMN (**Figura 23**) presentan las siguientes características:

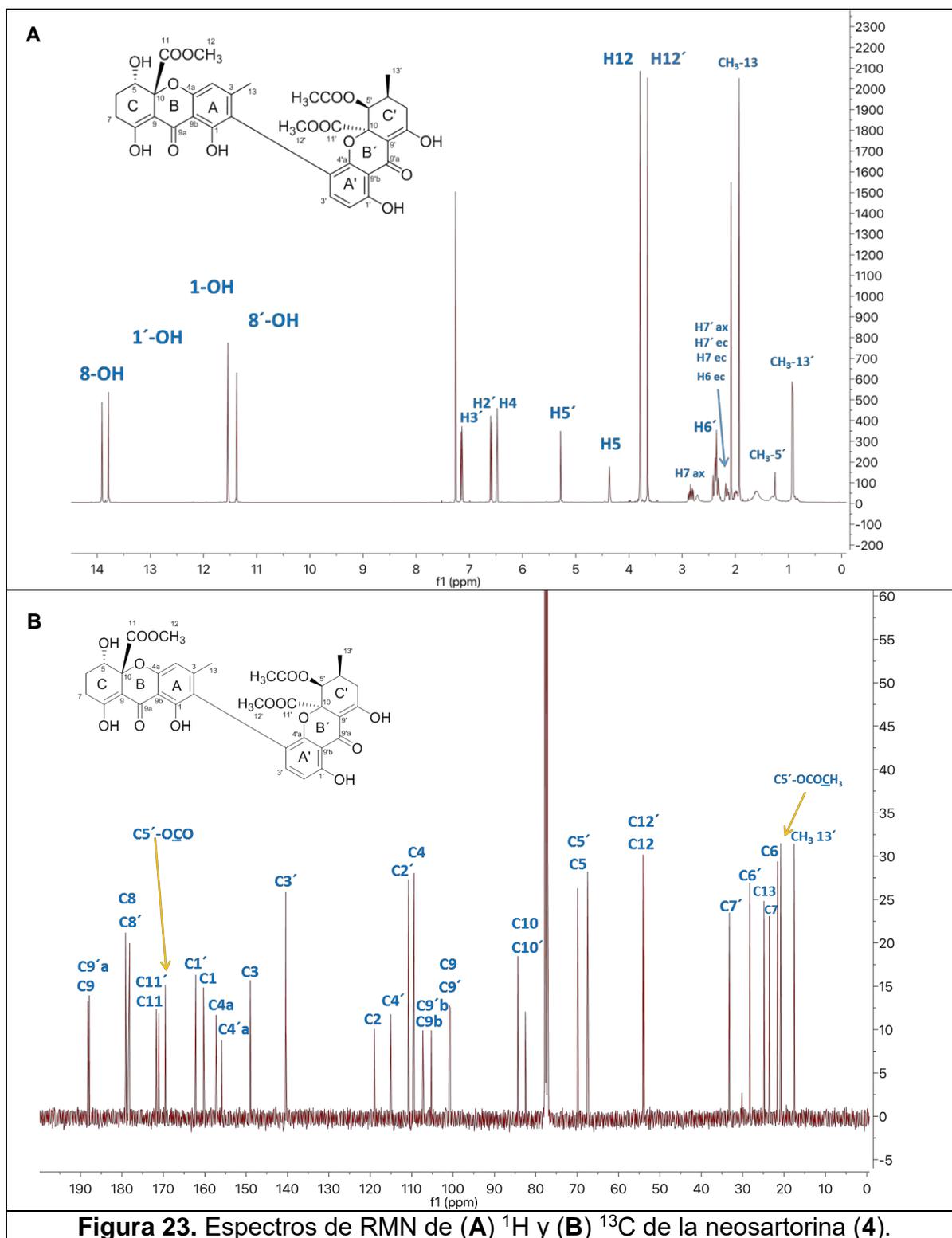
a) En el espectro de RMN 1H se observan señales simples para cuatro grupos hidroxilo quelatados en δ_H 11.38 (C8'-OH), δ_H 11.54 (C1-OH), δ_H 13.79 (C1'-OH) y δ_H 13.91 (C8-OH), estas señales correlacionan con los desplazamientos observados en el espectro de RMN ^{13}C δ_C 178.81, δ_C 159.97, δ_C 161.87 y δ_C 178.81, respectivamente.

