



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE HÁBITATS INEXPLORADOS DE
MÉXICO PARA EL DESCUBRIMIENTO DE PRINCIPIOS BIODINÁMICOS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. MANUEL ALEJANDRO APARICIO CUEVAS

DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Agosto de 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Rachel Mata Essayag

Vocal: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

Vocal: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Vocal: Dra. Patricia Vélez Aguilar

Secretario: Dr. José Alberto Rivera Chávez

Lugar donde se desarrolló el proyecto de tesis:

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

Estancias de investigación autorizadas por el comité académico:

Departamento de Química y Bioquímica, Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

Presentaciones en congresos:

-57ª Reunión ASP del 24 al 27 de julio de 2016 en Copenhague, Dinamarca (cartel).

-58ª Reunión ASP del 29 de julio al 2 de agosto de 2017 en Portland, Oregón, EE.UU. (cartel).

-59ª Reunión ASP, del 21 al 25 de julio de 2018 en Lexington, Kentucky, EE.UU. (cartel).

Publicaciones:

-M.A. Aparicio-Cuevas, I. Rivero-Cruz, M. Sanchez-Castellanos, D. Menendez, H.A. Raja, P. Joseph-Nathan, M.d.C. González, M. Figueroa, J. Nat. Prod. 80 (2017) 2311-2318.

-M.A. Aparicio-Cuevas, M.d.C. González, H.A. Raja, I. Rivero-Cruz, S.J. Kurina, J.E. Burdette, N.H. Oberlies, M. Figueroa, Tett. Lett. 60 (2019) 1649-1652.

Firma del Tutor:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
Profesor Titular A, TC
Facultad de Química, UNAM

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Posgrado en Ciencias Químicas y finalmente a la Facultad de Química, por haberme otorgado la oportunidad de formarme dentro de sus muros.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo monetario otorgado durante mis estudios de posgrado en la UNAM (CVU/becario: 486168/274048), agradezco también el apoyo económico al grupo de investigación a través de los proyectos CONACyT CB 236564 e INFRA-252226, DGAPA PAPIIT IA205017 y FQ PAIP 5000-9145.

A mi tutor, el Dr. Mario A. Figueroa Saldívar, por haberme empujado a conocer mi potencial y por enseñarme tantas cosas que sin duda, serán de mucha utilidad en los años venideros.

A la Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor del Instituto de Biología de la UNAM y a la Dra. Susana de la Torre Zavala de la Universidad Autónoma de Nuevo León por proporcionar los cultivos axénicos su apoyo en la identificación de los microorganismos estudiados en este proyecto. También agradezco a los Dres. Valeria Souza y Luis Eguiarte del Instituto de Ecología, UNAM por proporcionar la muestra para el aislamiento de las bacterias de estudio, y a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por el permiso otorgado a la Dra. Souza (oficio No. SGPA/DGVS/02002/16, para la recolección de muestras con fines académicos y de investigación.

Al Dr. Nicholas H. Oberlies de la UNCG por permitirme realizar una estancia de investigación su laboratorio que aportó resultados invaluable al presente trabajo, además de permitir el uso de sus instalaciones para la obtención de datos de EM y RMN; y al Dr. Huzefa Raja por su apoyo en la identificación molecular de los microorganismos fúngicos.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), FQ, UNAM, por el apoyo en el registro de espectros de RMN.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez por su apoyo y consejo.

A la Dras. Rachel Mata Essayag e Isabel Rivero Cruz por su guía y consejo durante el desarrollo de este proyecto.

A todos mis amigos, viejos y nuevos, que también estuvieron conmigo.

Dedicatorias

Para Cecilia, como siempre, por ser a veces pilar y a veces almohada, pero sobre todo mi compañera.

Para mis padres, mis escultores, por su amor y consejo incondicionales.

Para mis hermanos, cómplices en el trajín de la vida.

Índice

Agradecimientos.....	III
Dedicatorias.....	IV
Índice.....	V
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tablas.....	VII
Lista de Símbolos y Abreviaturas.....	IX
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Antecedentes.....	3
1.1 Productos naturales como fuente de compuestos biodinámicos.....	3
1.2 Ecosistemas inexplorados como fuente de especies microbianas únicas.....	5
1.2.1 Hábitats inexplorados de México como fuente de cepas fúngicas y de actinobacterias para su bioprospección.....	5
1.2.2 Bahía de Caleta, Acapulco, Guerrero, como ecosistema inexplorado.....	6
1.2.3 Área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	6
1.3 El género <i>Aspergillus</i>	7
1.4 El género <i>Beauveria</i>	8
1.5 El género <i>Gymnoascus</i>	10
1.6 El género <i>Simplicillium</i>	10
1.7 El género <i>Acremonium</i>	11
1.8 El género <i>Streptomyces</i>	12
2. Hipótesis.....	14
3. Objetivos.....	14
4. Parte experimental.....	14
4.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos.....	14
4.1.1 Cepas fúngicas.....	14
4.1.2 Cepas bacterianas.....	16
4.2 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de especies fúngicas.....	16
4.3 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de las actinobacterias.....	18
4.4 Procedimientos cromatográficos generales.....	20
4.5 Caracterización estructural.....	20
4.6 Estudio químico de <i>Aspergillus</i> sp. ACA-9.....	21
4.6.1 Fraccionamiento primario de los extractos en pequeña escala y purificación de los compuestos 1-7	21
4.6.2 Obtención de los compuestos 8 y 9	23
4.6.3 Pruebas de estabilidad del compuesto 7	30
4.6.4 Análisis MS/MS del compuesto 6	30
4.6.5 Análisis de Marfey del compuesto 6	31
4.6.6 Evaluación biológica de los compuestos 1, 3 y 7	31
4.7 Estudio químico de <i>Beauveria</i> sp. ACA-13.....	31
4.8 Estudio químico de <i>G. hyalinusporus</i> ACA-16.....	33
4.8.1 Hidrólisis del compuesto 15	36
4.9 Estudio químico de <i>S. obclavatum</i> ACA-17.....	36
4.10 Estudio químico de <i>Acremonium</i> sp. ACA-4.....	37
4.11 Estudio químico de las actinobacterias provenientes del área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CC).....	38
4.11.1 Fraccionamiento primario de los extractos y obtención de los compuestos 19 y 20	38
4.11.2 Determinación de potencial citotóxico de los extractos bacterianos de <i>Streptomyces</i> sp. PR-35.....	39
4.11.3 Fraccionamiento primario de los extractos obtenidos con medio almidón/peptona. Aislamiento de los compuestos 21-26	41
5. Resultados y discusión.....	45
5.1 Estudio químico de las cepas fúngicas de la Bahía de Caleta.....	45
5.1.1 Estudio químico de <i>Aspergillus</i> sp. ACA-9.....	45
5.1.2 Estudio químico de <i>Beauveria</i> sp. ACA-13.....	67
5.1.3 Estudio químico de <i>Gymnoascus hyalinusporus</i> ACA-16.....	67
5.1.4 Estudio químico de <i>Simplicillium obclavatum</i> ACA-17.....	71
5.1.5 Estudio químico de <i>Acremonium</i> sp. ACA-4.....	76
5.1.6 Estudios químicos de las cepas Trichomonosporales ACA-1, <i>Chrysosporium</i> sp. ACA-5, Onygenales ACA-11 y <i>Chrysosporium</i> sp. ACA-12.....	78

5.2	Estudio químico de cepas de <i>Streptomyces</i> de Cuatro Ciénegas, Coahuila	78
5.2.1	Fraccionamiento primario del extracto PR-35 AcOEt/P de PR-35	85
6.	Conclusiones	85
7.	Referencias	86
8.	Anexos	90

Lista de Figuras

Figura 1.	Ejemplos de metabolitos selectos con actividad biológica	4
Figura 2.	Metabolitos secundarios obtenidos de microorganismos aislados en territorio mexicano	6
Figura 3.	Algunos metabolitos obtenidos de <i>Aspergillus</i> spp.	8
Figura 4.	Algunos metabolitos aislados de <i>Beauveria</i> spp.	9
Figura 5.	Metabolitos obtenidos biotecnológicamente a través del uso de <i>Beauveria</i> spp.	9
Figura 6.	Algunos metabolitos secundarios aislados de <i>Gymnoascus</i> spp.	10
Figura 7.	Algunos metabolitos secundarios aislados de <i>Simplicillium</i> spp.	11
Figura 8.	Algunos metabolitos secundarios aislados de <i>Acremonium</i> spp.	12
Figura 9.	Metabolitos de origen natural y semisintéticos obtenidos de <i>Streptomyces</i> spp.	13
Figura 10.	Localización geográfica del sitio de colecta en la Bahía de Caleta, Acapulco, Guerrero, México	14
Figura 11.	Cultivos axénicos en medio V8 de los microorganismos fúngicos estudiados	15
Figura 12.	Localización geográfica del sitio de colecta en CC	16
Figura 13.	Cultivos axénicos en medio ISP2 de las actinobacterias estudiadas	16
Figura 14.	Ejemplo del cultivo en medio sólido de la especie <i>Simplicillium obclavatum</i> ACA-17	17
Figura 15.	Estrategia metodológica general empleada para la obtención de los extractos bacterianos	19
Figura 16.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₈ de ACA-9	22
Figura 17.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y de la purificación a nivel analítico de la fracción F ₁₄ de ACA-9	22
Figura 18.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₁₅ de ACA-9	23
Figura 19.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-9b de ACA-9	24
Figura 20.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-9c de ACA-9	24
Figura 21.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₅ de ACA-9	25
Figura 22.	Cromatograma del fraccionamiento secundario por CF de la fracción F ₅ de ACA-9	25
Figura 23.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F _{5,7} de ACA-9	26
Figura 24.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₆ de ACA-9	26
Figura 25.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₁₀ de ACA-9	27
Figura 26.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₁₁ de ACA-9	27
Figura 27.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₁₂ de ACA-9	27
Figura 28.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₁₃ de ACA-9	27
Figura 29.	Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de la fracción F ₁₄ de ACA-9	28
Figura 30.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F _{14,4} de ACA-9	29
Figura 31.	Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F ₁₅ de ACA-9	29
Figura 32.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₁₆ de ACA-9	30
Figura 33.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-13a-b de ACA-13	32
Figura 34.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₆ de ACA-13	33
Figura 35.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-16a-b de ACA-13	33
Figura 36.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₄ de ACA-13	34
Figura 37.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₆ de ACA-13	35
Figura 38.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₇ de ACA-13	35
Figura 39.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₆ de ACA-17	37
Figura 40.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-4a de ACA-4	37
Figura 41.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₄ de ACA-4	38
Figura 42.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto PR-35 MeOH de PR-35	39
Figura 43.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₄ de PR-35	40
Figura 44.	Fraccionamiento primario por HPLC del extracto PR-35 AcOEt/P de PR-35	40
Figura 45.	Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto AcOEt AP de PR-35	41
Figura 46.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₆ de PR-35	42
Figura 47.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₇ de PR-35	43
Figura 48.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F ₈ de PR-35	43
Figura 49.	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la mezcla de compuestos 25/26 de PR-35	44
Figura 50.	Metabolitos obtenidos a partir de <i>Aspergillus</i> sp. ACA-9	45
Figura 51.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 1 (CD ₃ OD, 400 MHz)	46

Figura 52. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 1 (CD ₃ OD, 100 MHz)	47
Figura 53. Espectro de HSQC del compuesto 1	47
Figura 54. Espectro COSY del compuesto 1 , mostrando los distintos sistemas de espín.	48
Figura 55. Espectro HMBC del compuesto 1 , mostrando correlaciones clave.	49
Figura 56. Comparación de espectros de RMN ¹ H y ¹³ C para los compuestos 1 y 2 (CD ₃ OD).	50
Figura 57. Comparación de espectros de ¹ H y ¹³ C para los compuestos 2 y 3 (CD ₃ OD), mostrando diferencias clave.	51
Figura 58. Comparación de espectros de RMN ¹ H mostrando diferencias clave: A) compuesto 4 ; B) compuesto 7 (CDCl ₃ , 500 MHz).	52
Figura 59. Espectro COSY del compuesto 4 , mostrando los distintos sistemas de espín.	54
Figura 60. Espectro HMBC del compuesto 4 , mostrando correlaciones clave.	54
Figura 61. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 4 (CDCl ₃ , 125 MHz)	55
Figura 62. Espectro HSQC del compuesto 4	55
Figura 63. Comparación entre espectros de RMN ¹ H: A) reportado por Khalil et al. (CDCl ₃ , 600 MHz); B) compuesto 7 (CDCl ₃ , 500 MHz).	56
Figura 64. Comparación de espectros de RMN ¹³ C para los compuestos 4 , 5 , 7 y 8 (CDCl ₃).	57
Figura 65. Comparación de espectros de RMN ¹³ C para los compuestos 1-3 (CD ₃ OD).	58
Figura 66. Ampliaciones de los espectros NOESY de los compuestos 4 y 5 , mostrando correlaciones clave.	59
Figura 67. Comparación de los espectros de IR y DCV calculados y experimentales de los enantiómeros (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,2' <i>S</i>)- 4 (A), (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,2' <i>S</i>)- 5 (B) y (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,2' <i>S</i>)- 7 (C).	60
Figura 68. Fundamento del ensayo de retención de calceína.	61
Figura 69. Efecto de 1 , 3 y 7 en la extrusión de calceína en células (A) A549/DXR y (B) A549. (C) actividad de 1 , 3 y 7 en la sensibilidad a DXR en células A-549 y A-549/DXR	62
Figura 70. Comparación de espectros de RMN ¹ H de la caletasina (6) y de la cotteslosina B.	64
Figura 71. Ampliación del espectro TOCSY del compuesto 6 , mostrando correlaciones clave.	64
Figura 72. Ampliación del espectro NOESY del compuesto 6 , mostrando correlaciones clave.	65
Figura 73. Espectros completo y de fragmentación por HRESIMS-MS/MS en modo positivo	66
Figura 74. Análisis de Marfey para el compuesto 6	66
Figura 75. Metabolitos aislados a partir de <i>Beauveria</i> sp. ACA-13.	67
Figura 76. Metabolitos aislados de <i>G. hyalinosporus</i> ACA-16.	68
Figura 77. Comparación de espectros de ¹³ C y perfiles UV/Vis cualitativos de los compuestos 13 y 15 (piridina- <i>d</i> ₅ , 100 y 125 MHz, respectivamente).	69
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 15 (piridina- <i>d</i> ₅ , 500 MHz).	70
Figura 79. Ampliación del espectro HMBC del compuesto 15 , mostrando correlaciones clave.	70
Figura 80. Ampliación del espectro COSY del compuesto 15 , mostrando la secuencia de unión de la metil hexosa.	71
Figura 81. Compuestos aislados de <i>S. obclavatum</i> ACA-17.	72
Figura 82. Comparación de espectros de RMN ¹³ C del ácido hirsutético A (16) y del ácido <i>N</i> -formil hirsutético A (17) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 y 125 MHz, respectivamente).	72
Figura 83. Espectro HSQC del compuesto 17	74
Figura 84. Ampliación del espectro HMBC del compuesto 17 , mostrando correlaciones clave.	75
Figura 85. Ampliación del espectro NOESY del compuesto 17 , mostrando correlaciones clave.	75
Figura 86. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto 18 (CD ₃ OD, 700 y 175 MHz, respectivamente).	77
Figura 87. Ampliación del espectro NOESY del compuesto 18 , mostrando correlaciones clave.	78
Figura 88. Compuestos aislados de <i>Streptomyces</i> sp. PR-35.	79
Figura 89. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto 19 (D ₂ O, 400 y 100 MHz, respectivamente).	79
Figura 90. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto 20 (D ₂ O, 700 y 175 MHz, respectivamente).	80
Figura 91. Comparación de espectros de RMN ¹ H para los compuestos A) 21 y B) 22 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ y CD ₃ OD, respectivamente).	81
Figura 92. Comparación de espectros de RMN ¹³ C de los compuestos A) 21 y B) 22 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ y CD ₃ OD, respectivamente).	81
Figura 93. Comparación de espectros de RMN ¹ H para los compuestos 25 y 26 (CD ₃ OD, 400 MHz).	83
Figura 94. Comparación de espectros de RMN ¹³ C para los compuestos 25 y 26 (CD ₃ OD, 100 MHz).	84

Lista de Tablas

Tabla 1. Identificación taxonómica de los organismos fúngicos de la serie ACA.	15
---	----

Tabla 2. Preparación de los extractos orgánicos en mediana escala.	17
Tabla 3. Rendimientos y extractos orgánicos preparados a partir del cultivo de las especies de actinobacterias.	19
Tabla 4. Extractos orgánicos obtenidos a partir de <i>Streptomyces</i> sp. PR-35 en medio almidón/peptona.	19
Tabla 5. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9a de ACA-9.	21
Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9d de ACA-9.	21
Tabla 7. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9b de ACA-9.	24
Tabla 8. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9c de ACA-9.	25
Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción F ₅ de ACA-9.	26
Tabla 10. Resumen del proceso cromatográfico por CF de la fracción F ₁₄ de ACA-9.	28
Tabla 11. Resumen del proceso cromatográfico por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-13a-b de ACA-13.	32
Tabla 12. Resumen del fraccionamiento primario por CF del extracto ACA-16a-b de ACA-13.	34
Tabla 13. Resumen del fraccionamiento primario por CCA del extracto ACA-17a de ACA-17.	36
Tabla 14. Resumen del fraccionamiento primario por CF del extracto ACA-4a de ACA-4.	38
Tabla 15. Resumen del fraccionamiento primario del extracto PR-35 MeOH de PR-35.	39
Tabla 16. Resumen del fraccionamiento primario por HPLC del extracto PR-35 AcOEt/P de PR-35.	41
Tabla 17. Fraccionamiento primario por CF del extracto AcOEt AP de PR-35.	41
Tabla 18. Datos de espectroscópicos de los compuestos 1-3	45
Tabla 19. Datos espectroscópicos de los compuestos 4, 5, 7 y 8	53
Tabla 20. Datos de nivel de confianza para los espectros de IR y DCV.	60
Tabla 21. Datos espectroscópicos de la caletasina (6).	62
Tabla 22. Datos de espectroscópicos del 10- <i>O</i> -[β -D-(4'-metoxi-glucopiranosil)]-4- <i>O</i> -metil-alternariol (15).	68
Tabla 23. Datos espectroscópicos del ácido <i>N</i> -formil hirsutético A (17).	73
Tabla 24. Datos espectroscópicos del ácido 4',5'-dihidro-4'-hidroxiascoclorínico (18).	76
Tabla 25. Datos espectroscópicos de la <i>ciclo</i> -(4-hidroxiprolinil)- 2'-hidroxifenilalanina (25).	84

Lista de Símbolos y Abreviaturas

μm	Micrómetro	mg	Miligramo
% p/V	Porcentaje peso/volumen	MHz	Mega Hertz
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius	min	Minuto
^{13}C	Carbono 13	mL	Mililitro
^1H	Hidrógeno	mm	Milímetro
ACN	Acetonitrilo	MS/MS	Masas/masas
AcOEt	Acetato de etilo	mV	Milivolt
ADN	Ácido desoxirribonucleico	nm	Nanómetro
bs	Singulete ancho	NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
CD ₃ OD	Metanol tetradeuterado	PCR	Polimerase Chain Reaction
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	Phe	Fenilalanina
CHCl ₃	Cloroformo	Piridina- <i>d</i> ₅	Piridina deuterada
COSY	Correlation Spectroscopy	ppm	Partes por millón
d	Doblete	Pro	Prolina
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional	t	Triplete
dd	Doble de dobles	td	Triple de dobles
ddd	Doble de doble de dobles	TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
DMSO	Dimetil sulfóxido	<i>t</i> _R	Tiempo de retención
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado	Tyr	Tirosina
ERO	Especies reactivas de oxígeno	ufc	Unidades formadoras de colonia
FT-VCD	Dicroísmo circular vibracional con transformada de Fourier	uma	Unidades de masa atómica
g	Gramo	UPLC-MS	Cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	UV	Ultravioleta
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	UV/Vis	Ultravioleta/Visible
IDH	Índice de deficiencia de hidrógeno	Val	Valina
IR	Infrarrojo	δ_{C}	Desplazamiento químico de carbono 13
ITS	Internal Transcribed Spacer	ΔG	Energía libre de Gibbs
Leu	Leucina	δ_{H}	Desplazamiento químico de hidrógeno
M	Concentración molar	λ	Longitud de onda
m	Multiplete	λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorción
MeOH	Metanol		

Resumen

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo la obtención de moléculas bioactivas novedosas a través del estudio químico de microorganismos, tanto fúngicos como bacterias, aislados de hábitats inexplorados del país.

En este sentido, mediante el uso de técnicas convencionales, se estudiaron nueve cepas fúngicas procedentes de Bahía de Caleta, en Acapulco, Guerrero y tres cepas de actinobacterias, aisladas del área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Estos ecosistemas fueron seleccionados por ser considerados como ambientes inexplorados y por la falta de estudios de bioprospección en dichos nichos ecológicos.

El estudio químico de las cepas fúngicas derivó en la obtención de 18 compuestos, que fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia. Los resultados muestran que ocho de estos compuestos corresponden a nuevas entidades químicas. Por otra parte, el trabajo con las actinobacterias resultó en la obtención de ocho compuestos, uno de ellos novedoso.

De todos los microorganismos estudiados, varios fueron identificados solamente a nivel de género, por lo cual existe la posibilidad de que se trate de especies nuevas. Esto evidencia la importancia de continuar realizando estudios taxonómicos y químicos sobre los organismos de dichos ecosistemas.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación contribuyen al conocimiento de la biodiversidad microbiana nuestro país, además de ser el primer estudio químico de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, y el más amplio referente la química de los hongos de la Bahía de Caleta.

Abstract

This work is part of an ongoing research program that focuses in the isolation of novel bioactive compounds from microorganisms (fungi & bacteria) isolated from unexplored habitats of Mexico. Thus, we studied nine fungal strains from a sample collected in the Bahía de Caleta, Acapulco, Guerrero, and three actinobacteria isolated from the Cuatro Ciénegas basin, Coahuila. These ecosystems have been poorly studied for bioprospecting purposes.

The chemical study of the fungal strains, using conventional techniques, led to the isolation and characterization of eight new compounds along with 10 known ones. In addition, seven known and one new compound were isolated from the actinobacteria.

Most of the microorganisms were identified at the genus level; therefore, further studies are needed to establish their taxonomic identity at the species level.

Altogether, the results presented here represent the first chemical study of actinobacteria from the Cuatro Ciénegas basin and of fungal strains from Caleta Bay, and contribute to the knowledge of our country's biodiversity.

1. Antecedentes.

1.1 Productos naturales como fuente de compuestos biodinámicos.

El uso de los productos naturales con diversos propósitos en la vida del hombre ha estado presente desde épocas remotas, comenzando con el empleo de levaduras para fabricar pan o cerveza (~3500 a. C.), la preparación y el consumo de remedios (papiro egipcio de Ebers, ~2900 a. C.), hasta el descubrimiento de la penicilina (1928), por mencionar algunos ejemplos [1]. Actualmente, diversos grupos de investigación a nivel mundial están enfocados en el estudio de los productos naturales como fuentes de compuestos químicos biodinámicos útiles en áreas como la terapéutica y en las industrias como la alimentaria, la cosmética, la veterinaria y la agrícola, debido a la aparición de nuevas enfermedades o de fenómenos de resistencia a los fármacos convencionales o simplemente para cumplir con las necesidades cotidianas de la humanidad [2-6]. Cabe destacar que, según lo reportado por Newman & Cragg, aproximadamente una cuarta parte del total de fármacos aprobados por la FDA (Food & Drug Administration por sus siglas en inglés) entre 1981 y 2014, son compuestos de origen natural, derivados de éstos o mezclas de drogas naturales [7].

En particular, los hongos y bacterias representan una fuente invaluable de productos naturales debido a su potencial biosintético, ya que de los más de 300,000 compuestos existentes en el diccionario de productos naturales, cerca del 10% han sido aislados de estos microorganismos, varios de estos con actividad antibacteriana, antitumoral, inmunoestimulante, antifúngica, antiparasitaria, inmunosupresora e hipocolesterolemia, por mencionar algunas [7]. De todos los compuestos microbianos bioactivos, el 45% se han aislado a partir de actinobacterias, 38% de hongos y 17% de bacterias unicelulares; es importante mencionar que de los compuestos anteriores, aproximadamente cien son utilizados en la terapéutica contemporánea [8].

Como se mencionó anteriormente, la penicilina fue primer antibiótico descubierto, a partir del hongo *Penicillium notatum* (ahora *P. chrysogenum*). Este fármaco revolucionó la terapéutica de las infecciones y dio origen a “la época dorada de los antibióticos”, motivando además a las empresas farmacéuticas más importantes a desarrollar programas de investigación destinados al descubrimiento de nuevos compuestos a partir de fuentes naturales [9].

Otros ejemplos de metabolitos de gran interés son los antibióticos actinomicina y estreptomycin aislados de actinobacterias, y los metabolitos fúngicos lovastatina, con actividad hipocolesterolemia, el antifúngico griseofulvina y el ácido micofenólico con actividad inmunosupresora (**Figura 1**) [8].

Las fuentes naturales, además de producir una amplia gama de metabolitos secundarios con estructuras interesantes, han servido también como inspiración en el desarrollo de fármacos obtenidos por síntesis química. Un ejemplo exitoso de lo anterior es el fingolimod, el cual se sintetizó a partir del metabolito miriocina, compuesto lipofílico aislado del hongo entomopatógeno *Isaria sinclairii*, y que constituye el primer fármaco de administración oral para el tratamiento de la esclerosis múltiple [4]. Otros ejemplos son los antifúngicos caspofungina, micafungina y anidulafungina, que representan una nueva clase de antifúngicos llamados equinocandinas y que fueron obtenidos por semisíntesis a partir de los metabolitos fúngicos pneumocandina B₀ [10], FK463 [11] y equinocandina B [12], respectivamente. En la **Figura 1** se muestran las estructuras químicas de algunos de los ejemplos antes mencionados, además de otros metabolitos importantes en la terapéutica.

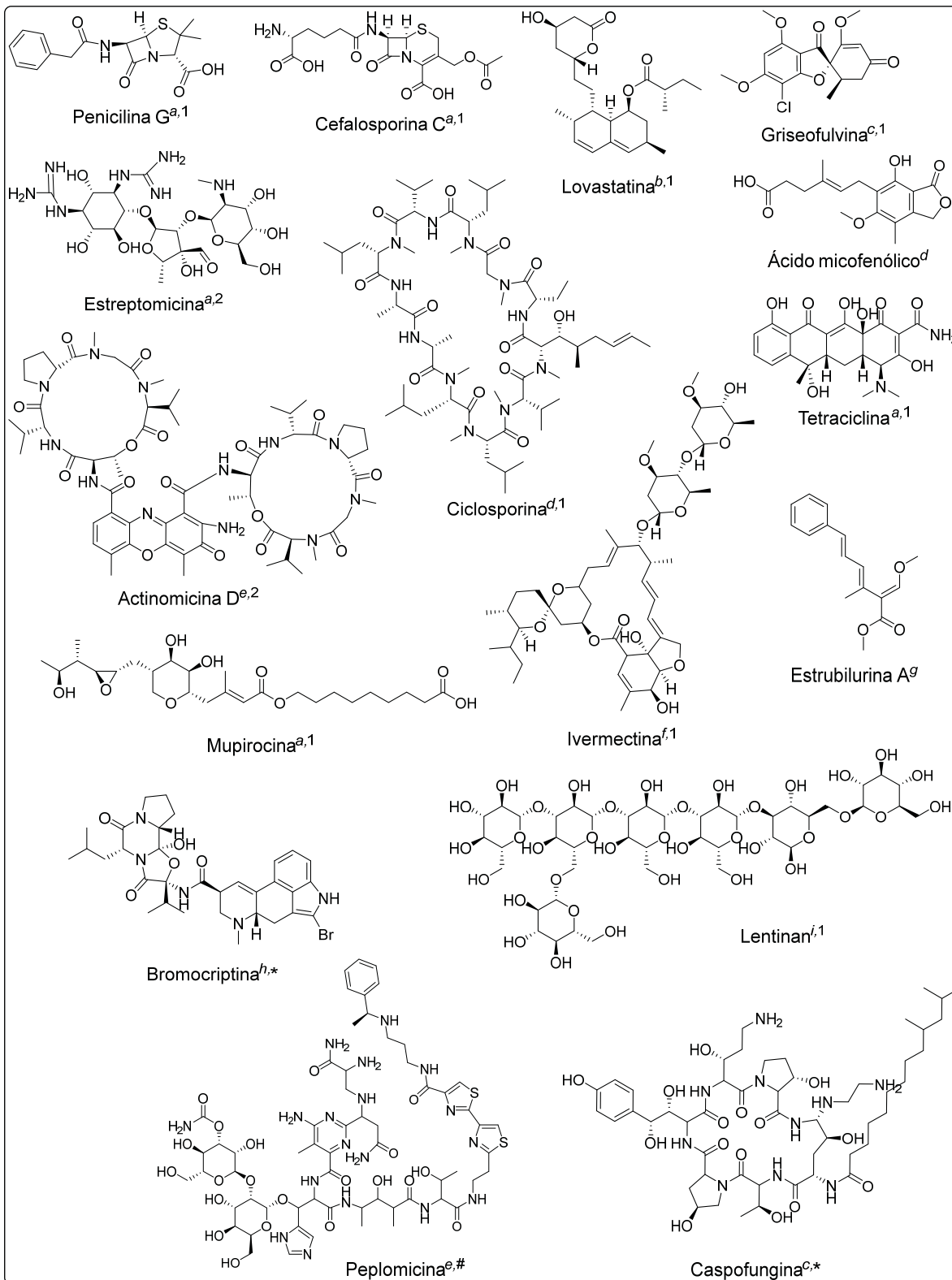


Figura 1. Ejemplos de metabolitos selectos con actividad biológica: ^aantibiótico; ^bhipocolesterolemiante; ^cantifúngico; ^dinmunosupresor; ^eanticancerígeno; ^fantiparasitario; ^gfungicida; ^hacromegalia y enfermedad de Parkinson; ⁱinmunoestimulante. Origen: ¹fúngico; ²bacteriano; *semisintético fúngico, #semisintético bacteriano.

1.2 Ecosistemas inexplorados como fuente de especies microbianas únicas.

Los microorganismos están presentes en todos los hábitats del planeta, incluyendo ecosistemas extremos como los océanos profundos, los lagos volcánicos, el hielo ártico, entre muchos más; además, son muchos los factores bióticos y abióticos que tienen influencia en su diversidad biológica [9,13,14]. En la actualidad se han descrito taxonómicamente más de 140,000 especies fúngicas y 2,400 especies bacterianas, números que subestiman por mucho la cantidad total existente estimada por Larsen y colaboradores (146 a 3,955 millones de especies bacterianas y 22.8 a 165.5 millones de especies fúngicas) [15,16].

Cada especie microbiana cuenta con un genotipo exclusivo, y además con el objetivo de cubrir de forma específica sus necesidades de supervivencia, estos microorganismos desarrollan adaptaciones metabólicas que les permiten proliferar en condiciones específicas de temperatura, presión, nivel de salinidad, pH, disponibilidad de nutrientes, cantidad de radiación solar, etc. Un ejemplo de lo anterior, es la producción bacteriana de azúcares y polioles con acción crioprotectora, proceso que ayuda a estabilizar las membranas celulares en ambientes con baja temperatura, o la producción de melaninas fúngicas, que ejercen acción protectora contra la radiación UV en ciertos ambientes donde la radiación solar es muy abundante [17].

Bajo todas las consideraciones antes mencionadas, la bioprospección de ecosistemas inexplorados incrementa la posibilidad de encontrar cepas inusuales con capacidad potencial de producir metabolitos secundarios novedosos.

1.2.1 Hábitats inexplorados de México como fuente de cepas fúngicas y de actinobacterias para su bioprospección.

Hawksworth y Rossman subrayan que la principal fuente de especies microbianas nuevas son las selvas y otros hábitats inexplorados [18]. México, al contar con el 10% de la biodiversidad mundial [19] y poseer una gran variedad de ecosistemas, producto de una topografía accidentada y una gran variedad de climas [20], representa una fuente potencial para el aislamiento de especies microbianas únicas.

Algunos estudios estiman que nuestro país cuenta con aproximadamente 200,000 especies fúngicas de las cuales solamente se han descrito taxonómicamente el 5% [20], y un número aún menor ha sido estudiado químicamente. Sin embargo, en los últimos veinte años, científicos mexicanos han realizado esfuerzos importantes en la bioprospección de especies fúngicas aisladas del territorio nacional, logrando así obtener una gran variedad de metabolitos secundarios novedosos, estructuralmente diversos y bioactivos (**Figura 2**) [21].

Por otro lado, los trabajos de investigación realizados sobre cepas bacterianas aisladas en México se han enfocado principalmente en la descripción de la diversidad taxonómica y sus interacciones con el entorno. Sin embargo, a pesar de que existen muy pocos estudios químicos de estas especies bacterianas, se ha logrado el aislamiento de compuestos químicos novedosos, subrayando así la importancia de estas fuentes naturales para la obtención de diversas moléculas bioactivas (**Figura 2**) [22-24].

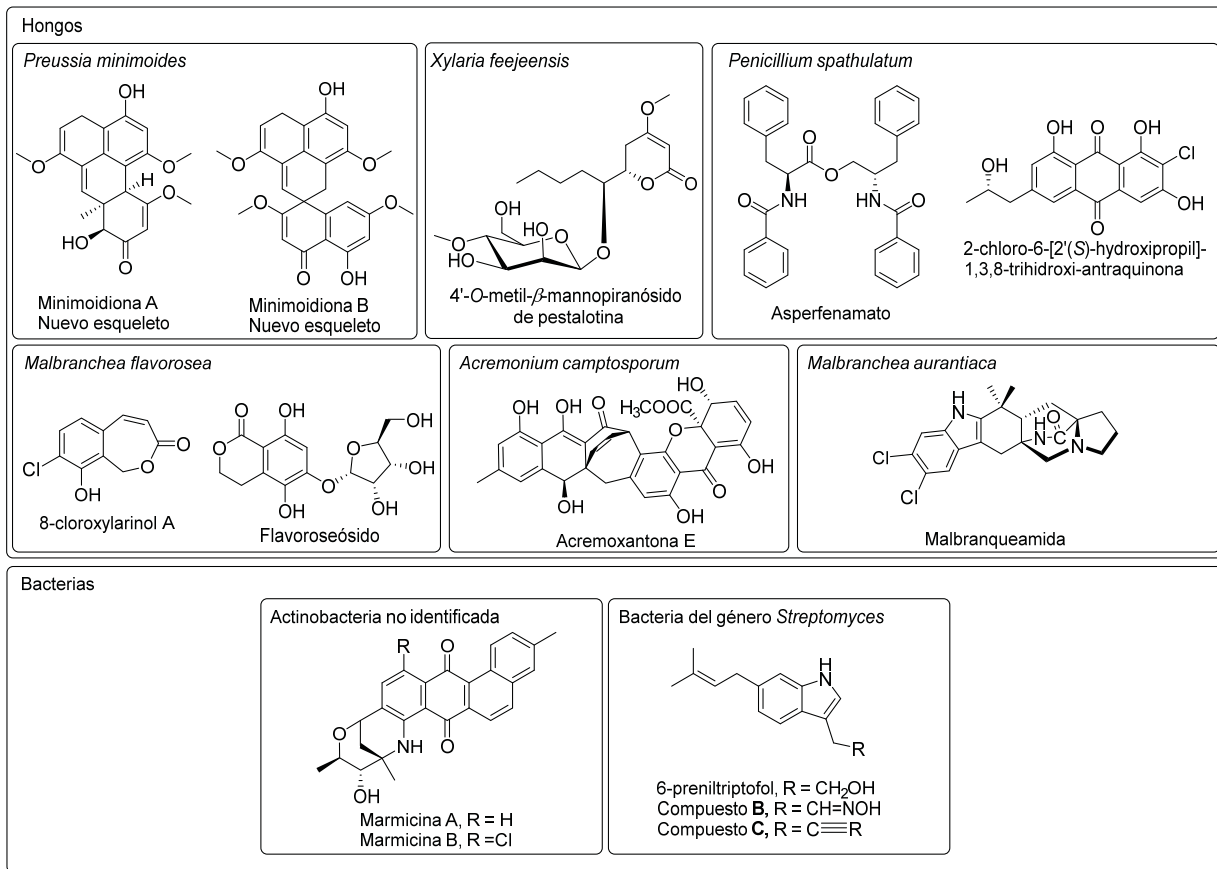


Figura 2. Metabolitos secundarios obtenidos de microorganismos aislados en territorio mexicano.

1.2.2 Bahía de Caleta, Acapulco, Guerrero, como ecosistema inexplorado.

Las playas constituyen ecosistemas dinámicos, los cuales son afectados por diversos factores como los continuos cambios de humedad, temperatura, radiación solar, cantidad de nutrientes etc.; además, en muchos de estos ecosistemas, el impacto antropogénico es considerable, afectando con esto a las especies que conforman la microbiota del lugar. En el mundo, existen descritos algunos estudios químicos sobre microorganismos aislados de este tipo de ecosistemas. Sin embargo, son pocos los realizados sobre hongos obtenidos de playas mexicanas [25]. En particular, a la fecha existe poca información sobre la microbiota de la Bahía de Caleta (16°49'53.92" N, 99°54'12.27" W) [26], representando así un ecosistema casi inexplorado en términos de bioprospección de gran interés, ya que es posible que dichos organismos hayan desarrollado adaptaciones metabólicas a causa de las variables ambientales antes mencionadas.

1.2.3 Área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

El área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas (CC) cuenta con una extensión de territorio de aproximadamente 85,000 Ha y un alto índice de endemismos, además de ser uno de los humedales más importantes del país. Esta área natural protegida desde 1994 a la fecha, forma parte del desierto Chihuahuense en el estado de Coahuila (26°45'00" y 27°00'00" N y 101°48'49" y 101°48'49" O) y está formado por cadenas montañosas de hasta 3000 m de altura, cañones profundos con corrientes subterráneas, tiene escasa precipitación anual (< 200 mm anuales), poca vegetación, un clima árido (44 °C en verano y menos de 0 °C en invierno) y manantiales, llamados localmente

pozas, cuya acumulación da origen a lagos y lagunas [27,28]. Estos ecosistemas acuáticos poseen altas concentraciones de iones sulfato y calcio, resultado de los procesos de evaporación y precipitación de agua con yeso disuelto ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Una característica especial de este ecosistema es la baja concentración de nitrógeno y fósforo, elementos clave en procesos fisiológicos y bioquímicos de todos los organismos vivos como es la síntesis de membranas celulares, de ADN, de proteínas y en procesos de transferencia de electrones a través del ATP. En particular, se ha observado que las bacterias que habitan en lugares oligotróficos desarrollan algunas adaptaciones fisiológicas para asegurar su supervivencia [29]. En CC existen proporciones de N:P que van desde muy bajo fósforo (157:1), hasta muy bajo nitrógeno (1.8:1) [30]. En este sentido, los diversos nichos ecológicos de CC constituyen sitios ideales para la bioprospección de microorganismos.

1.3 El género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* se compone por más de 500 especies de distribución cosmopolita [16]. Se ha establecido que la mayoría de sus miembros son terrestres y juegan distintos papeles importantes dentro del ecosistema, entre los que destacan su rol como degradadores de materia orgánica, como productores de micotoxinas y como causantes de daño a cultivos [31]. Los organismos de este género poseen características macro y micro morfológicas heterogéneas, y aunque una gran parte son hongos saprófitos, existen también algunas especies que son agentes patógenos para el ser humano, los animales y las plantas. La mayor parte de las especies de *Aspergillus* se reproducen de forma asexual, mediante la producción de conidios (esporas fúngicas) ; sin embargo, se estima que un tercio del total se reproducen de forma sexual [32]. La identificación de estos microorganismos se realiza mediante el análisis de su morfología macroscópica, no obstante, actualmente es indispensable también el uso de herramientas de biología molecular, como en el análisis de las secuencias de ITS y el uso de marcadores moleculares como las regiones *RPB1*, *RPB2*, *tub2/BenA* y de calmodulina parcial (CaM) [33], para su posicionamiento dentro de los diferentes clados de este género. Existe una gran variedad de estudios químicos a partir de especies del género *Aspergillus* en donde se describen cientos de metabolitos secundarios, de tipo policétidos, péptidos no ribosomales (penicilina, cefalosporina, vancomicina), terpenos (aspergilucenos, asperólidas) y alcaloides (dioxopiperazinas, derivados quinazolínicos), y muchos de ellos con actividad biológica [34,35]. Además, de los metabolitos de interés terapéutico, *Aspergillus* produce también compuestos de utilidad en áreas como la biorremediación y en la industria textil, alimentaria y agropecuaria [36-39]. En la **Figura 3** se ilustran algunos metabolitos aislados del género *Aspergillus*.

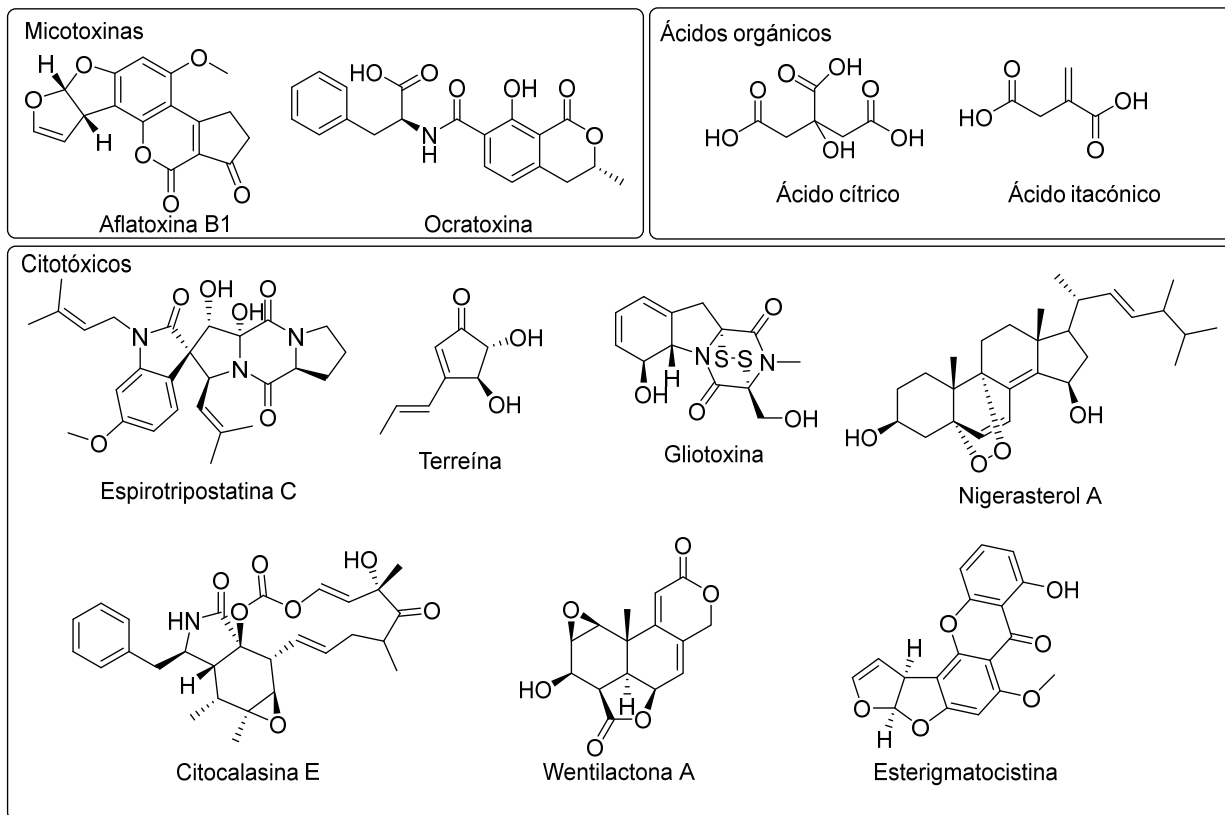


Figura 3. Algunos metabolitos obtenidos de *Aspergillus* spp.

1.4 El género *Beauveria*.

Este género está compuesto por más de 33 especies [16] distribuidas en distintos ecosistemas y sustratos como el suelo, plantas e insectos. Algunas especies de *Beauveria* son reconocidas por ser utilizadas como pesticidas naturales debido a su capacidad de parasitar distintos insectos [40,41].

La identificación taxonómica a nivel de género de estos microorganismos es sencilla ya que su morfología macroscópica es muy característica: micelio de rápido crecimiento, textura de polvosa a algodonosa, superficie blanca, amarilla o rosada con reversos de blanco a amarillo pálido [42]. Sin embargo, la diferenciación a nivel de especie exige un trabajo detallado y el análisis de varios genes, la amplificación de ADN polimórfico, y la búsqueda de polimorfismos de conformación de cadena sencilla, entre otras [40].