b) Se observan una señal correspondientes a un metilo adyacente a un anillo aromático δ_H 0.92 m (C-13') y una señal en δ_H 2.08 s (C-13) para otro metilo, cuyas señales corresponden con las observadas en el espectro de RMN ^{13}C δ_C 17.2 (C-13') y δ_C 20.4 (C-13) Adicionalmente, se observan señales pertenecientes a los protones de los grupos metil éster presentes en la molécula δ_H 3.79 s, δ_H 3.65 s y δ_H 1.93 s y en el espectro de RMN ^{13}C están presentes las señales correspondientes en δ_C 53.7, δ_C 53.5 y 21.2.

c) En el espectro de RMN ^{13}C , se observan cuatro señales correspondientes a carbonos con función éter en δ_{C} 84.0 (C-10), δ_{C} 156.9 (C-4a), δ_{C} 82.2 (C-10') y δ_{C} 155. (C-4a'). Se identificó que los dos núcleos de xanteno se acoplan a través de las uniones entre C2 y C4'.



Cuadro 15. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) de la neosartorina (4).					
Posición	δ_H, mult (J en Hz)	Tipo de C	δ_C	δ_H, mult (J en Hz)⁷⁹	δ_C⁷⁹
1		C	159.9		159.9
1'		C	161.8		161.8
2		C	118.7		118.4
2'	6.59, d (8.5)	CH	110.4	6.58, d (8.5)	110.0
3		C	148.6		148.5
3'	7.15, d (8.5)	CH	140.0	7.12, d (8.5)	139.8
4	6.48 s	CH	109.1	6.47, s	108.9
4'		C	114.7		114.5
4a		C	156.9		156.7
4'a		C	155.6		155.3
5	4.36, dd (4.1, 1.9)	CH	67.1	4.36, dd (4.1, 1.7)	66.8
5'	5.28, d (1.5)	CH	69.5	5.28, d (1.4)	69.2
6		CH ₂	23.2		22.9
6ax	1.97, m	CH ₂		1.97, m	
6 ec	2.16 m	CH ₂		2.14, m	
6'	2.31, m	CH	27.9	2.31, m	27.6
7		CH ₂	24.5		24.2
7ax	2.84, m	CH ₂		2.83, m	
7ec	2.38, m	CH ₂		2.37, m	
7'		CH ₂	32.9		32.4
7'ax	2.38, m	CH ₂		2.37, m	
7'ec	2.38, m	CH ₂		2.37, m	
8	13.91, s	C	178.8	13.90, s	178.5
8'	11.38, s	C	177.8	11.36, s	177.7
9		C	100.3		100.4
9'		C	100.6		100.0
9a		C	187.5		187.7
9'a		C	187.8		187.8
9b		C	104.9		104.7
9'b		C	106.9		106.7
10		C	84.0		83.8
10'		C	82.2		81.9
11		C	171.3		171.0
11'		C	170.7		170.5
12	3.79, s	OCH ₃	53.7	3.79, s	53.6
12'	3.65, s	OCH ₃	53.5	3.64, s	53.2
13	2.08, s	CH ₃	20.4	2.07, s	20.8
13'	0.92, m	CH ₃	17.2	0.92, m	17.2
1-OH	11.54, s	C		11.53, s	
1'-OH	13.79, s	C		13.78, s	
5'-OCO		C	169.2		169.0
5'-OCOCH ₃	1.93, s	CH ₃	21.2	1.92, s	20.3
8-OH	13.91, s	C		13.90, s	
8'-OH	11.38, s	C		11.36, s	



La neosartorina se aisló por primera vez en 1998 y se identificó como un pigmento amarillo producido por *Neosartorya fischeri*.⁷⁹ También, se aisló de la especie *Aspergillus fumigati*affinis.⁸⁰ La neosartorina inhibió el crecimiento de un amplio espectro de bacterias Gram (+) como *S. aureus*, *B. Subtilis*, además de diferentes especies de estreptococos y enterococos.⁸⁰ La actividad citotóxica del compuesto se ensayó contra diversas líneas celulares.; Sin embargo, se observó que éste no interfería con el crecimiento y la viabilidad de las células eucariotas.⁸⁰

5. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento axénico de 44 taxones fúngicos provenientes de cuatro muestras diferentes (suelo, placa microbiana y sedimento) colectadas en la RCCC.
- La evaluación biológica de los extractos orgánicos de las 44 especies, utilizando como ensayo la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+) positivo, Gram (-) negativo y una levadura, junto con los estudios de metabolómica, permitió la selección de cinco hongos de la serie CC5 para el descubrimiento de moléculas biodinámicas con posible actividad antimicrobiana.
- Las especies seleccionadas fueron identificadas mediante los análisis del marcador molecular ITS como: *Epicoccum nigrum* (CC5-5), *Alternaria* sp. (CC5-8), *Didymellaceae* sp. (CC5-10), *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) y *Aspergillus* sp. (CC5-13). Estos organismos fueron cultivados en mediana escala y sometidos a un estudio químico biodirigido.
- El fraccionamiento del extracto orgánico obtenido a partir de la especie *Alternaria* sp. (CC5-8) permitió el aislamiento y caracterización de dos moléculas de tipo esteroidal, el peróxido de ergosterol (**1**) y el 5,8-*epi*-dioxiergosta-6,9(11), 22-trien-3-ol (**2**), este último reportado por primera vez para una especie en el género *Alternaria*. Por otra parte, el estudio químico del extracto orgánico obtenido de la especie *Coniothyriaceae* sp. (CC5-11) permitió el aislamiento e identificación de la monocilina I (**3**), la cual es reportada por primera vez para una especie perteneciente a la familia Coniothyriaceae. Finalmente, a partir del extracto orgánico de la especie *Aspergillus* sp. (CC5-13) se obtuvo el policétido neosartorina (**4**), el cual es descrito por primera vez de una especie fúngica de la RECCC.

6. PERSPECTIVAS

Continuar con el estudio químico de las fracciones activas de las cinco especies fúngicas seleccionadas, con la finalidad de purificar y caracterizar los productos minoritarios responsables de la actividad biológica.

Realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos puros contra la una batería de microorganismos resistentes a fármacos, y establecer su potencial para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Nigam, P. S.; Singh, A. *Encycl. Food Microbiol.* **2014**, 2, 570–578.
- (2) Demain, A. L. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2013**.
- (3) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. *Microbiol. Spectr.* **2017**, 5 (4).
- (4) Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W. *Microbiology* **2005**, 3, 937–947.
- (5) Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, 1830 (6), 3670–3695.
- (6) Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P. *Nat. Rev.* **2010**, 9 (11), 883–897.
- (7) Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1830 (6), 3670–3695.
- (8) Silber, J.; Kramer, A.; Labes, A.; Tasdemir, D. *Mar. Drugs* **2016**, 14, 1–20.
- (9) Ligon, B. L.; August, I.; Fleming, A.; Howard, S.; Florey, W.; Boris, E. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **2004**, 15 (1), 52–57.
- (10) Singh, S. B.; Barrett, J. F. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 1006–1015.
- (11) Clardy, J.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24 (12), 1541–1550.
- (12) Scheeren, T. W. L. *Future Microbiol.* **2015**, 10, 1913–1928.
- (13) Waites, M. J.; Morgan, N. L.; Rockey, J. S. *Industrial Microbiology: An Introduction*; 2001.
- (14) Ali, A. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, 4 (11), 859–870.
- (15) Mikawrawng, K. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier B.V., 2016; pp 221–234.
- (16) Davies, J.; Columbia, B. *Antibiotic Resistance*; Elsevier Inc., 2013; Vol. 2.
- (17) Salud, O. M. de la. Resistencia a antimicrobianos
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> (accessed Jan 19, 2018).
- (18) Healthcare, I. I. for. *The Global Use of Medicines: Outlook Through 2016*; 2016.
- (19) Dreser, A.; Wirtz, V. J.; Corbett, K. K.; Echániz, G.; Dreser, A.; Vj, W.; Kk, C.; Echániz, G. *Salud Publica Mex.* **2008**, 50 (2).
- (20) Echaniz-Aviles, G.; Velazquez-Meza, M. E.; Carnalla-Barajas, M. N.; Soto-Noguerón, A.; Luis, J.; Fabio, D. I.; Solórzano-Santos, F.; Jiménez-Tapia, Y.; Tomasa, A. *Microb. Drug Resist.* **1998**, 4 (3).
- (21) Camargos, P.; Fischer, G. B.; Mocelin, H. *Pediatr. Respir. Rev.* **2006**, 7, 209–214.
- (22) Lewin, A.; Wentzel, A.; Valla, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, 24 (3), 516–525.
- (23) Magan, N. In *Environmental and Microbial Relationships*; 2007; pp 85–103.