Los hongos del género *Beauveria* también son prolíficos productores de metabolitos secundarios, por ejemplo, los alcaloides basiatina, tenelina, piridovericina, piridomacrolidina y la oosporeína; además de los depsipéptidos cíclicos basianólida, beauvericina y sus derivados; así como los beauverólidos, entre otros (Figura 4) [41,43]. Además, algunas especies del género *Beauveria* han sido utilizadas en procesos biotecnológicos para producir metabolitos secundarios novedosos con actividades biológicas mejoradas, a partir del aprovechamiento de su maquinaria sintética. Las reacciones de biotransformación mejor descritas para este género son la hidroxilación, la glicosidación y la desmetilación. Algunos ejemplos son la biotransformación del antioxidante silibina a la 8-hidroxisilibina, la cual posee una actividad de 8 a 9 veces mayor que su precursor; la del xantohumol en el 4'-O-β-D-glucopiranosido de

xantohumol, que también presenta una actividad antioxidante mayor y del donepezilo, prescrito en forma de mezcla racémica en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en sus derivados desmetilados 5-*O*-donepezilo y 6-*O*-donepezilo [41,44,45] (**Figura 5**).

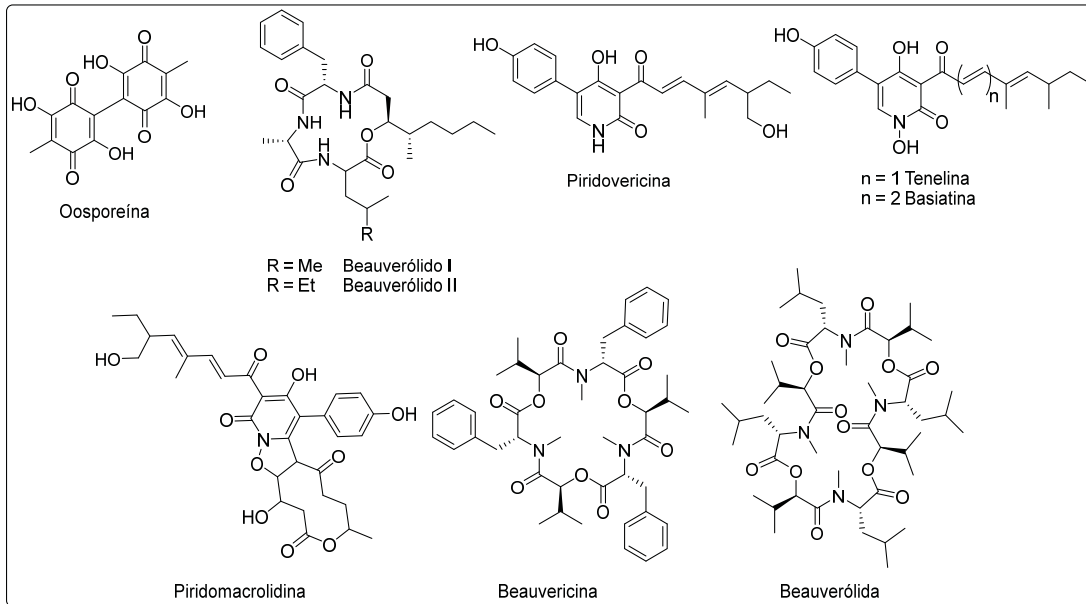


Figura 4. Algunos metabolitos aislados de *Beauveria* spp.

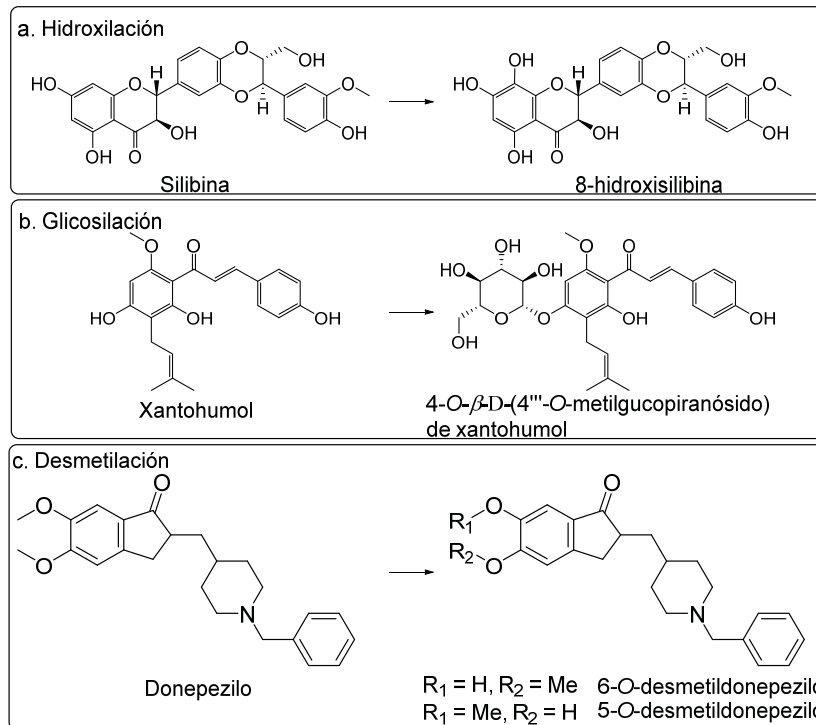


Figura 5. Metabolitos obtenidos biotecnológicamente a través del uso de *Beauveria* spp.

1.5 El género *Gymnoascus*.

Este género está compuesto por 21 especies [16] y su identificación se basa en el análisis de sus características morfológicas, fisiológicas y de filogenia molecular (secuencias de ITS, 18S y 28S del ADNr) [46,47]. En 2002, Solé y colaboradores realizaron una reclasificación de los géneros *Arachniotus*, *Gymnascella*, *Gymnoascoideus* y *Narasimhella* dentro de *Gymnoascus* [46]. Macroscópicamente, el género *Gymnoascus* se caracteriza por presentar colonias amarillas, ocre, anaranjadas o rojas en medio de agar levadura-dextrosa, con un micelio compuesto de hifas hialinas o pigmentadas [46,47].

Gymnoascus reessii fue la primera especie descrita de este género y ha sido objeto de numerosos estudios biotecnológicos [48-61]. Los metabolitos secundarios que se han aislado de este género son en su mayoría de tipo policétidos con actividad antifúngica [49], antibacteriana [58] citotóxica [50,52,53,61], antimalárica [50], antiinflamatoria [60] y nematocida [48]. En la **Figura 6** se muestran algunos metabolitos aislados de *Gymnoascus*.

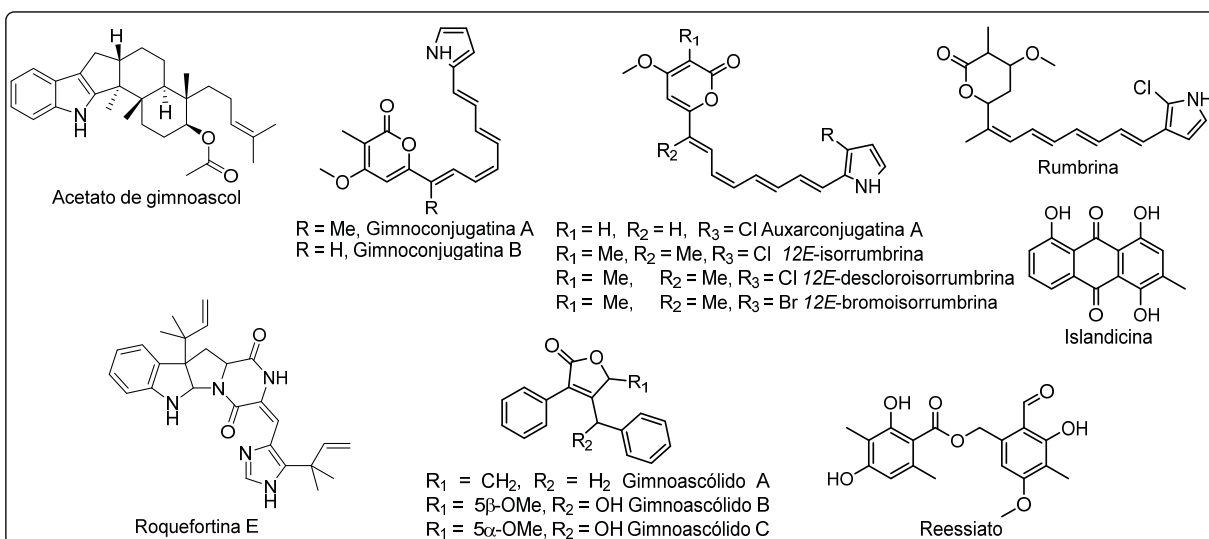


Figura 6. Algunos metabolitos secundarios aislados de *Gymnoascus* spp.

1.6 El género *Simplicillium*.

Este género se conforma por 10 especies descritas a la fecha distribuidas por todo el mundo [16,62]. Los miembros de este género suelen ser de crecimiento rápido, alcanzando de 30-32 mm en 10 días en medio APD o MEA, además presentan fiáldes espaciadas y poco diferenciadas de forma puntiaguda y estrecha. Los miembros de este género que han sido estudiados químicamente son *S. obclavatum*, *S. lanosoniveum* y *Simplicillium* spp. y se han aislado diversos polipéptidos [63-65], polisacáridos [66], policétidos [67,68], alcaloides [69] y enzimas [70] con actividad antifúngica [65], antiviral [65] y antibacteriana [67,68] (**Figura 7**).

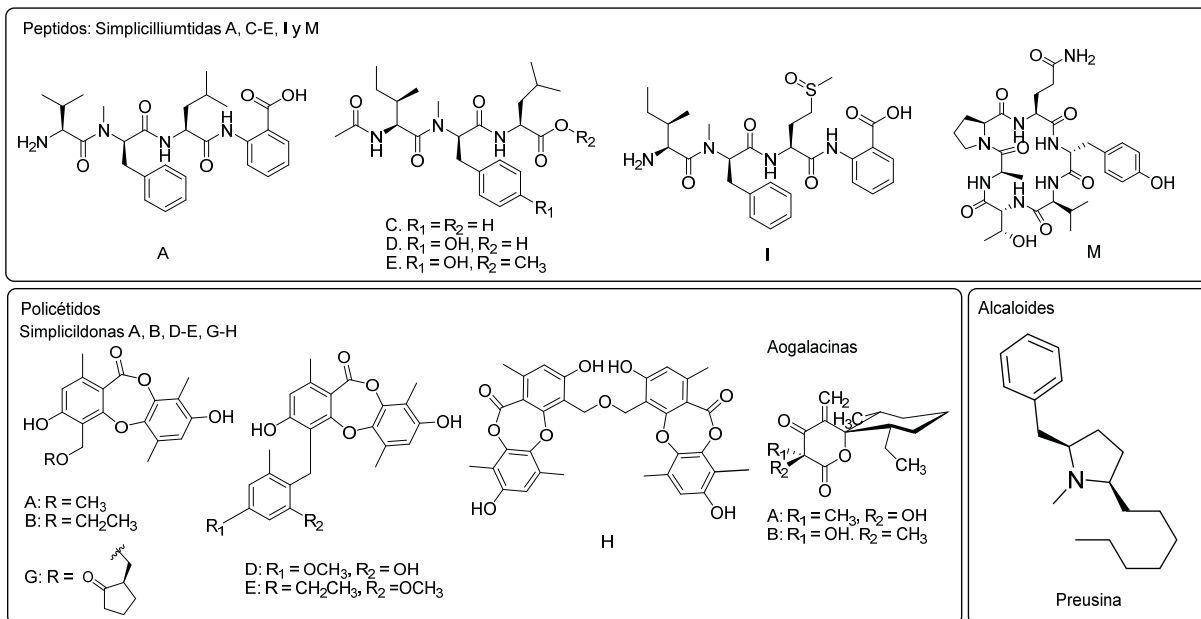


Figura 7. Algunos metabolitos secundarios aislados de *Simplicillium* spp.

1.7 El género *Acremonium*.

Este género consta de aproximadamente 120 especies y su distribución es cosmopolita [16,71]. Recientemente, han sido descritas algunas especies como patógenos humanos [72]. Sus colonias son de crecimiento lento, compactas, húmedas en un principio y con el tiempo polvosas, aterciopeladas o flocosas y pueden presentar coloraciones blancas, grises, rosas o anaranjadas. Sus hifas son finas y hialinas con fiálides en forma de punzones. Su identificación molecular habitualmente se lleva a cabo con base en el análisis de las secuencias 18S y D1/D2 [72,73]. *Acremonium chrysogenum* es reconocido por ser el productor las cefalosporinas. Otros metabolitos identificados en este género pertenecen a las categorías de esteroides, terpenoides, meroterpenoides, policétidos y alcaloides, entre otros (Figura 8).

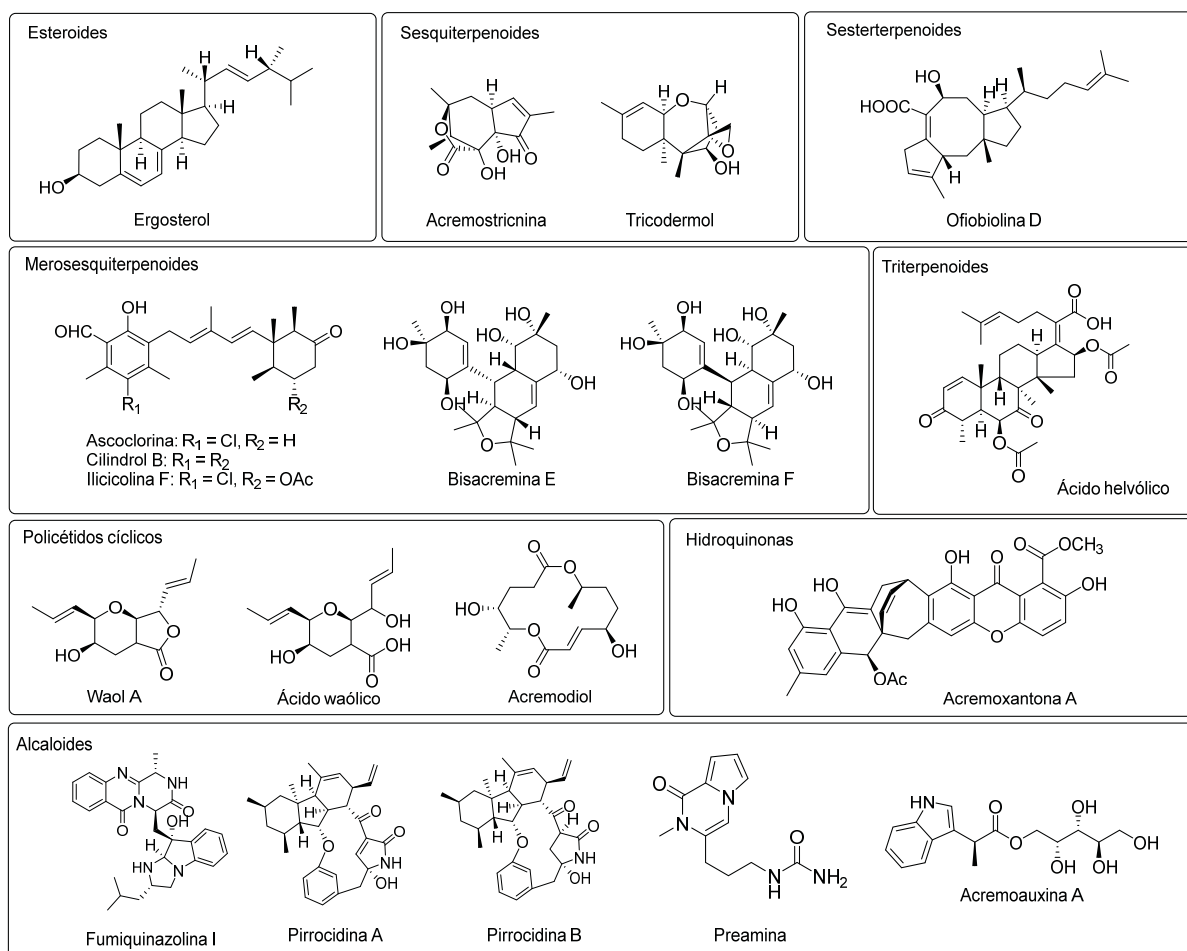


Figura 8. Algunos metabolitos secundarios aislados de *Acremonium* spp.

1.8 El género *Streptomyces*.

Este género consta de alrededor de 522 especies [16] de actinobacterias Gram-positivas, las cuales son capaces de crecer en una amplia variedad de hábitats [74] y con una gran variedad de características morfológicas [75]. La identificación de las especies de este género se realiza mediante el análisis del gen 16S del ARNr, aunque en especies altamente relacionadas resulta insuficiente, siendo necesario el análisis de otras secuencias, como la del gen 23S del ARNr [75].

Asimismo, las especies de este género han sido ampliamente estudiadas debido a su eficiente producción de metabolitos de utilidad terapéutica e industrial. Cabe destacar que a partir de *Streptomyces* se obtienen la mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina, en la práctica veterinaria y en la agricultura [75,76]. Desde el descubrimiento de la actinomicina, primer antibiótico con propiedades antitumorales, otros más se han sumado a la lista de compuestos importantes, como las antraciclinas, la bleomicina, la doxorubicina y la vitamina B12 [77] (Figura 9).

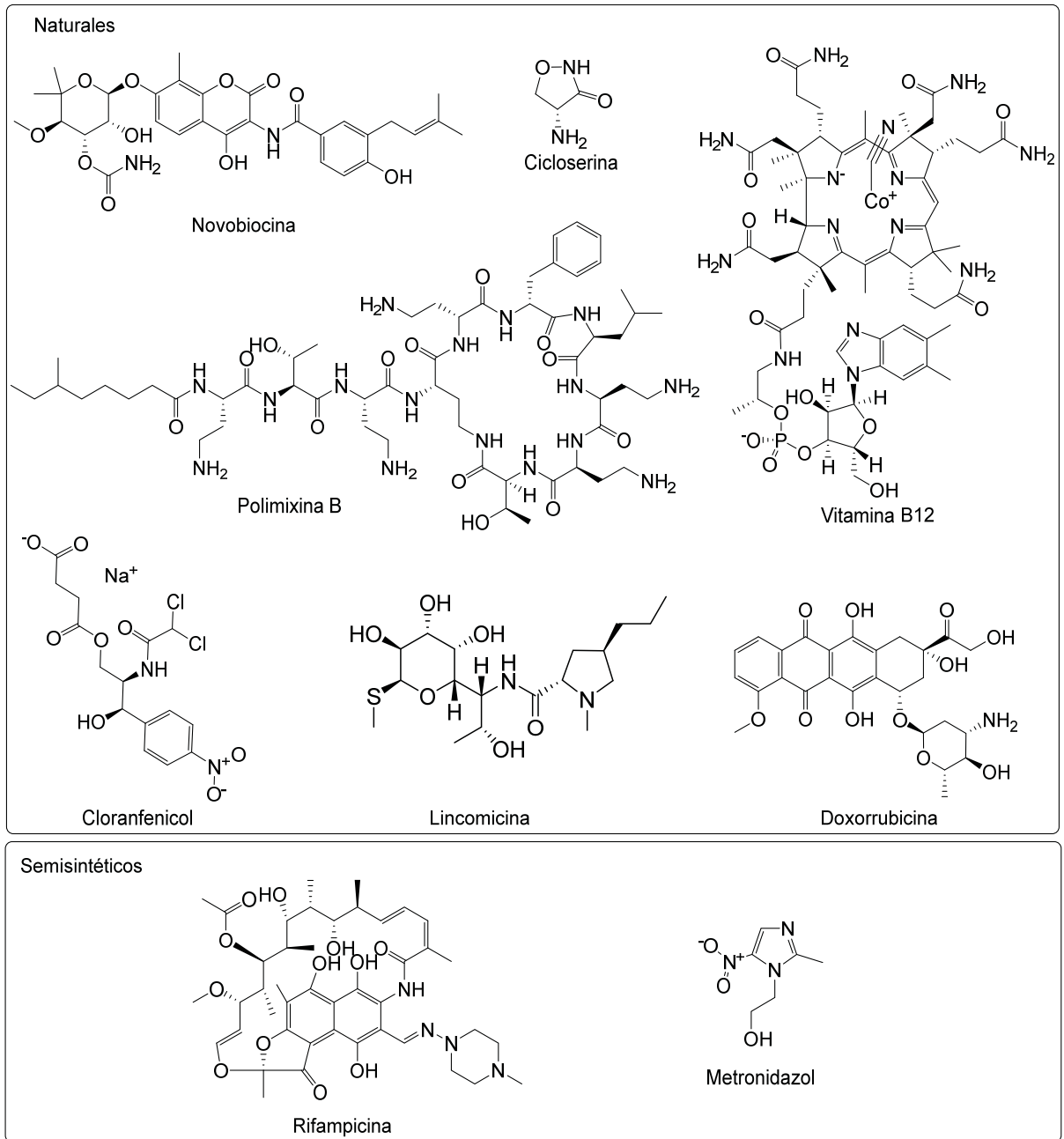


Figura 9. Metabolitos de origen natural y semisintéticos obtenidos de *Streptomyces* spp.

2. Hipótesis.

El estudio químico de organismos fúngicos y bacterias aislados a partir de hábitats poco explorados de México permitirá el descubrimiento de metabolitos secundarios novedosos con una posible aplicación en la terapéutica y/o en la agricultura.

3. Objetivos.

El objetivo principal del presente proyecto consistió en el descubrimiento de nuevos metabolitos con utilidad potencial a partir de especies fúngicas y bacterianas no estudiadas previamente, provenientes de ecosistemas inexplorados de México, así como contribuir al conocimiento de la biodiversidad microbiana de nuestro país. Para el cumplimiento de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Acondicionar y caracterizar taxonómicamente a los microorganismos aislados a partir de hábitats inusuales.
- Cultivar a los microorganismos aislados utilizando medios de crecimiento adecuados.
- Preparar los extractos orgánicos a partir de los cultivos microbianos indicados en el objetivo anterior, utilizando técnicas de maceración y/o reparto y/o adsorción con resinas poliméricas.
- Establecer los perfiles cromatográficos de todos los extractos orgánicos aplicando técnicas cromatográficas de vanguardia.
- Cultivar algunas especies en mediana escala y obtener los extractos orgánicos.
- Realizar el estudio químico de los extractos orgánicos mediante la aplicación de diversos procedimientos cromatográficos y aquellos que permitan realizar la caracterización estructural de los compuestos aislados.

4. Parte experimental.

4.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos.

4.1.1 Cepas fúngicas.

Los hongos arenícolas facultativos objeto de estudio de la presente investigación fueron aislados por la Dra. María del Carmen González Villaseñor del Instituto de Biología de la UNAM, a partir de muestras de arena colectadas en la zona intermareal de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero, México ($16^{\circ}49'53.92''$ N, $99^{\circ}54'12.27''$ O), en enero de 2015 (**Figura 10**). Para el aislamiento de los organismos se utilizaron placas con medio V8 adicionado con penicilina (0.5 g/L) y estreptomycin (0.5 g/L). Los cultivos axénicos obtenidos fueron identificados con los códigos internos ACA-1, ACA-4, ACA-5, ACA-9, ACA-11, ACA-12, ACA-13, ACA-16 y ACA-17 (**Figura 11**).

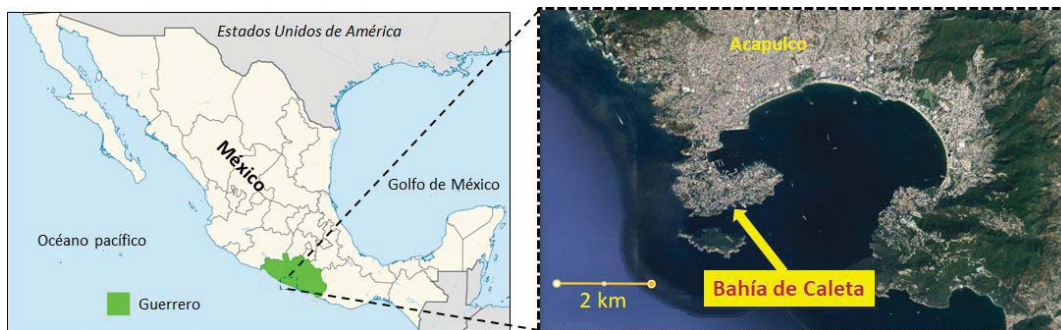


Figura 10. Localización geográfica del sitio de colecta en la Bahía de Caleta, Acapulco, Guerrero, México.

La caracterización taxonómica de los organismos se realizó mediante el análisis de las características tanto morfológicas (micro y macroscópicas), como genéticas del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal (ITS). Esta última actividad se realizó en colaboración con el Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro (UNCG), Carolina del Norte, EUA. Brevemente, el ADN genómico de los hongos se obtuvo a partir del micelio de cultivos frescos en medio de agar papa dextrosa (APD), y siguiendo la metodología descrita en los kits comerciales de extracción de ADN (Zymo Research). Posteriormente, se realizó la amplificación de las regiones ITS con el sistema PuReTaq Ready-To Go, utilizando la combinación de cebadores ITS1F e ITS4 y el siguiente protocolo de termociclado: 95 °C por 5 min (desnaturalización inicial), seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, y 72 °C por 1 min, con un periodo de extensión final de 72 °C por 8 min. Los productos finales de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como revelador, y se purificaron utilizando el kit de limpieza de PCR (Promega) para su posterior secuenciación. Todas las secuencias fueron generadas en un secuenciador capilar de alto rendimiento 3730XL (Applied Biosystems), y posteriormente se realizó un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparativo de la homología de las secuencias obtenidas con aquellas descritas en la base de datos GenBank. Los organismos con valores de homología menores al 99% se identificaron solo a nivel de género [33] (Tabla 1).



Figura 11. Cultivos axénicos en medio V8 de los microorganismos fúngicos estudiados.

Tabla 1. Identificación taxonómica de los organismos fúngicos de la serie ACA.

Clave	Cepa	Clave	Cepa
ACA-1	Trichomonascaceae	ACA-12	<i>Chrysosporium</i> sp.
ACA-4	<i>Acremonium</i> sp.	ACA-13	<i>Beauveria</i> sp.
ACA-5	<i>Chrysosporium</i> sp.	ACA-16	<i>Gymnoascus hyalinusporus</i>
ACA-9	<i>Aspergillus</i> sp.	ACA-17	<i>Simplicillium obclavatum</i>
ACA-11	Onygenales		

4.1.2 Cepas bacterianas.

El aislamiento y la identificación taxonómica de las bacterias objeto de estudio de la presente investigación fueron realizadas por el grupo de trabajo de la Dra. Susana de la Torre Zavala de la Universidad Autónoma de Nuevo León. A partir de distintas muestras líquidas y de sedimento colectadas en algunos sistemas acuáticos del área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas (CC), Coahuila (26°52'18" N, 102°1'12" O (**Figura 12**) y con el permiso otorgado a la Dra. Valeria F. Souza (oficio No. SGPA/DGVS/02002/16) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) para su bioprospección con fines académicos y de investigación, se logró el aislamiento de numerosas cepas bacterianas utilizando la metodología descrita por Arocha-Garza y colaboradores [78]. Los medios selectivos enriquecidos con nistatina (100 mg/mL) y ácido nalidíxico, permitieron la obtención de las actinobacterias identificadas como PR-5, PR-35 y PR-108 (**Figura 13**). La clasificación taxonómica de los organismos se realizó mediante la secuenciación molecular del gen 16S del ADN y por el análisis comparativo con las secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las actinobacterias PR-5, PR-35 y PR-108 fueron clasificadas como pertenecientes al género *Streptomyces*.

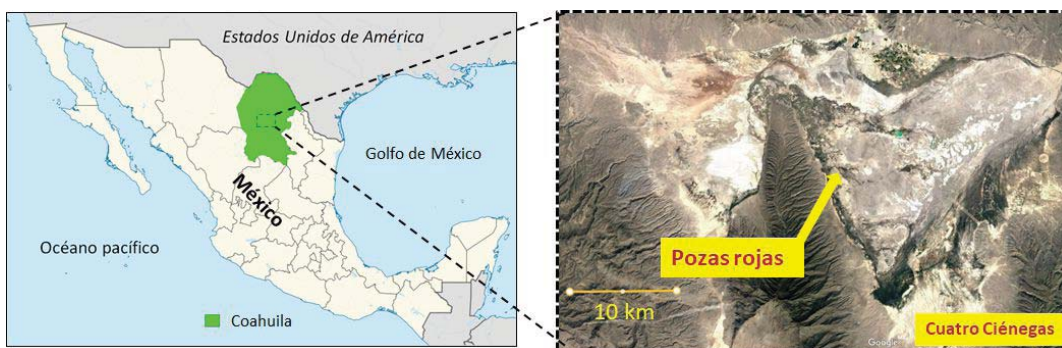


Figura 12. Localización geográfica del sitio de colecta en CC.



Figura 13. Cultivos axénicos en medio ISP2 de las actinobacterias estudiadas.

4.2 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de especies fúngicas.

Las cepas fúngicas antes descritas fueron sembradas en cajas de Petri con los medios APD y V8 y se dejaron crecer por 7 días a temperatura ambiente. Al término de este periodo, se inocularon 30 mL de medio YESD extracto de levadura, 1%; peptona de soya, 2%; y dextrosa, 2% con cinco trozos de agar (1 cm²) que contenían al organismo y se mantuvieron en agitación por 7 días a 100 rpm, a temperatura ambiente y con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h. Enseguida, cada uno de los inóculos fue transferido a un medio sólido de arroz estéril (30 g de arroz y 60 mL de H₂O), y se dejaron crecer durante 21 días, a temperatura ambiente y con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h.

Una vez concluido el periodo de crecimiento, se realizó el registro digital de los cultivos (**Figura 14**) y se procedió a la obtención de los extractos orgánicos correspondientes. Así, en primer lugar se adicionaron 10 mL de MeOH a cada matraz y se dejaron reposar por 15 min. Luego, se añadieron 60 mL de una mezcla de MeOH-CHCl₃ (1:1) y se fragmentó manualmente su contenido con la ayuda de una espátula. Los cultivos se colocaron en agitación constante a 100 rpm durante 8 h, para enseguida filtrarlos al vacío. Al filtrado obtenido se agregaron 60 mL de CHCl₃, se ajustó el volumen total a 200 mL con agua destilada y la solución se mantuvo en agitación durante 30 min. La fase orgánica se separó mediante reparto y se llevó a sequedad al vacío. Posteriormente, la fase orgánica se desgrasó con una mezcla de *n*-hexano-ACN-MeOH (2:1:1), y la fase de ACN-MeOH se concentró a sequedad.



Figura 14. Ejemplo del cultivo en medio sólido de la especie *Simplicillium obclavatum* ACA-17: **A)** vista frontal, **B)** anverso y **C)** reverso.

Los cultivos fúngicos en mediana escala y la obtención de sus correspondientes extractos orgánicos se realizó siguiendo la estrategia metodológica descrita anteriormente utilizando una proporción diez veces mayor (10×). Aplicando la metodología descrita, se obtuvieron una serie de extractos orgánicos de CHCl₃-MeOH (**Tabla 2**).

Tabla 2. Preparación de los extractos orgánicos en mediana escala.

	Proporción*	Cepa	Clave	Peso (mg)
Medio APD	3×	Trichomonasaceae ACA-1	ACA-1a	59.2
	3×	<i>Acremonium</i> sp. ACA-4	ACA-4a	373.0
	2×	<i>Chrysosporium</i> sp. ACA-5	ACA-5a	262.8
	3×	<i>Aspergillus</i> sp. ACA-9	ACA-9a	594.1
	10×	<i>Aspergillus</i> sp. ACA-9	ACA-9b	2125.1
	10×	<i>Aspergillus</i> sp. ACA-9	ACA-9c	2205.5
	3×	Onygenales ACA-11	ACA-11a	117.4
	3×	<i>Chrysosporium</i> sp. ACA-12	ACA-12a	211.6
	3×	<i>Beauveria</i> sp. ACA-13	ACA-13a	422.7
	3×	<i>G. hyalinusporus</i> ACA-16	ACA-16a	445.6
	6×	<i>S. obclavatum</i> ACA-17	ACA-17a	1335.5

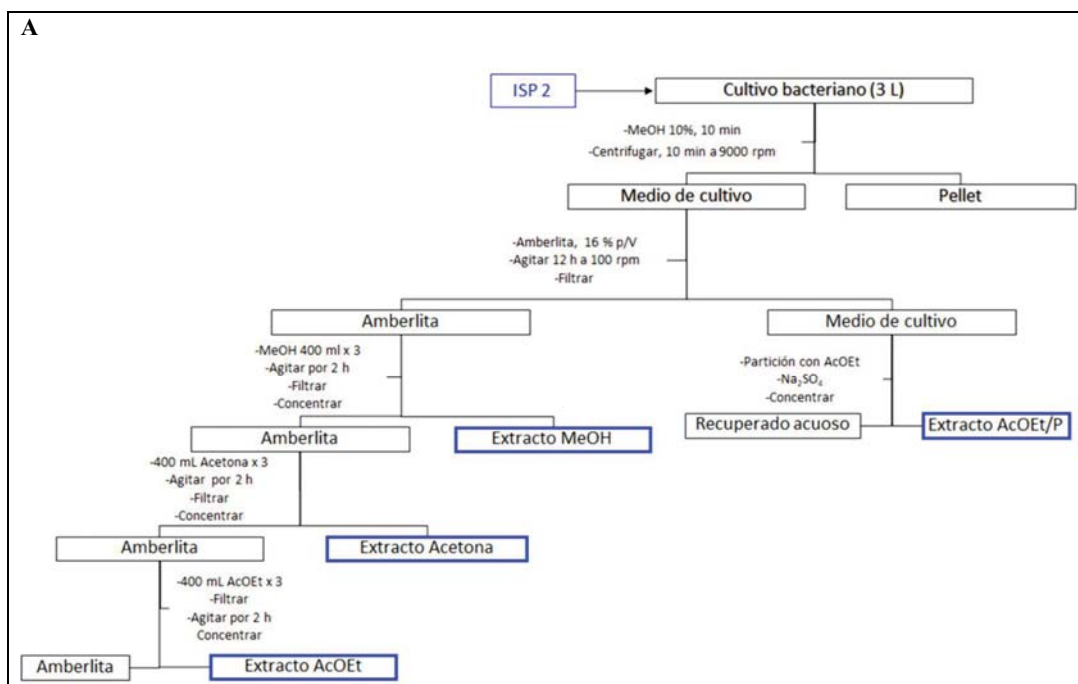
Medio V8	2×	Trichomonasceae ACA-1	ACA-1b	39.2
	1×	<i>Chrysosporium</i> sp. ACA-5	ACA-5b	294.3
	2×	<i>Aspergillus</i> sp. ACA-9	ACA-9d	291.4
	3×	Onygenales ACA-11	ACA-11b	102.3
	3×	<i>Chrysosporium</i> sp. ACA-12	ACA-12b	127.1
	3×	<i>Beauveria</i> sp. ACA-13	ACA-13b	298.8
	3×	<i>G. hyalinusporus</i> ACA-16	ACA-16b	386.6

*1× = 30 g de arroz y 60 mL de H₂O

4.3 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de las actinobacterias.

Las actinobacterias PR-5, PR-35 y PR-108 fueron resembradas en cajas de Petri con medio ISP2 (extracto de levadura, 1%; extracto de malta, 0.4%; dextrosa, 0.4%; y agar, 2%; ajustado a pH de 7.2), para después ser transferidas a medio marino (3 L) compuesto por almidón (1%), extracto de levadura (0.4%), peptona (0.2%), CaCO₃ (0.1%), Fe₂(SO₄)₃ 4H₂O (0.004%) y KBr (0.01%) y se dejaron crecer por 7 días a temperatura ambiente en agitación a 120 rpm. En el caso de la bacteria PR-35, se realizó un segundo cultivo en un medio (12 L) compuesto por almidón (1%) y peptona (0.8%) bajo las mismas condiciones de crecimiento (**Figura 15**). Cabe destacar que en ambas metodologías se emplean resinas poliméricas (XAD16 o XAD7HP) para realizar el proceso extracción mediante lavados sucesivos con disolventes orgánicos (MeOH, Acetona y AcOEt). Finalmente, todos los extractos se concentraron al vacío bajo presión reducida.

Siguiendo la metodología indicada en la **Figura 15 A**, a partir del cultivo de los microorganismos en medio marino se obtuvieron los extractos de MeOH, Acetona, AcOEt, así como un cuarto extracto obtenido mediante el reparto del medio de cultivo acuoso con AcOEt. Los resultados de los rendimientos y extractos orgánicos obtenidos se resumen en la **Tabla 3**.



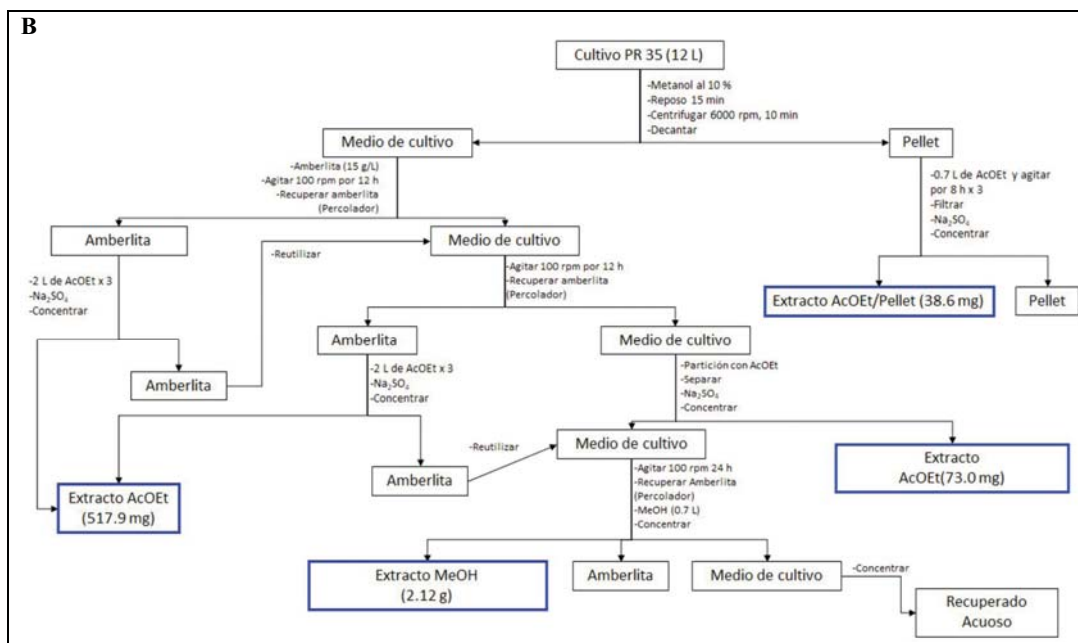


Figura 15. Estrategia metodológica general empleada para la obtención de los extractos bacterianos: **A)** en medio marino (3 L) y **B)** en medio de almidón y peptona (12 L).

Tabla 3. Rendimientos y extractos orgánicos preparados a partir del cultivo de las especies de actinobacterias.

Bacteria	Extracto/Clave	Peso (mg)
PR-5	PR-5 MeOH	6393.4
	PR-5 Acetona	1356.1
	PR-5 AcOEt	206.1
PR-35	PR-35 MeOH	3567.3
	PR-35 Acetona	1189.3
	PR-35 AcOEt	245.6
PR-108	PR-108 MeOH	9955.8
	PR-108 Acetona	1601.0
	PR-108 AcOEt	163.6
PR-5	PR-5 AcOEt/P	7.4
PR-35	PR-35 AcOEt/P	39.3
PR-108	PR-108 AcOEt/P	113.0

Por otra parte, con la metodología indicada en la **Figura 15 B**, a partir del cultivo bacteriano en medio con almidón/peptona y utilizando una resina de Amberlita® (XAD-7HP), se logró la obtención de cuatro extractos, utilizando MeOH y AcOEt como disolventes de extracción y la técnica de reparto (**Tabla 4**).

Tabla 4. Extractos orgánicos obtenidos a partir de *Streptomyces* sp. PR-35 en medio almidón/peptona.

Extracto	Clave	Peso
AcOEt/Amberlita	AcOEt	517.9 mg
AcOEt/Pellet	Pellet	38.6 mg
MeOH/Amberlita	MeOH	2121.5 mg

AcOEt/Partición medio de cultivo	AcOEt-MC	73.1 mg
Recuperado acuoso medio de cultivo	-	~80 g

4.4 Procedimientos cromatográficos generales.

El fraccionamiento, la separación y la purificación de los componentes presentes en los extractos orgánicos de las especies objeto de estudio se realizó empleando técnicas cromatográficas convencionales: cromatografía en capa delgada (CCD), en columna abierta (CCA), de tipo flash (CF) y/o de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Para la CCD, se utilizaron placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 y como fase móvil distintos sistemas de elución compuestos por mezclas entre CHCl_3 , AcOEt y/o MeOH. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de UV (254 y 364 nm) y como agente revelador se empleó sulfato cérico amoniacal al 10% en ácido sulfúrico, para el desarrollo del color fue necesario calentar a 110 °C en una parrilla de calentamiento. Para la CCA se utilizaron columnas de vidrio de distintas dimensiones empacadas con gel de sílice 60. La elución se realizó empleando un gradiente de polaridad creciente entre hexano, CHCl_3 y MeOH. Las separaciones por CF se realizaron en un cromatógrafo CombiFlash Rf System (Teledyne Isco), equipado con un detector UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA; barrido entre 190-500 nm) y otro evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y una bomba binaria. Como fase estacionaria se emplearon columnas Redi Sep Rf Gold Si-gel y C_{18} Gold de distintos tamaños y como fase móvil, mezclas entre MeOH- H_2O (fase reversa), y entre hexano, CHCl_3 , AcOEt y MeOH (fase normal). La separación y purificación de los metabolitos se realizó en un HPLC marca Waters equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, detectores PDA (barrido entre 190-500 nm) y ELSD y un colector de fracciones. La adquisición y manejo de datos se realizó con el software Empower 3 (Waters). Todos los análisis se realizaron con las siguientes columnas analíticas y/o preparativas: Gemini C_{18} (5 μm , 250 \times 4.6 mm y 5 μm , 250 \times 21.2 mm, Phenomenex), Kinetex C_{18} (5 μm , 250 \times 4.6 mm y 5 μm , 250 \times 21.2 mm, Phenomenex) y Atlantis T3 C_{18} (5 μm , 250 \times 4.6 mm y 5 μm , 250 \times 10 mm, Phenomenex). La fase móvil consistió en mezclas de ACN y ácido fórmico en agua (0.1%) en diferentes sistemas de tipo gradiente o isocrático. Los flujos empleados fueron de 1 mL/min en el sistema analítico, y 15, 17 y 21.24 mL/min en el preparativo.

4.5 Caracterización estructural.

De manera general, la caracterización estructural de los metabolitos secundarios se realizó empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bidimensionales (1D y 2D) se registraron en CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$, $\text{MeOH}-d_4$ o piridina- d_5 , en un equipo JEOL ECS 400 MHz (JEOL Ltd.), o Varian VNMRs 400 MHz (Agilent Tech.), o JEOL ECA 500 MHz o Agilent 700 MHz. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron en los equipos Thermo LTQ Orbitrap XL o Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific), y los de baja resolución en un Waters SQD2 (Waters), en modo positivo y negativo y con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Las muestras se analizaron por inyección directa o mediante un sistema de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia Acquity UPLC system (Waters) equipado con un detector PDA y empleando una columna Acquity BEH C_{18} (1.7 μm , 2.1 \times 10 mm, Waters) y una mezcla de elución binaria constituida por ACN (A) y ácido fórmico acuoso (0.1%; B), en un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% A hasta 100% A en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min, con flujos de 0.3 ó 0.4 mL/min. Los espectros en el infrarrojo (IR) fueron obtenidos en un espectrómetro PerkinElmer Frontier IR400 (PerkinElmer), los de ultravioleta en un Shimadzu U160 (Shimadzu Corp.), utilizando MeOH como disolvente, y los de dicroísmo circular vibracional (DCV) se registraron en colaboración con el Dr. Pedro Joseph Nathan del CINVESTAV, IPN, en un espectrómetro dual PEM BioTools Chiral IR FT-VCD (BioTools) con una resolución de 4 cm^{-1} y utilizando CHCl_3 como disolvente. Finalmente, los valores de

rotación óptica (RO) fueron colectados en un polarímetro PerkinElmer 343 (PerkinElmer) en la línea D de sodio, con una celda de 1 dm, con una temperatura entre 22 y 25 °C y utilizando CHCl₃ y MeOH como disolventes.