- (24) Timling, I.; Taylor, D. L.; Newsham, K. K. *Fungal Ecol.* **2012**, *5* (4), 419–429.
- (25) Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P. *Food Technol. Biotechnol.* **2014**, *52* (2), 170–179.
- (26) Nosanchuk, J. D.; Casadevall, A. *Cell. Microbiol.* **2003**, *5*, 203–223.
- (27) Hawksworth, D. L. *Mycologist* **1997**, *11* (1), 18–22.
- (28) Aguirre-Acosta, E.; Ulloa, M.; Aguilar, S.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R. *Rev. Mex. Biodivers.* **2014**, *85*, 76–81.
- (29) Meyer, E. R. *Ecology* **1973**, *54* (5), 982–995.
- (30) Souza, V.; Escalante, A.; Espinoza, L.; Valera, A.; Souza, V.; Escalante, A.; Espinoza, L.; Valera, A. *Ciencias* **2004**, *75*, 4–12.
- (31) Minckley, T. A.; Jackson, S. T. *J. Biogeogr.* **2008**, *35* (1), 188–190.
- (32) Elser, J. J.; Schampel, J. H.; Garcia-pichel, F.; Wade, B. D. *Freshw. Biol.* **2005**, *50*, 1808–1825.
- (33) Escalante, A. E.; Eguiarte, L. E.; Espinosa-Asuar, L.; Forney, L. J.; Noguez, A. M.; Saldivar, V. S. *FEMS Microbiol Ecol.* **2008**, *65*, 50–60.
- (34) Souza, V.; Espinosa-asuar, L.; Escalante, A. E.; Eguiarte, L. E.; Farmer, J.; Forney, L.; Sobero, X.; Dirzo, R.; Elser, J. J.; Lloret, L.; Rodri, J. M. *PNAS* **2006**, *103* (17), 6565–6570.
- (35) Stein, B. A.; Kutner, L. S.; Adams, J. S. *Precious Heritage: The Status of Biodiversity in the United States*; Oxford University Press, 2000.
- (36) López-Lozano, N. E.; Eguiarte, L. E.; Bonilla-Rosso, G.; García-Oliva, F.; Martínez-Piedragil, C.; Rooks, C.; Souza, V. *Astrobiology* **2012**, *12* (7), 699–709.
- (37) Orgiazzi, A.; Dunbar, M. B.; Panagos, P.; de Groot, G. A.; Lemanceau, P. *Soil Biol. Biochem.* **2015**, *80*, 244–250.
- (38) Gereá, A. L.; Branscum, K. M.; King, J. B.; You, J.; Powell, D. R.; Miller, A. N.; Spear, J. R.; Cichewicz, R. H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (32), 4202–4205.
- (39) Fiehn, O. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171.
- (40) Nuzillard, J. H. J.; Renault, J. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16* (1), 55–95.
- (41) Gaudêncio, S. P.; Pereira, F. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (6), 779–810.
- (42) El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B. M.; Cech, N. B.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (9), 1709–1716.
- (43) Lou, J.; Fu, L.; Peng, Y.; Zhou, L. *Molecules* **2013**, 5891–5935.
- (44) Patriarca, A.; Vaamonde, G.; Pinto, V. F.; Aires, U. D. B.; Aires, B. *Encycl. Food Microbiol.* **2014**, *1*, 54–60.
- (45) Päivi M. Salo, PhDa, Samuel J. Arbes Jr, DDS, MPH, PhDa, Michelle Sever, BSa,