4.6 Estudio químico de *Aspergillus* sp. ACA-9.

4.6.1 Fraccionamiento primario de los extractos en pequeña escala y purificación de los compuestos 1-7.

Los extractos orgánicos procedentes de los cultivos axénicos en medios APD (clave ACA-9a, 594.1 mg) y V8 (clave ACA-9b, 291.4 mg) (**Tabla 2**), se fraccionaron por medio de una CCA sobre gel de sílice, utilizando en ambos casos un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-MeOH y se colectaron eluatos de 800 mL y 100 mL, respectivamente. Este proceso generó un conjunto de nueve fracciones primarias a partir del primer extracto (F₁-F₉) y siete a partir del segundo (F₁₀-F₁₆), mismas que se reunieron con base en su similitud cromatográfica por CCD. El resumen de estos procesos cromatográficos se indica en las **Tablas 5 y 6**.

Tabla 5. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9a de ACA-9.

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-12	F ₁	7.4
13-20	F ₂	8.1
21-29	F ₃	7.4
30-33	F ₄	5.1
34-37	F ₅	6.9
38-45	F ₆	8.9
46-47	F ₇	392.1
48-59	F ₈	115.9
60-71	F ₉	28.5
Total recuperado:		580.3
Total inicial:		594.1
% Recuperado:		97.7

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9d de ACA-9.

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-4	F ₁₀	1.6
5-10	F ₁₁	6.1
11-14	F ₁₂	5.1
15-18	F ₁₃	6.3
19-22	F ₁₄	8.4
23-29	F ₁₅	174.0
30-38	F ₁₆	62.7
Total recuperado:		264.2
Total inicial:		291.4
% Recuperado		90.7

El análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC de cada fracción permitió la selección de las fracciones F₈ (115.9 mg), F₁₄ (8.4 mg) y F₁₅ (174.0 mg) para su separación y purificación. F₈ se purificó utilizando una columna Gemini C₁₈ y un gradiente de elución ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (35:65-100:0) en 15 min, y un flujo de 21.24 mL/min, lo que permitió la obtención de los compuestos **1** (5.5 mg, *t_R* = 10.9 min), **2** (2.5 mg, *t_R* = 13.3 min) y **3** (2.1 mg, *t_R* = 14.5 min) (**Figura 16**).

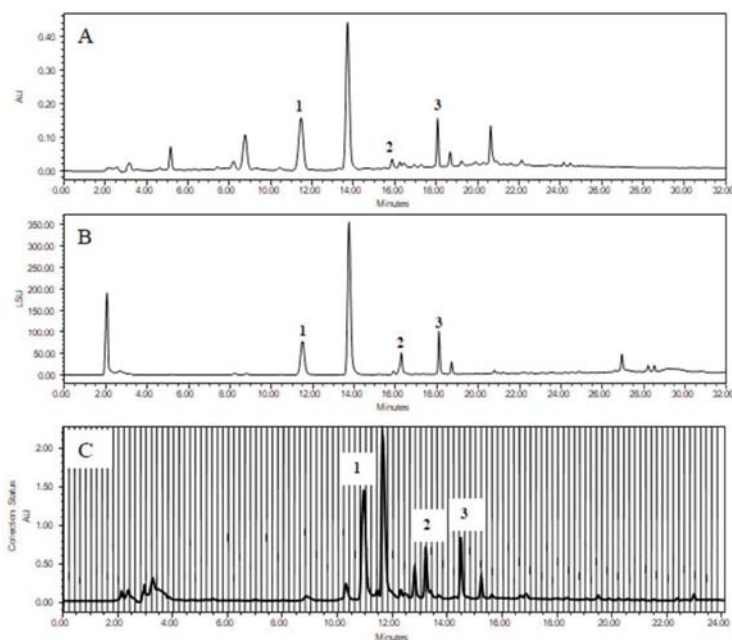


Figura 16. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 298.7$ nm); B] Detector ELSD] y preparativo [C] Detector UV/Vis ($\lambda = 298.7$ nm) de la fracción F₈ de ACA-9.

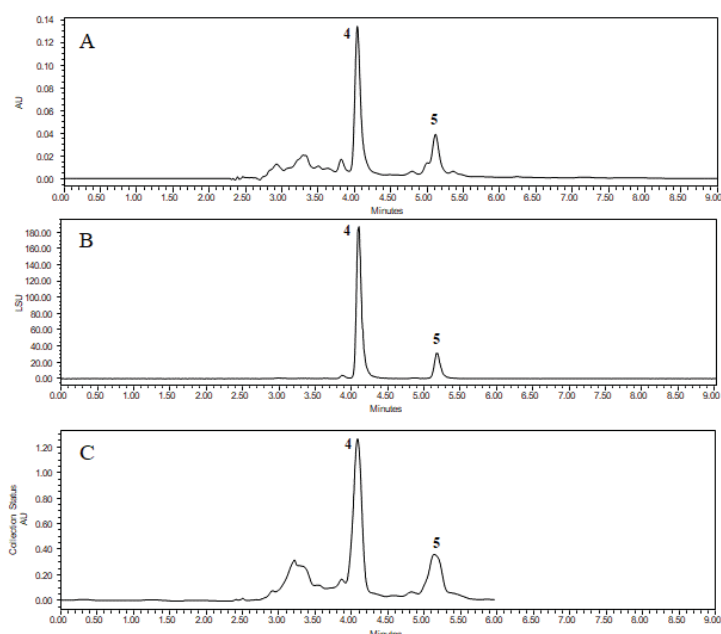


Figura 17. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 254$ nm); B] Detector de ELSD] y de la purificación a nivel analítico [C] Detector UV/Vis ($\lambda = 254$ nm)] de la fracción F₁₄ de ACA-9.

La fracción F₁₄ (**Figura 17**) se purificó utilizando un sistema de elución isocrático de ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (80:20) con un flujo de 1 mL/min y una columna Gemini C₁₈, lo que permitió la obtención de los productos identificados como **4** (0.8 mg, $t_R = 4.1$ min) y **5** (0.9 mg, $t_R = 5.2$ min).

Por otra parte, la fracción F₁₅ se purificó también por HPLC utilizando un gradiente de elución ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-100:0) en 15 min, con un flujo de 21.24 mL/min y una columna Gemini C₁₈, proceso que

permitió la separación de los compuestos **6** (4.3 mg, $t_R = 7.5$ min) y **7** (4.0 mg, $t_R = 9.6$ min). En la **Figura 18** se muestran los cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la obtención de los compuestos antes mencionados.

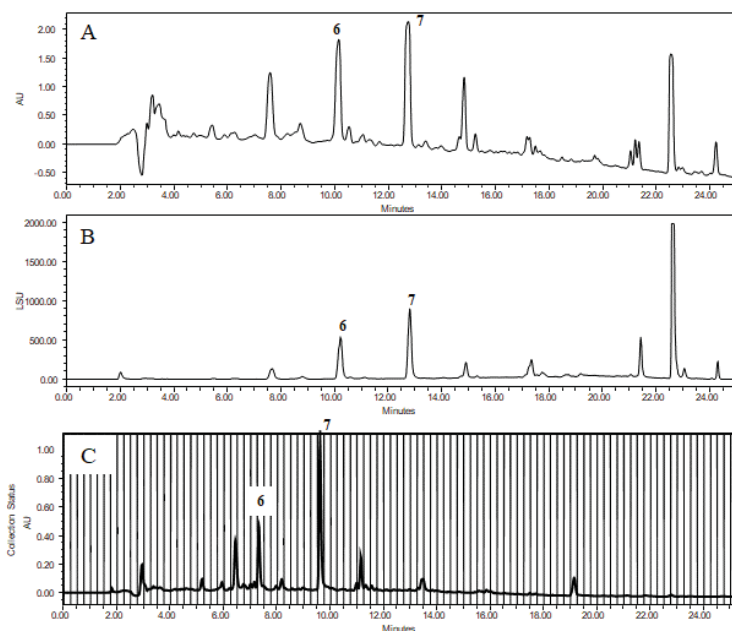


Figura 18. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [**A**] Detector UV/Vis ($\lambda = 254$ nm); **B**] Detector ELSD] y preparativo [**C**] Detector UV/Vis ($\lambda = 254$ nm)] de la fracción F_{15} de ACA-9.

4.6.2 Obtención de los compuestos **8** y **9**.

Los cultivos en mediana escala ACA-9b (2.1 g) y ACA-9c (2.2 g) (**Tabla 2**) fueron fraccionados mediante una CF, utilizando para la separación de ACA-9b una columna Silica Gold empacada con 120 g de gel de sílice, con un flujo de 85 mL/min, un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano- CHCl_3 -MeOH durante 77 min y colectando fracciones de 23 mL (**Figura 19**, **Tabla 7**). Por otro lado, el extracto ACA-9c se fraccionó en una columna Silica Gold empacada con 24 g de gel de sílice, un flujo de 35 mL/min y un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano- CHCl_3 -MeOH durante 38.4 min y colectando fracciones de 23 mL (**Figura 20**, **Tabla 8**).

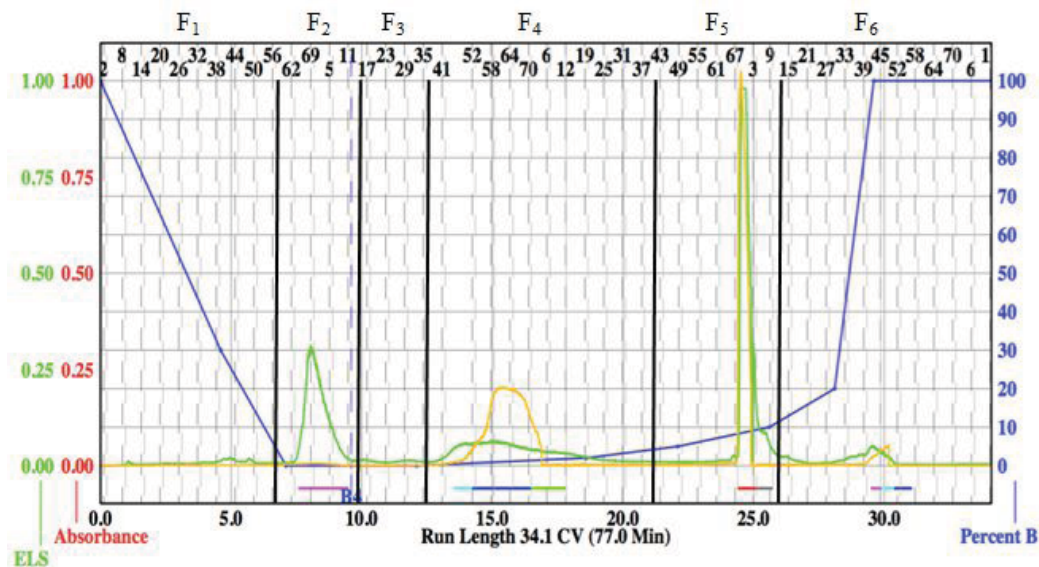


Figura 19. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-9b de ACA-9. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 7. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9b de ACA-9.

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-57	F ₁	29.3	223-289	F ₆	202.6
58-82	F ₂	373.8	Cantidad recuperada:		2019.2
83-106	F ₃	29.6	Cantidad inicial:		2026.7
107-170	F ₄	320.0	% Recuperado:		99.6
171-222	F ₅	1063.9			

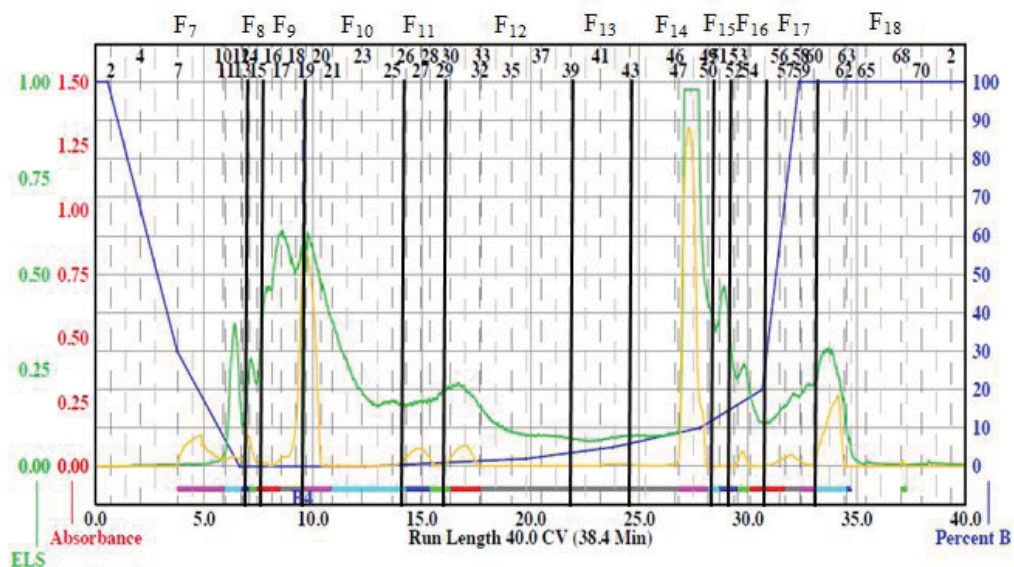


Figura 20. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-9c de ACA-9. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 8. Fraccionamiento primario del extracto ACA-9c de ACA-9.

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-12	F ₇	35.2	51	F ₁₅	50.2
13-14	F ₈	24.3	52-54	F ₁₆	44.2
15-17	F ₉	210.0	55-59	F ₁₇	65.9
18-24	F ₁₀	286.7	60-72	F ₁₈	119.8
25-28	F ₁₁	72.3	Cantidad recuperada:		1842.5
29-38	F ₁₂	118.8	Cantidad inicial:		2135.0
39-44	F ₁₃	52.1	% Recuperado:		86.3
45-50	F ₁₄	783.7			

Una muestra de 387.6 mg de la fracción primaria F₅ (**Tabla 7**) fue resuelta mediante HPLC (**Figura 21**) permitiendo el aislamiento de 2.3 mg del compuesto **5** ($t_R = 23.0$ min), 5.8 mg del compuesto **6** ($t_R = 14.0$ min) y 9.3 mg del compuesto **8** ($t_R = 17.1$ min).

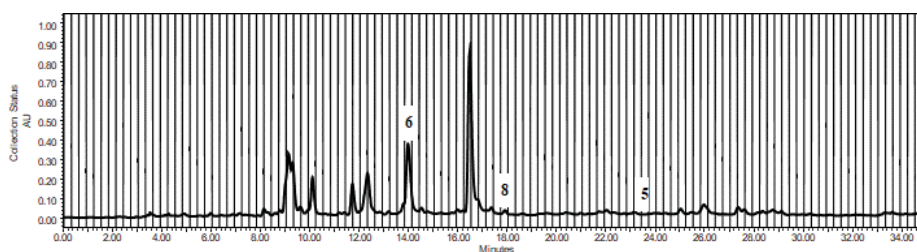


Figura 21. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₅ de ACA-9. Condiciones de separación: Kinetex C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-88:12) en 30 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 254$ nm.

El fraccionamiento secundario por CF (**Figura 22**) en una columna Silica Gold empacada con 12 g de gel de sílice, empleando un flujo de 30 mL, un gradiente de polaridad entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, durante 45.8 min y colectando fracciones de 9 mL, de la fracción F₅, permitió el aislamiento de 13.5 mg del producto **8** ($t_R = 14.0$ min) (**Figura 23**) a partir de la fracción secundaria F_{5.7} (**Tabla 9**).

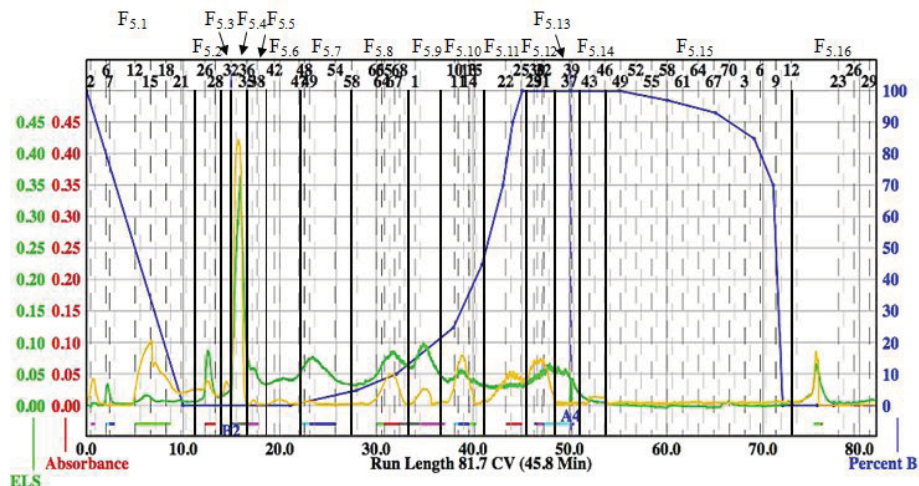


Figura 22. Cromatograma del fraccionamiento secundario por CF de la fracción F₅ de ACA-9. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción F₅ de ACA-9.

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-23	F _{5.1}	5.1	87-94	F _{5.11}	72.2
24-29	F _{5.2}	9.7	95-104	F _{5.12}	117.9
30-31	F _{5.3}	5.0	105-111	F _{5.13}	34.7
32-35	F _{5.4}	65.8	112-116	F _{5.14}	8.1
36-40	F _{5.5}	10.8	117-151	F _{5.15}	34.6
41-44	F _{5.6}	9.1	152-179	F _{5.16}	32.8
45-58	F _{5.7}	38.8	Cantidad recuperada:		581.5
59-69	F _{5.8}	44.6	Cantidad inicial:		632.1
70-76	F _{5.9}	38.8	% Recuperado:		92.0
77-86	F _{5.10}	53.5			

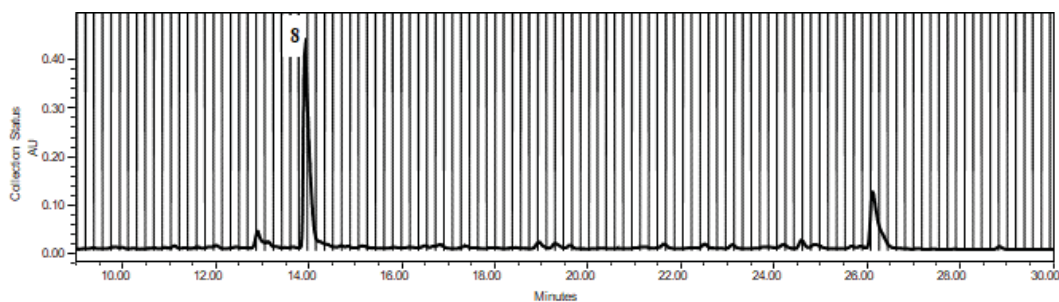


Figura 23. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F_{5.7} de ACA-9. Condiciones de separación: Kinetex C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-88:12) en 30 min; Flujo = 21.24 mL/min; λ = 290 nm.

De la fracción F₆ (202.1 mg) (**Tabla 7**) se realizó el reaislamiento de 8.0 mg del compuesto **3** (t_R = 9.1 min), utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en la **Figura 24**.

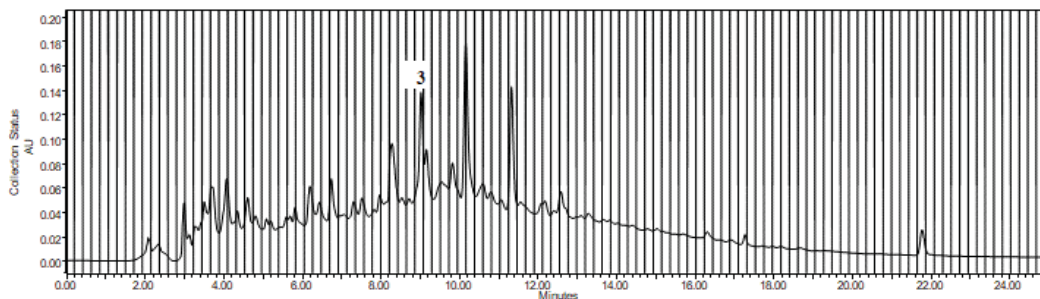


Figura 24. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₆ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; λ = 254 nm.

Por otro lado, 286.7 mg de la fracción F₁₀ (**Tabla 8**) fueron purificados mediante HPLC con las condiciones de separación indicadas en la **Figura 25**, logrando así la separación de 4.4 mg del compuesto **5** (t_R = 15.8 min).

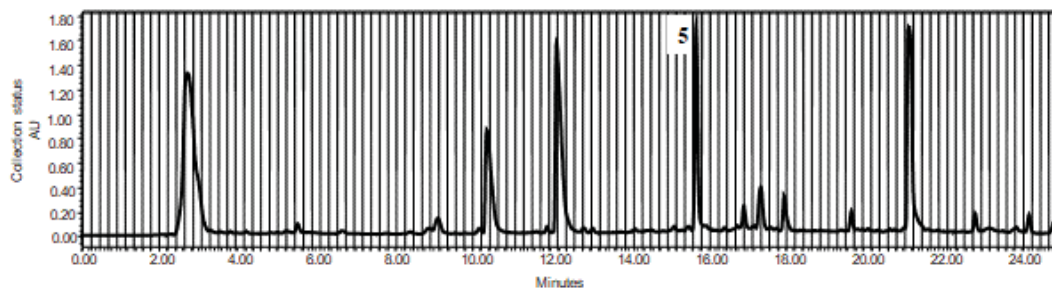


Figura 25. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₁₀ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈, ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (45:55-100:0) en 15 min, Flujo = 21.24 mL/min; λ = 254 nm.

De las fracciones primarias F₁₁ (72.3 mg), F₁₂ (118.8 mg) y F₁₃ (52.1 mg) (**Tabla 8**) se obtuvieron 3.6, 2.7 y 15.8 mg, respectivamente, del compuesto **4** (t_R = 13.9 min) y 3.8 mg del compuesto **5** (t_R = 16.5 min). En las **Figuras 26-28** se ilustran los cromatogramas de cada una de estas separaciones.

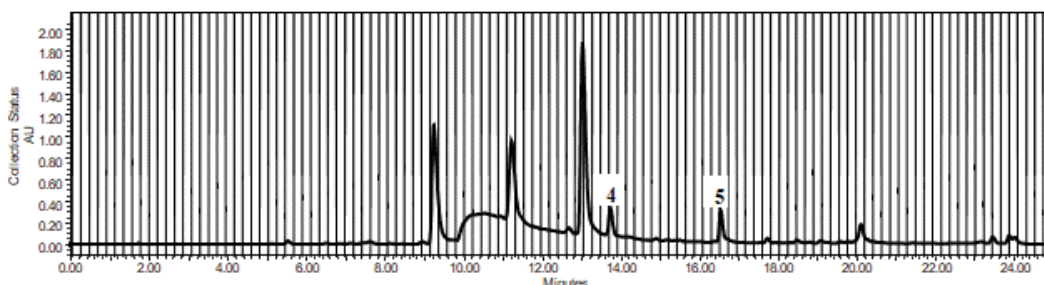


Figura 26. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₁₁ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (50:50-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; λ = 245 nm.

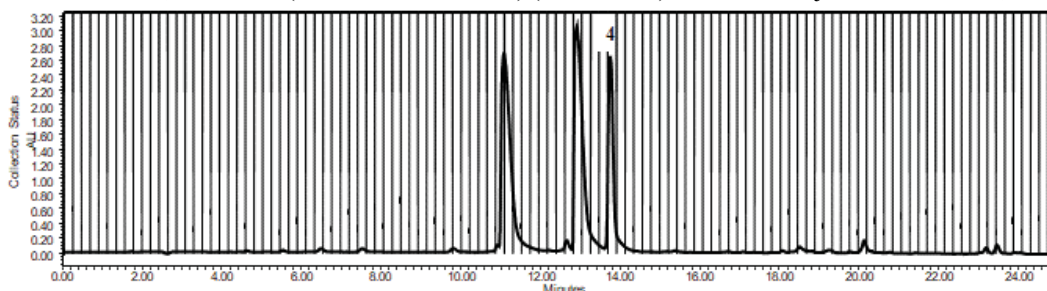


Figura 27. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₁₂ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (50:50-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; λ = 210 nm.

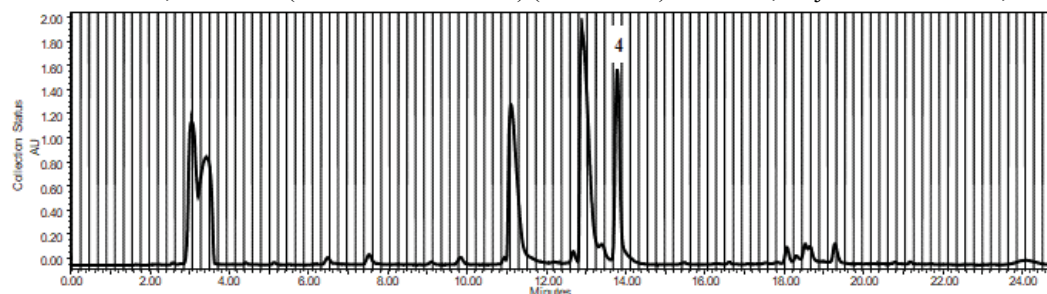


Figura 28. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₁₃ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (50:50-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; λ = 190 nm.

La fracción F₁₄ (783.7 mg) (**Tabla 8**) se sometió a un fraccionamiento secundario por CF, utilizando una columna Silica Gold empacada con 12 g de gel de sílice, empleando un flujo de 30 mL/min, un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-MeOH durante 28 min y colectando fracciones de 11 mL (**Figura 29**).

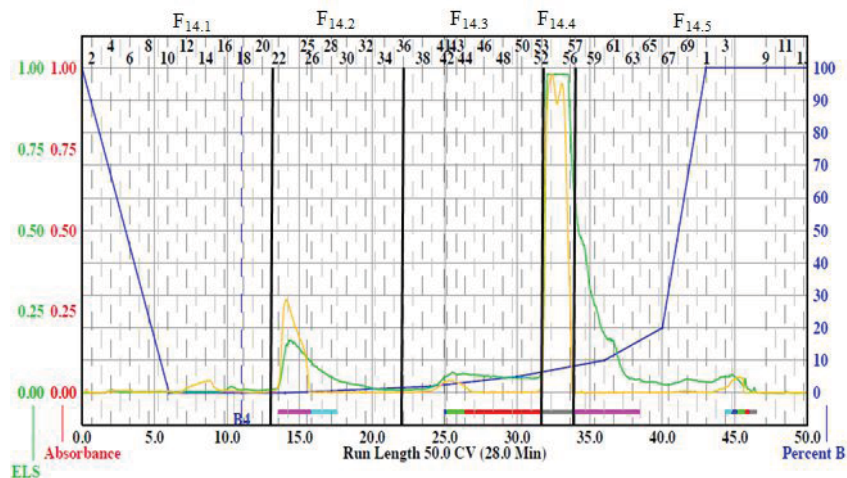


Figura 29. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de la fracción F₁₄ de ACA-9. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 10. Resumen del proceso cromatográfico por CF de la fracción F₁₄ de ACA-9.

Fraciones	Clave	Peso (mg)
0-20	F _{14.1}	4.1
21-35	F _{14.2}	36.8
36-51	F _{14.3}	33.9
52-56	F _{14.4}	565.9
57-Fin	F _{14.5}	119.7
Cantidad recuperada:		760.4
Cantidad inicial:		783.7
% Recuperado:		97.0

Posteriormente, la fracción F_{14.4} (565.9 mg) fue resuelta en un HPLC preparativo utilizando un sistema de elución ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (45:55-90:10) durante 12 min, un flujo de 21.24 mL/min y una columna Gemini C₁₈, para obtener cantidades adicionales de **7** (37.7 mg, *t_R* = 12.8 min) y 21.8 mg del compuesto **8** (*t_R* = 14.8 min) (**Figura 30**).

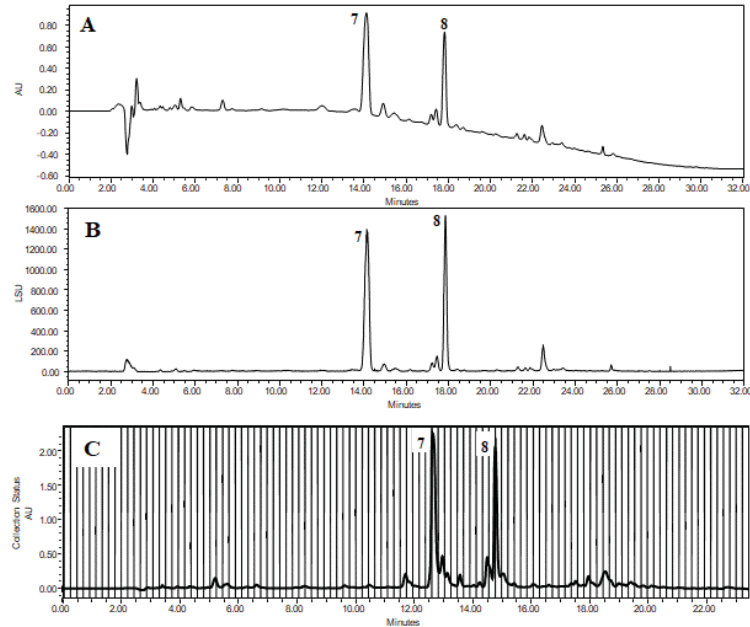


Figura 30. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A) detector UV/Vis ($\lambda = 213$ nm; B) detector ELSD] y preparativo [C) detector UV/Vis $\lambda = 213$ nm] de la fracción F_{14.4} de ACA-9.

De la purificación por HPLC de la fracción F₁₅ (**Tabla 8**) se obtuvieron 18.2 mg adicionales del compuesto **6** ($t_R = 10$ min) utilizando las condiciones de separación descritas en la **Figura 31**.

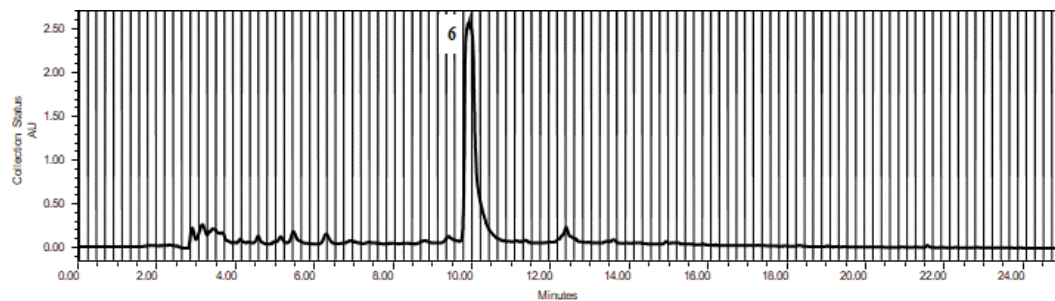


Figura 31. Cromatograma por HPLC a nivel preparativo de la purificación de la fracción F₁₅ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (43:57-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 200$ nm.

De F₁₆ (44.2 mg, **Tabla 8**) se purificaron por HPLC 7.2 mg del compuesto **9** ($t_R = 6.0$ min) y cantidades adicionales de **5** (5.2 mg, $t_R = 9.0$ min), utilizando las condiciones de separación indicadas el pie de **Figura 32**.

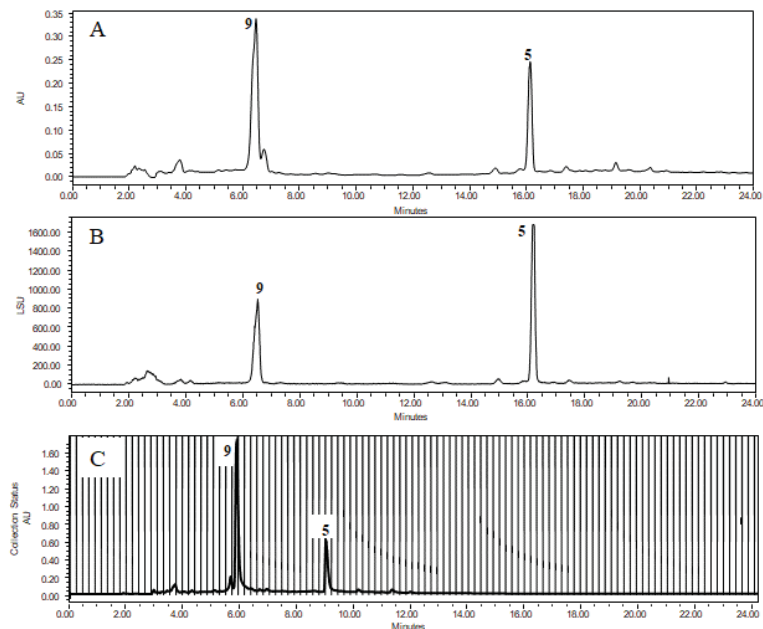


Figura 32. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** detector UV/Vis ($\lambda = 213$ nm); **B)** detector ELSD] y preparativo **(C)** de la fracción F₁₆ de ACA-9. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 285$ nm.

4.6.3 Pruebas de estabilidad del compuesto 7.

Con la finalidad de confirmar la estabilidad del compuesto **7** se realizaron los experimentos que se describen a continuación:

a) Metanólisis: 0.5 mg de **7** fueron disueltos en MeOH (500 μ L) y se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación constante por 24 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 20 μ L a los 30 min, 8 h y 24 h de reacción.

b) Hidrólisis ácida: 0.5 mg de **7** se disolvieron en ACN ácido (0.1% ácido fórmico, 500 μ L). Las condiciones de reacción y la toma de muestra fueron las mismas que las descritas en el inciso anterior.

Todas las alícuotas se analizaron por UPLC-MS, en una columna Acquity BEH C₁₈, utilizando un gradiente de elución ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) en 10 min (15:85-100:0) y un flujo de 0.3 mL/min.

4.6.4 Análisis MS/MS del compuesto 6.

Para esta determinación, la muestra fue introducida de forma directa a la fuente de ionización del espectrómetro con un flujo de 5 μ L/min y a una concentración de 0.1 mg/mL. Los espectros de masas se registraron en modo positivo y la fragmentación MS/MS selectiva se realizó empleando un método de análisis de 5 eventos de escaneo: durante el primer evento, se registró el espectro completo de masas en el rango de 75–2000 umas; en los siguientes cuatro eventos, se llevaron a cabo fragmentaciones por disociación colisional de alta energía (HCD) de los cuatro iones más abundantes (m/z 606.3632, 521.2737, 471.2950 y 360.1909), todos a una energía de colisión optimizada de 20 mV.

4.6.5 Análisis de Marfey del compuesto 6.

Este experimento se realizó de acuerdo a los protocolos ya descritos en la literatura [79]. A cada estándar (~0.3 mg), se le adicionaron 50 μ L de H₂O, 20 μ L de NaHCO₃ 1 M y 100 μ L del reactivo de Marfey (N_α-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alaninamida) al 1% en acetona. Las mezclas de reacción fueron agitadas por 1.5 h a 40 °C, una vez transcurrido este periodo, las reacciones fueron detenidas con la adición de 10 μ L de HCl 2 N. Los productos de todas las reacciones fueron secados con nitrógeno y enseguida disueltos en ~1.0 mL de MeOH. Los estándares derivatizados se inyectaron (2 μ L) en un equipo de UPLC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución LTQ Orbitrap XL™, utilizando una columna BEH C₁₈, con un gradiente ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (10:90-90:10) durante 10 min con un flujo de 0.4 mL/min (λ_{max} de 340 nm). El compuesto 6 (~0.5 mg) fue hidrolizado con 0.5 mL de HCl 6 N a 90 °C durante 20 h, después de este tiempo, la muestra fue secada con nitrógeno. Para obtener el producto de hidrólisis se siguió el mismo procedimiento descrito para los estándares, después se reconstituyó en ~100 μ L de MeOH y se analizó bajo las mismas condiciones cromatográficas.

4.6.6 Evaluación biológica de los compuestos 1, 3 y 7.

Esta determinación se realizó en colaboración con el Dr. Daniel Menéndez del National Institute of Environmental Health Sciences, NIH en el Research Triangle Park, Carolina del Norte, EUA.

Las líneas tumorales que se utilizaron fueron líneas celulares con fenotipo silvestre: A549 (adenocarcinoma alveolar humano), U2OS (osteosarcoma humano) y HCT116 p53+/+ (carcinoma de colon); con fenotipo mutante con pérdida de función: HCT116 p53 -/- (carcinoma de colon); con fenotipo mutante de ganancia de función: MDA-MB-231 p53^{R280K} (adenocarcinoma mamario). Para el ensayo se utilizaron células A549 (con expresión normal de Pgp) y A549/DXR [resistentes a doxorrubicina (DXR) y con sobreexpresión de Pgp]. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio 5A de McCoy o medio DMEM alto en glucosa (medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco), adicionado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomina, de acuerdo con lo sugerido por la American Type Culture Collection (ATCC®). Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂. La DXR se disolvió en agua desionizada (H₂Odd, stock a 1 mM) y se realizaron diferentes diluciones con medio de cultivo. Las soluciones stock de 1, 3 y 7 se prepararon a 2 mM en DMSO estéril y las diluciones seriadas se prepararon con buffer de fosfatos estéril. Para el ensayo, las células se colocaron en una placa de 96 pozos entre 18 y 24 h antes del tratamiento con 1, 3, 7 y DXR a distintas concentraciones por 72 h. Se utilizó agua estéril o DMSO estéril (0.01% v/v) como vehículos. La sublínea celular A549 resistente a DXR fue desarrollada por exposición a concentraciones crecientes de DXR durante un periodo de 4 meses. Un cultivo de células A549 fue tratado con 0.5 nM de DXR hasta obtener colonias de células sobrevivientes, y algunas colonias se seleccionaron y amplificaron en presencia de 0.5 nM de DXR, alcanzando la confluencia antes de incrementar la concentración de fármaco en múltiplos de dos para la siguiente ronda de selección. Las células resistentes fueron cultivadas y mantenidas en presencia de 0.1 μ M de DXR.

4.7 Estudio químico de *Beauveria* sp. ACA-13.

A partir de cultivos axénicos de *Beauveria* sp., en medios APD y V8 (Figura 11), se realizaron dos cultivos en pequeña escala (180 g de arroz), obteniéndose 422.7 y 265.2 mg de extracto, respectivamente (claves ACA-13a y ACA-13b). Ambos extractos se analizaron por HPLC, y así se determinó su similitud cromatográfica, por lo que se combinaron y el extracto resultante (clave ACA-13a-b, 687.9 mg) se fraccionó por medio de una CF, en una columna Silica Gold empacada con 12 g de gel de sílice, con un flujo de 30 mL/min, un gradiente de polaridad creciente de *n*-hexano-CHCl₃-MeOH, durante 28.0 min y colectando fracciones de 23 mL (Figura 33, Tabla 11).

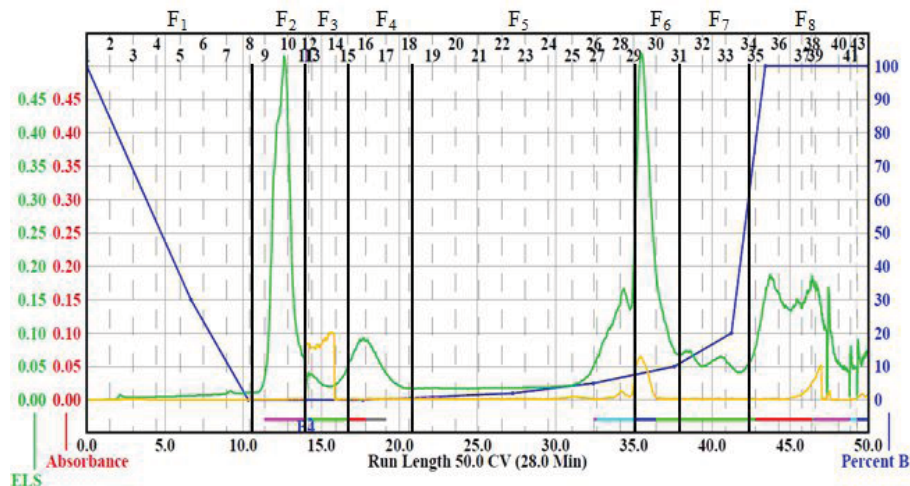


Figura 33. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-13a-b de ACA-13. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 11. Resumen del proceso cromatográfico por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-13a-b de ACA-13.

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-7	F ₁	1.8
8-10	F ₂	76.0
11-13	F ₃	3.8
14-17	F ₄	19.8
18-28	F ₅	49.6
29-30	F ₆	64.0
31-33	F ₇	26.7
34-Fin	F ₈	184.4
	Cantidad recuperada:	432.8
	Cantidad inicial:	687.9
	% Recuperado:	61.9

Todas las fracciones obtenidas a partir del proceso cromatográfico resumido en la **Tabla 11**, fueron analizadas por HPLC y los resultados obtenidos permitieron seleccionar a la fracción F₆ para su posterior estudio químico. La resolución de esta fracción por HPLC preparativo permitió el aislamiento y separación de los compuestos **10** (1.4 mg, $t_R = 5.6$ min), **11** (25.6 mg, $t_R = 11.5$ min) y **12** (1.4 mg, $t_R = 12.9$ min). Los cromatogramas correspondientes a esta purificación se ilustran en la **Figura 34**.

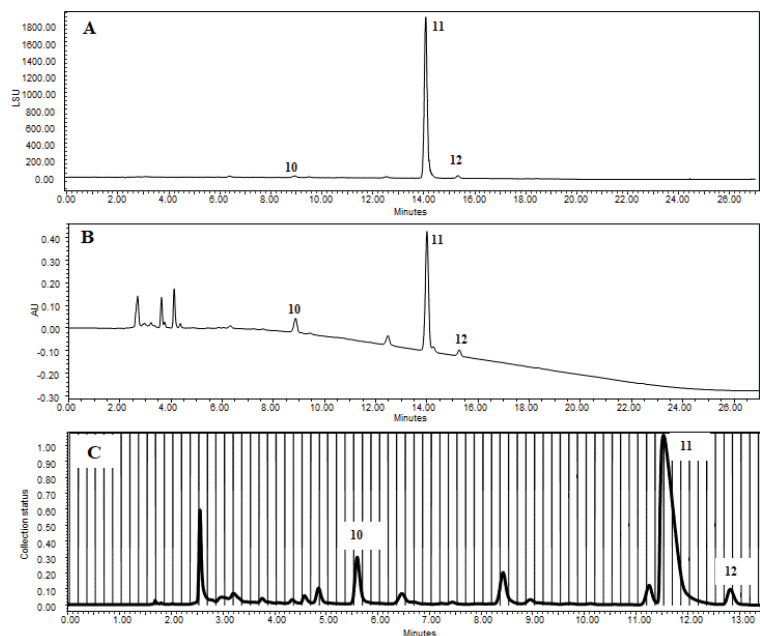


Figura 34. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** Detector UV/Vis ($\lambda = 221$ nm); **B)** Detector ELSD] y preparativo **(C)** de la fracción F_6 de ACA-13. Condiciones de separación: Gemini C_{18} ; ACN- H_2O (0.1% de ácido fórmico) (70:30-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 221$ nm.

4.8 Estudio químico de *G. hyalinusporus* ACA-16.

Los extractos orgánicos ACA-16a (612.2 mg) y ACA-16b (386.2 mg) (**Tabla 2**), fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica al analizarlos por HPLC. Esta reunión (ACA 16a-b, 794.8 mg) se fraccionó por CF, en una columna empacada con 12 g de gel de sílice, con un flujo de 30 mL/min y un gradiente de polaridad creciente (*n*-hexano- $CHCl_3$ -MeOH), colectando fracciones de 22 mL (**Figura 35**, **Tabla 12**).

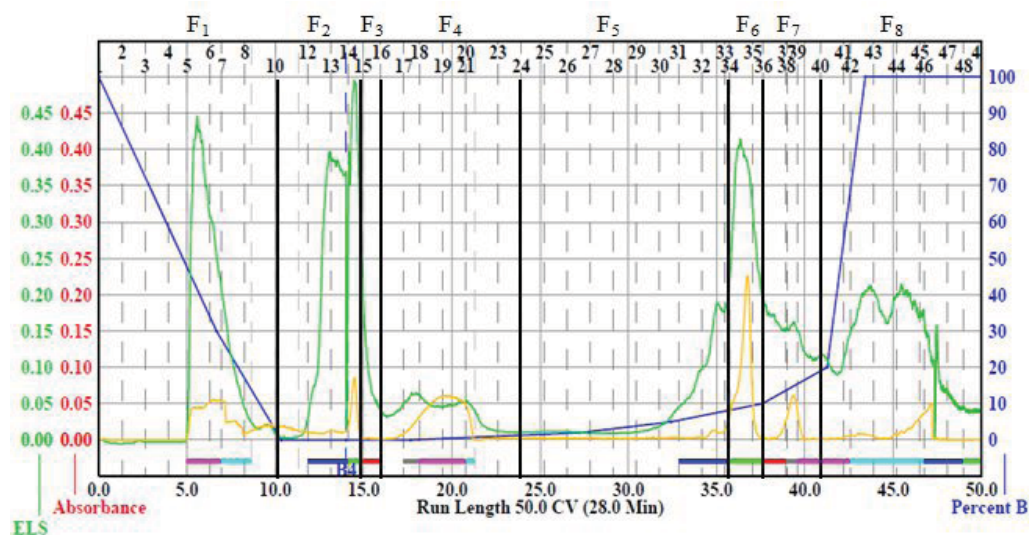


Figura 35. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-16a-b de ACA-13. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 12. Resumen del fraccionamiento primario por CF del extracto ACA-16a-b de ACA-13.

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-9	F ₁	45.7
10-13	F ₂	84.9
14-15	F ₃	46.2
16-23	F ₄	33.5
24-33	F ₅	61.4
34-35	F ₆	52.9
36-39	F ₇	46.1
40-49	F ₈	241.5
Cantidad recuperada:		631.9
Cantidad inicial:		794.8
% Recuperado:		77.0

Con base en los perfiles cromatográficos por HPLC analítico, se seleccionaron a las fracciones F₄ (33.5 mg), F₆ (52.9 mg) y F₇ (46.1 mg) para su separación y purificación por HPLC. Así la resolución de F₄ permitió el aislamiento del compuesto **13** (9.1 mg, $t_R = 8.1$ min) (**Figura 36**).

La resolución de la fracción F₆ permitió el aislamiento de 1.5 mg del compuesto identificado como **14** ($t_R = 7.4$ min, **Figura 37**). Finalmente, el compuesto **15** (4.8 mg; $t_R = 7.4$ min; **Figura 38**) fue aislado a partir de la fracción F₇.

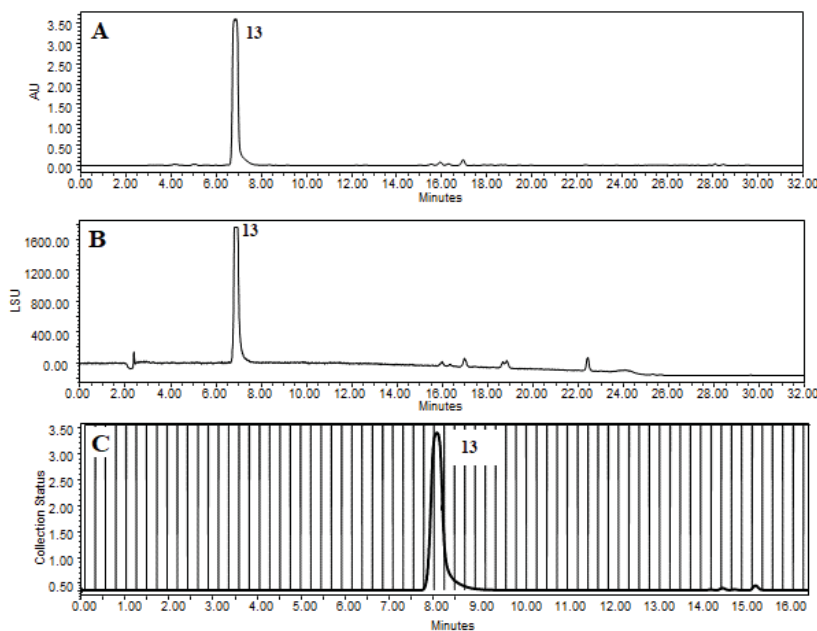


Figura 36. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 190$ nm); B) Detector ELSD] y preparativo (C) de la fracción F₄ de ACA-13. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (60:40-100:0) en 15 min, Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 254$ nm.

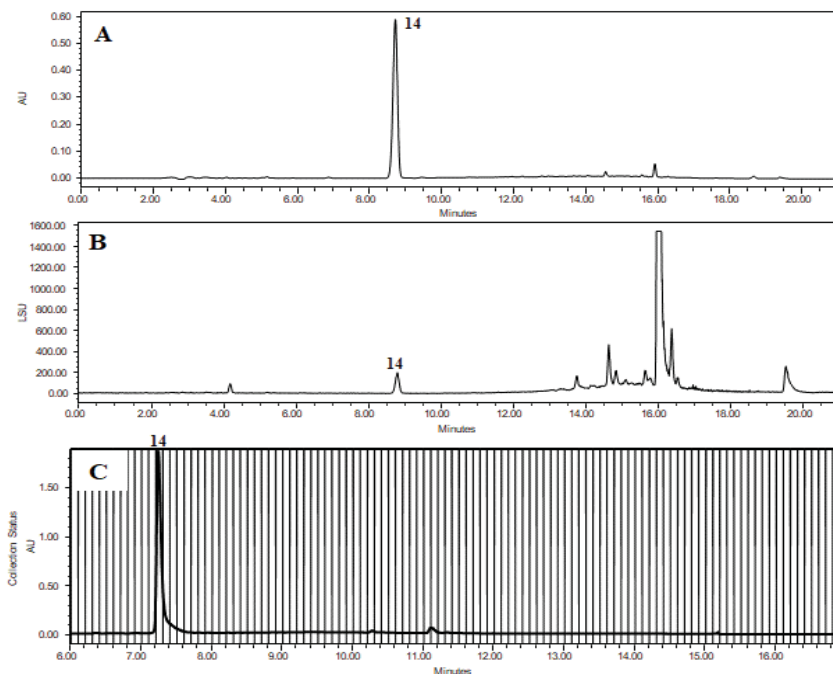


Figura 37. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 254 \text{ nm}$); B] Detector ELSD] y preparativo (C) de la fracción F₆ de ACA-13. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-100:0) en 10 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

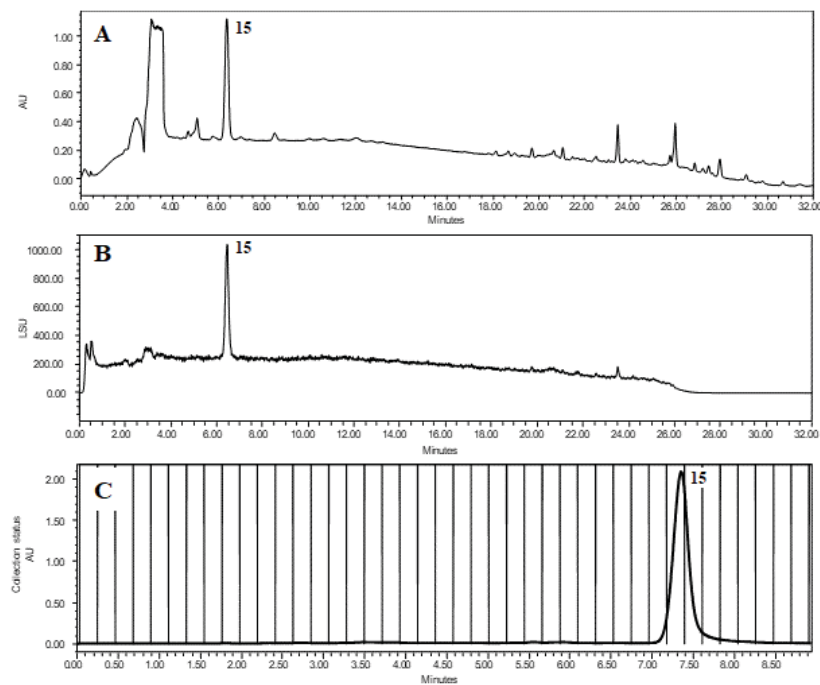


Figura 38. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 190 \text{ nm}$); B] Detector ELSD] y preparativo (C) de la fracción F₇ de ACA-13. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (40:60-100:0) en 15 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

4.8.1 Hidrólisis del compuesto 15.

La hidrólisis en medio ácido del compuesto **15** se realizó siguiendo la estrategia reportada por Saepua et al. [80]. De manera general, 2.0 mg de **15** (0.004 mol) y 0.5 mL de ácido clorhídrico 3 M se sometieron a un proceso de calentamiento a 90 °C por 13 h. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción fue diluida con 7 mL de H₂O y se extrajo con 7 mL de AcOEt. La fases acuosa y orgánica fueron colectadas y concentradas al vacío obteniéndose 2.3 y 1.7 mg, respectivamente.

4.9 Estudio químico de *S. obclavatum* ACA-17.

El extracto orgánico de *S. obclavatum* (clave ACA-17a, 1.3 g, **Tabla 2**) se fraccionó por medio de una cromatografía en CCA sobre gel de sílice, con un gradiente de polaridad creciente (*n*-hexano-CHCl₃-MeOH) colectándose eluatos de 1000 mL cada uno. Este fraccionamiento fue monitoreado por CCD y de esta manera se obtuvieron ocho conjuntos de fracciones primarias (F₁-F₈) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Resumen del fraccionamiento primario por CCA del extracto ACA-17a de ACA-17.

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-2	F ₁	10.7
3-5	F ₂	13.3
6-7	F ₃	19.5
8	F ₄	19.7
9-11	F ₅	37.3
12	F ₆	751.3
13-15	F ₇	228.2
16-17	F ₈	284.9
	Total recuperado:	1364.9
	Total inicial:	1451.9
	% Recuperado:	94.0

Todas las fracciones obtenidas (F₁-F₈) se analizaron mediante HPLC. Este análisis permitió seleccionar a la fracción F₆ (751.3 mg) para su purificación por HPLC. Así, utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en la **Figura 39**, se realizó la separación de 20.7 y 3.1 mg de los compuestos **16** (*t_R* = 8.0 min) y **17** (*t_R* = 11.0 min), respectivamente.

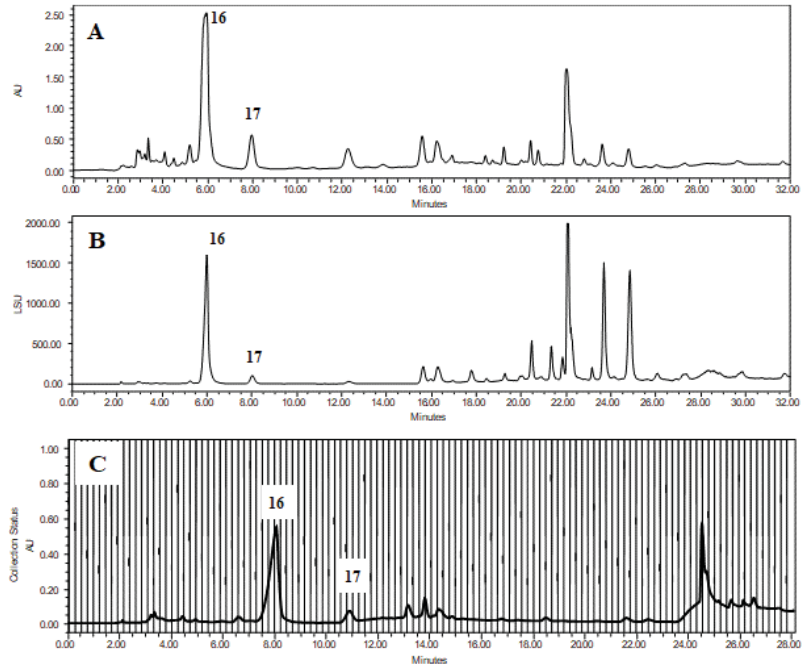


Figura 39. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** Detector UV/Vis ($\lambda = 207$ nm); **B)** Detector ELSD) y preparativo **(C)** de la fracción F₆ de ACA-17. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (75:25-90:10) en 2 min, después una elución isocrática (90:10) por 12 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 207$ nm.

4.10 Estudio químico de *Acremonium* sp. ACA-4.

El fraccionamiento del extracto orgánico ACA-4a (373.0 mg) por una CF sobre gel de sílice (Flujo = 30 mL/min; gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-MeOH; Vol. de fracción 15 mL) permitió la obtención de seis conjuntos de fracciones primarias (F₁-F₆). Este proceso cromatográfico se resume en la **Figura 40** y en la **Tabla 14**.

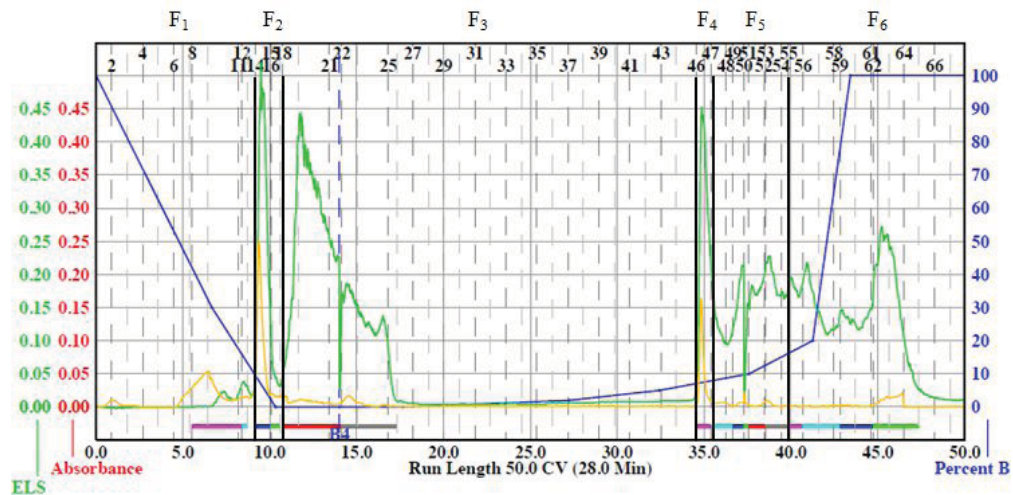


Figura 40. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto ACA-4a de ACA-4. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 14. Resumen del fraccionamiento primario por CF del extracto ACA-4a de ACA-4.

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-13	F ₁	6.1
14-17	F ₂	20.3
18-44	F ₃	108.8
45-46	F ₄	20.9
47-53	F ₅	40.5
54-66	F ₆	113.6
Cantidad recuperada:		313.6
Cantidad inicial:		373.0
% Recuperado:		83.2

Con base en los perfiles cromatográficos por HPLC de todas las fracciones obtenidas (**Tabla 14**), se seleccionó a la fracción F₄ (20.9 mg) para separar a los componentes mayoritarios. La resolución por HPLC de esta fracción (**Figura 41**) permitió el aislamiento del compuesto **18** (1.0 mg, $t_R = 10.4$ min).

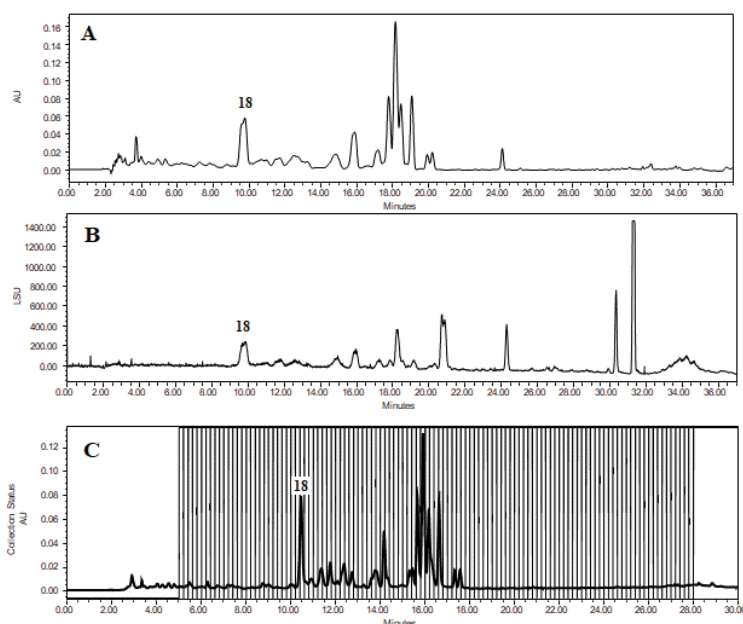


Figura 41. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 281$ nm); B) Detector ELSD] y preparativo (C) de la fracción F₄ de ACA-4. Condiciones de separación: Kinetex C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (50:50-100:0) en 20 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 281$ nm.

4.11 Estudio químico de las actinobacterias provenientes del área de protección de la flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CC).

4.11.1 Fraccionamiento primario de los extractos y obtención de los compuestos 19 y 20.

El extracto PR-35 MeOH (3.5 g) (**Tabla 3**) de *Streptomyces* sp. fue fraccionado por CF en fase reversa, en una columna C₁₈ Gold empacada con 150 g de gel de sílice C₁₈, con un gradiente binario de polaridad entre H₂O_{dd}-MeOH, con un flujo de 75 mL/min durante 69.3 min, colectando fracciones de 25 mL. El cromatograma del

fraccionamiento anterior se muestra en la **Figura 42** y el resumen del proceso cromatográfico se indica en la **Tabla 15**.

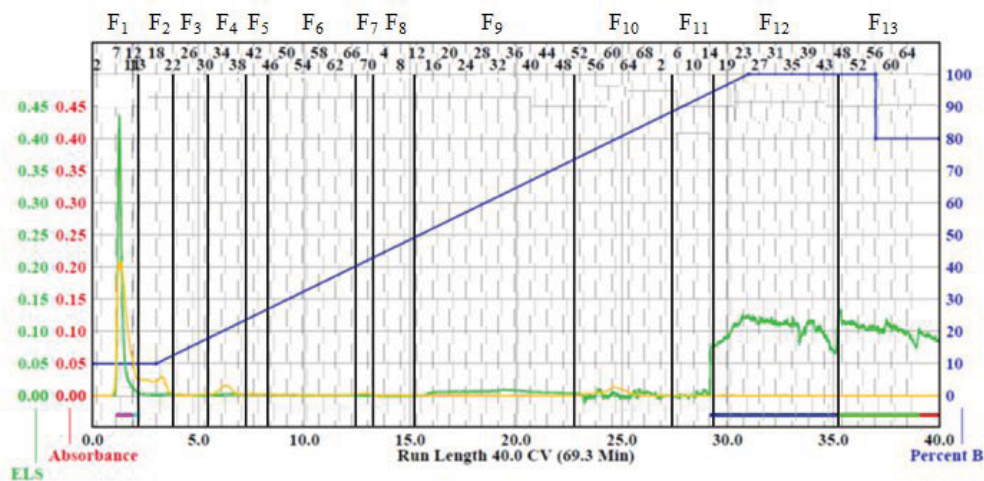


Figura 42. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto PR-35 MeOH de PR-35. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 15. Resumen del fraccionamiento primario del extracto PR-35 MeOH de PR-35.

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-12	F ₁	2624.4	81-120	F ₉	38.3
13-21	F ₂	90.8	121-144	F ₁₀	9.3
22-30	F ₃	68.5	145-152	F ₁₁	2.6
31-40	F ₄	99.1	153-185	F ₁₂	13.4
41-45	F ₅	50.9	186-204	F ₁₃	5.3
46-66	F ₆	157.1	Cantidad recuperada:		3208.9
67-70	F ₇	20.4	Cantidad inicial:		3567.3
71-80	F ₈	28.8	% Recuperado:		90.0

Enseguida, todas las fracciones (F₁-F₁₃) fueron analizadas por HPLC a nivel analítico y así se eligió al conjunto de F₄ (99.1 mg) para realizar la purificación de los productos mayoritarios presentes mediante HPLC preparativo. Este proceso cromatográfico permitió el aislamiento de los productos **19** (16.5 mg, $t_R = 9.4$ min) y **20** (1.9 mg, $t_R = 18.0$ min). La purificación antes mencionada se ilustra en la **Figura 43**.

4.11.2 Determinación de potencial citotóxico de los extractos bacterianos de *Streptomyces* sp. PR-35.

De todos los extractos enlistados en la **Tabla 3**, se tomó una muestra (~10 mg) y se envió a la UANL para su evaluación biológica contra las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (HTB-38), carcinoma de pulmón (HTB-177) y adenocarcinoma de mama (HTB-22), utilizando células de fibroblastos (CCL-116) como control de células normales. Para el ensayo de citotoxicidad, se colocaron de 5×10^4 a 6×10^4 células de las líneas antes mencionadas en placas de cultivo celular de 96 pozos. Cuando las células alcanzaron el 75% de confluencia, éstas fueron incubadas a las concentraciones de 25 y 200 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente, las placas se incubaron por 24 h y la citotoxicidad se evaluó utilizando el ensayo con el colorante MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Para obtener el valor de las concentraciones letales medias (CL_{50}), se calcularon los porcentajes de

viabilidad celular y de inhibición de crecimiento utilizando las ecuaciones que se indican más adelante y cada determinación se realizó de forma independiente en cinco ocasiones por triplicado.

Ecuación 1.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{(\text{DO de células tratadas}) - \text{DO del blanco}}{\text{DO del control} - \text{DO del blanco}} \times 100$$

Donde: DO = Densidad óptica

Ecuación 2.

$$\text{Inhibición del crecimiento celular (\%)} = 100 - \text{Viabilidad celular (\%)}$$

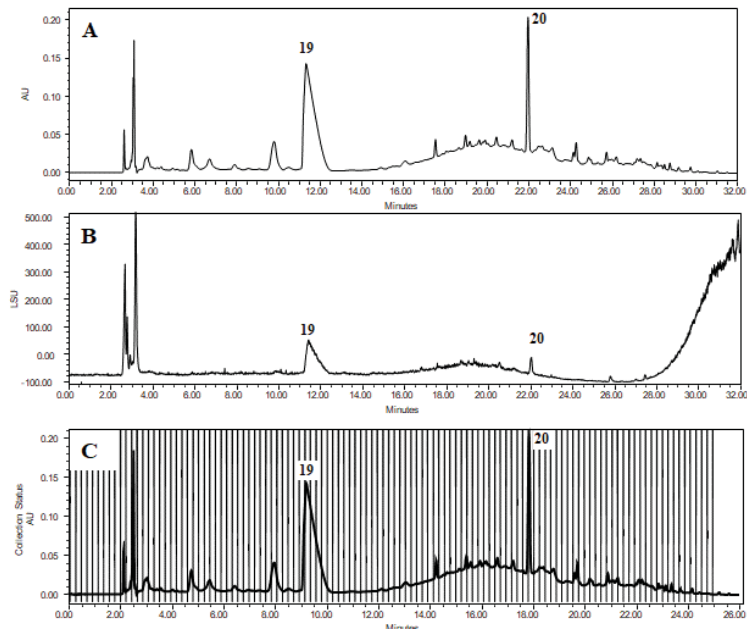


Figura 43. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** Detector UV/Vis ($\lambda = 254 \text{ nm}$); **B)** Detector ELSD] y preparativo **(C)** de la fracción F₄ de PR-35. Condiciones de separación: Kinetex C₁₈; MeOH-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (10:90 -100:0) en 15 min; Flujo = 17.0 mL/min; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

El fraccionamiento primario por HPLC del extracto orgánico PR-35 AcOEt/P (39.3 mg: **Figura 44**; **Tabla 16**) permitió la obtención de cinco de fracciones primarias (F₁-F₅).

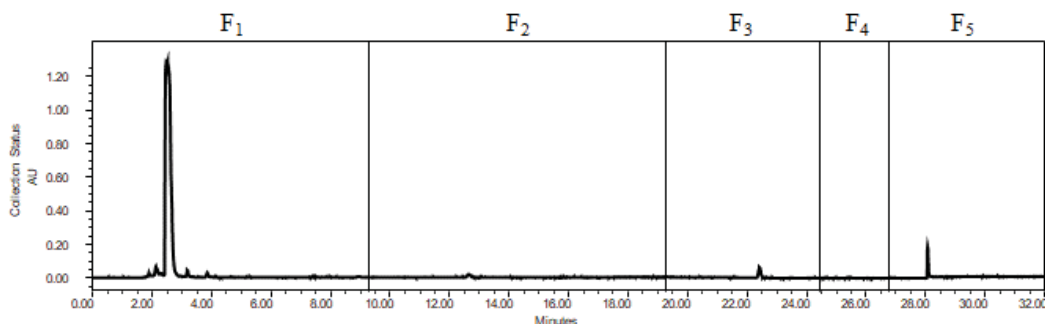


Figura 44. Fraccionamiento primario por HPLC del extracto PR-35 AcOEt/P de PR-35. Condiciones de separación: Kinetex C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (70:30-100:0) en 5 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 190 \text{ nm}$.

Tabla 16. Resumen del fraccionamiento primario por HPLC del extracto PR-35 AcOEt/P de PR-35.

Fracción (min)	Clave	Peso (mg)
0 - 9.9	F ₁	5.9
10.0 - 19.6	F ₂	12.5
19.7 - 25.0	F ₃	9.7
25.1 - 27.0	F ₄	4.9
27.1 - 32.0	F ₅	2.2
Cantidad recuperada:		35.2
Cantidad inicial:		39.3
% Recuperado:		94.3

4.11.3 Fraccionamiento primario de los extractos obtenidos con medio almidón/peptona. Aislamiento de los compuestos 21-26.

Todos los extractos enlistados en la **Tabla 4** fueron analizados por HPLC a nivel analítico, con la finalidad de establecer sus perfiles cromatográficos y su complejidad. El resultado de este análisis permitió establecer su similitud cromatográfica y con base en estos resultados se realizó la reunión de los extractos de AcOEt (AcOEt AP, 556.5 mg). Enseguida, se realizó el fraccionamiento primario por CF de esta reunión (**Figura 45, Tabla 17**).

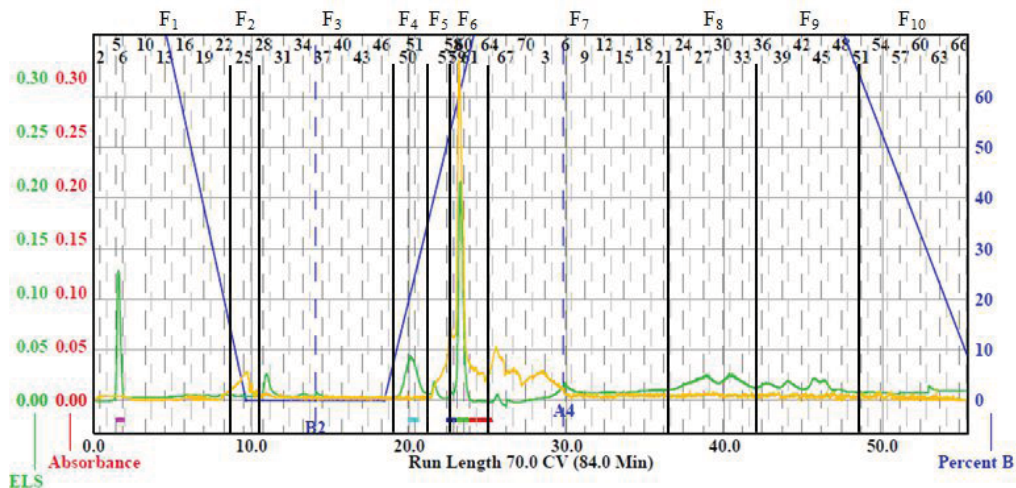


Figura 45. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto AcOEt AP de PR-35. En verde la señal del detector ELSD y en amarillo la señal del detector PDA.

Tabla 17. Fraccionamiento primario por CF del extracto AcOEt AP de PR-35.

Fraciones	Clave	Peso (mg)
1-20	F ₁	7.7
21-26	F ₂	2.7
27-46	F ₃	15.5
47-53	F ₄	20.0
54-58	F ₅	30.8
59-63	F ₆	88.4
64-91	F ₇	88.8
92-105	F ₈	120.0

106-119	F ₉	108.3
120-136	F ₁₀	33.8
	Total recuperado:	516.0
	Total inicial:	556.5
	% Recuperado:	92.8

El fraccionamiento primario de AcOEt AP se realizó en una columna Silica Gold empacada con 40 g de gel de sílice, con un flujo de 40 mL/min, un gradiente de polaridad entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, durante 84.0 min y colectando fracciones de 20 mL.

Los conjuntos de fracciones F₁-F₁₀ obtenidos, fueron analizados por HPLC analítico eligiéndose a las fracciones F₆ (88.4 mg), F₇ (88.8 mg) y F₈ (120.0 mg) para su posterior separación por HPLC. En primer lugar, la purificación de F₆ se llevó a cabo utilizando las condiciones de análisis indicadas en la **Figura 46** y así, se realizó el aislamiento de 39.6 mg del producto **21** ($t_R = 9.5$ min) y de 4.6 mg del **22** ($t_R = 10.4$ min).

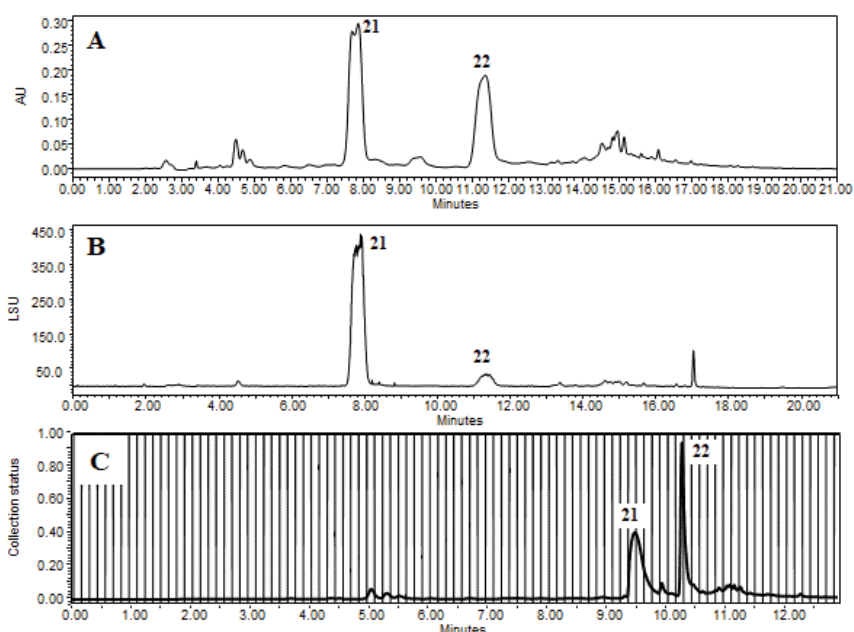


Figura 46. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico [A] Detector UV/Vis ($\lambda = 254$ nm); B) Detector ELSD] y preparativo (C) de la fracción F₆ de PR-35. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (25:75-100:0) en 5 min; Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 254$ nm.

De la misma manera, el análisis por HPLC de la fracción F₇ (**Figura 47**) permitió el aislamiento de **23** (6.7 mg, $t_R = 21.0$ min).

Finalmente, la resolución por HPLC de la fracción F₈ (**Figura 48**) permitió evidenciar la presencia de dos componentes mayoritarios en los t_R de 21.8 y 23.7 min. El pico en el t_R de 21.8 min fue caracterizado como el compuesto **24** (21.8 mg). El segundo pico ($t_R = 23.7$ min) era una mezcla de dos compuestos que fue purificada mediante la re-inyección de la muestra utilizando las condiciones de análisis indicadas en la **Figura 49**. Este último procedimiento cromatográfico permitió el aislamiento de 8.0 y 1.5 mg de los productos **25** ($t_R = 5.8$ min) y **26** ($t_R = 29.0$ min), respectivamente.

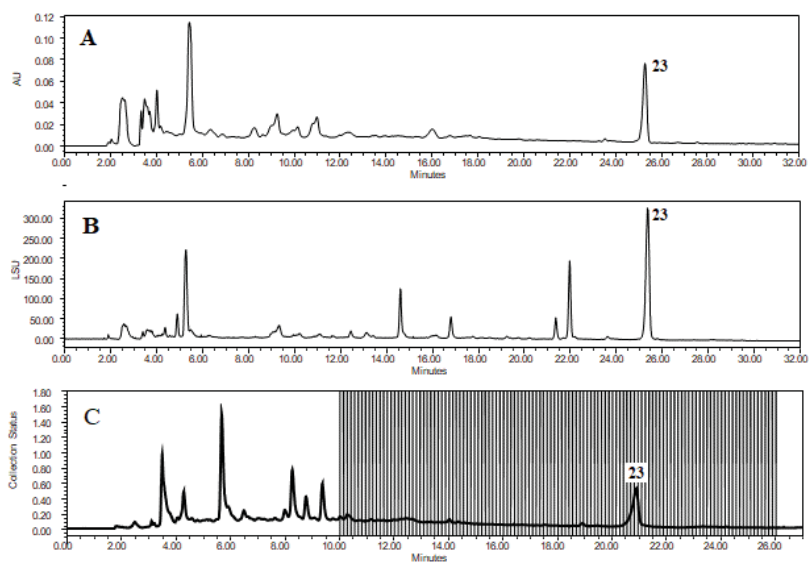


Figura 47. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** Detector UV/Vis ($\lambda = 296$ nm); **B)** Detector ELSD] y preparativo **(C)** de la fracción F₇ de PR-35. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (30:70-80:20) en 20 min, Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 296$ nm.

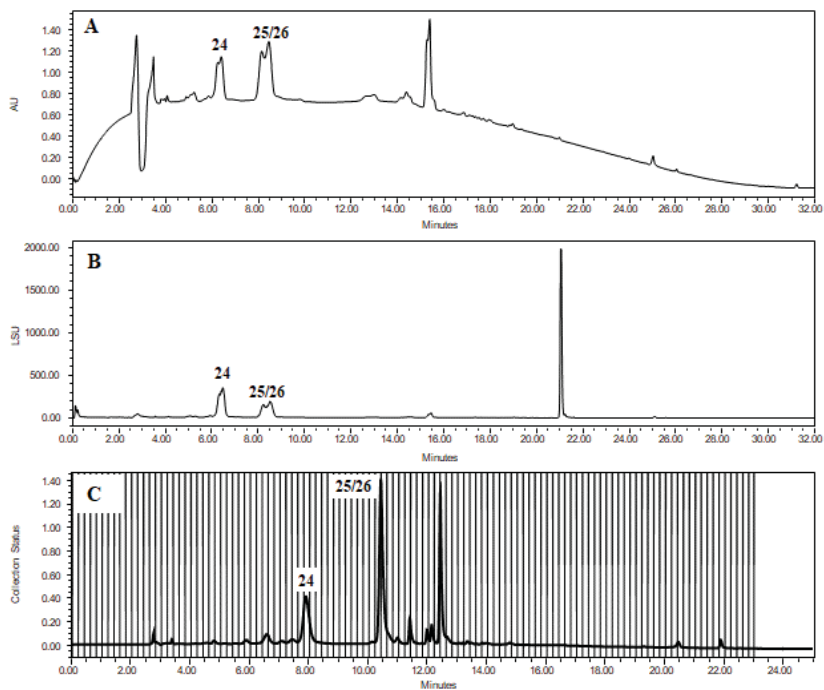


Figura 48. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** Detector UV/Vis ($\lambda = 217$ nm); **B)** Detector ELSD] y preparativo **(C)** de la fracción F₈ de PR-35. Condiciones de separación: Gemini C₁₈; ACN-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (15:85-100:0) en 15 min, Flujo = 21.24 mL/min; $\lambda = 217$ nm.

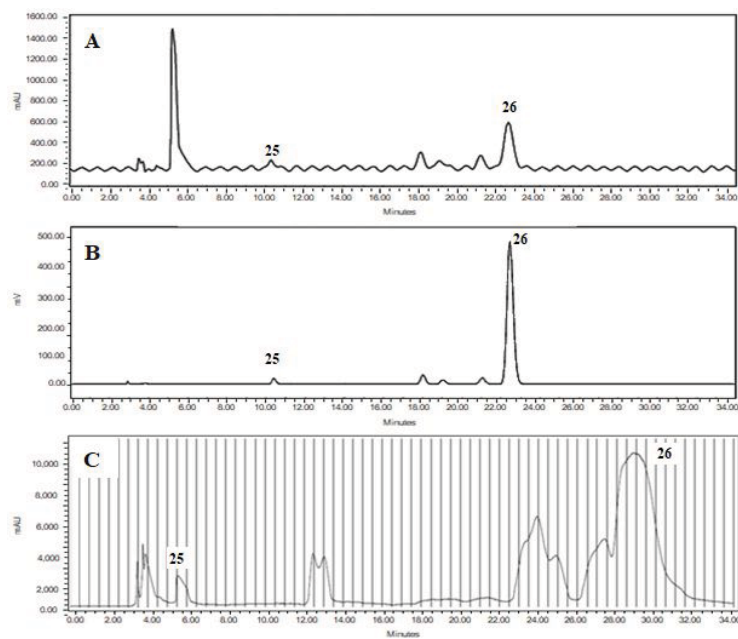


Figura 49. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico **[A]** Detector UV/Vis ($\lambda = 335$ nm); **B)** Detector ELSD] y preparativo **(C)** de la mezcla de compuestos **25/26** de PR-35. Condiciones de separación: Atlantis T3 C₁₈; elución isocrática [MeOH-H₂O (0.1% de ácido fórmico) (25:75)]; Flujo = 15 mL/min; $\lambda = 335$ nm.

5. Resultados y discusión.

5.1 Estudio químico de las cepas fúngicas de la Bahía de Caleta.

5.1.1 Estudio químico de *Aspergillus* sp. ACA-9.

A partir de esta especie fúngica se aislaron y caracterizaron nueve metabolitos secundarios de los cuales, seis fueron novedosos. Los compuestos **1-5** y **7-8** pertenecen a la categoría de las dioxomorfolinas [81,82], mientras que **6** es un ciclopentapéptido y **9** una butirolactona (**Figura 50**).

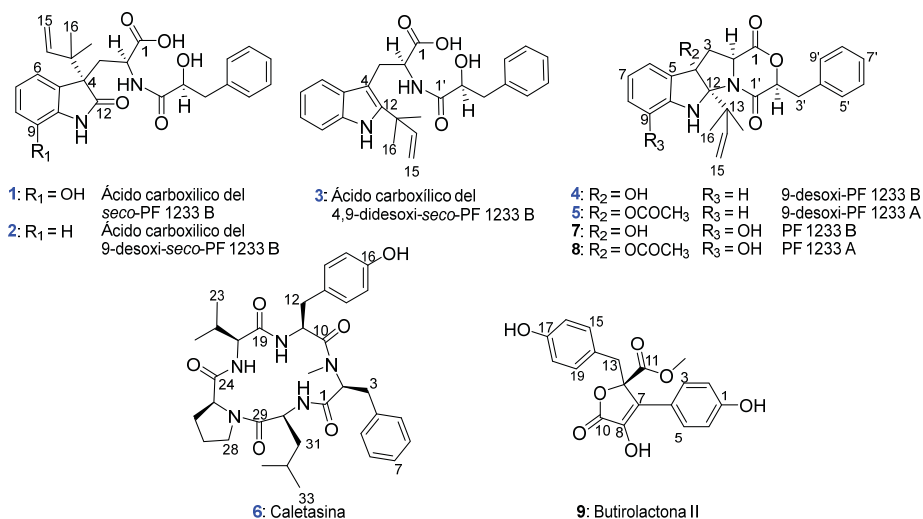


Figura 50. Metabolitos obtenidos a partir de *Aspergillus* sp. ACA-9.

El compuesto **1** (**Figura 50**) se obtuvo como un aceite de color amarillo pálido. La fórmula molecular se determinó como C₂₅H₂₈N₂O₆ (IDH = 13), con base en el análisis de los espectros de RMN ¹H y ¹³C (**Tabla 18**) y HRESIMS ([M+H]⁺ 453.2018 y [M-H]⁻ 451.1877) (**Tabla A 1**).

Tabla 18. Datos de espectroscópicos de los compuestos **1-3**.

Posición	1 ^a			2 ^b			3 ^a		
	δ _C	Tipo	δ _H mult. (J en Hz)	δ _C	Tipo	δ _H mult. (J en Hz)	δ _C	Tipo	δ _H mult. (J en Hz)
1	173.6,	C		175.5,	C		177.5,	C	
1-OH									
2	51.8,	CH	3.99, dd (10.6, 2.3)	51.3,	CH	3.92, dd (10.3, 2.3)	55.7,	CH	4.75, dd (10.4, 5.3)
3	34.0,	CH ₂	2.59, dd (14.2, 2.3) 2.39, dd (14.2, 10.6)	33.3,	CH ₂	2.63, dd (14.2, 2.3) 2.38, dd (14.2, 10.3)	29.0,	CH ₂	3.39, dd (14.6, 5.3) 3.12, dd (14.6, 10.4)
4	58.6,	C		56.8,	C		106.8,	C	
5	131.1,	C		128.9,	C		131.1,	C	
6	116.2,	CH	6.72, d (7.8)	126.4,	CH	7.32, d (7.4)	119.7,	CH	7.60, dd (7.6, 1.4)
7	123.2,	CH	6.80, t (7.8)	121.2,	CH	7.02, t (7.4)	119.4,	CH	7.03, m
8	118.8,	CH	6.78, d (7.8)	127.9,	CH	7.19, t (7.4)	121.7,	CH	7.03, m
9	142.9,	C		109.3,	CH	6.83, d (7.4)	111.6,	CH	7.29, dd (7.6, 1.4)
9-OH									
10	131.4,	C		142.7,	C		136.4,	C	
11-NH									
12	183.1,	C		182.0,	C		141.9,	C	
13	43.2,	C		41.9,	C		40.1,	C	
14	144.6,	CH	6.08, dd (17.4, 10.5)	143.2,	CH	6.06, dd (17.2, 10.9)	148.0,	CH	6.17, dd (17.4, 10.5)

15	114.3,	CH ₂	5.10, dd (10.5, 1.2)	112.9,	CH ₂	5.07, dd (10.9, 1.2)	111.9,	CH ₂	5.16, dd (17.4, 1.2)
			5.03, dd (17.4, 1.2)			4.97, dd (17.2, 1.2)			5.12, dd (10.5, 1.2)
16	22.3,	CH ₃	1.12, s	21.2,	CH ₃	1.10, s	28.6,	CH ₃	1.54, s
17	22.4,	CH ₃	1.04, s	20.9,	CH ₃	1.02, s	28.3,	CH ₃	1.54, s
1'	176.4,	C		174.9,	C		175.9,	C	
2'	74.5,	CH	3.98, dd (10.5, 2.3)	73.5,	CH	3.93, dd (10.3, 2.3)	74.0,	CH	4.01, dd (8.5, 3.4)
2'-OH									
3'	41.3,	CH ₂	2.90, dd (14.2, 2.3)	39.9,	CH ₂	2.87, dd (14.3, 2.3)	40.9,	CH ₂	2.51, dd (14.0, 3.4)
			2.68, dd (14.2, 10.5)			2.63, dd (14.3, 10.3)			2.06, dd (14.0, 8.5)
4'	140.4,	C		139.1,	C		139.2,	C	
5'/9'	130.5,	CH	7.29, d (7.3)	129.2,	CH	7.27, d (7.4)	130.4,	CH	6.93, m
6'/8'	129.1,	CH	7.24, dd (7.3)	127.8,	CH	7.23, t (7.4)	128.9,	CH	7.03, m
7'	127.2,	CH	7.16, dd (7.3)	125.8,	CH	7.16, t (7.4)	127.1,	CH	7.03, m

^aCD₃OD, 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C. ^bCD₃OD, 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C.

En el espectro de RMN ¹H (**Figura 51**) se observan dos sistemas aromáticos: uno correspondiente a un anillo monosustituido (δ_H 7.17-7.24, 5H); y el otro a un sistema trisustituido con tres protones con acoplamiento tipo *orto* ($J = 7.4$ Hz). Además, a campos más altos se observaron tres sistemas de espín, uno de un metino unido a nitrógeno (δ_H 3.99) y a un metileno (δ_H 2.59 y 2.39), otro por un metino unido a oxígeno (δ_H 3.98) y a otro metileno (δ_H 2.90 y 2.68), y el tercero por el metino (δ_H 6.08) y el metileno (δ_{Ha} y δ_{Hb} 5.10 y 5.03) de un residuo de isopentenilo.

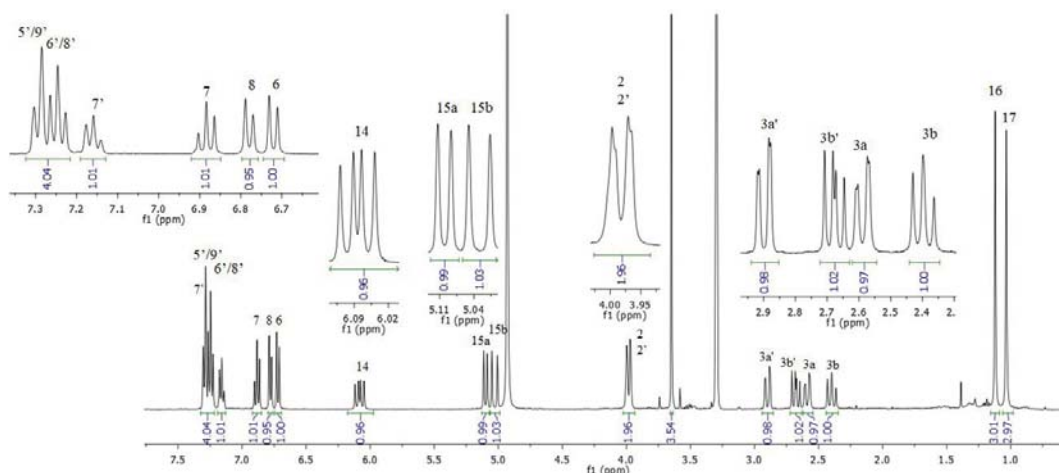


Figura 51. Espectro de RMN ¹H del compuesto **1** (CD₃OD, 400 MHz).