- Renee Jaramillo, MStatb, Richard D. Cohn, PhD, Stephanie J. London, DrPH, MDa, and Darryl C. Zeldin, Md. *J. allergy Clin. immunol* **2007**, *118* (4), 892–898.
- (46) Hille, J. E. M. and J. *Mol. Plant Pathol.* **2001**, *2*, 229–239.
- (47) Fernández-cruz, M. L.; Mansilla, M. L.; Tadeo, J. L. *J. Adv. Res.* **2010**, *1*, 113–122.
- (48) Solfrizzo, M. *Curr. Opin. Food Sci.* **2011**, *17*, 57–61.
- (49) Phukhamsakda, C.; Ha, A.; Id, G.; Phookamsak, R. *Mycosphere* **2017**, *8*, 697–796.
- (50) Schulz, B.; Krohn, K.; Hussain, H.; Flo, U. *Chirality* **2007**, *470*, 464–470.
- (51) Krohn, K.; Kouam, S. F.; Cludius-brandt, S.; Draeger, S.; Schulz, B. *European J. Org. Chem.* **2008**, 3615–3618.
- (52) Sun, P.; Huo, J.; Kurtán, T.; Mándi, A.; Antus, S.; Tang, H. U. A.; Draeger, S.; Schulz, B.; Hussain, H.; Krohn, K.; Pan, W.; Yi, Y.; Zhang, W. E. N. *Chirality* **2012**, 4–11.
- (53) Bennett, J. W. In *Aspergillus and Penicillium in the Post-genomic Era*; 1926; pp 1–24.
- (54) Houbraken, J.; Vries, R. P. De; Samson, R. A. In *Advances in Applied Microbiology*; 2014; Vol. 86, pp 199–249.
- (55) Barkai-Golan, R. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*; 2008; p 387.
- (56) Frisvad, J. C.; Larsen, T. O.; Vries, R. De; Meijer, M.; Houbraken, J.; Cabañes, F. J.; Ehrlich, K.; Samson, R. A. *Stud. Mycol.* **2007**, *59*, 31–37.
- (57) Hedayati, M. T.; Pasqualotto, A. C.; Warn, P. A.; Bowyer, P.; Denning, D. W. *Microbiology* **2007**, *153*, 1677–1692.
- (58) Kumar, P.; Mahato, D. K.; Kamle, M.; Mohanta, T. K. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*, 1–10.
- (59) Begerow, D.; Nilsson, H.; Unterseher, M.; Maier, W. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, 99–108.
- (60) Appendino, G.; Gibbons, S.; Giana, A.; Pagani, A.; Grassi, G.; Stavri, M.; Smith, E.; Rahman, M. M. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (8), 1427–1430.
- (61) White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. *AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS*; Academic Press, Inc., 1989.
- (62) Hibbett, D. S.; Binder, M.; Bischoff, J. F.; Blackwell, M.; Cannon, P. F.; Eriksson, O. E.; Huhndorf, S.; James, T.; Kirk, P. M.; Lücking, R.; Thorsten Lumbsch, H.; Lutzoni, F.; Matheny, P. B.; McLaughlin, D. J.; Powell, M. J.; Redhead, S.; Schoch, C. L.; Spatafora, J. W.; Stalpers, J. A.; Vilgalys, R.; Aime, M. C.; Aptroot, A.; Bauer, R.;