En los espectros de RMN ¹³C (**Figura 52**) y HSQC (**Figura 53**) se evidenció la presencia de 18 carbonos protonados, de los cuales, once corresponden a metinos [δ_C/δ_H 144.6/6.08, 130.5/7.29 ($\times 2$), 129.1/7.24 ($\times 2$), 127.2/7.16, 123.2/6.80, 118.8/6.78, 116.2/6.72, 74.5/3.98 y 51.8/3.99], tres a metilenos (δ_C/δ_{Ha} y δ_{Hb} 114.3/5.10 y 5.03, 41.3/2.90 y 2.68 y 34.0/2.59 y 2.39) y dos a metilos (δ_C/δ_H 22.4/1.04 y 22.3/1.12). Asimismo, se observaron también nueve señales de carbonos no protonados: dos de tipo carbonilo de amida (δ_C 183.1 y 176.4), una de ácido carboxílico (δ_C 176.3), cuatro de aromático y uno de ellos unido a un grupo hidroxilo (δ_C 142.9, 140.4, 131.4 y 131.1) y dos de tipo alifático (δ_C 58.6 y 43.2). La vecindad de los protones que componen los sistemas anteriores se corroboró con el análisis de sus constantes de acoplamiento y con las señales observadas en el espectro COSY (**Figura 54**). Finalmente, se observaron también dos singuletes en δ_H de 1.12 y 1.04, asignables a los dos metilos existentes en la estructura.

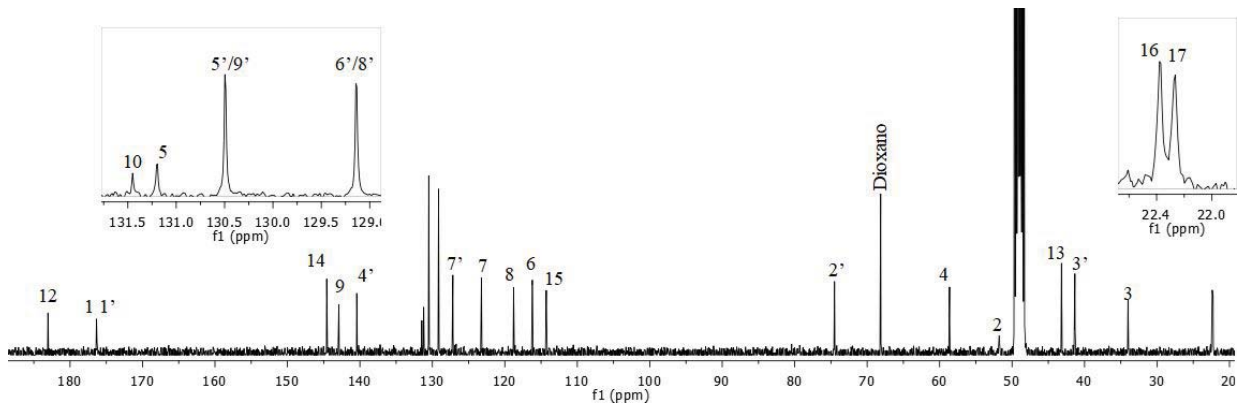


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 1 (CD_3OD , 100 MHz).

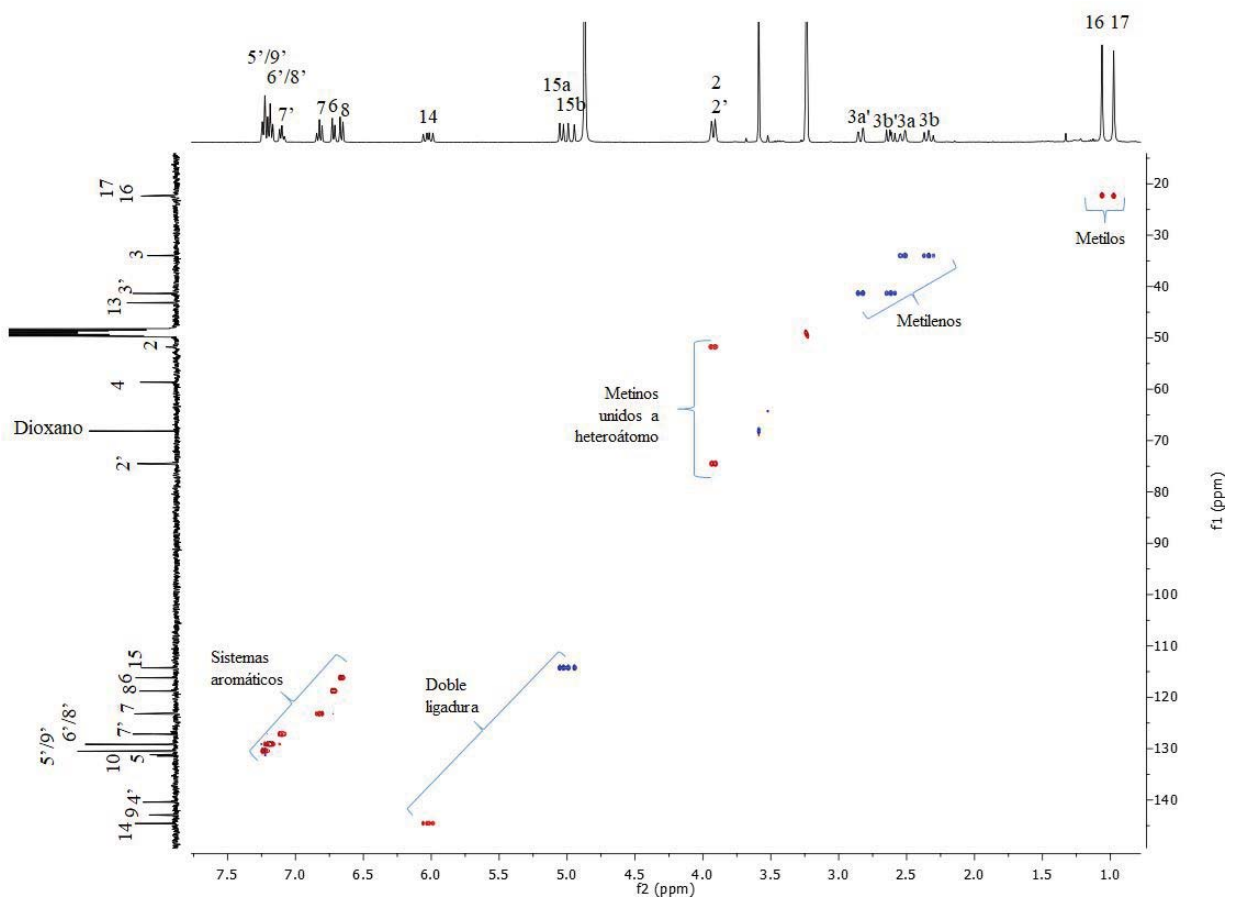


Figura 53. Espectro de HSQC del compuesto 1.

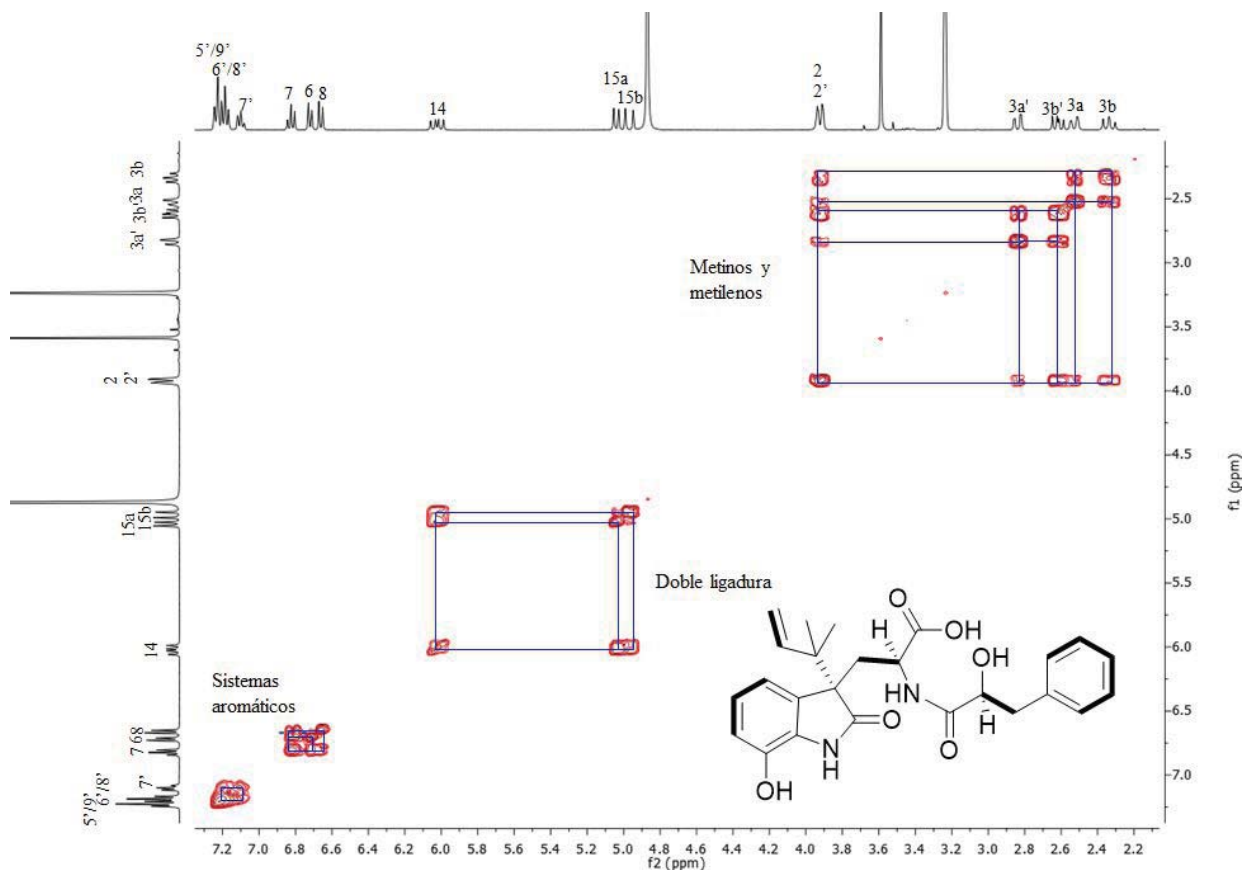


Figura 54. Espectro COSY del compuesto **1**, mostrando los distintos sistemas de espín.

En el espectro HMBC (**Figura 55**) se observaron las siguientes correlaciones que permitieron integrar la parte indólica: H-6 (δ_H 6.72) con C-4 (δ_C 58.6), C-5 (δ_C 131.1) y C-10 (δ_C 58.6); H-7 (δ_H 6.80) con C-9 (δ_C 142.9); y H-3 (δ_H 2.59 y 2.39) con C-4 (δ_C 58.6), C-12 (δ_C 183.1) y C-5 (δ_C 131.1). De la misma manera, las correlaciones H-2' (δ_H 6.72)/C-1' (δ_C 176.4) con C-4' (δ_C 140.4) y la de los protones diastereotópicos H-3' (δ_H 2.90 y 2.68) con C-5'/C-9' (δ_C 130.5) permitieron integrar la porción del ácido fenil láctico.

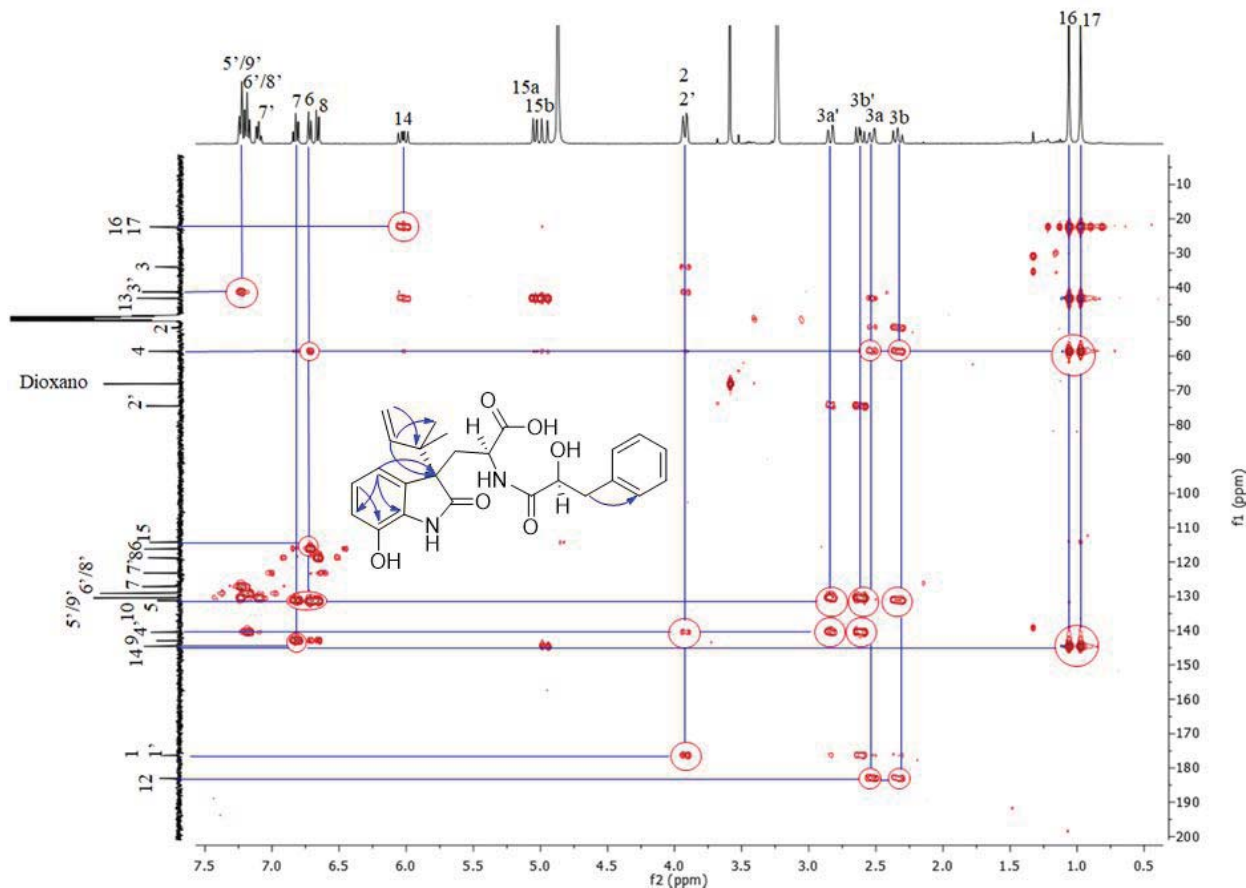


Figura 55. Espectro HMBC del compuesto **1**, mostrando correlaciones clave.

Las correlaciones entre los protones H-16 (δ_H 1.12) y H-17 (δ_H 1.04) con C-14 (δ_C 144.6) y con C-4 (δ_C 58.6) permitieron ensamblar los fragmentos isopentenilo e indólico y, mediante la correlación entre H-2 (δ_H 3.99) y C-1 (δ_C 176.3) se corroboró la posición del ácido carboxílico en C-1 (δ_C 173.6). Así, con base en las asignaciones antes mencionadas se estableció la estructura del compuesto **1**, el cual corresponde a un análogo novedoso desmetilado de la dioxomorfolina conocida como éster metílico de *seco*-PF 1233 B [83].

El compuesto **2** (**Figura 50**) se obtuvo como un aceite de color amarillo. La fórmula molecular se determinó como $C_{25}H_{28}N_2O_5$ (IDH = 13) con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Tabla 18**) y HRESIMS ($[M+H]^+$ 437.2062 y $[M-H]^-$ 435.1920) (**Tabla A 1**). Este compuesto presentó 16 unidades de masa menos que el compuesto **1**, consistente con la pérdida de un átomo de oxígeno; asimismo, en los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Figura 56**) se observa que la señal en C-9 (δ_C 142.9) en **1** es reemplazada por una señal en δ_C 109.3 ppm en **2**, la cual mostró una correlación en el espectro HSQC con un metino aromático en δ_H 6.83 ppm, consistente con la pérdida de un grupo hidroxilo fenólico en posición C-9. El análisis detallado de los espectros HSQC, COSY y HMBC (**Figuras A 2-A 4**) permitió establecer la estructura de **2** como el ácido carboxílico del 9-desoxi-*seco*- PF 1233 B [83].

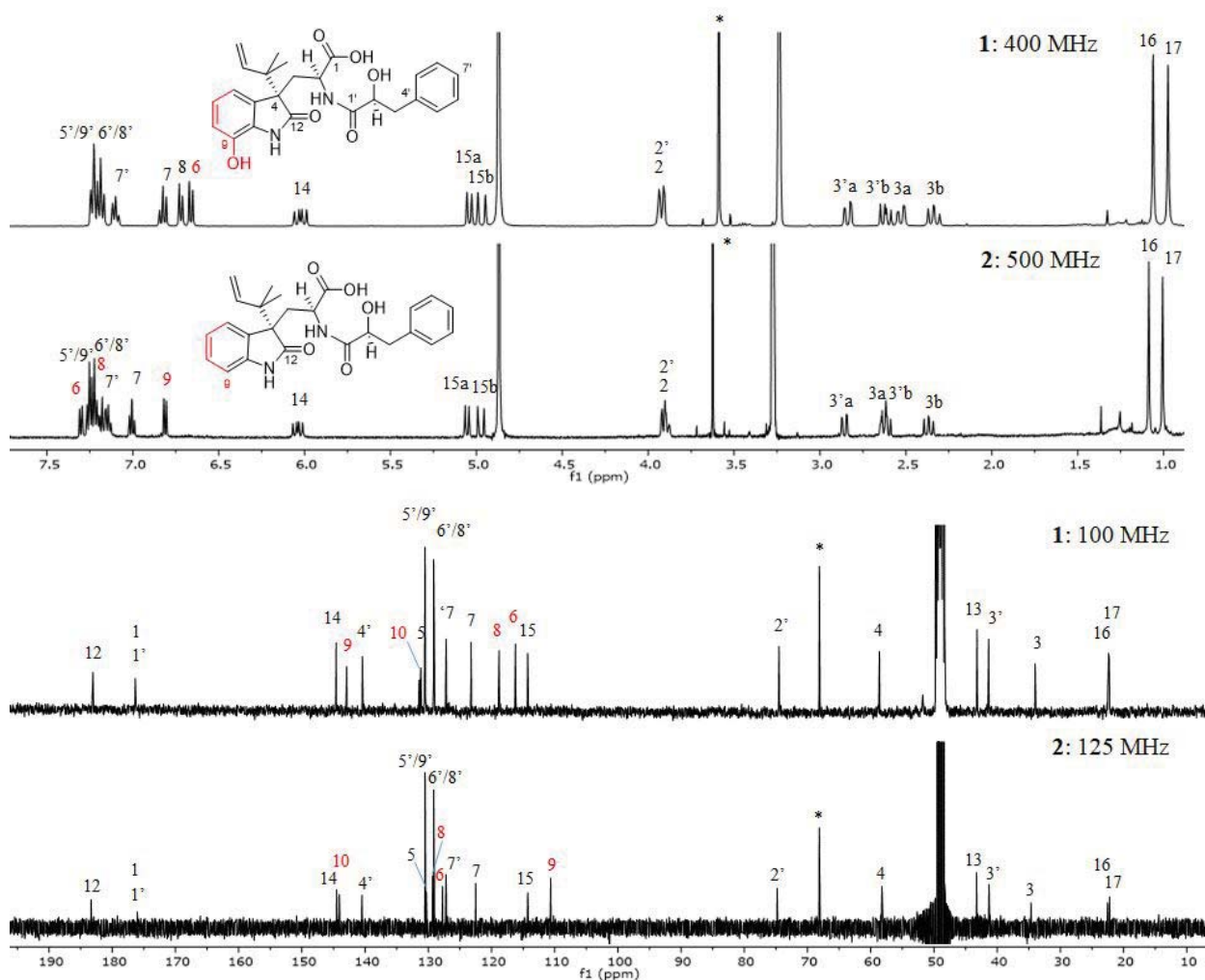


Figura 56. Comparación de espectros de RMN ^1H y ^{13}C para los compuestos **1** y **2** (CD_3OD). *Dioxano.

El compuesto **3** (**Figura 50**) se obtuvo como un aceite color amarillo pálido. La fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{IDH} = 13$) con base en el análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Tabla 18**) y HRESIMS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 421.2110 y $[\text{M}-\text{H}]^-$ 419.1970) (**Tabla A 1**). El compuesto **3** presentó 16 unidades de masa menor que **2**, consistente con la pérdida de un átomo de oxígeno; además se observa una doble ligadura entre C-12 (δ_{C} 141.9) y C-4 (δ_{C} 106.8), que evidencia la pérdida del grupo carbonilo en posición C-12 (δ_{C} 182.0) respecto al **2**. Las correlaciones HMBC entre H-2 (δ_{H} 4.75) y C-4 (δ_{C} 106.8), H-6 (δ_{H} 7.60) y C-4 (δ_{C} 106.8) y H-14 (δ_{H} 6.17) y C-12 (δ_{C} 141.9) confirmaron, no solamente la presencia de la doble ligadura en la posición antes señalada, sino también la migración del residuo de isopentenilo desde la posición C-4 en el compuesto **2** hacia la posición C-12 en el **3**. Es importante señalar que este cambio de posición del grupo isopentenilo también afectó el desplazamiento químico de los átomos vecinos, como el protón H-2 (δ_{H} 4.75), los protones diastereotópicos H-3a (δ_{H} 3.39) y H-3b (δ_{H} 3.12) y de los metilos del isopentenilo H-16/H-17 (δ_{H} 1.54) (**Figura 57**).

Con base en lo anterior, el compuesto **3** se caracterizó como el ácido carboxílico del 4,9-didesoxi-*seco*-PF 1233 B [83]. En las **Figuras A 4-A 5** se muestran los espectros bidimensionales de **3**, que corroboran la estructura propuesta.

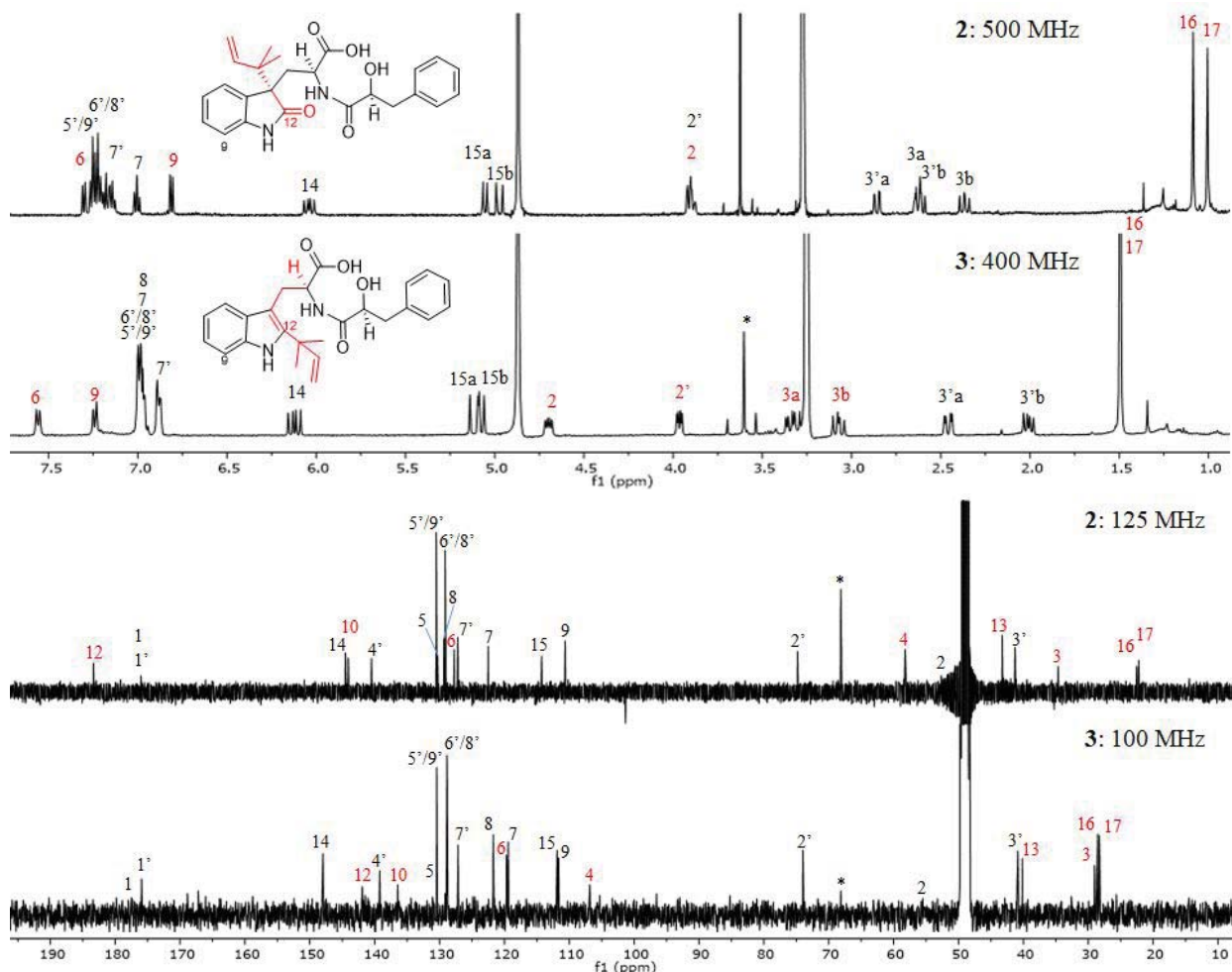


Figura 57. Comparación de espectros de ^1H y ^{13}C para los compuestos **2** y **3** (CD_3OD), mostrando diferencias clave entre ambas estructuras en rojo. *Dioxano.

El compuesto **4** (**Figura 50**) fue obtenido como un aceite color amarillo. La fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ (IDH = 14), con base en el análisis de los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) (**Tabla 19**) y HRESIMS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.1945 y $[\text{M}-\text{H}]^-$ 417.1808) (**Tabla A 1**). El análisis simultáneo de los espectros de RMN ^1H (**Figura 58 A**) y COSY (**Figura 59**) permitió identificar señales consistentes con dos sistemas aromáticos, uno de ellos monosustituido (δ_{H} 7.21-7.22, 5H) y el otro disustituido (δ_{H} 6.68-7.29, 4H), además de tres sistemas de espín: uno correspondiente a un metino (δ_{H} 6.36) unido a un metileno (δ_{Ha} y δ_{Hb} 5.19 y 5.12) de una doble ligadura vinílica, y dos más de metinos unidos a heteroátomos (δ_{H} 4.77, 3.33 y 2.88; 4.34, 3.28 y 2.83).

El análisis detallado del espectro HMBC (**Figura 60**) permitió integrar los distintos fragmentos de la estructura de forma análoga a los compuestos **1-3** y **7**: las correlaciones de H-6 (δ_{H} 7.29) con C-8 (δ_{C} 131.0) y C-10 (δ_{C} 147.8); H-8 (δ_{H} 7.16) con C-10 (δ_{C} 147.8); H-3a (δ_{H} 3.28) con C-4 (δ_{C} 88.0), C-12 (δ_{C} 94.7) y C-1 (δ_{C} 167.4); H-3b (δ_{H} 2.83) con C-1 (δ_{C} 167.4); C-4 (δ_{C} 88.0); y H-2' (δ_{H} 4.77) con C-1' (δ_{C} 166.1) permitieron construir la porción tetracíclica del metabolito. Por otro lado, las correlaciones entre H-16 (δ_{H} 1.37) y C-12 (δ_{C} 94.7) y H-17 (δ_{H} 1.35) y C-12 (δ_{C} 94.7) permitieron unir el fragmento de isopentenilo al esqueleto, y entre H-3'a (δ_{H} 3.33) y C-1' (δ_{C} 166.1), H-3'b (δ_{H} 2.88) y C-1' (δ_{C} 166.1), H-5' (δ_{H} 7.22) y C-3' (δ_{C} 34.8) y H-9' (δ_{H} 7.22) y C-3' (δ_{C} 34.8) se logró unir el anillo aromático monosustituido con el fragmento de dioxomorfolina.

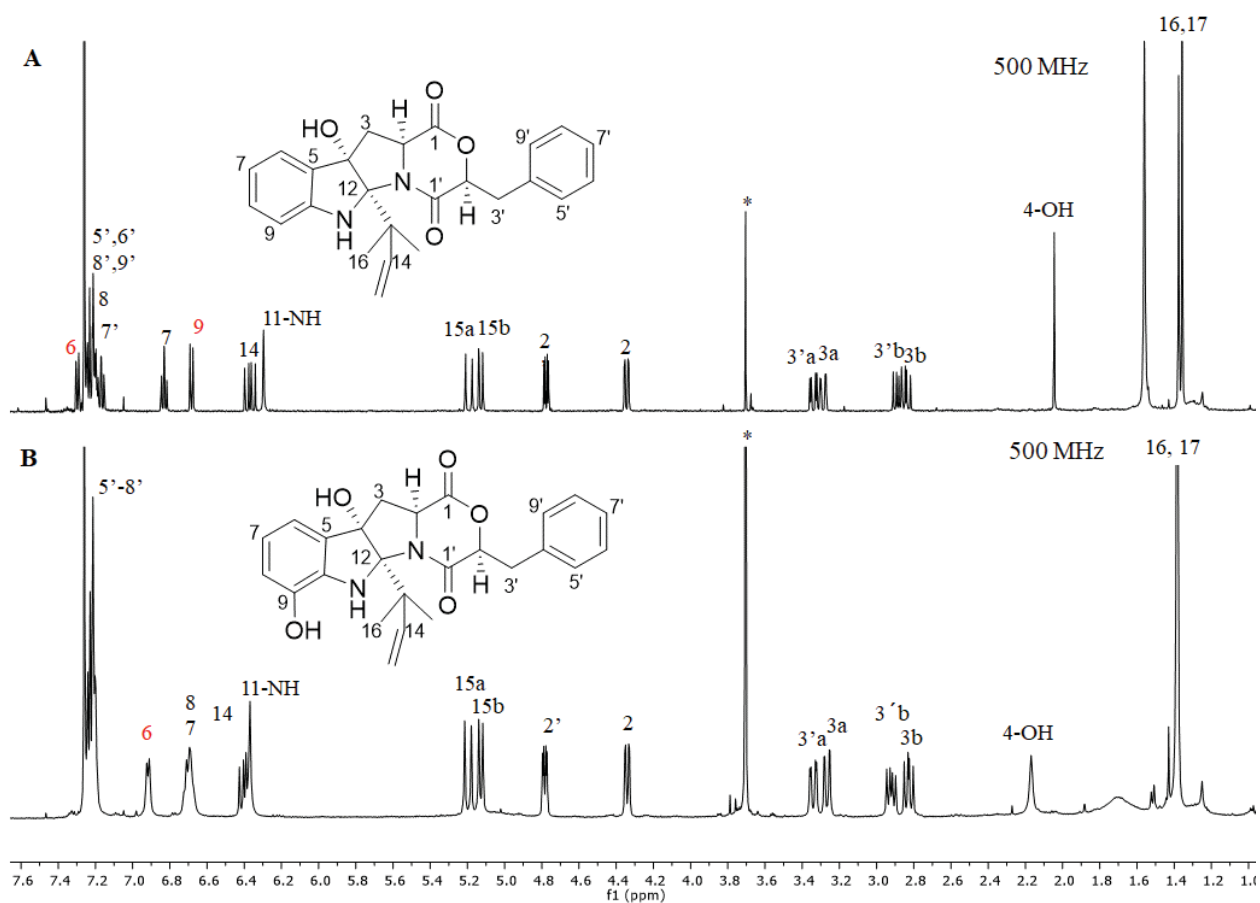


Figura 58. Comparación de espectros de RMN ^1H mostrando diferencias clave: **A)** compuesto **4**; **B)** compuesto **7** (CDCl_3 , 500 MHz). *Dioxano.

Tabla 19. Datos espectroscópicos de los compuestos **4**, **5**, **7** y **8**.

Posición	7 ^a			4 ^b			8 ^c			5 ^d		
	δ_c	Tipo	δ_{H} mult (J in Hz)	δ_c	Tipo	δ_{H} mult (J in Hz)	δ_c	Tipo	δ_{H} mult (J in Hz)	δ_c	Tipo	δ_{H} mult (J in Hz)
1	167.5	C		167.4	C		167.3	C		167.0	C	
2	57.3	CH	4.33, dd (10.3, 2.2)	57.2	CH	4.34, dd (10.3, 1.7)	58.6	CH	4.37, dd (10.5, 2.0)	58.4	CH	4.35, dd (10.4, 1.7)
3	36.0	CH ₂	3.26, dd (13.7, 2.2) 2.88, dd (13.7, 10.3)	36.9	CH ₂	3.28, dd (13.7, 1.7) 2.83, dd (13.7, 10.3)	35.1	CH ₂	4.19, dd (14.2, 1.4) 2.79, dd (14.2, 10.5)	34.8	CH ₂	4.19, dd (14.0, 1.7) 2.78, dd (14.0, 10.4)
4	88.7	C		88.0	C		91.9	C		91.1	C	
4-OH			2.17, bs			2.0, s						
5	131.3	C		128.9	C		127.7	C		125.6	C	
6	117.0	CH	6.91, d (6.9)	124.8	CH	7.29, d (7.5)	120.8	CH	6.65, m	128.6	CH	7.61, d (7.4)
7	117.5	CH	6.71, m	120.7	CH	6.82, td (7.5, 1.2)	118.0	CH	6.66, m	120.3	CH	6.77, t (7.4)
8	121.2	CH	6.69, m	131.0	CH	7.16, td (7.5, 1.2)	121.3	CH	7.25, m	131.1	CH	7.14, t (7.8)
9	141.6	C		111.1	CH	6.68, d (7.5)	141.3	CH		110.8	C	6.66, d (7.8)
10	136.2	C		147.8	C		137.3	C		148.7	C	
11-NH			6.36, bs			6.29, bs			6.39, bs			6.28, bs
12	95.0	C		94.7	C		98.7	C		98.3	C	
13	45.1	C		45.0	C		45.5	C		45.2	C	
14	144.0	CH	6.39, dd (17.9, 10.8)	143.9	CH	6.36, dd (17.8, 10.9)	144.2	CH	6.33, dd (17.6, 10.8)	144.0	CH	6.30, dd (17.6, 10.7)
15	113.9	CH ₂	5.19, dd (17.8, 1.2) 5.12, dd (10.8, 1.2)	113.9	CH ₂	5.19, dd (17.8, 1.2) 5.12, dd (10.9, 1.2)	113.0	CH ₂	5.16, dd (17.6, 1.2) 5.12, dd (10.8, 1.2)	112.8	CH ₂	5.14, dd (17.6, 1.2) 5.10, dd (10.7, 1.2)
16	23.3	CH ₃	1.37, s	23.3	CH ₃	1.37, s	25.6	CH ₃	1.46, s	24.9	CH ₃	1.42, s
17	26.0	CH ₃	1.38, s	26.1	CH ₃	1.35, s	25.0	CH ₃	1.37, s	25.5	CH ₃	1.35, s
18							168.6	C		168.7	C	
19							21.7	CH ₃	1.99, s	21.6	CH ₃	1.98, s
1'	166.2	C		166.1	C		165.9	C		166.0	C	
2'	78.6	CH	4.77, dd (8.6, 2.9)	78.6	CH	4.77, dd (8.5, 3.4)	78.5	CH	4.76, dd (8.6, 3.5)	78.3	CH	4.73, dd (9.0, 3.4)
3'	34.8	CH ₂	3.33, dd (14.9, 2.9) 2.91, dd (14.9, 8.6)	34.8	CH ₂	3.33, dd (14.9, 3.4) 2.88, dd (14.9, 8.5)	34.7	CH ₂	3.33, dd (15.1, 3.5) 2.91, dd (15.1, 8.6)	34.6	CH ₂	3.31, dd (15.4, 3.4) 2.84, dd (15.4, 9.0)
4'	136.1	C		136.2	C		136.1	C		136.0	C	
5'/9'	128.6	CH	7.21, m	128.6	CH	7.22, m	129.6	CH	7.22, m	128.4	CH	7.19, d (7.4)
6'/8'	129.7	CH	7.21, m	129.6	CH	7.22, m	128.4	CH	7.24, m	129.4	CH	7.19, d (7.4)
7'	127.0	CH	7.23, m	127.0	CH	7.21, m	126.8	CH	7.22, m	126.9	CH	7.23, m

^aCDCl₃, 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C. ^bCDCl₃, 700 MHz para ¹H y 175 MHz para ¹³C. ^cCDCl₃, 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C.

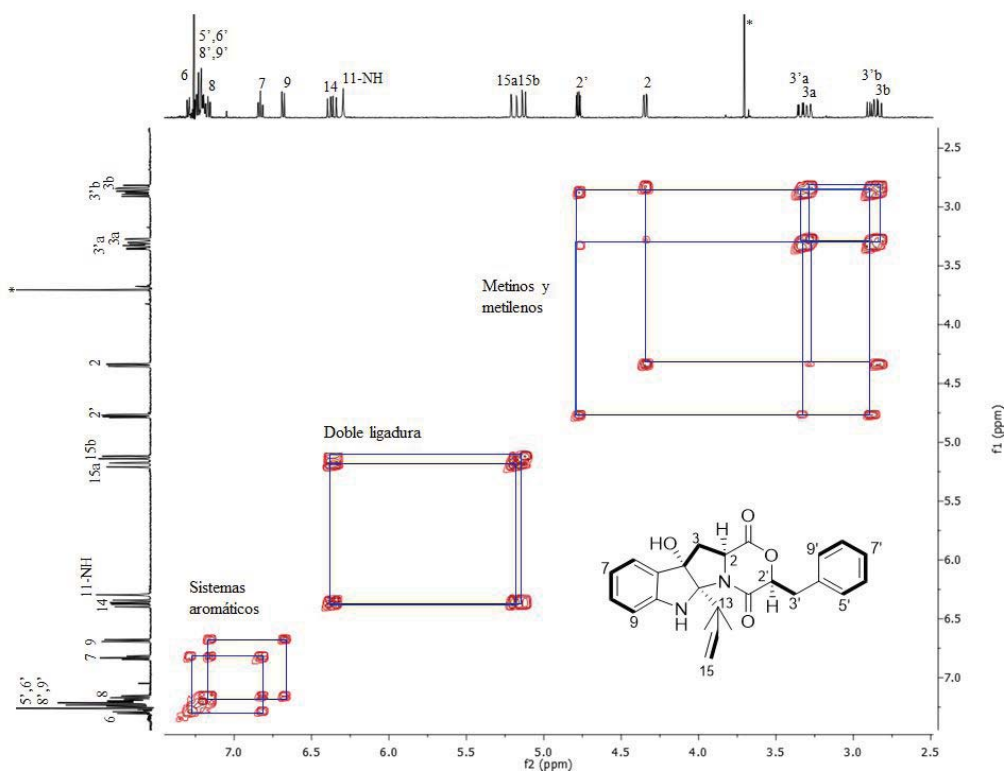


Figura 59. Espectro COSY del compuesto 4, mostrando los distintos sistemas de espín.

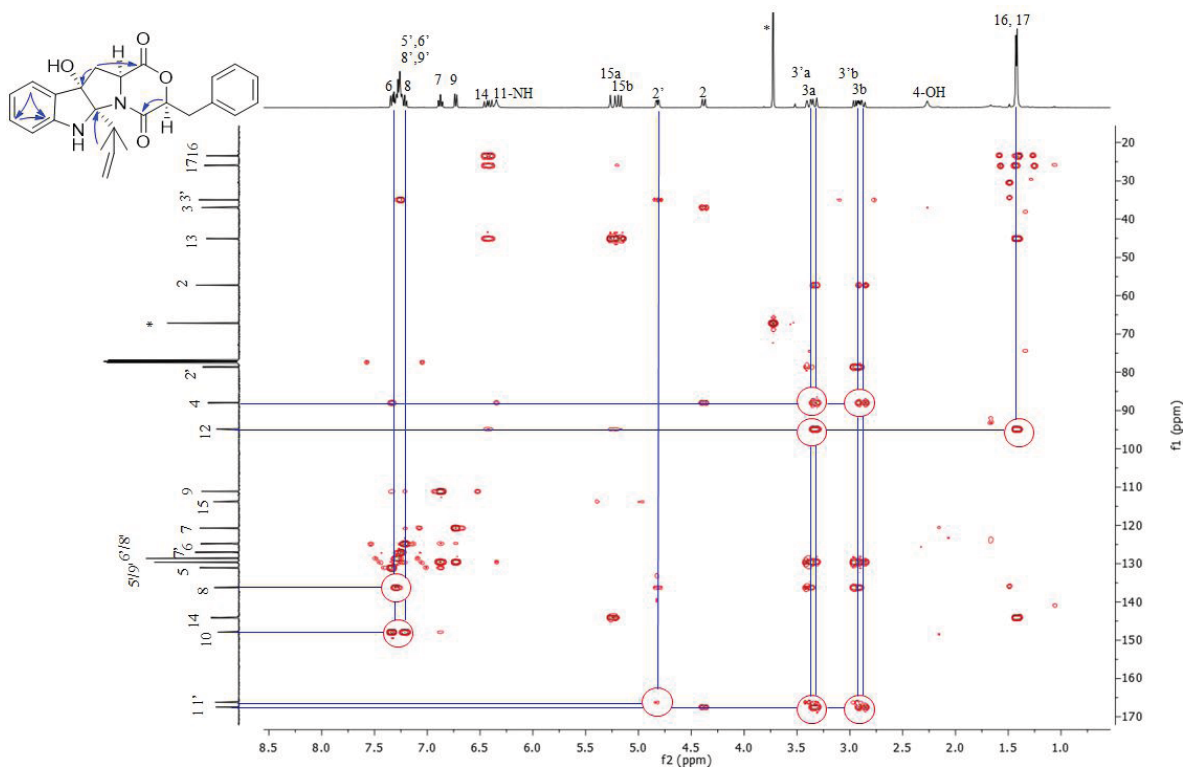


Figura 60. Espectro HMBC del compuesto 4, mostrando correlaciones clave.

En los espectros de RMN ^{13}C (**Figura 61**) y HSQC (**Figura 62**) se confirmó la presencia de los 17 carbonos protonados: nueve asignables a metinos aromáticos [$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 131.0/7.16, 129.6 ($\times 2$)/7.22, 128.6 ($\times 2$)/7.22, 127.0/7.21, 124.8/7.29, 120.7/6.82, 111.1/6.68], uno de doble ligadura ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 146.9/6.36) y dos a metinos alifáticos unidos a heteroátomos ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 78.6/4.77 y 57.2/4.34); tres a metilenos y uno de ellos de una doble ligadura vinílica ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ y δ_{Hb} 113.9/5.19 y 5.12) y dos alifáticos ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ y δ_{Hb} 36.9/3.28 y 2.83; 34.8/3.33 y 2.88); y dos señales de metilo ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 26.1/1.35 y 23.3/1.37). Del mismo modo, se observaron ocho señales asignables a carbonos no protonados: dos de tipo carbonilo (δ_{C} 167.4 y 166.1), tres aromáticos (δ_{C} 147.8, 136.2 y 128.9) y tres alifáticos (δ_{C} 94.7, 88.0 y 45.0).

Basándonos en las consideraciones anteriores, al compuesto **4** se le asignó el nombre trivial de 9-desoxi-PF 1233 B.

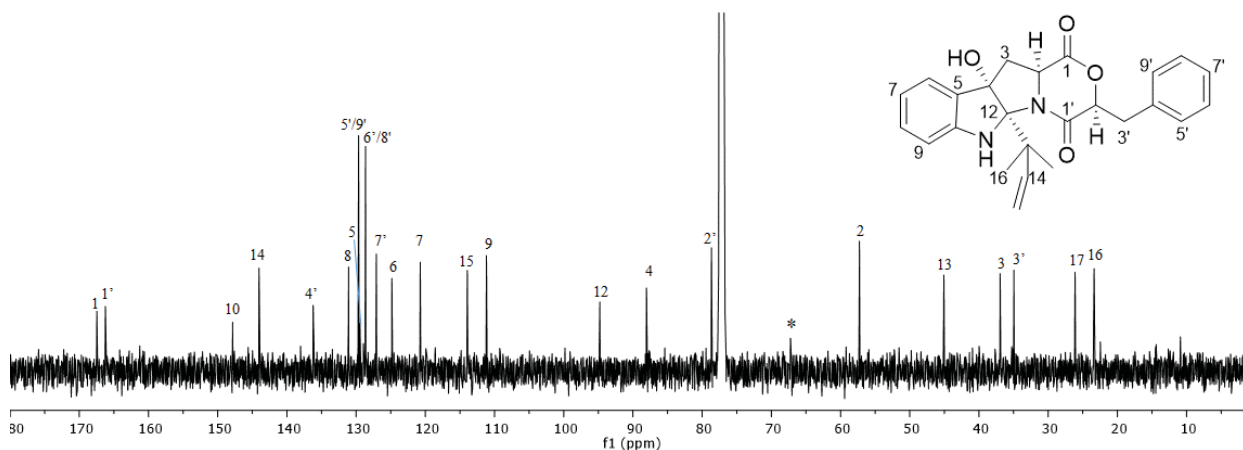


Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **4** (CDCl_3 , 125 MHz). *Dioxano.

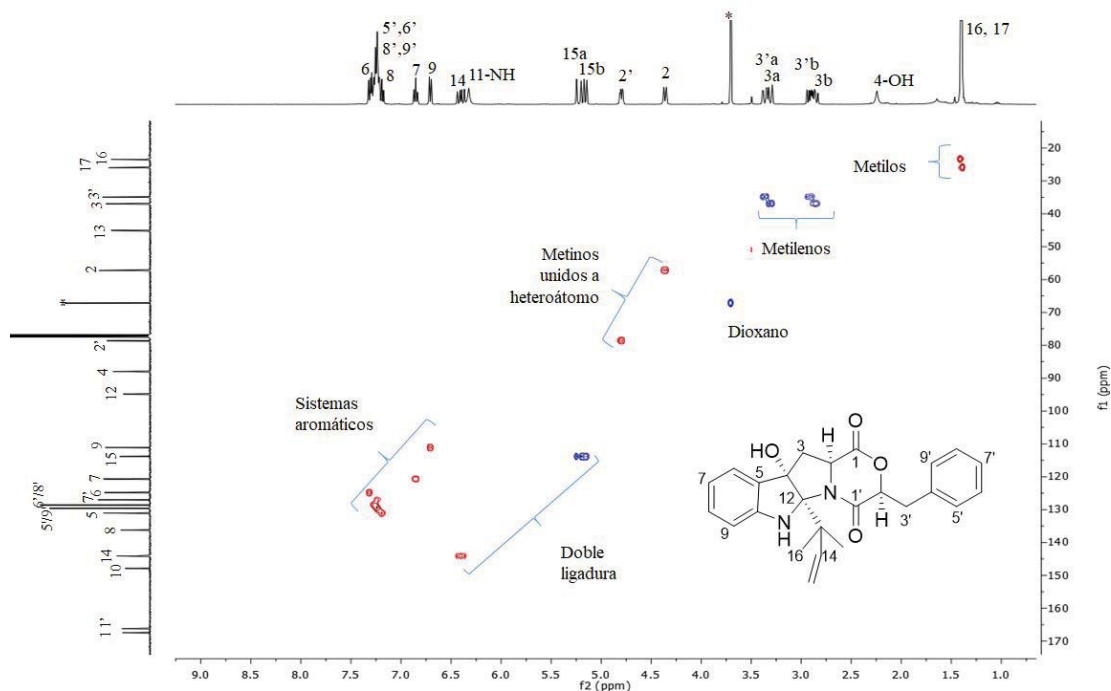


Figura 62. Espectro HSQC del compuesto **4**.

El compuesto **7** (**Figura 50**) se aisló como un aceite de color amarillo. La fórmula molecular se determinó como $C_{25}H_{26}N_2O_5$ (IDH = 14), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Tabla 19**) y HRESIMS ($[M+H]^+$ 435.1896 y $[M-H]^-$ 433.1755) (**Tabla A 1**).

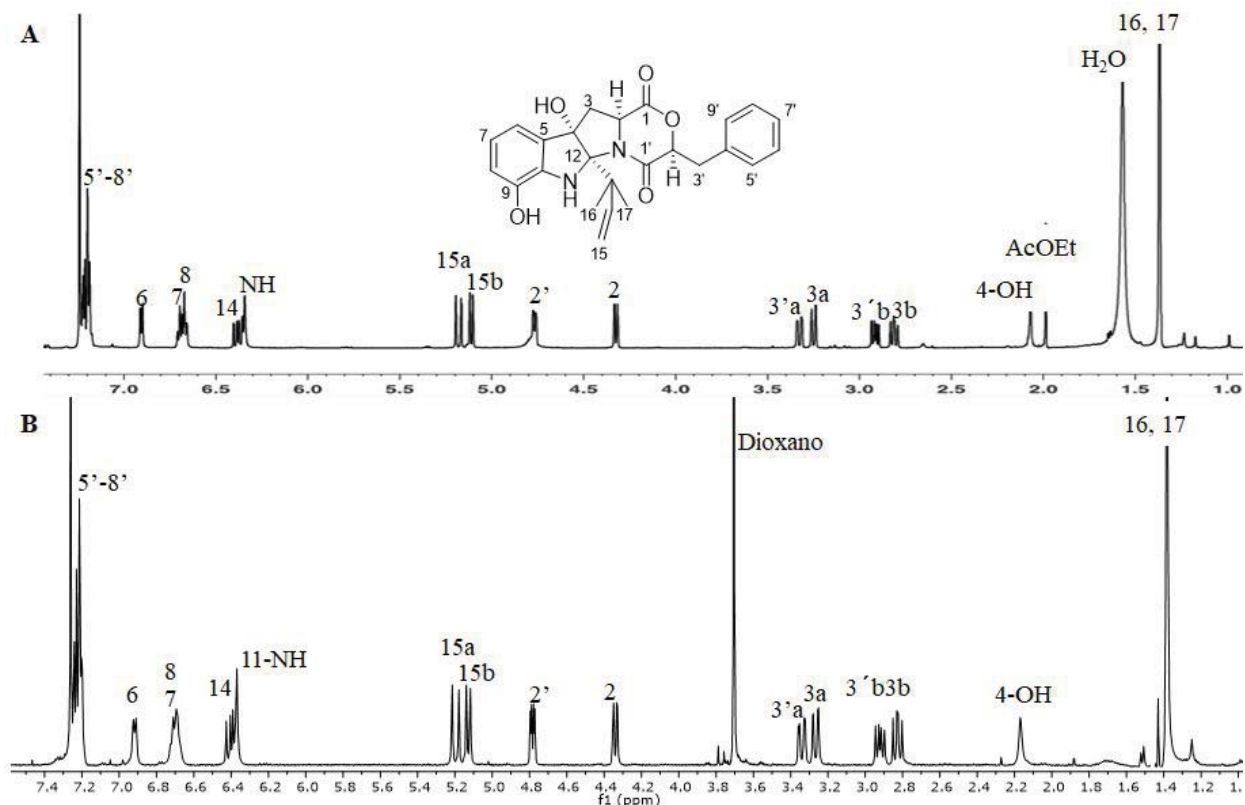


Figura 63. Comparación entre espectros de RMN 1H : **A**) reportado por Khalil et al. ($CDCl_3$, 600 MHz); **B**) compuesto **7** ($CDCl_3$, 500 MHz).

Posteriormente y mediante la comparación de estos datos espectroscópicos con los descritos en la literatura, se estableció que **7** se trataba del compuesto de tipo dioxomorfolina conocido como PF 1233 B [81].

El compuesto **5** (**Figura 50**) se aisló como un aceite de color amarillo. La fórmula molecular se determinó como $C_{27}H_{28}N_2O_5$ (IDH = 15), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Tabla 19**) y HRESIMS ($[M+H]^+$ 461.2049 y $[M-H]^-$ 459.1916) (**Tabla A 1**). El análisis de los datos de RMN 1H y ^{13}C de **5** (**Tabla 19**) reveló una gran similitud con el compuesto **4**. La diferencia principal radica en la presencia de un grupo acetilo (δ_C/δ_H 21.6/1.98) y el desplazamiento de C-4 a campos más bajos (δ_C 91.1). Esta diferencia es consistente con el incremento de 42 umas respecto **5**. Así el compuesto **5** se caracterizó como 9-desoxi-PF 1233 A. Los espectros bidimensionales de **5** se muestran en las **Figuras A 6-A 7**.

El compuesto **8** (**Figura 50**) se aisló como un aceite de color rojo. Su fórmula molecular se determinó como $C_{27}H_{28}N_2O_6$ (IDH = 15), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Tabla 19**) y HRESIMS ($[M+H]^+$ 477.2019 y $[M-H]^-$ 475.1872) (**Tabla A 1**). La comparación de los datos de RMN 1H y ^{13}C (**Tabla 19**) y de HRESIMS con los descritos en la literatura evidenció que **8** corresponde con la dioxomorfolina conocida como PF 1233 A [81]. Los espectros de RMN de 1H , ^{13}C y bidimensionales se muestran en las **Figuras A 8-A 10**.

En resumen, las diferencias estructurales más relevantes fueron la presencia o ausencia de un hidroxilo fenólico en C-9 o la de un grupo acetilo en posición C-4 y la apertura del anillo dioxomorfolínico que origina los compuestos 1-3.

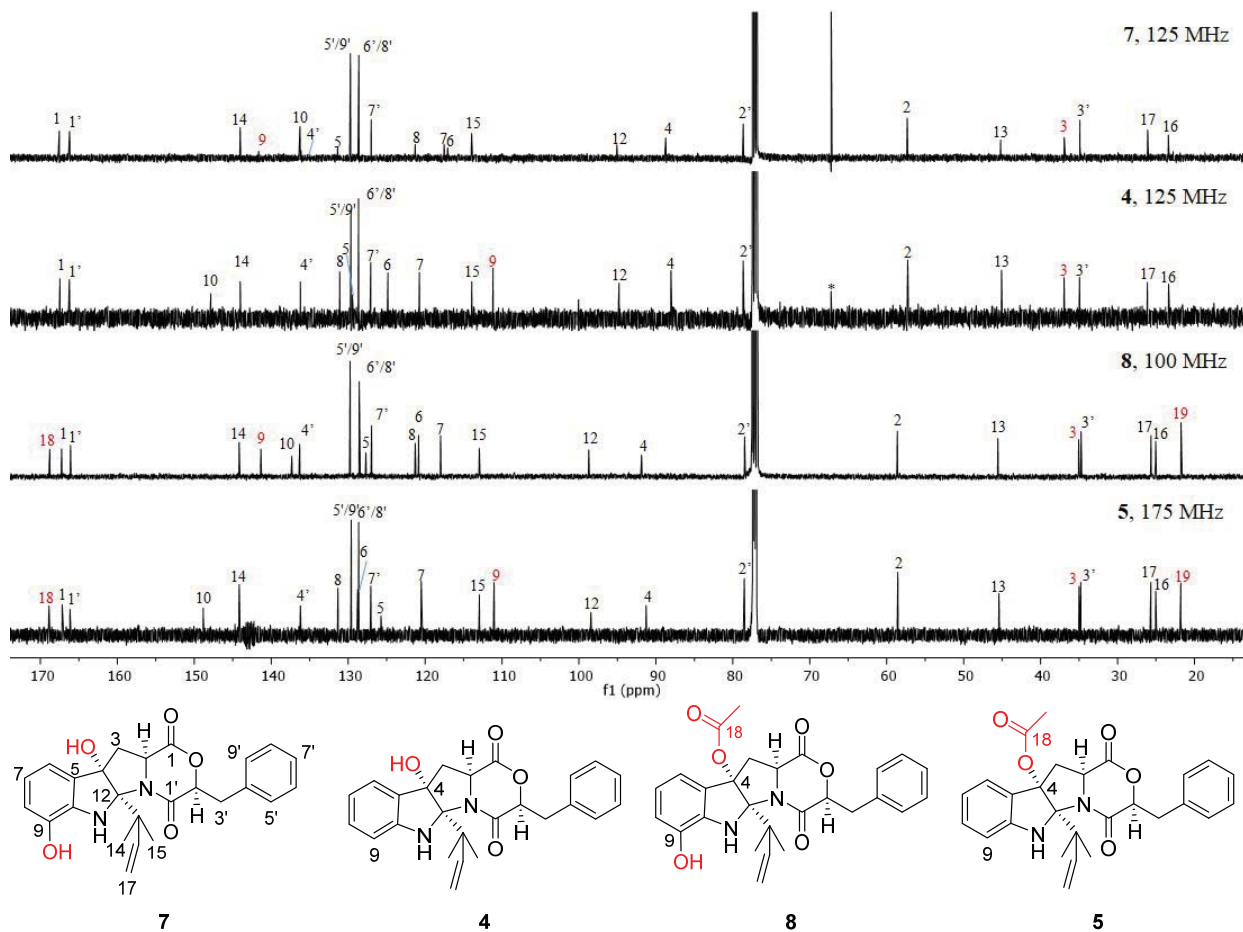


Figura 64. Comparación de espectros de RMN ^{13}C para los compuestos 4, 5, 7 y 8 (CDCl_3).

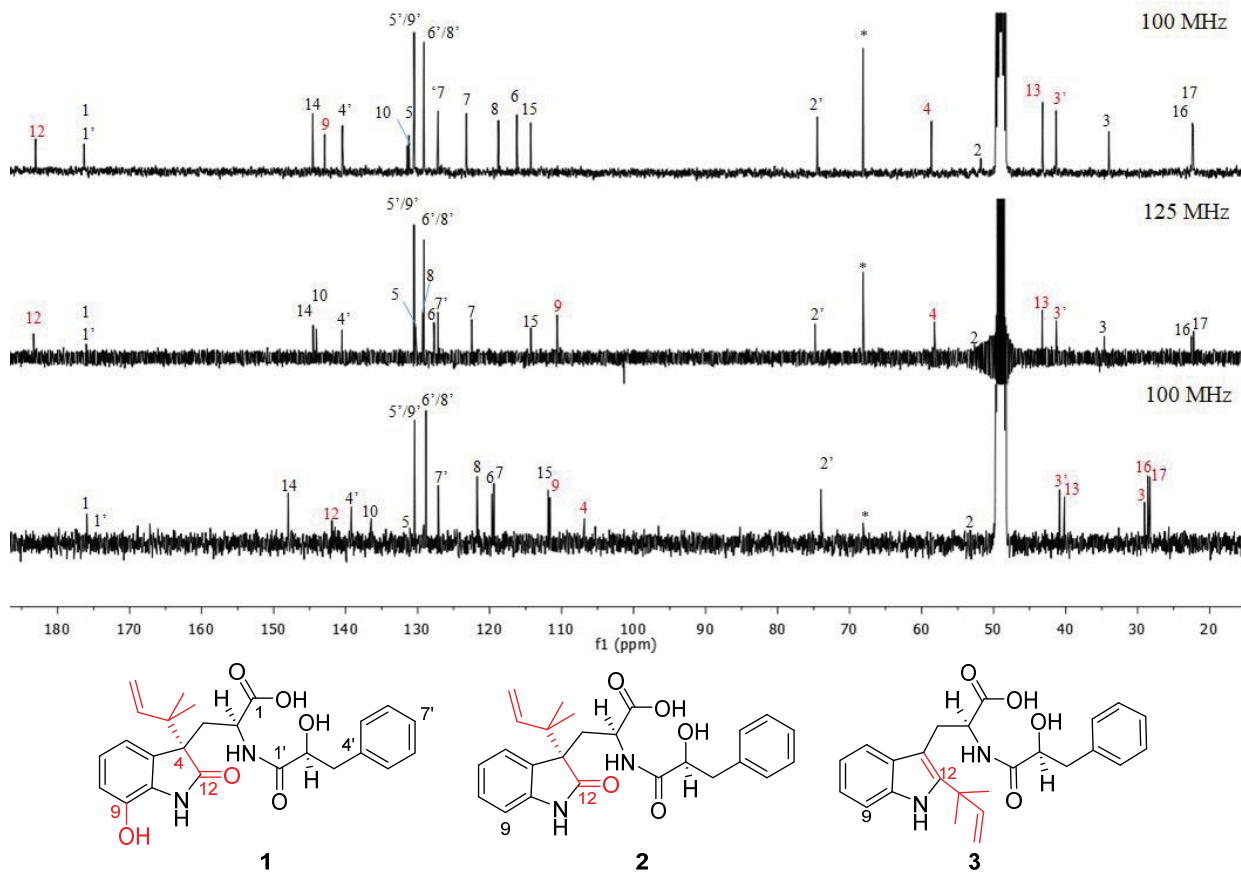


Figura 65. Comparación de espectros de RMN ^{13}C para los compuestos 1-3 (CD_3OD).

La determinación de la configuración relativa de los carbonos C-2, C-2' y C-12 de los compuestos 4 y 5 se llevó a cabo mediante el análisis de las correlaciones en sus espectros NOESY (**Figura 66**). Así, en ambos casos las correlaciones entre H-2/H-2', H-2/H-16 y H-2/H-17, fueron idénticas a las reportadas para el compuesto 7 [84].

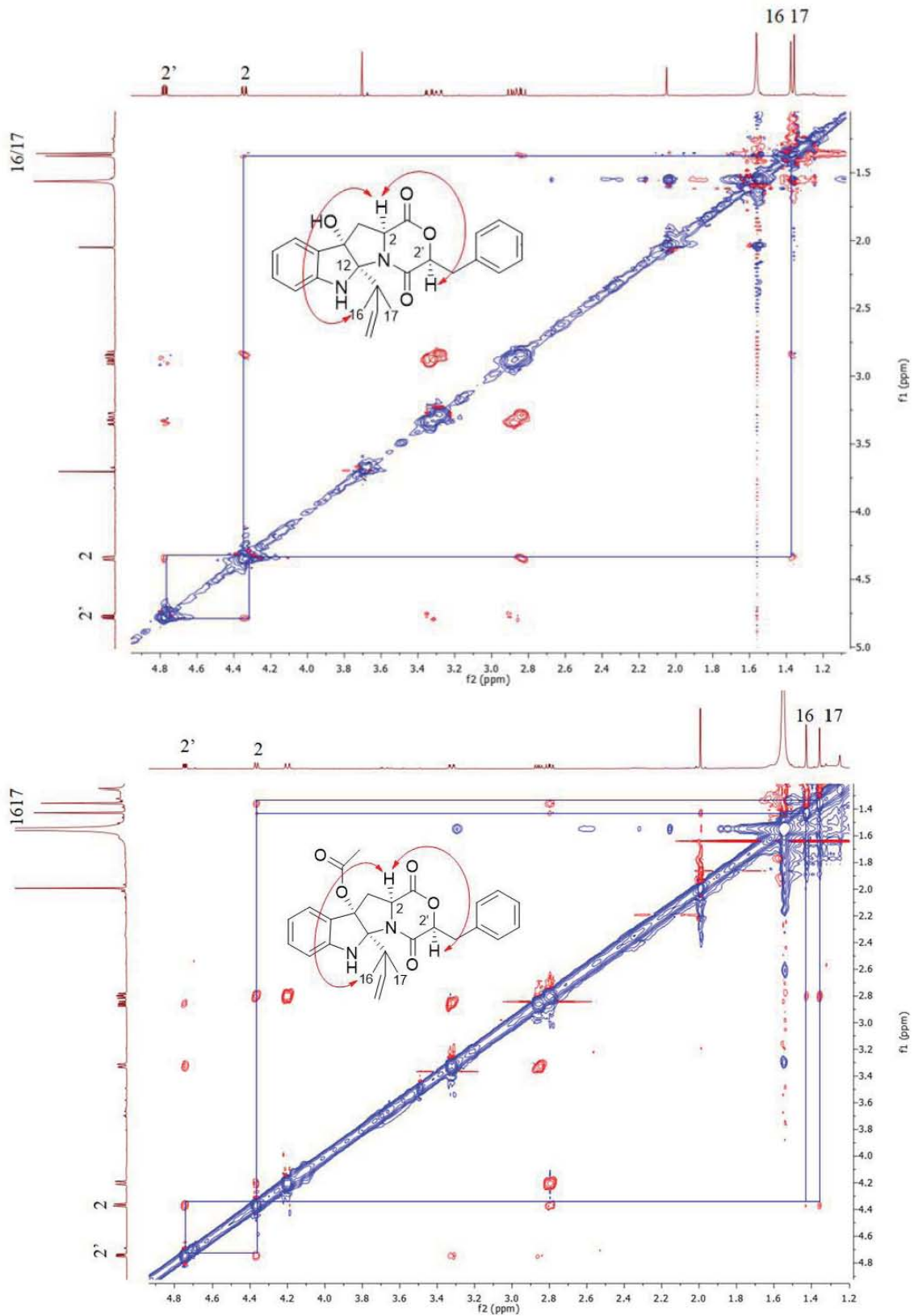


Figura 66. Ampliaciones de los espectros NOESY de los compuestos 4 (arriba) y 5 (abajo), mostrando correlaciones clave.

La configuración absoluta de los compuestos **4**, **5** y **7** se determinó utilizando la técnica de dicroísmo circular vibracional (DCV). Este método se basa en la comparación de los espectros de IR y de DCV experimentales y teóricos para la muestra en estudio. La búsqueda conformacional utilizando el método de campo de fuerza MMFF94 para **4**, **5** y **7** arrojó 94, 144 y 59 conformeros, respectivamente, dentro del rango de 10 kcal/mol. Posteriormente, las estructuras obtenidas se optimizaron utilizando la teoría de funcional de la densidad (TFD), con el funcional B3PW91 y el set base DGDZVP, reduciendo así el número de conformeros a 35, 55 y 41, respectivamente. Después, se seleccionaron 19, 15 y 20 conformeros dentro del rango de 0 a 3 kcal/mol para realizar el cálculo del momento dipolar y fuerza rotacional en el mismo nivel de teoría. Los valores de ΔG permitieron elegir nueve conformeros para **4**, siete para **5** y ocho para **7**. Finalmente los espectros calculados de IR y DCV (**Figura 67**) fueron obtenidos considerando los factores de ponderación que se indican en la **Tabla A 4**.

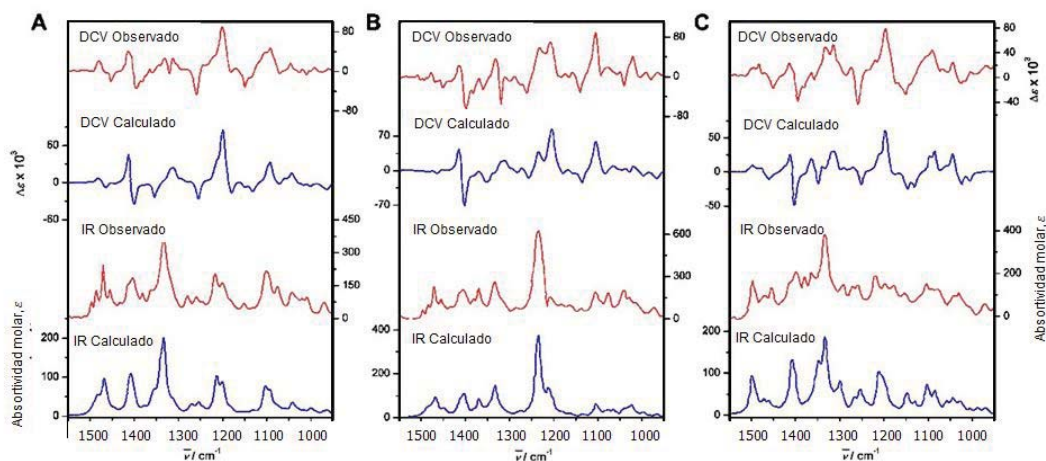


Figura 67. Comparación de los espectros de IR y DCV calculados y experimentales de los enantiómeros (2*S*,4*S*,12*R*,2'*S*)-**4** (A), (2*S*,4*S*,12*R*,2'*S*)-**5** (B) y (2*S*,4*S*,12*R*,2'*S*)-**7** (C).

Los datos en la **Tabla 20** muestran valores mayores a 96 para los índices de similitud espectral de IR (S_{IR}) y valores mayores a 83 para el índice de similitud espectral de DCV para el enantiómero correcto (S_E), estableciendo así la configuración absoluta con un 100% de confianza. Además, los bajos valores de similitud espectral en DCV para el enantiómero incorrecto (S_E) produjeron altos índices de selectividad enantiomérica (ISE) para los compuestos en cuestión (**4**, **5** y **7**).

Tabla 20. Datos de nivel de confianza para los espectros de IR y DCV.

Compuesto	anH ^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI ^e	Cf (%)
4	0.972	96.9	84.1	11.2	72.9	100
5	0.972	97.5	83.3	9.9	73.3	100
7	0.971	96.1	84.4	8.9	75.6	100

^aFactor de anarmonicidad. ^bSimilitud espectral de IR. ^cSimilitud espectral de DCV para el enantiómero correcto. ^dSimilitud espectral de DCV para el enantiómero incorrecto. ^eÍndice de selectividad enantiomérica, calculado como $S_E - S_{-E}$. Nivel de confianza para las asignaciones estereoquímicas.

Finalmente, la configuración absoluta de los compuestos **1-3** se asumió por consideraciones biogenéticas debido a que poseen los mismos núcleos de indolina 2-3 disustituida y de 2-hidroxi-3-fenilpropanoamida presentes en los compuestos **4**, **5** y **7** [83].

En 2014, Khalil y colaboradores [84], describieron el aislamiento del éster metílico de *seco*-PF 1233 B y sugirieron que este producto se trataba de un artefacto producido por metanólisis a partir del "solvolíticamente inestable" PF

1233 B. Debido a que los metabolitos **1-3**, al igual que el éster metílico de *seco*-PF 1233 B poseen la porción dioxomorfolínica en forma abierta, fue necesario comprobar que dichos compuestos no fueran artefactos producidos durante los procesos de extracción y/o purificación. Para esto, el compuesto **7** se sometió a condiciones de metanólisis e hidrólisis (inciso 4.6.3). Los productos de las reacciones fueron analizados por UPLC-ESIMS y no se encontraron productos de hidrólisis y/o metanólisis, ya sea mediante la comparación con muestras puras de **1-3** o mediante la búsqueda selectiva de los iones en m/z de 453 $[M + H]^+$ para **1**, 437 $[M + H]^+$ para **2**, 421 $[M + H]^+$ para **3**, y 467 $[M + H]^+$ y 489 $[M + Na]^+$ para el éster metílico de *seco*-PF 1233 B. Adicionalmente, se demostró por esta técnica, la presencia de los compuestos **1-5** en el extracto de AcOEt (libre de MeOH o ácido). Los resultados de los experimentos antes descritos (**Figuras A 34-A 35**), muestran que el compuesto **7** es estable bajo las condiciones de trabajo de este proyecto, y que los compuestos **1-5** son productos naturales derivados del metabolismo secundario del microorganismo, y no artefactos producidos durante los procesos de extracción y/o purificación [83].

La obtención de los compuestos tipo dioxomorfolina y sus derivados es muy interesante, ya que se trata de metabolitos muy poco usuales entre los productos naturales y dentro de la química sintética [84,85]. Son metabolitos cuyo interés en la terapéutica ha crecido en los últimos años [86], debido a la actividad biológica que algunos de ellos presentan como antibacterianos [87], como inhibidores de la actividad de los canales transmembranales dependientes de sodio [81] y en últimos años como inhibidores de la Pgp [83,84], hecho que pone en evidencia su posible uso dentro de la terapéutica. Con base en esto, se decidió establecer el potencial citotóxico y como inhibidores de la Pgp de los compuestos **1**, **3**, y **7** (dos compuestos novedosos tipo *seco* y una dioxomorfolina conocida).

Ninguno de los compuestos mostró actividad citotóxica cuando se evaluaron frente a un panel de líneas celulares tumorales con diferentes grados funcionales de la proteína supresora de tumor p53 [líneas celulares con fenotipo silvestre: A549 (adenocarcinoma alveolar humano), U2OS (osteosarcoma humano) y HCT116 p53+/+ (carcinoma de colon); con fenotipo mutante con pérdida de función: HCT116 p53-/- (carcinoma de colon); con fenotipo mutante de ganancia de función: MDA-MB-231 p53^{R280K} (adenocarcinoma mamario)]. Sin embargo, los productos sí mostraron una actividad de inhibición sobre la glicoproteína P (Pgp), proteína transmembranal cuya sobreexpresión está asociada con el fenotipo de resistencia a fármacos. Para el ensayo de retención de calceína (**Figura 68**) se utilizaron células A549 (con expresión normal de Pgp) y A549/DXR (resistentes a doxorubicina y con sobreexpresión de Pgp). La inhibición de la proteína Pgp se llevó a cabo de manera dependiente de la concentración (0.1 y 0.5 μ M) y los resultados demuestran que **1**, **3** y **7** (**Figura 69**) favorecen la acción de la doxorubicina en células resistentes a este agente quimioterapéutico [83,88].

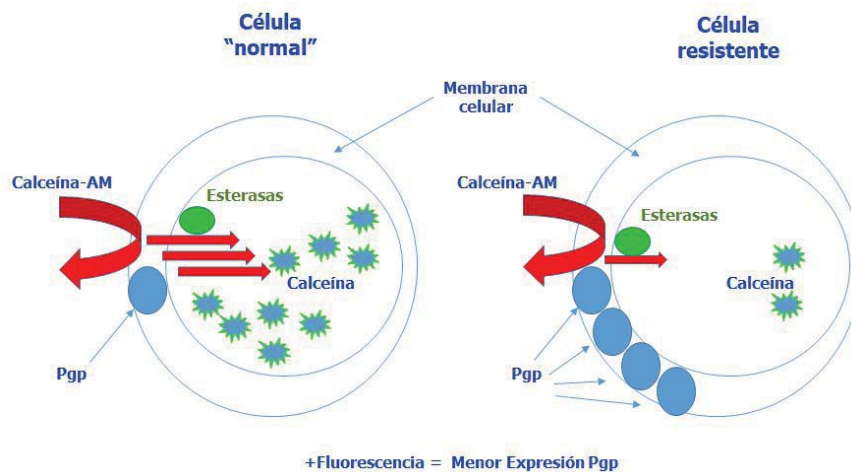


Figura 68. Fundamento del ensayo de retención de calceína.

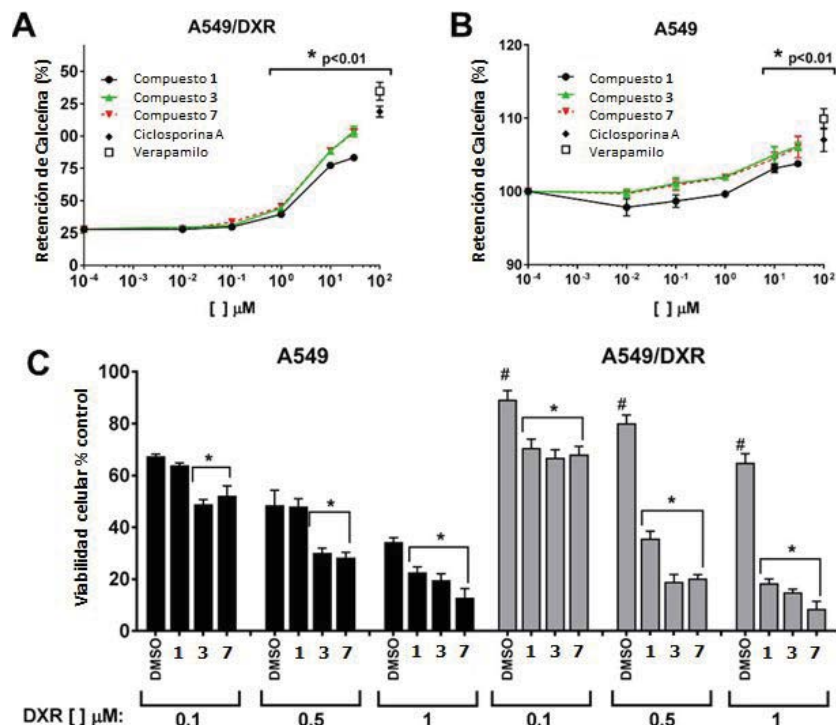


Figura 69. Efecto de **1** (●), **3** (▲) y **7** (▼) en la extrusión de calceína en células (A) A549/DXR y (B) A549. Se utilizaron Verapamilo (□; 50 μg/mL) y ciclosporina A (◆; 25 μg/mL) como controles positivos. (C) actividad de **1**, **3** y **7** en la sensibilidad a DXR en células A-549 y A-549/DXR (con sobreexpresión de Pgp). Las células se trataron con diferentes concentraciones de DXR, solas o en combinación con 10 μM de cada compuesto por 72 h. Los datos representan la media ± EEM de los tres experimentos independientes (valor de [#]*p* < 0.01 muestras tratadas con DMSO; valor de ^{*}*p* < 0.01 células A-549/DXR se tratadas con DXR en presencia del vehículo (DMSO) en comparación con su condición correspondiente en células A-549).

El compuesto **6** (Figura 50) se obtuvo como un sólido anaranjado. La fórmula molecular se determinó como C₃₅H₄₇N₅O₆ (IDH = 15), con base en el análisis de los espectros de ¹H y ¹³C (Figuras 70 y A 11) y HRESIMS ([M+H]⁺ 634.3571 y [M-H]⁻ 632.3436) (Tabla A 1).

Tabla 21. Datos espectroscópicos de la caletasina^a (**6**).

Posición	δ _C	δ _H , mult. (J en Hz)	COSY	TOCSY	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
<i>N</i> -Me-L-Phe					
1	167.9				
2	61.3	4.26, dd (11.4, 3.3)	3	3a, 3b	1, 2-NMe, 3, 10
3a	33.9	3.26, dd (14.3, 3.3)	2	2, 3b	2, 4, 5/9
3b		2.78, dd (14.3, 11.5)		2, 3a	2, 4, 5/9
4	137.2				
5/9	128.9	7.09, m	6/8	6/8	3, 6/8, 7
6/8	128.4	7.19, m	5/9, 7	5/9	4, 5/9, 7
7	126.6	7.17, m	5/9		5/9, 6/8
2-NMe	30.4	2.70, s			2, 10
<i>L</i> -Tyr					
10	170.1				
11	49.2	3.99, ddd (8.7, 8.2,	11-NH, 12	11-NH, 12	10, 12, 19
12	36.9	a 2.64, dd (14.0, 8.2)	11	11, 11-NH, 12	10, 11, 13, 14/18
		b 2.28, dd (14.0, 5.3)			
13	127.4				

14/18	129.7	6.50, s	15/17	15/17	12, 13, 15/17, 16
15/17	114.6	6.50, s	14/18	14/18	13, 14/18, 16
16	155.3				
11-NH		8.38, d (8.7)	11	11, 12	11, 19
16-OH		9.02, s			15/17
			L-Val		
19	169.3				
20	61.0	3.86, t (9.7)	20-NH, 21	20-NH, 21, 22, 23	19, 21, 22, 23, 24
21	30.5	1.66, m	20, 22, 23	20, 20-NH, 22, 23	20, 22, 23
22	19.14	0.78, d (6.6)	21	20, 20-NH, 21, 22	20, 21, 23
23	19.12	0.65, d (6.6)	21	20, 20-NH, 21, 22	20, 21, 22
20-NH		7.00, d (9.7)	20	20, 21, 22, 23	20, 24
			L-Pro		
24	170.6				
25	61.0	4.39, dd (8.1, 0.8)	26	26, 27, 28	24, 26, 27, 29
26	31.5	a 2.16, m	25, 27	25, 26, 27, 28	24, 25, 27, 28
		b 1.99, m			
27	21.4	a 1.90, m	26, 28	25, 26, 27, 28	25, 26, 28
		b 1.66, m			
28	46.3	a 3.61, m	27	25, 26, 27, 28	26, 27
		b 3.38, m			
			L-Leu		
29	169.3				
30	49.1	4.62, m	30-NH, 31	30-NH, 31, 32, 33, 34	1, 29, 31
31	41.7	a 1.79, m	30, 32	30, 30-NH, 31, 32, 33, 34	29, 30, 33, 34
		b 1.29, m			
32	24.4	1.49, m	31, 33, 34	30, 30-NH, 31, 33, 34	30, 31, 33, 34
33	22.8	0.89, d (5.1)	32	30, 30-NH, 31, 32, 34	31, 34
34	22.5	0.87, d (5.1)	32	30, 30-NH, 31, 32, 33	31, 33
30-NH		7.05, d (8.4)	30	30, 31, 32, 33, 34	1, 29, 30

^aDMSO-*d*₆, 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C.

Con el análisis detallado de los espectros de RMN 1D y 2D de **6** (**Figuras A 11-A 14**), fue evidente que este producto es muy similar al péptido cotteslosina B (**Figura 70**). Las diferencias más importantes entre **6** y la cotteslosina B se resumen a continuación: la presencia de un solo hidroxilo fenólico en un desplazamiento de δ_H 9.02 (1H, s, 16-OH), un anillo *para* disustituido representado por dos dobletes en $\delta_H = 6.7$ (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H14/H18) y 6.6 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-15/H-17) (CD₃OD) de un residuo de tirosina y 10 protones del aminoácido leucina en δ_H 4.62 (1H, m, H-30), 1.79 (1H, m, H_{2a}-31), 1.29 (1H, m, H_{2b}-31), 1.49 (1H, m, H-32), 0.89 (3H, d, $J = 5.1$ Hz, H₃-33), y 0.87 (3H, d, $J = 5.1$ Hz, H₃-33). Por otra parte, el análisis conjunto de los espectros TOCSY y NOESY (**Figuras 71-72**), así como de los de MS/MS (**Figura 73**), permitió conocer la identidad y la secuencia de conexión entre los residuos de aminoácidos. Para cumplir con el requisito de 15 grados de insaturación, **6** debía tratarse de un compuesto cíclico, por lo que su estructura se estableció de forma preliminar como *ciclo*-(Tyr-*N*-Me-Phe-Leu-Pro-Val).

Es importante señalar que el espectro TOCSY (**Figura 71**) permitió diferenciar cada uno de los sistemas de espín que componen al péptido, además, el análisis MS/MS (**Figura 73 B**) reveló una serie de fragmentos a partir de los iones en m/z 521.2737 [M-Leu+H]⁺ y 471.2950 [M-Tyr+H]⁺ y dos sitios principales de ruptura del metabolito (Val/Tyr y Pro/Leu) coherentes con la estructura propuesta.

La configuración relativa de **6** fue establecida con base en el análisis de las correlaciones en el espectro NOESY (**Figura 72**) y la configuración absoluta de cada aminoácido, mediante un análisis de Marfey (**Figura 74**), que permitió establecer la estructura final de **6** como *ciclo*-(L-Tyr-*N*-Me-L-Phe-L-Leu-L-Pro-L-Val).

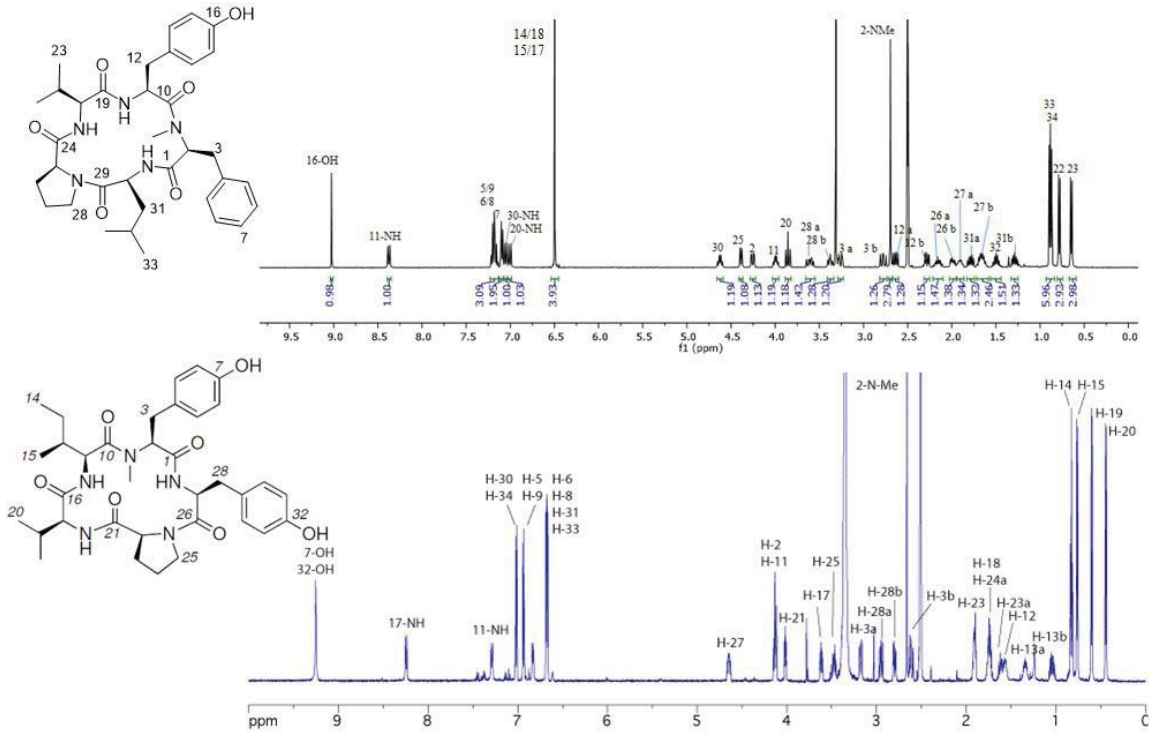


Figura 70. Comparación de espectros de RMN ¹H de la caletasina (6) (arriba) y de la cotteslosina B (abajo).

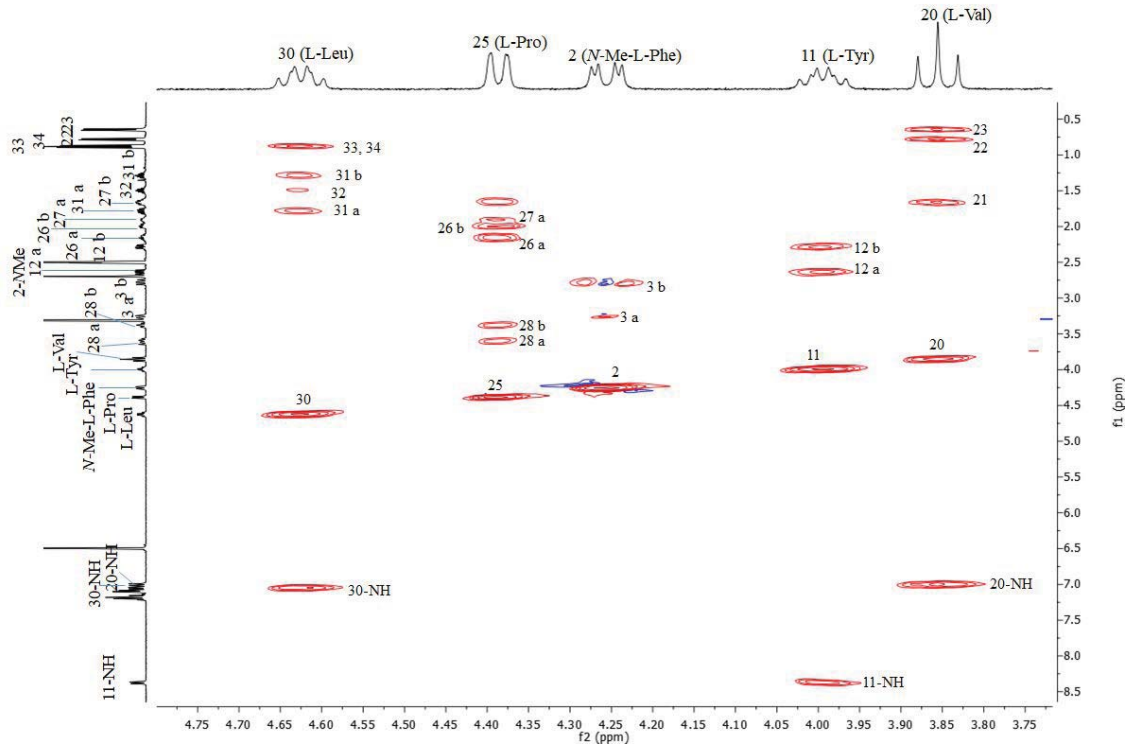


Figura 71. Ampliación del espectro TOCSY del compuesto 6 (f1 = 0.3-8.6 ppm, f2 = 3.7-4.8 ppm), mostrando correlaciones clave.