- Begerow, D.; Benny, G. L.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W.; Dai, Y. C.; Gams, W.; Geiser, D. M.; Griffith, G. W.; Gueidan, C.; Hawksworth, D. L.; Hestmark, G.; Hosaka, K.; Humber, R. A.; Hyde, K. D.; Ironside, J. E.; Kõljalg, U.; Kurtzman, C. P.; Larsson, K. H.; Lichtwardt, R.; Longcore, J.; Miadlikowska, J.; Miller, A.; Moncalvo, J. M.; Mozley-Standridge, S.; Oberwinkler, F.; Parmasto, E.; Reeb, V.; Rogers, J. D.; Roux, C.; Ryvarden, L.; Sampaio, J. P.; Schüßler, A.; Sugiyama, J.; Thorn, R. G.; Tibell, L.; Untereiner, W. A.; Walker, C.; Wang, Z.; Weir, A.; Weiss, M.; White, M. M.; Winka, K.; Yao, Y. J.; Zhang, N. *Mycol. Res.* **2007**, *111* (5), 509–547.
- (63) Kim, D. S.; Baek, N.; Oh, S. R.; Jung, K. Y.; Lee, I. S.; Kim, J. H.; Lee, H. *Arch Pharm Res* **1997**, *20* (3), 201–205.
- (64) Lindequist, U., Lesnau, A., Teuscher, E., & Pilgrim, H. *Pharmazie* **1989**, *44* (8), 579–58.
- (65) Kahlos, K.; Kangas, L.; Hiltunen, R. *Planta Med.* **1989**, *55* (4), 389–390.
- (66) Moloney, M. G. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *xx*, 1–13.
- (67) Yu, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zheng, C.; Guo, L.; Li, W.; Sun, P.; Qin, L. *Microbiol. Res.* **2010**, *165* (6), 437–449.
- (68) Gauvin, A.; Smadja, J.; Aknin, M.; Faure, R.; Gaydou, E. *Can. J. Chem* **2000**, *992*, 986–992.
- (69) Bu, M.; Hu, B. B. Y. and L. *Med. Chem. (Los Angeles)*. **2014**, *4* (10), 709–716.
- (70) Chen, Y. K.; Kuo, Y. H.; Chiang, B. H.; Lo, J. M.; Sheen, L. Y. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (13), 5713–5719.
- (71) Bensemhoun, J., Bombarda, I., Aknin, M., Faure, R., & Gaydou, E. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36* (12), 942–944.
- (72) Chang, F. R.; Yen, C. T.; El-Shazly, M.; Yu, C. Y.; Yen, M. H.; Cheng, Y. Bin; Chen, S. L.; Wu, Y. C. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (9), 2738–2742.
- (73) Brown, L. C.; Jacobs, J. *J. Chem.* **1975**, *28*, 2317–2318.
- (74) Ayer, A. S. P. L. *Microbiol. Res.* **1980**, *26*.
- (75) Wijeratne, E. M. K.; Paulista, U. E.; Federal, U.; Gerais, D. M.; Horizonte, B. J. *Antibiot. (Tokyo)*. **2004**, *57* (8), 3–8.
- (76) Wicklow, D. T.; Jordan, A. M.; Gloer, J. B. *Mycol. Res.* **2009**, *113* (12), 1433–1442.
- (77) Wicklow, D. T.; Jordan, A. M.; Gloer, J. B. *Mycol. Res.* **2009**, *113* (12), 1433–1442.
- (78) Garbaccio, D. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1.
- (79) B. Proska, D. Uhrin, T. L. *Pergamon* **1998**, *48* (7), 1161–1164.
- (80) Ola, A. R. B.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Mandi, A.; Zerfass, I.; Hamacher, A.; Kassack,

8. ANEXO

QPNT-P14-C



Potencial antimicrobiano de hongos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México

Osmaly Villedas Hernández y Mario Figueroa
 Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México.
 Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, 04510, México. osmaly.vihe@gmail.com



Introducción

En la actualidad, los hongos constituyen una de las fuentes naturales más importante para la obtención de nuevas moléculas bioactivas. A la fecha se han descrito taxonómicamente alrededor de 120,000 especies y se estima que podrían existir entre 2.2 y 3.8 millones en el planeta.¹ Sin embargo, sólo cerca de 25,000 taxones han sido estudiados químicamente, por lo que este grupo de organismos representa una fuente inagotable de nuevas entidades químicas. Así, los nichos inexplorados de nuestro país, como la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila (RCCC), constituyen una fuente importante de especies fúngicas únicas que puedan ser estudiadas para la búsqueda de moléculas bioactivas novedosas y de utilidad terapéutica.