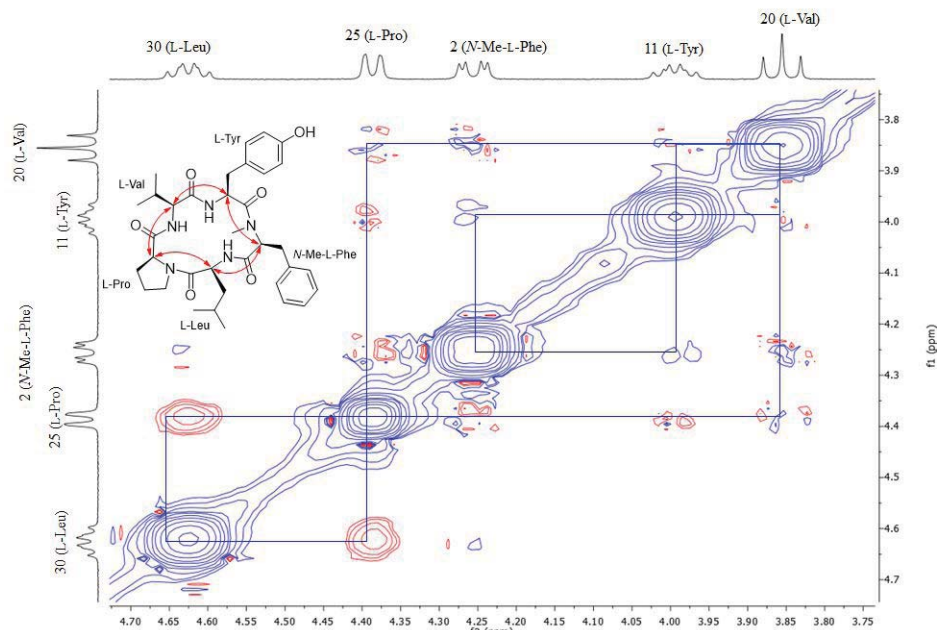
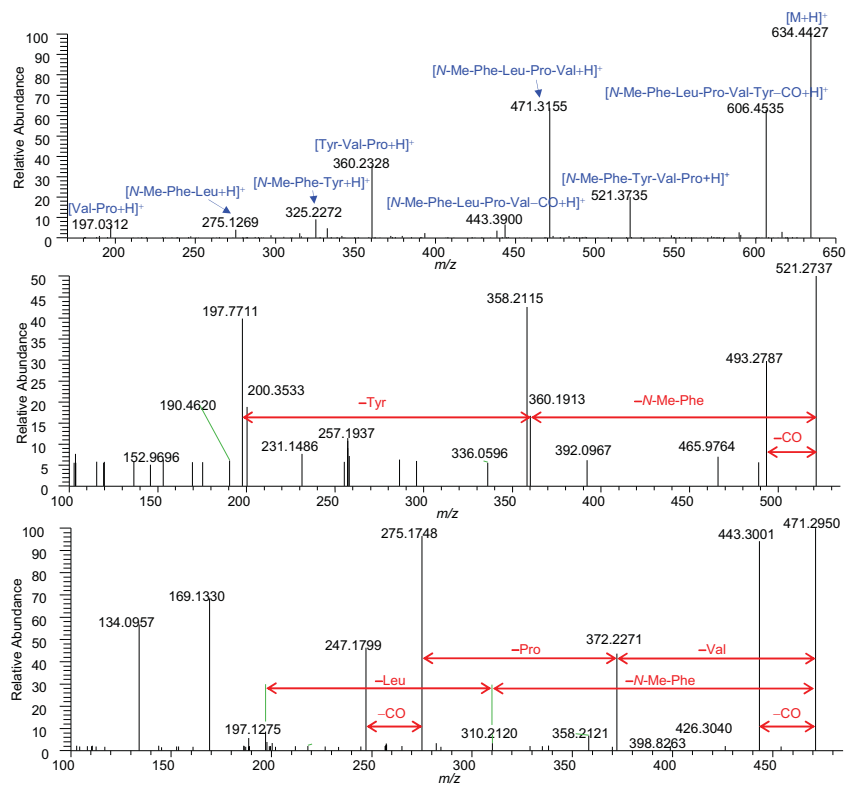


Figura 72. Ampliación del espectro NOESY (f1: 4.7-3.7, f2: 4.7-3.7 ppm) del compuesto 6, mostrando correlaciones clave.



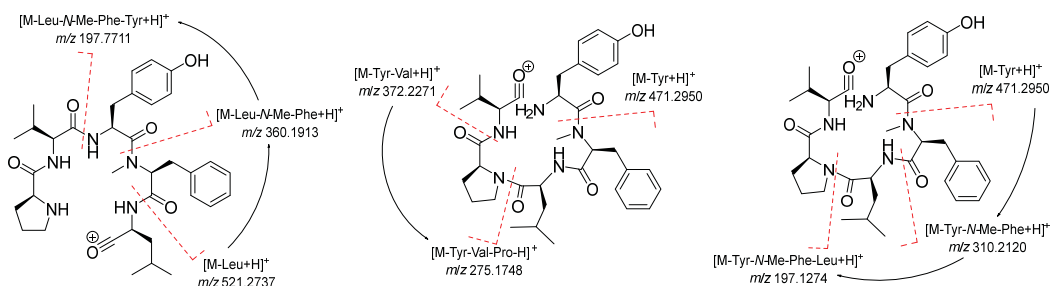


Figura 73. Espectros completo y de fragmentación por HRESIMS-MS/MS en modo positivo, a partir de los iones m/z 521.2737 $[M\text{-Leu+H}]^+$ y 471.2950 $[M\text{-Tyr+H}]^+$.

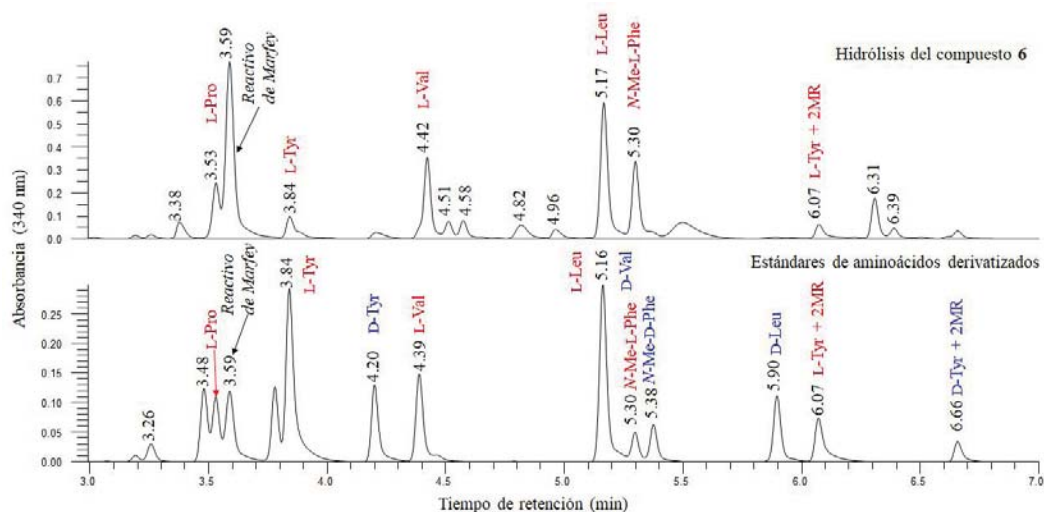


Figura 74. Análisis de Marfey para el compuesto **6**.

En este último experimento, no fue posible obtener la resolución cromatográfica en el UV de los aminoácidos L-Leu y D-Val, que permitiera su identificación inequívoca. Por tal motivo, se utilizó la información provista por los espectros de HRESIMS (**Figura A 1**) para determinar el aminoácido presente en la muestra de estudio. Así se confirmó la presencia de L-Leu y la estructura final de **6** se estableció como *ciclo*-(L-Tyr-N-Me-L-Phe-L-Leu-L-Pro-L-Val), al cual se le asignó el nombre trivial de caletasina [89].

Finalmente, se estableció el potencial citotóxico, antimicrobiano y fitotóxico de **6**, siguiendo los protocolos descritos previamente [90-92]. Desafortunadamente, el producto fue inactivo contra las líneas celulares de melanoma humano (MDA-MB-435), de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cáncer de ovario (OVCAR3) ($IC_{50} > 25 \mu M$) (**Tabla A 3**), contra las bacterias Gram-positivo [*S. aureus* (ATCC[®] 25923) y *B. subtilis* (ATCC[®] 6633)] y Gram-negativo [*S. typhi* (ATCC[®] 9992), *E. coli* (ATCC[®] 25923) y *P. aeruginosa* (ATCC[®] 27853)] y la levadura *C. albicans* (ATCC[®] 10231) (CIM > 100 mg/mL) y contra la maleza *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) (% de inhibición < 10%).

El compuesto **9** (**Figura 50**) fue aislado como un sólido amarillo. La fórmula molecular se determinó como $C_{19}H_{16}O_7$ (IDH = 12), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H , ^{13}C (**Figura A 15**) y de HRESIMS ($[M+H]^+$ 357.0966 y $[M-H]^-$ 355.0822) (**Tabla A 1**). La comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los descritos en la literatura, permitió identificar a este compuesto como la butirolactona II [82]. Este tipo de lactonas son comunes

en especies de *Aspergillus* y han mostrado actividad contra líneas tumorales de adenocarcinoma de colon, próstata y riñón [82], como inhibidores de enzimas α -glucosidasas y como antioxidantes [93].

5.1.2 Estudio químico de *Beauveria* sp. ACA-13.

El estudio químico de la especie fúngica *Beauveria* sp. ACA-13 permitió el aislamiento de tres compuestos de tipo peptídico, la benzomalvina A (**10**) y dos ciclohexadepsipéptidos, la beauvericina (**11**) y la beauvericina A (**12**) (**Figura 75**). La elucidación estructural de **10-12** se realizó comparando sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los descritos en la literatura [94-96] (**Figuras A 16-A-18** y **Tabla A 1**).

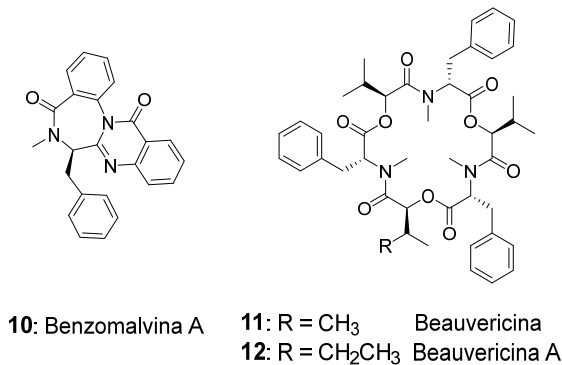


Figura 75. Metabolitos aislados a partir de *Beauveria* sp. ACA-13.

La benzomalvina A (**10**) es un metabolito poco común, ya que su aislamiento se ha reportado sólo en tres ocasiones [94,97,98], donde destaca por su actividad como inhibidor de la unión de la sustancia P a los receptores NK1 [94] y como inhibidor de enzimas α -glucosidasas [98]. Es interesante mencionar que este trabajo constituye el primer reporte de la obtención de un metabolito de este tipo a partir de una especie del género *Beauveria*, ya que en todos los estudios previos, se obtuvieron a partir de distintas cepas de *Aspergillus* [94,98-100]. Por otra parte, la beauvericina (**11**) y la beauvericina A (**12**) (**Figura 75**) son ciclohexadepsipéptidos producidos por una gran variedad de especies fúngicas y que han sido de gran interés para la industria farmacéutica y agroquímica debido a su importante actividad insecticida, antimicrobiana, antiviral, citotóxica, nematocida y antifúngica [101-103].

5.1.3 Estudio químico de *Gymnoascus hyalinusporus* ACA-16.

A partir del hongo *G. hyalinusporus* ACA-16 se obtuvieron cuatro metabolitos, los compuestos conocidos beauvericina (**11**), 4-*O*-metil éter de alternariol (**13**), alternariol (**14**) y el compuesto novedoso 10-*O*-[β -D-(4'-metoxi-glucopiranosil)]-4-*O*-metil-alternariol (**15**) (**Figura 76**). La elucidación estructural de los compuestos conocidos se realizó con base en la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos (**Figura A 19-A 20** y **Tabla A 1**) con los descritos en la literatura [95,104,105].

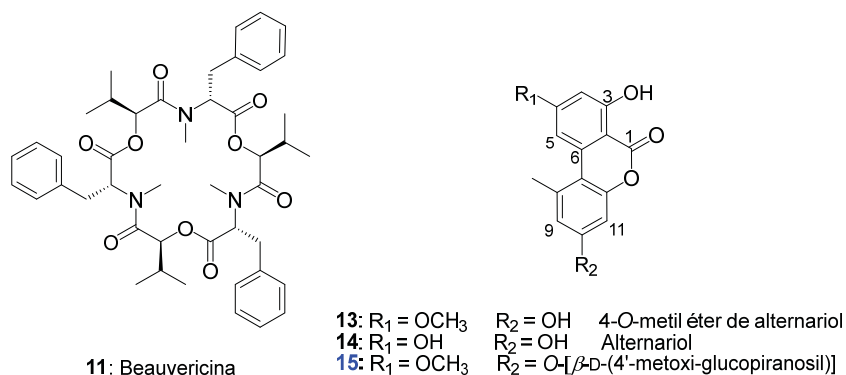


Figura 76. Metabolitos aislados de *G. hyalinosporus* ACA-16.

Cabe destacar que el 4-*O*-metil éter de alternariol (**13**) y el alternariol (**14**) fueron las primeras dibenzo- α -pironas sustituidas aisladas de origen fúngico [106]. Son micotoxinas muy comunes, frecuentemente encontradas en alimentos y como contaminantes en productos derivados de granos, producidos por distintas cepas de *Alternaria tenuis* [106]. Estos productos son carcinogénicos y mutagénicos, y dicha actividad está ligada al consumo de granos contaminados [107,108]. Estos metabolitos también son citotóxicos [109,110], generadores de ERO's que ocasionan daño en el ADN [109,111], modifican también la morfología de los macrófagos [108] y tienen actividad antibacteriana [112].

Por otra parte, el compuesto **15** (**Figura 76**) fue aisló como un sólido amorfo blanco. La fórmula molecular se determinó como C₂₂H₂₅O₁₀ (IDH = 11), con base en el análisis de los espectros de RMN ¹H y ¹³C (**Tabla 22**) y de HRESIMS ([M+H]⁺ 449.1439 y [M-H]⁻ 447.1299) (**Tabla A 1**). Su perfil en el UV cualitativo, (**Figura 77**) fue muy parecido a los del 4-*O*-metil éter de alternariol (**13**) y del alternariol (**14**) y los datos de RMN ¹H y ¹³C (**Figuras 77-78**) confirmaron la presencia de un esqueleto carbonado similar, con la adición de una unidad de 4-*O*-metil-D-glucopiranososa en la posición 10: en δ_C 102.0 se observa el carbono anomérico, además de cinco señales correspondientes a metinos oxigenados (δ_C 80.8, 78.5, 78.1, 75.4, 62.1) y una señal correspondiente a un grupo metoxilo (δ_C 61.1) [105,113-115].

El sitio de unión de la unidad sacárida así como la posición del grupo metoxilo dentro de la misma, se dedujeron mediante las correlaciones observadas en el espectro de HMBC: H-1' (δ_H 5.70) con C-10 (δ_C 159.1) y H-4' (δ_H 3.93) con CH₃O-4' (δ_C 61.1), respectivamente (**Figuras 79** y **A 22**).

Tabla 22. Datos de espectroscópicos del 10-*O*-[β-D-(4'-metoxi-glucopiranosil)]-4-*O*-metil-alternariol^a (**15**).

Posición	δ_C	Tipo	δ_H , mult. (J en Hz)
1	100.3	C	
2	166.0	C	
3	100.4	CH	6.82, d (2.2)
4	167.2	C	
5	105.3	CH	7.29, d (2.2)
6	139.2	C	
7	112.6	C	
8	138.5	C	
9	119.1	CH	7.07, d (2.6)
10	159.1	C	
11	103.8	CH	7.25, d (2.7)
12	153.7	C	
13	166.0	C	
1'	102.0	CH	5.70, d (7.8)
2'	75.4	CH	4.32, dd (9.0, 7.8)

3'	78.5	CH	4.41, t (9.0)
4'	80.8	CH	3.93, dd (9.4, 9.0)
5'	78.1	CH	4.02, m
6'	62.1	CH ₂	4.36, dd (12.3, 2.0) 4.24, dd (12.3, 4.7)
CH ₃ O-4	56.2	CH ₃	3.81, s
CH ₃ O-4'	61.1	CH ₃	3.90, s
CH ₃ -8	25.8	CH ₃	2.66, s

^αpiridina-*d*₅, 500 MHz.

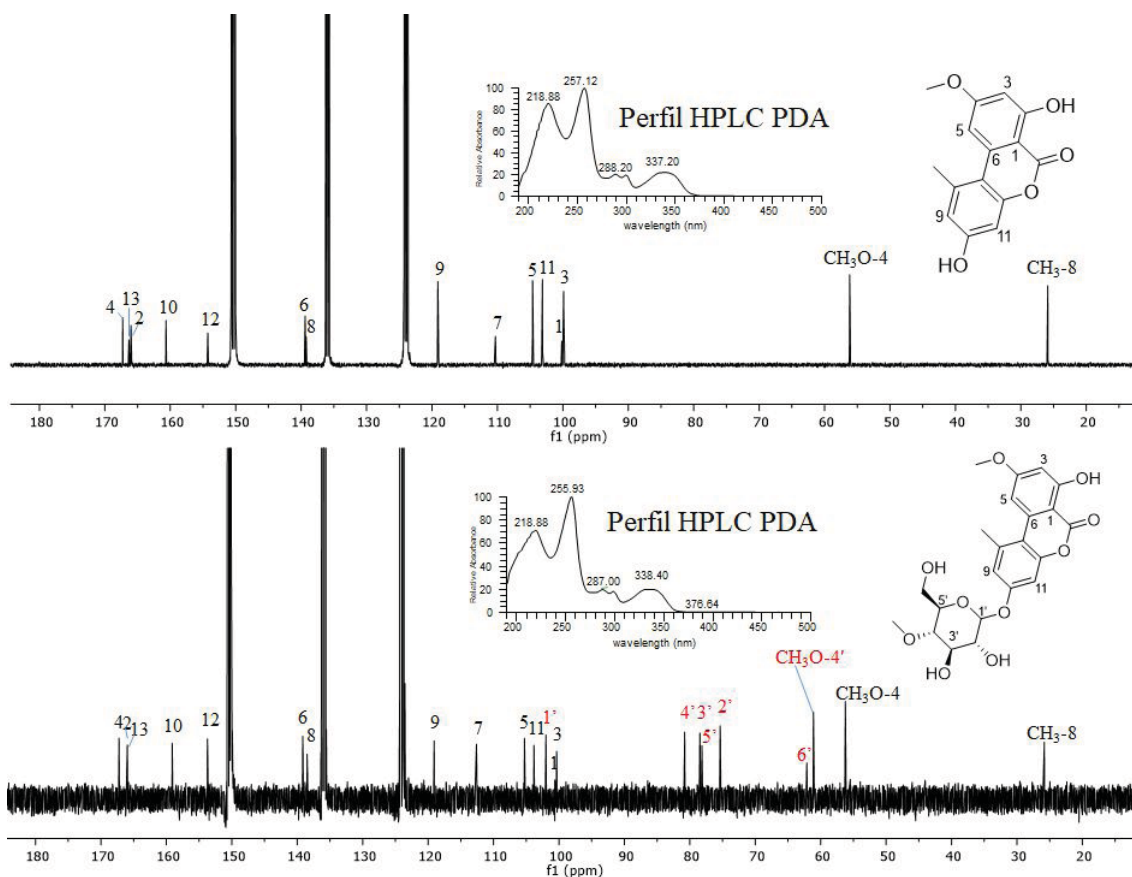


Figura 77. Comparación de espectros de ¹³C y perfiles UV/Vis cualitativos de los compuestos **13** (arriba) y **15** (abajo) (piridina-*d*₅, 100 y 125 MHz, respectivamente). Las señales correspondientes a la unidad de metil hexosa se muestran en rojo.

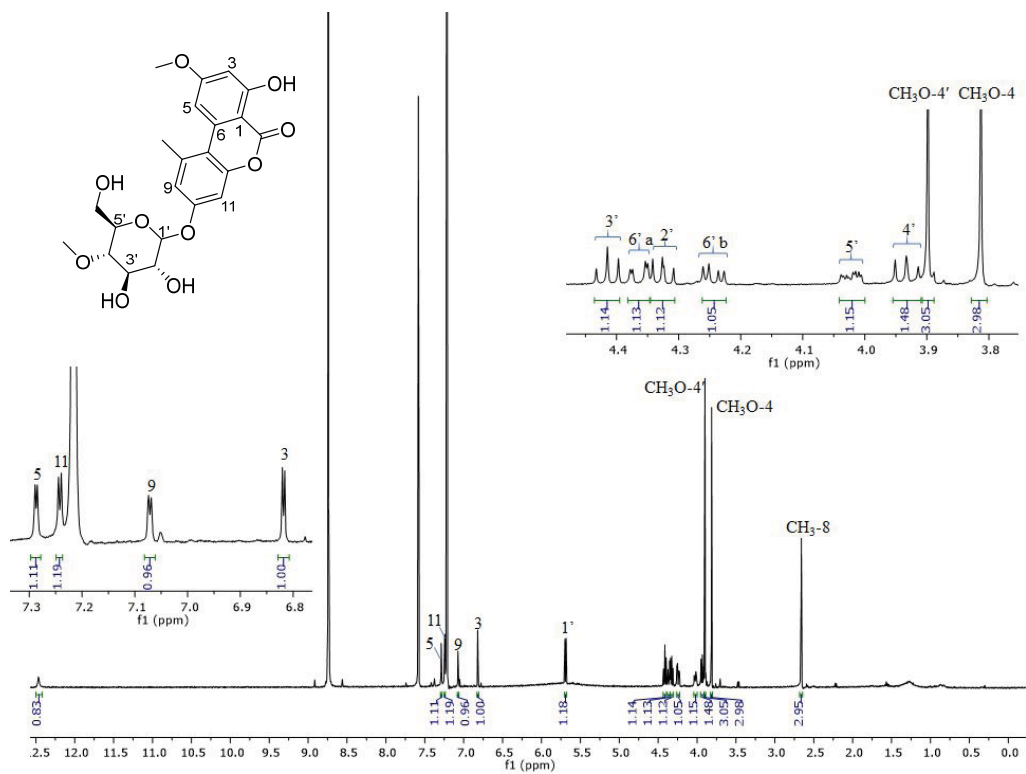


Figura 78. Espectro de RMN ^1H del compuesto **15** (piridina- d_5 , 500 MHz).

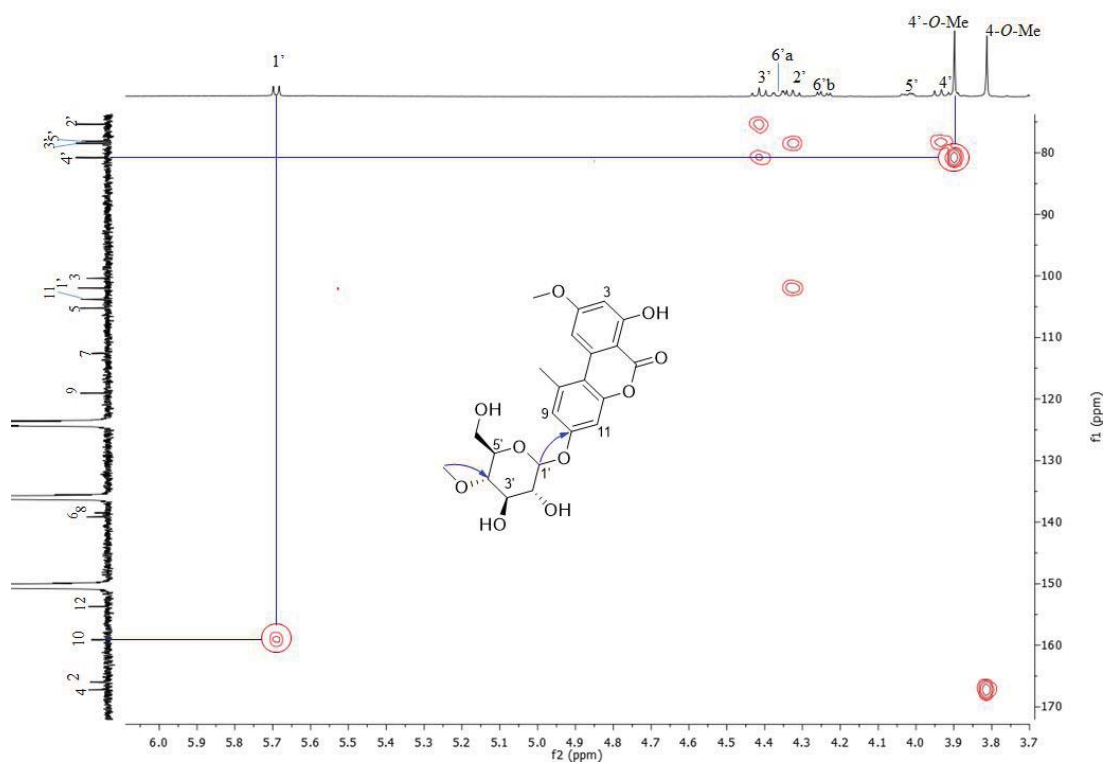


Figura 79. Ampliación del espectro HMBC (f1: 175-75 ppm, f2: 6.8-3.7 ppm) del compuesto **15**, mostrando correlaciones clave.

Además, el espectro COSY (**Figura 80**) permitió establecer la secuencia de unión del residuo de azúcar y la configuración relativa del mismo, junto con el análisis las constantes de acoplamiento y con las correlaciones NOESY (**Tabla 22**). Finalmente, la configuración D del residuo β -D-4'-metoxi-glucopiranosil se determinó mediante la comparación de las rotaciones ópticas específicas del producto de hidrólisis ácida soluble en agua ($[\alpha]_D^{25} +25$, c 0.08, MeOH) con el de la 4-O-metil-D-glucopiranososa ($[\alpha]_D^{25} +80$, c 1.30, MeOH) [80]. Adicionalmente, el espectro de RMN ^1H de la aglicona obtenida de la hidrólisis anterior, fue idéntica al del 4-O-metil éter de alternariol (**13**) (**Figura A 21**).

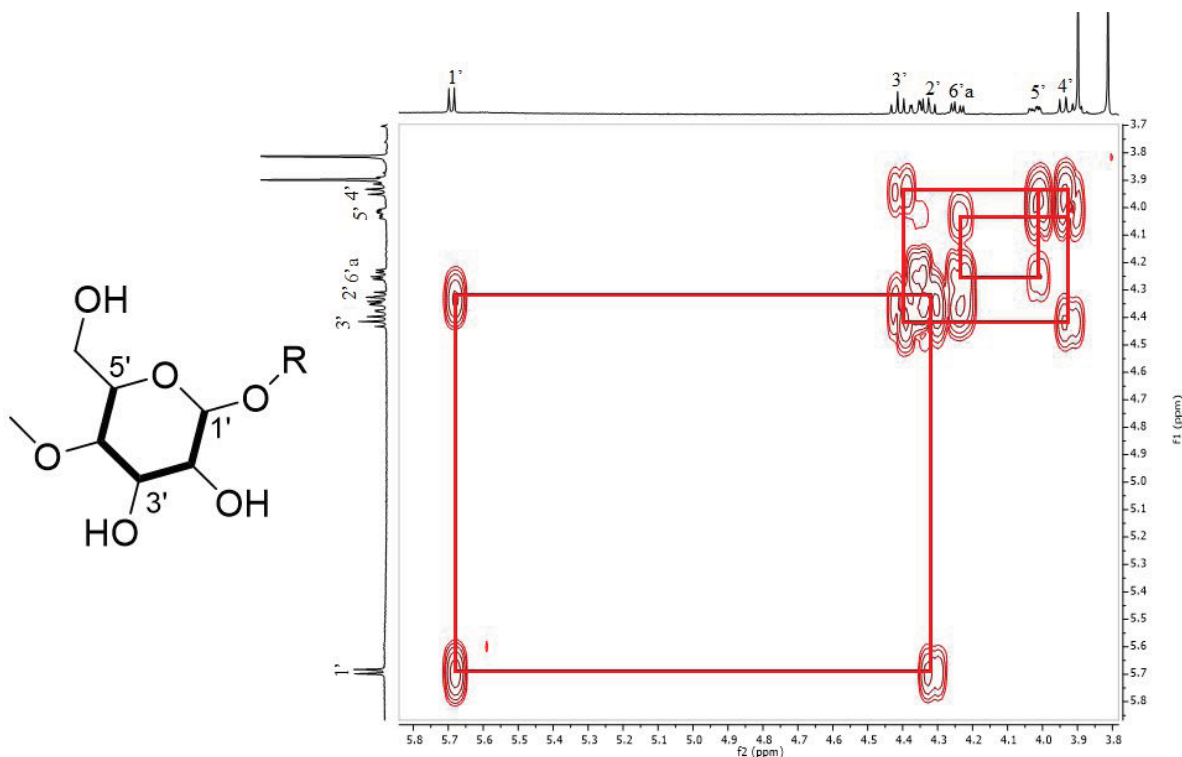


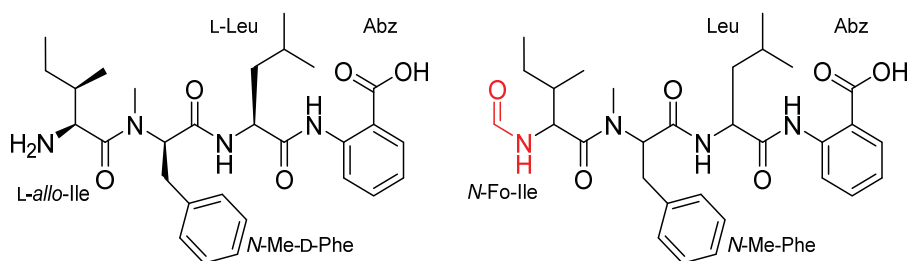
Figura 80. Ampliación del espectro COSY (f1, f2 = 5.8 – 3.8 ppm) del compuesto **15**, mostrando la secuencia de unión de la metil hexosa.

El compuesto **15** fue evaluado frente a un panel de líneas celulares de melanoma (MDA-MB-435), cáncer de mama (MDA-MB-231) y de ovario (OVCAR3) resultando inactivo ($\text{IC}_{50} < 25 \mu\text{M}$). De la misma forma, se evaluó su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de *A. hypocondriacus*, resultando también inactivo (% de inhibición $< 10\%$). Es importante señalar que este trabajo representa el primer estudio químico de la especie *G. hyalinosporus*, además, todos los compuestos aislados e identificados son nuevos para este género [116-122].

5.1.4 Estudio químico de *Simplicillium obclavatum* ACA-17.

A partir de esta especie fúngica se logró el aislamiento y la caracterización de dos compuestos, el ácido hirsutílico A (**16**) y un derivado novedoso, designado con el nombre trivial de ácido *N*-formil hirsutílico A (**17**). La elucidación estructural de **16** se realizó mediante la comparación de sus datos de RMN (**Figura A 23**) y de HRESIMS (**Tabla A 1**) con los descritos en la literatura [95]. Cabe destacar que **16** fue reportado en 2005 a partir del hongo entomopatógeno *Hirsutella* sp. BC 1528 [123], y presentó actividad antimalárica sobre *Plasmodium falciparum* K1 ($\text{CI}_{50} = 8 \mu\text{M}$) y baja citotoxicidad sobre células VERO ($\text{CI}_{50} = 95 \mu\text{M}$). Asimismo, **16** inhibió la proteína tirosina fosfatasa B de *Mycobacterium tuberculosis* (MtpB) y mostró actividad antifúngica [64].

Es importante señalar que este es el tercer reporte de la obtención de este metabolito [64,123] y son pocas las actividades biológicas que se han establecido, por lo que su potencial biológico aún está pendiente por explorar.



16: Ácido hirsutético A

17: Ácido *N*-formil hirsutético A

Figura 81. Compuestos aislados de *S. obclavatum* ACA-17.

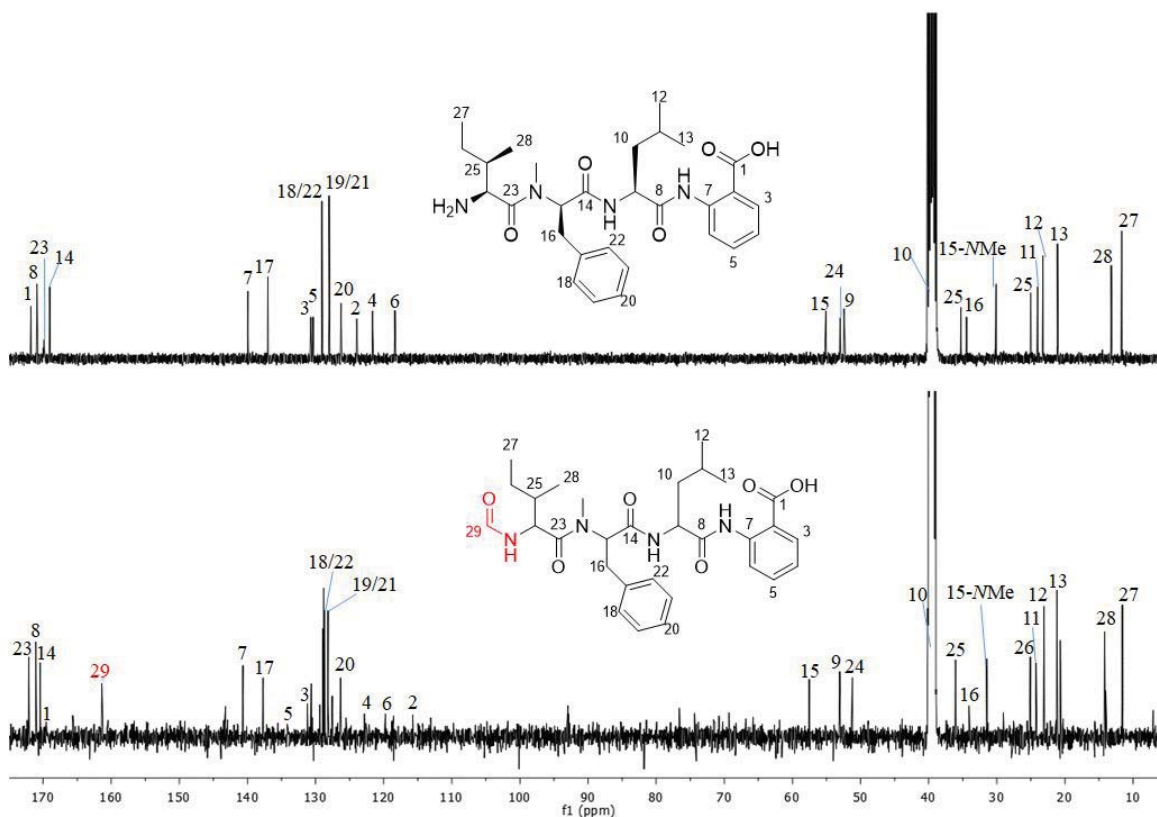


Figura 82. Comparación de espectros de RMN ^{13}C del ácido hirsutético A (16) (arriba) y del ácido *N*-formil hirsutético A (17) (abajo) (DMSO- d_6 , 100 y 125 MHz, respectivamente).

El compuesto 17 (Figura 81) se obtuvo como un sólido amarillo. Su fórmula molecular determinó como $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_7$ (IDH = 13), con base en el análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Tabla 23) y HRESIMS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 553.2999 y $[\text{M}-\text{H}]^-$ 551.2862) (Tabla A 1). Este producto mostró 28 unidades

de masa más que el compuesto 16, y que se atribuye a la adición de un grupo carbonilo en la molécula. Los datos de RMN 1D y 2D mostraron también semejanza con los del compuesto 16 (Figura 82), revelando su naturaleza

peptídica. La aparición de una señal en δ_C 161.4, la cual correlaciona con un protón en δ_H 7.93 en el espectro HSQC (**Figuras 82 y A 24**) es coherente con la presencia de un grupo aldehído de tipo formamida.

Tabla 23. Datos espectroscópicos del ácido *N*-formil hirsutólico A^a (**17**).

Posición	δ_C	Tipo	δ_H , mult, (J en Hz)	COSY	TOCSY	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
Abz						
1	169.5	C	-			
2	116.4	C	-			
3	131.2	CH	7.99, dd (8.0, 1.6)	4	4, 5, 6	1, 5, 7
4	122.8	CH	7.14, m	3, 5	3, 5, 6	2, 6
5	134.2	CH	7.58, dd (8.5, 8.0)	4, 6	3, 4, 6	3, 7
6	119.7	CH	8.53, dd (8.5, 1.0)	5	3, 4, 5	2, 4
7	140.7		-			
Leu						
8	171.1	C	-			
9	53.1	CH	4.34, ddd (11.3, 7.6, 4.6)	9-NH, 10	9-NH, 10, 11, 12, 13	
9-NH			8.10, d (7.6)	9	9, 10, 11, 12, 13	14,
10	39.6	CH ₂	a. 1.73, ddd (13.5, 11.3, 4.7) b. 1.64, ddd (13.5, 11.3, 4.7)	9, 11	9, 9-NH, 11, 12, 13	9, 13 12, 9
11	24.2	CH	1.47, m	10, 12, 13	9, 9-NH, 10, 12, 13	
12	23.1	CH ₃	0.89, d (6.4)	11	9, 9-NH, 10, 11, 13	10, 11, 13
13	21.2	CH ₃	0.86, d (6.4)	11	9, 9-NH, 10, 11, 12	10, 11, 12
<i>N</i> -Me-Phe						
14	170.4	C	-			
15	57.5	CH	5.51, dd (12.1, 4.5)	16	16	15 <i>N</i> -CH ₃ , 14
16	34.1	CH ₂	3.35, m	15	15	18, 22
15- <i>N</i> CH ₃	31.5	CH ₃	3.00, dd (13.9, 12.1)	15		18, 22
17	137.7	C	2.98, s			23
18/22	128.7	CH	7.23, m		19/21, 20	16
19/21	128.8	CH	7.23, m		18/22, 20	17, 19/21
20	126.4	CH	7.18, m	19/21, 22	18/22, 19/21	18, 22
<i>N</i> -formil-Ile						
23	172.1	C	-			
24	51.2	CH	4.51, dd (13.9, 6.5)	24-NH, 25	24-NH, 25, 26, 27, 28, 29	23, 25, 28, 29
24-NH			8.30, d (7.9)	24	24, 25, 26, 27, 28, 29	29
25	36.1	CH	1.16, m	24, 26, 28	24, 24-NH, 26, 27, 28, 29	
26	25.1	CH ₂	0.70, m	25, 27	24, 24-NH, 25, 27, 28, 29	
			0.62, m			
27	11.6	CH ₃	0.63, m	26	24, 24-NH, 25, 26, 28, 29	25, 26
28	14.2	CH ₃	0.47, d (6.7)	25	24, 24-NH, 25, 26, 27, 29	24, 25, 26
29	161.4	CH	7.93, bs		24, 24-NH, 25, 26, 27, 28	

^aDMSO-*d*₆, 500 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C.

Por otra parte, el análisis detallado de los espectros de RMN 2D (**Figuras A 25-A26**) permitió identificar los fragmentos de ácido antranílico (Abz), Leu y *N*-Me-Phe, en la misma secuencia que en **16**; asimismo, se dedujo que **17** cuenta un residuo de Ile en su extremo *N*-terminal, con el aldehído antes mencionado y que correlaciona en el espectro HMBC con el grupo 24-NH (δ_H 8.30) (**Figura 84**).

La configuración relativa de **17** se estableció mediante el análisis del espectro NOESY que se indica en la **Figura 85**. Lamentablemente, la configuración absoluta de **17** no pudo establecerse debido a la escasa cantidad de producto aislado. El reaislamiento de este compuesto se encuentra en proceso.

Vale la pena señalar que en estudios anteriores de *S. obclavatum*, se aislaron polipéptidos lineares similares a **16** y **17** [63,64].

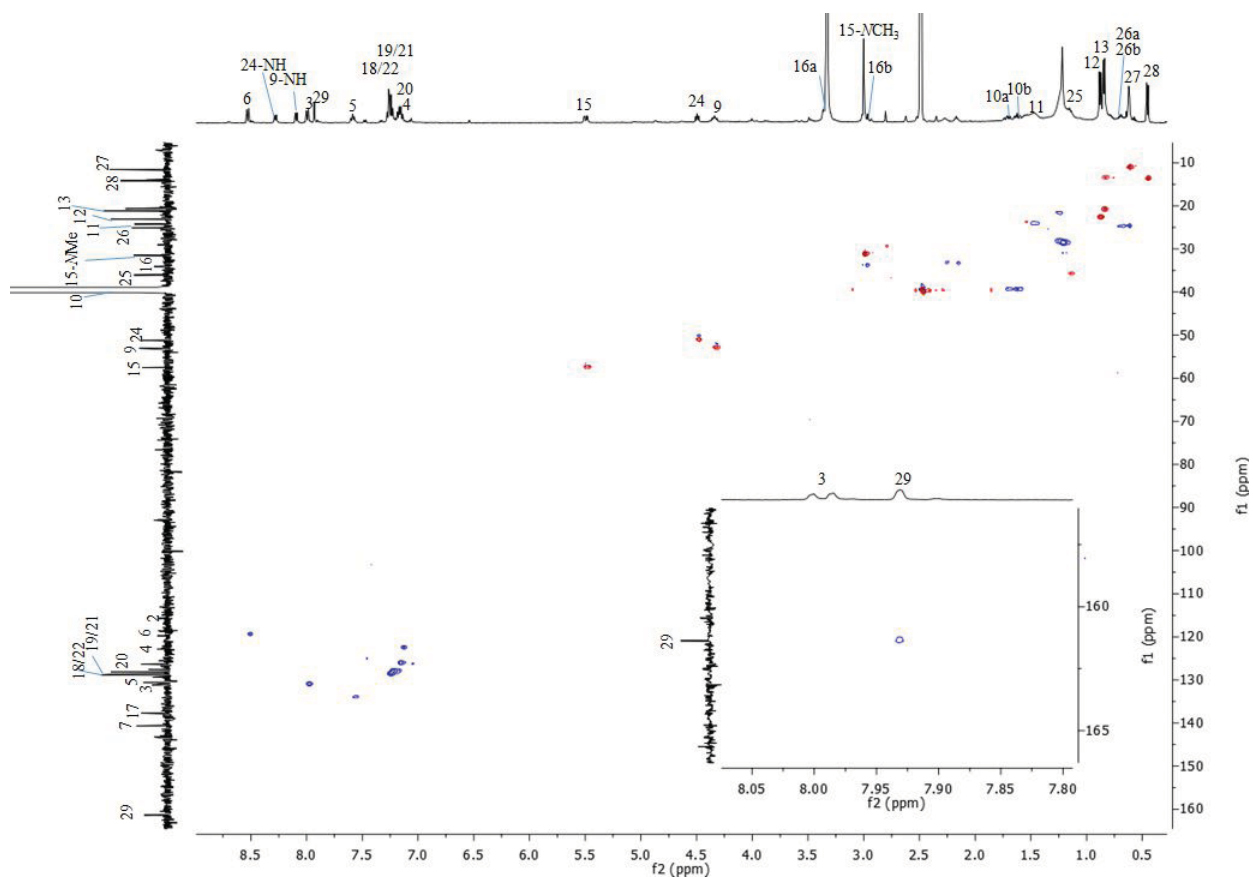


Figura 83. Espectro HSQC del compuesto **17**.

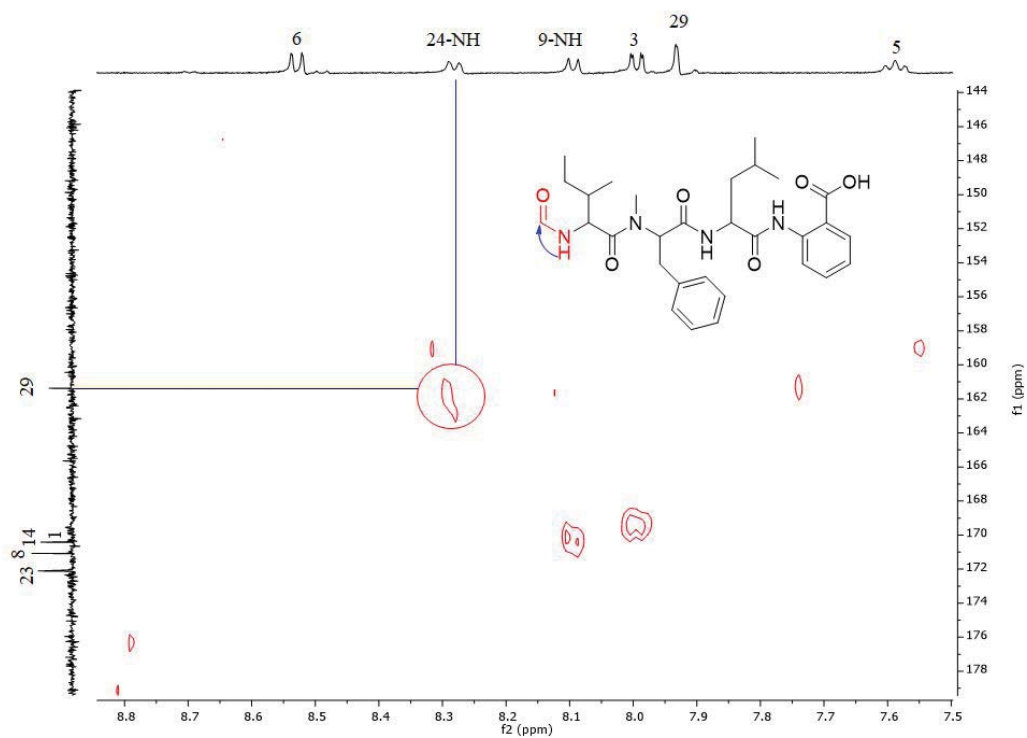


Figura 84. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **17** (f1: 179 – 144 ppm, f2: 9.2 -7.5 ppm), mostrando correlaciones clave.