Por otro lado, debido al alarmante incremento de infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos, es de gran relevancia la búsqueda continua de nuevos antibióticos *per se* y/o moléculas líderes que permitan el desarrollo de nuevos medicamentos más eficaces y selectivos.

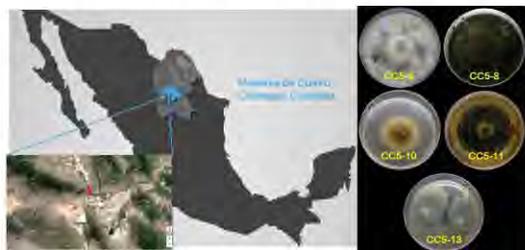
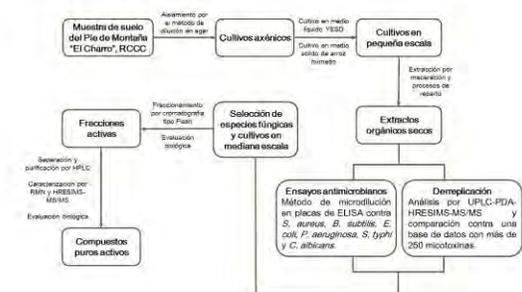


Figura 1. Localización geográfica del sitio de colecta en la RCCC (muestra de suelo, Pie de Montaña "El Charro" (26°58'39" N, 102°7'2" O; 625 msnm), y especies fúngicas seleccionadas para su estudio químico y biológico.

Objetivos

- Evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala de cada una de las especies fúngicas aisladas, así como de las fracciones primarias obtenidas de estos últimos, contra una batería de microorganismos Gram (+) y (-).
- Realizar los análisis de derreplicación sobre los extractos orgánicos y establecer el contenido metabólico preliminar.
- Aislar, purificar y caracterizar a los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las fracciones primarias activas.

Estrategia Experimental



Resultados

A partir de la muestra de suelo recolectada en la RCCC, se logró el aislamiento de 15 taxones fúngicos los cuales fueron cultivados en pequeña escala y se obtuvieron sus correspondientes extractos orgánicos (Figura 1). La evaluación biológica y estudios de replicación permitió la selección de las especies identificadas como CC5-5, CC5-8, CC5-10, CC5-11 y CC5-13, para su escalamiento en mediana escala (10⁻¹) y continuar con su estudio químico (Figura 2). Una vez realizado los extractos, se realizó su fraccionamiento primario mediante una cromatografía tipo Flash y las fracciones resultantes fueron evaluadas biológicamente.

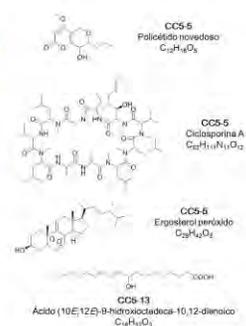


Figura 2. Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos y sus respectivas fracciones primarias, y resultados de los estudios de derreplicación de las especies fúngicas selectas de la serie CC5.

Conclusiones

- La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos en pequeña escala de la serie de hongos aislados de una muestra de la RCCC, permitió la selección de cinco taxones para su estudio químico.
- Los estudios de derreplicación por UPLC-HRESIMS-MS/MS sobre los extractos revelaron la presencia de algunos metabolitos secundarios de tipo policétidos, péptidos y terpenoides.

Perspectivas

- Realizar la identificación taxonómica de las especies objeto de estudio.
- Continuar con el estudio químico de las fracciones activas de las cinco especies fúngicas seleccionadas, con la finalidad de purificar y caracterizar los productos mayoritarios responsables de la actividad biológica. Esta actividad se encuentra actualmente en proceso.

Referencias

1) Hawksworth, D.L. and Lücking, R. *Microbiol Spectr.* 5(4):FUNK-0052-2016.

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.