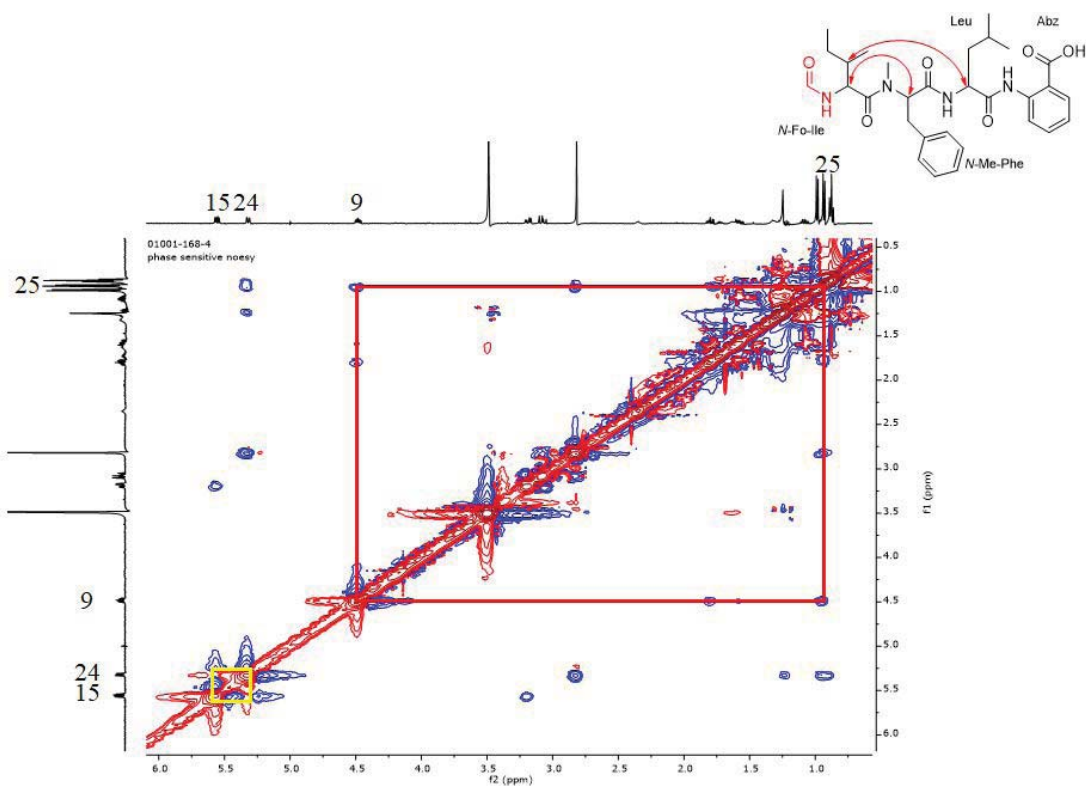
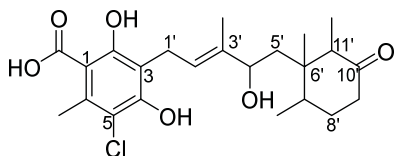


Figura 85. Ampliación del espectro NOESY del compuesto **17**, mostrando correlaciones clave.

5.1.5 Estudio químico de *Acremonium* sp. ACA-4.

El compuesto **18** fue obtenido como un sólido blanco. La fórmula molecular se determinó como C₂₃H₃₁ClO₆ (IDH = 8), con base en el análisis de los espectros de RMN ¹H y ¹³C (**24**) y HRESIMS ([M+H]⁺ 439.1845 y [M-H]⁻ 437.1740) (**Tabla A 1**). Cabe mencionar que en los espectros de HRESIMS se observó el conjunto isotópico correspondiente a la presencia de un átomo de cloro.



18: Ácido 4', 5'-dihidro-4'-hidroxiascoclorínico

Tabla 24. Datos espectroscópicos del ácido 4',5'-dihidro-4'-hidroxiascoclorínico^a (**18**).

Posición	δ_c	Tipo	δ_H mult. (J en Hz)
1	117.8,	C	
2	163.2,	C	
3	114.6,	C	
4	163.2,	C	
5	112.4,	C	
6	139.2,	C	
2-OH			^b
4-OH			^b
7	14.6,	CH ₃	2.51, m
1'	22.5,	CH ₂	3.49, dd (13.5, 9.0) 3.26, dd (13.0, 6.3)
2'	126.2,	CH	5.63, m
3'	138.8,	C	
4'	75.5,	CH	4.23, dd (7.8, 4.8)
5'	41.8,	CH ₂	1.62, dd (14.9, 7.9) 1.51, m
6'	44.8,	C	
7'	37.2,	CH	2.20, m
8'	32.1,	CH ₂	1.75, m 1.47, m
9'	42.4,	CH ₂	2.04, m 2.01, m
10'	216.8,	C	
11'	51.2,	CH	2.55, dd (13.2, 6.6)
12'	8.8,	CH ₃	0.71 (6.7)
13'	16.3,	CH ₃	0.49, s
14'	15.8,	CH ₃	0.96, d (6.7)
15'	11.2,	CH ₃	1.83, s
16'	173.6,	C	9.87, s

^aCD₃OD, 700 y 175 MHz, respectivamente. ^bNo se observan.

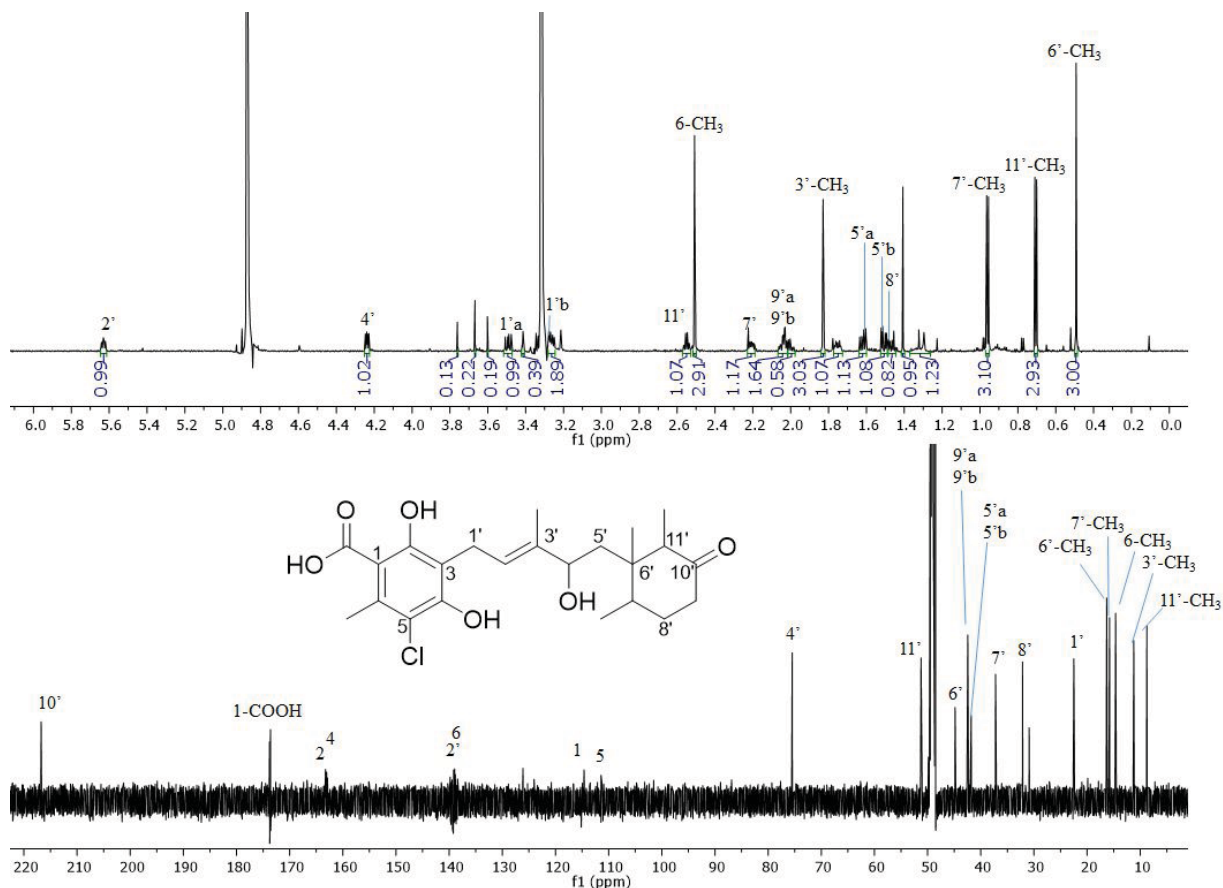


Figura 86. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **18** (CD_3OD , 700 y 175 MHz, respectivamente).

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Figura 86**) del compuesto **18** mostraron gran similitud con el compuesto conocido 4',5'-dihidro-4'-hidroxiasoclorina [124], sin embargo la diferencia de 16 umas más en **18**, y la presencia de un carbono de un ácido carboxílico en δ_{C} 173.6, son consistentes con la adición de un ácido carboxílico en lugar del grupo aldehído presente en la 4',5'-dihidro-4'-hidroxiasoclorina [124]. Debido a que esta señal en δ_{C} 173.6 aparece muy cerca de una señal de ruido del equipo en el espectro de RMN ^{13}C , se requiere de un espectro con mejor resolución, además del análisis de una derivatización de Mosher para determinar la configuración absoluta. El reaislamiento de cantidades adicionales de este compuesto se encuentra en proceso. Finalmente, se logró establecer la configuración relativa con base en las correlaciones observadas en el espectro NOESY (**Figura 87**) y fueron similares a las del compuesto conocido de tipo aldehído.

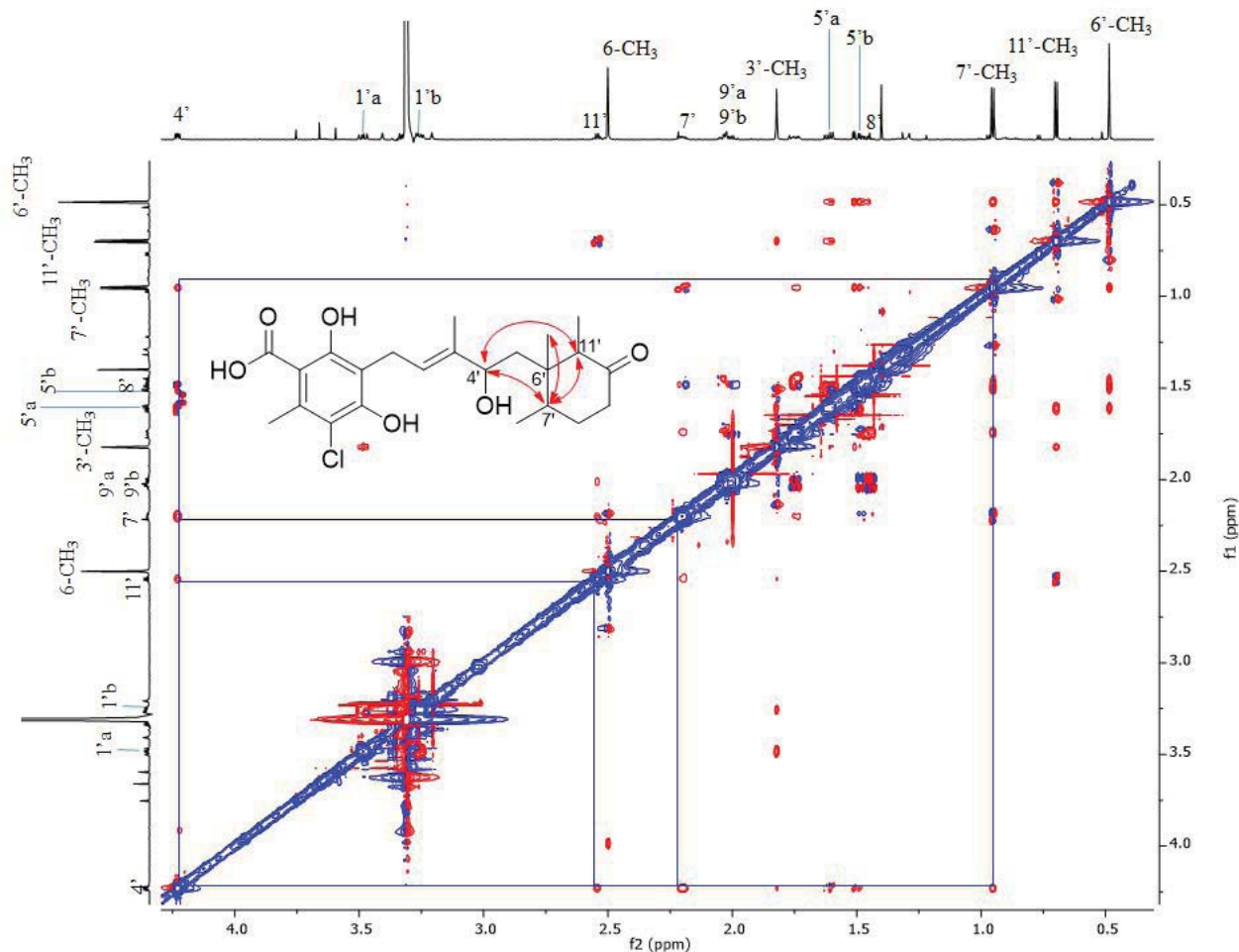


Figura 87. Ampliación del espectro NOESY (f1, f2: 0.5-4.6 ppm) del compuesto **18**, mostrando correlaciones clave.

5.1.6 Estudios químicos de las cepas *Trichomonascaceae* ACA-1, *Chrysosporium* sp. ACA-5, *Onygenales* ACA-11 y *Chrysosporium* sp. ACA-12.

Aplicando la metodología antes descrita (inciso 4.2), se obtuvieron los extractos de CHCl_3 -MeOH para cada cepa y se realizaron los respectivos fraccionamientos primarios por CF. Sin embargo, después de analizar todas las fracciones por HPLC, fue imposible purificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones debido a la escasez de material para este propósito, por lo que se propone continuar con el estudio químico de estas especies fúngicas en el futuro, modificando distintas variables de crecimiento.

5.2 Estudio químico de cepas de *Streptomyces* de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Los extractos orgánicos empleados para el aislamiento de los metabolitos a partir de *Streptomyces* sp. PR-35 fueron el de AcOEt y MeOH de la metodología 1 (**Figura 15 A**) y el de AcOEt de la metodología 2 (**Figura 15 B**). Todos los extractos se fraccionaron siguiendo la metodología descrita en la parte experimental y las fracciones resultantes se analizaron por HPLC a nivel analítico. Una vez establecidas las mejores condiciones de separación de las fracciones seleccionadas, estas se separaron mediante HPLC a nivel preparativo. Así, de estas fracciones se logró el aislamiento de los compuestos **19** al **26** y su caracterización se describe a continuación.

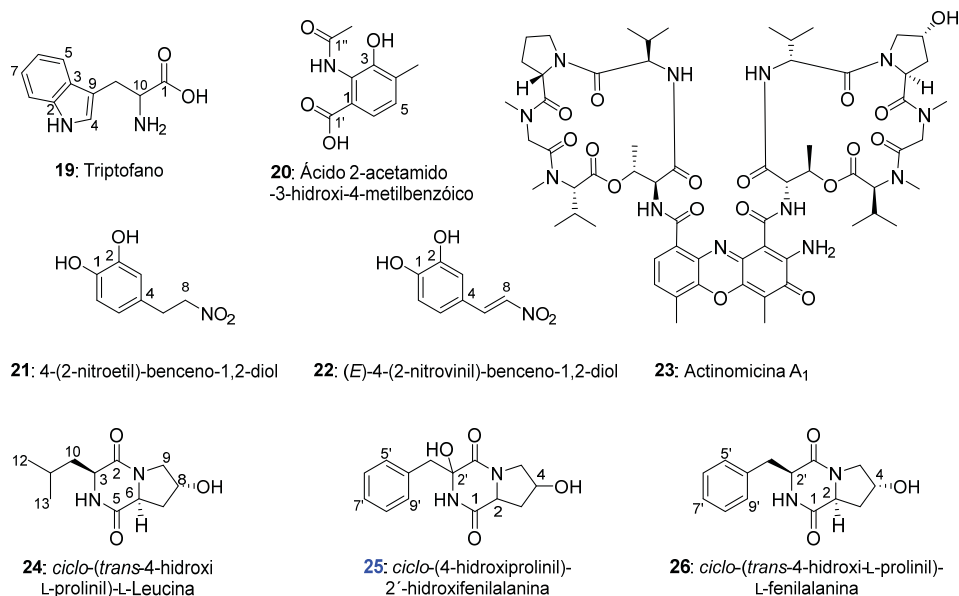


Figura 88. Compuestos aislados de *Streptomyces* sp. PR-35.

El compuesto **19** (**Figura 88**) se obtuvo como un sólido blanco. La fórmula molecular se determinó como $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (IDH = 7), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Figura 89**) y HRESIMS ($[M+H]^+$ 205.0970 y $[M-H]^-$ 203.0826) (**Tabla A 1**). Los datos antes mencionados fueron idénticos a descritos para el aminoácido triptófano [125]. Este aminoácido es el menos abundante de los 22 aminoácidos y forma parte de los nueve aminoácidos esenciales. Es importante mencionar que el triptófano es el precursor del neurotransmisor serotonina, la hormona melatonina y de la vitamina B3 [126]. Asimismo, se ha reportado también como un producto del metabolismo secundario de bacterias [127,128].

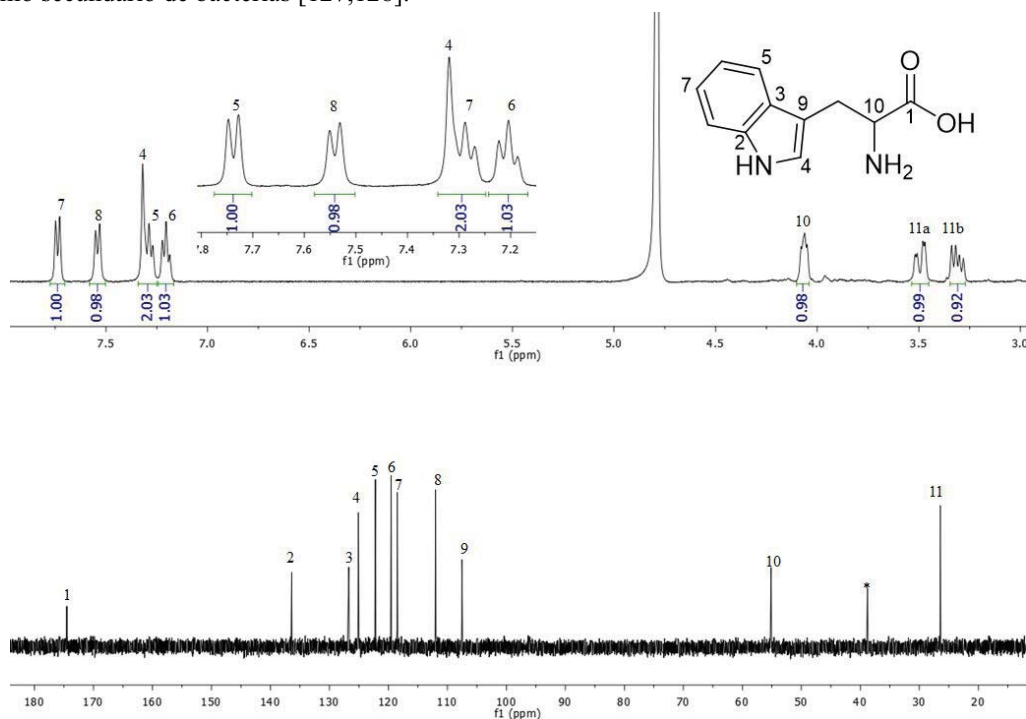


Figura 89. Espectros de RMN 1H y ^{13}C del compuesto **19** (D_2O , 400 y 100 MHz, respectivamente). *Impureza.

El compuesto **20** (**Figura 88**) se aisló como un sólido blanco. La fórmula molecular se determinó como $C_{10}H_{11}NO_4$ (IDH = 6), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Figura 90**) y HRESIMS ($[M+H]^+$ 210.0757 y $[M-H]^-$ 208.0611) (**Tabla A 1**). El espectro de RMN 1H (**Figura 90**) reveló la presencia de un sistema aromático tetrasustituido con 2H's vecinos (δ_H 7.05 y 7.01), y dos metilos, uno aromático (δ_H 2.11) y el otro unido a un grupo carbonilo de amida (δ_H 2.08). En el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 90**) se observaron seis señales correspondientes a un anillo aromático sustituido con dos heteroátomos (δ_C 122.5 y 129.7), y un ácido carboxílico (δ_C 127.9), además dos carbonilos, uno de amida (δ_C 173.9) y el otro de un ácido carboxílico (δ_C 174.4).

La estructura plana de este compuesto se confirmó mediante las correlaciones observadas en el espectro HMBC (**Figura A 32**). Una búsqueda exhaustiva en la literatura permitió establecer que el compuesto **20** se trataba del ácido 2-acetamido-3-hidroxi-4-metilbenzóico, mismo que ha sido aislado de cepas de *Streptomyces*. Sin embargo, fue imposible obtener los datos espectroscópicos de la literatura. Cabe destacar que este producto está relacionado con la producción del compuesto anticancerígeno aurantina, además de tener actividad como inhibidor de la 5 α reductasa, enzima involucrada en la biosíntesis de testosterona en humanos[129].

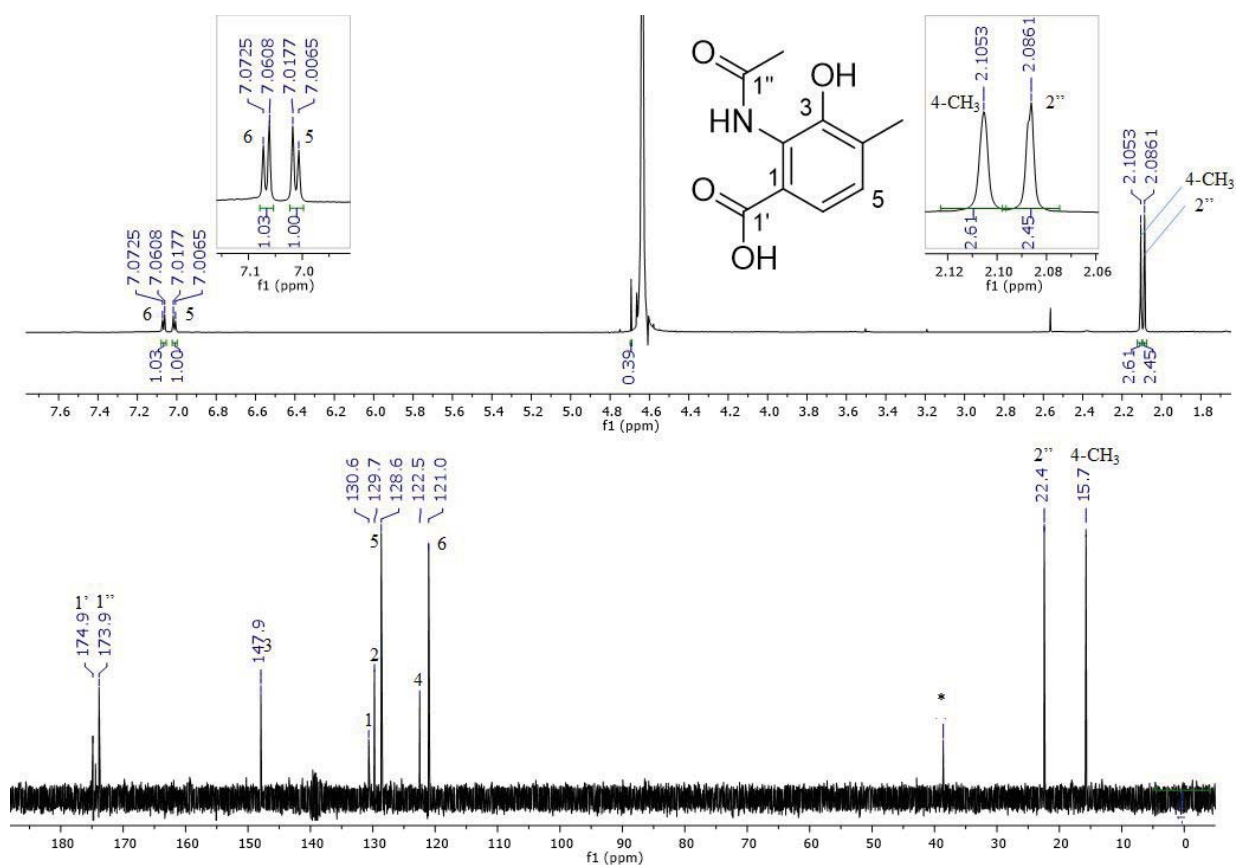


Figura 90. Espectros de RMN 1H y ^{13}C del compuesto **20** (D_2O , 700 y 175 MHz, respectivamente). *Impureza.

Los compuestos **21** y **22** (**Figura 88**) se obtuvieron como sólidos negros. Sus fórmulas moleculares se determinaron como $C_8H_9NO_4$ (IDH = 6) y $C_8H_7NO_4$ (IDH = 7), con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Figuras 90 y 91**) y HRESIMS (**21**: $[M+H]^+$ 184.0605 y $[M-H]^-$ 182.0455) (**22**: $[M+H]^+$ 182.9850 y $[M-H]^-$ 180.0301) (**Tabla A 1**). Los espectros de RMN 1H y ^{13}C fueron muy similares entre sí (**Figura 91**). La diferencia principal radica en el desplazamiento de H-7 y H-8 que en **21** pertenecen a hidrógenos de tipo alifático, mientras que en **22** se desplazan a

campos bajos (hidrógeno de tipo olefínico). El espectro de RMN ^{13}C (**Figura 92**) confirmó lo antes mencionado. La comparación de los datos descritos con los de la literatura científica reveló que estos productos corresponden a los catecoles 4-(2-nitroetil) benceno-1,2-diol (**21**) y (*E*)-4-(2-nitrovinil) benceno-1,2-diol (**22**) [130,131].

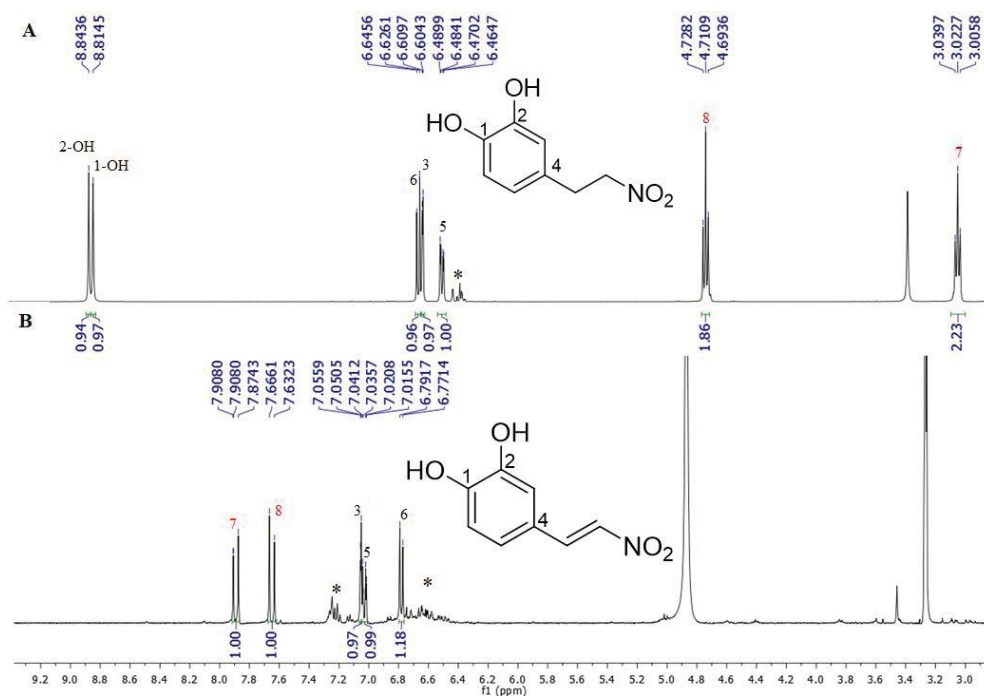


Figura 91. Comparación de espectros de RMN ^1H para los compuestos **A) 21** y **B) 22** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ y CD_3OD , respectivamente). *Impureza.

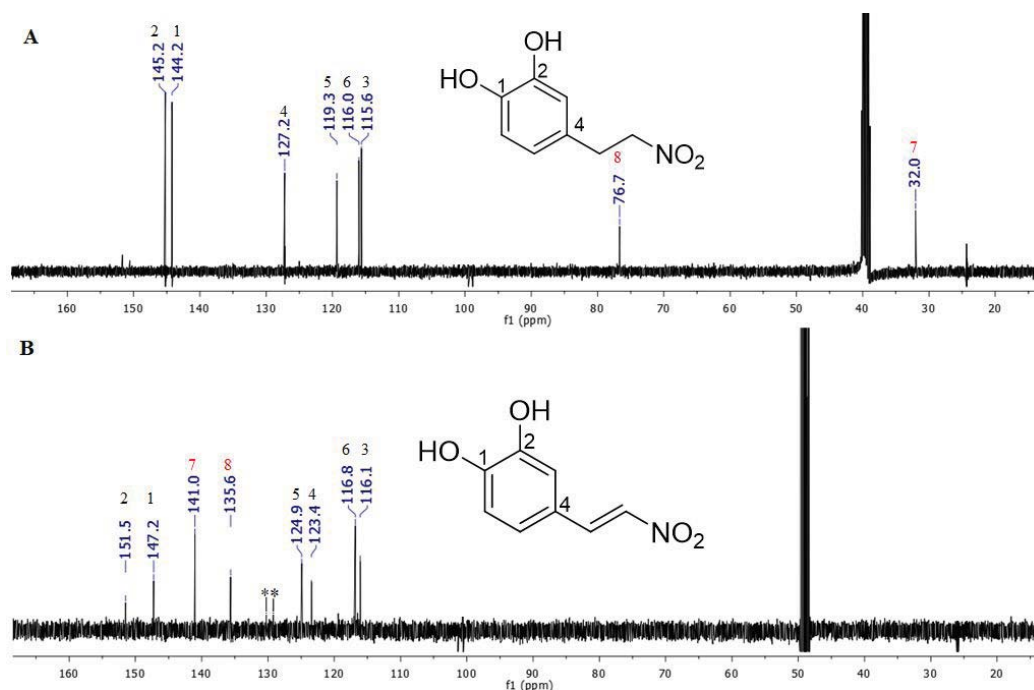


Figura 92. Comparación de espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **A) 21** y **B) 22** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ y CD_3OD , respectivamente). *Impureza.

El compuesto **21** ha mostrado buena actividad inhibitoria de la 5-lipooxigenasa en una línea celular de leucemia de rata (RBL-1) ($CI_{50} = 3.7 \mu M$), asimismo, no mostró toxicidad aguda ($DL > 200 \text{ mg/kg}$, dosis única) en ratones, administrados por vía oral, siendo propuesto como un candidato para ser considerado como agente terapéutico y/o preventivo de enfermedades alérgicas, como el asma bronquial, enfermedades reumáticas, psoriasis y varios tipos de enfermedades inflamatorias [131]. Por otra parte, el compuesto **22**, ha mostrado actividad antimicrobiana [130] contra *Streptococcus pyogenes* y *Brucella abortus* y contra algunos hongos dermatofitos, y citotóxico contra células de leucemia (L1210). También ha resultado ser inhibidor de la actividad de tirosina-quinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico en queratinocitos epidérmicos de ratón Balb/MK [132] y de la proteína p56, específica de linfocitos [133], siendo ambas, actividades esenciales en los procesos de proliferación y activación, respectivamente.

Los metales de transición, como el hierro, juegan un papel importante en el metabolismo de diferentes microorganismos y en muchas ocasiones, la baja concentración de estos metales en el ambiente complica su aprovechamiento por parte los microorganismos [134]. En respuesta a lo anterior, los microorganismos han desarrollado varias herramientas para aprovechar estos metales y en el caso del hierro, algunos microorganismos marinos, como los pertenecientes al género *Streptomyces*, han logrado producir compuestos que contienen uno o varios residuos de tipo catecol. Estos compuestos catecolicos son relevantes debido a que pueden funcionar como sideróforos [135], actividad particularmente importante si se considera que *Streptomyces* sp. PR-35 fue aislado de un ecosistema oligotrófico [136].

El compuesto **23** (**Figura 88**) se obtuvo como un sólido anaranjado y su elucidación estructural se realizó de forma tentativa por comparación de su valor de masa observado por HRESIMS en una relación m/z de 1271.6219 (**Tabla A 1**), y sus perfiles de UV/Vis característicos (**Tabla A 2**), con los descritos en la literatura [137]. La espectroscopía por RMN 1D y 2D colectada en los equipos disponibles (400 y 500 MHz) no fue concluyente, ya que se requieren espectros de mayor calidad.

Las actinomicinas son una familia de compuestos obtenidos de diversas cepas de actinobacterias, y están conformados por dos depsipéptidos pentacíclicos unidos a un cromóforo de fenoxazina. Estos compuestos son agentes intercalantes del ADN. Se han reportado más de 41 actinomicinas cuyas variaciones principales se encuentran en la porción peptídica [138]. El análogo deshidroxilado de **23** conocido como actinomicina D, es empleado como agente terapéutico en el tratamiento del tumor de Wilms [139], rhabdomyosarcoma [140], sarcoma de Ewing [141] y de neoplasias trofoblásticas de alto riesgo [142].

Los compuestos **24** y **25** (**Figura 88**) se obtuvieron como sólidos blancos y **26** se aisló como un sólido amarillo. Las fórmulas moleculares de los compuestos se determinaron como $C_{11}H_{18}N_2O_3$ (IDH = 4) para **24**, $C_{14}H_{16}N_2O_4$ (IDH = 5) para **25** y $C_{14}H_{16}N_2O_3$ (IDH = 5) para **26**, con base en el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Figuras 93-94** y **A 31**) y HRESIMS (**24**: $[M+H]^+$ 227.1386; **25**: $[M+H]^+$ 277.1178 y $[M-H]^-$ 275.1039; **26**: $[M+H]^+$ 261.1128 y $[M-H]^-$ 259.1086) (**Tabla A 1**). El análisis detallado de sus espectros de RMN permitió identificar a **24** y **26** como los dipéptidos *ciclo-(trans-4-hidroxi-L-prolinil)-L-leucina* y *ciclo-(trans-4-hidroxi-L-prolinil)-L-fenilalanina*, respectivamente. [143,144].

Por otra parte, **25** mostró 16 umas más que **26**, y esta diferencia se debe a la presencia de un grupo hidroxilo en posición 2' del residuo de fenilalanina. Los datos de RMN confirmaron que el protón en H-2' (δ_H 4.58) desaparece en **25** y el C-2' (δ_C 57.6) en **26**, se desplaza a campos más bajos (δ_C 85.8) en **25**. Vale la pena señalar que la introducción de grupos hidroxilo en posiciones α a los grupos carbonilo de un anillo dioxopiperazidínico ya ha sido documentada con anterioridad y los desplazamientos químicos de estas posiciones son congruentes con lo propuesto para C-2' del compuesto **25** [145-147]. Las correlaciones que permitieron establecer la estructura plana final de **25** se muestran en la **Figura A 33**.

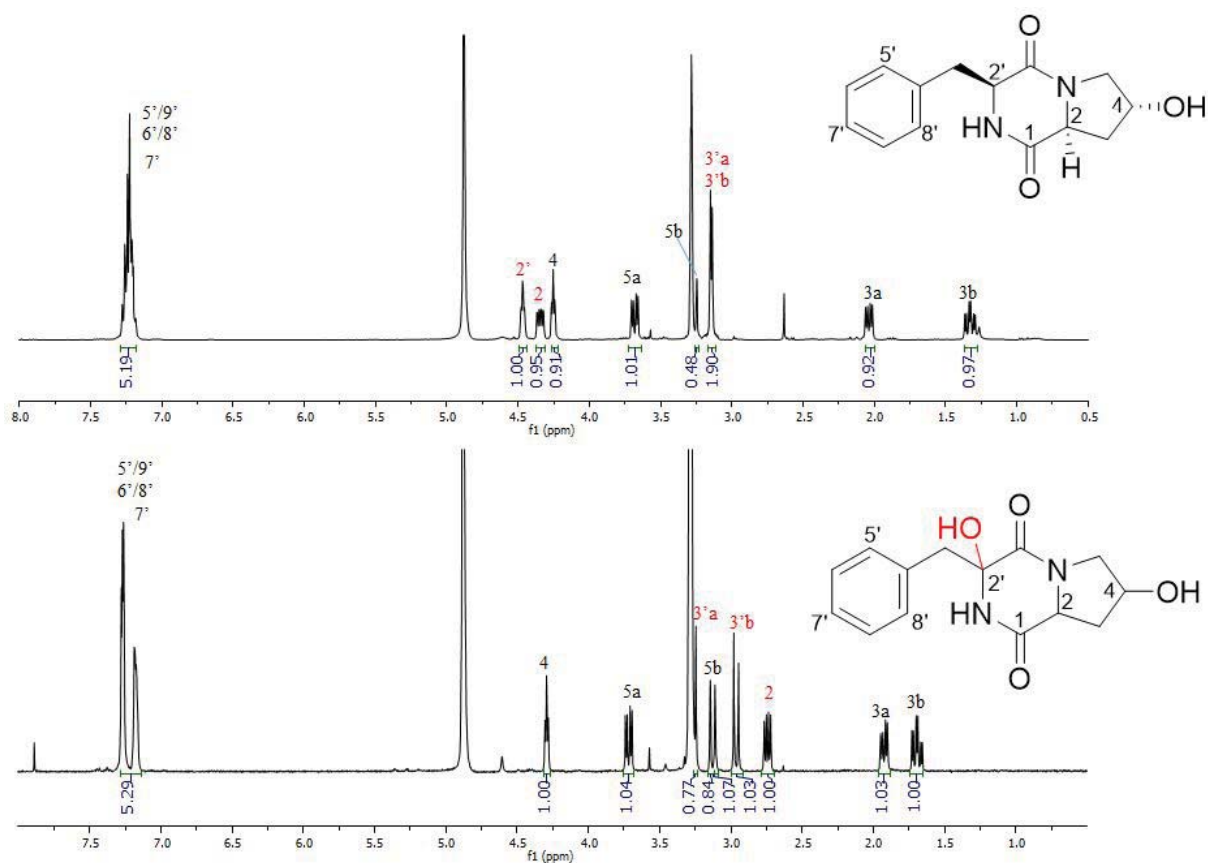


Figura 93. Comparación de espectros de RMN ^1H para los compuestos **25** (abajo) y **26** (arriba) (CD_3OD , 400 MHz).

Los compuestos **24** y **26**, se obtuvieron inicialmente de piel de conejo [148] y fueron de las primeras dioxopiperazinas con hidroxiprolina aisladas de una bacteria marina, resultando promotores de la germinación de arroz y de semillas de lechuga [143] y protectores contra distintas condiciones de estrés ambiental [148,149].

El compuesto **26** ha sido obtenido de hongos y bacterias y en trabajos recientes, se encontró que funciona como molécula señalizadora para la activación de genes biosintéticos, mediando así en la biosíntesis del metabolito bacteriano heronapirrol B en un cocultivo entre *Aspergillus* sp. CMB-StM0423 y *Streptomyces* sp. CMB-M0423 [144].

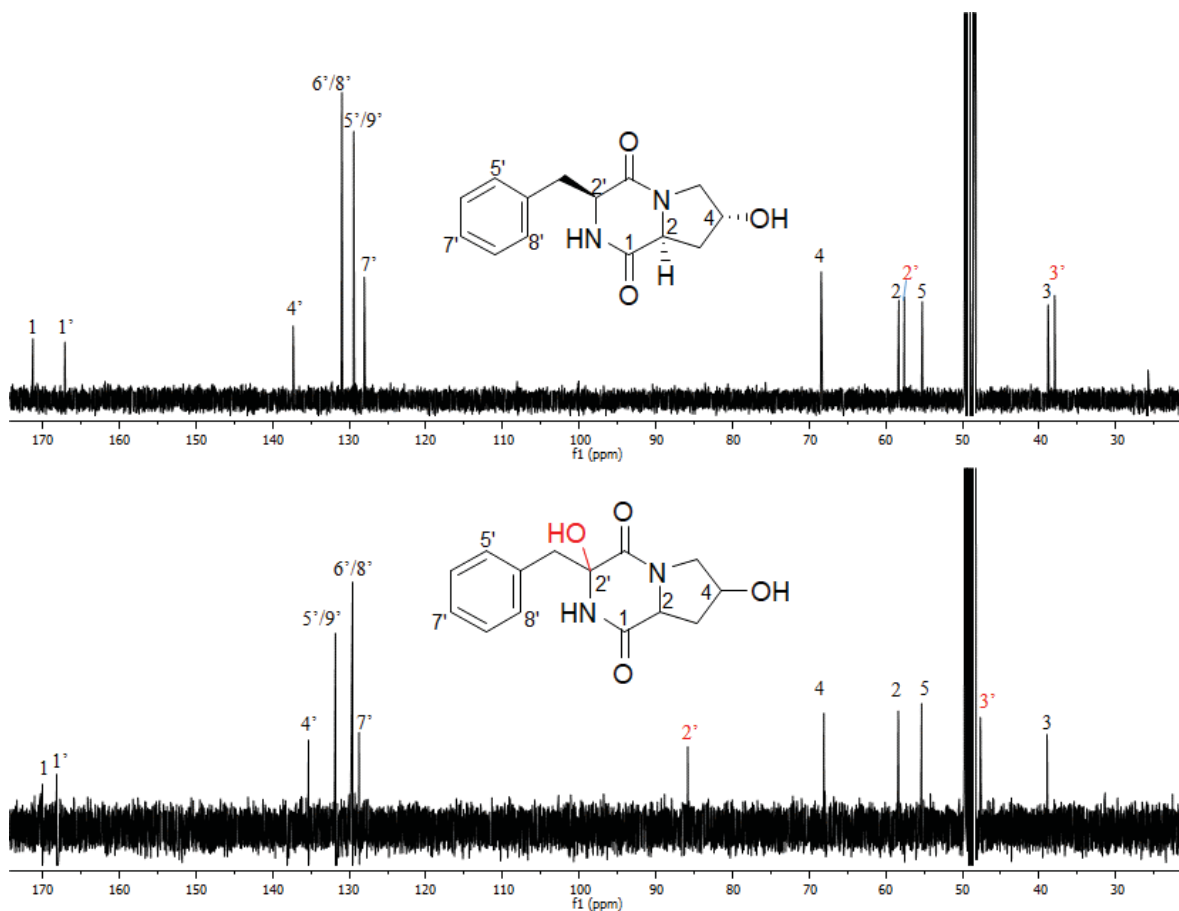


Figura 94. Comparación de espectros de RMN ^{13}C para los compuestos **25** (abajo) y **26** (arriba) (CD_3OD , 100 MHz).

Tabla 25. Datos espectroscópicos de la *ciclo*-(4-hidroxirolinil)-2'-hidroxifenilalanina^a (**25**).

Posición	δ_{C}	Tipo	δ_{H} mult (<i>J</i> en Hz)	COSY	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
4-hidroxirolina					
1	170.1	C			
2	58.3	CH	2.73, dd (12.0, 5.8)	3	1, 3, 4
3	39.0	CH_2	a 1.92, dd (13.5, 5.9)	2, 4	5
			b 1.68, td (12.7, 4.4)	2, 4	1
4	68.0	CH	4.28, t (4.5)	3, 5	2, 5
5	55.3	CH_2	a 3.70, dd (13.2, 4.9)	4	2, 1'
			b 3.12, dd (13.2)	4	2, 4, 1'
2'-hidroxifenilalanina					
1'	168.1	C			
2'-NH			<i>b</i>		
2'	85.8	C			
3'	47.7	CH_2	a 3.25, d (13.1)		1', 2', 4, 5'/9'
			b 2.95, d (13.1)		1', 2', 4, 5'/9'
4'	135.3	C			
5'/9'	131.7	CH	7.16, m	6'/8'	3', 7', 5'/9'
6'/8'	129.6	CH	7.26, m	5'/9', 7'	4', 6'/8', 5'/9'
7'	128.7	CH	7.16, m	6'/8'	5'/9', 6'/8'

^a CD_3OD , 400 MHz para ^1H y 100 para ^{13}C . ^bNo se observa.

5.2.1 Fraccionamiento primario del extracto PR-35 AcOEt/P de PR-35.

Se encontró que sólo el extracto PR-35 AcOEt/P (39.3 mg, **Tabla 16**) resultó activo en el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) contra las líneas tumorales de cáncer de colon (HTB-38, $CL_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$), cáncer de pulmón (HTB-177, $CL_{50} = 120 \mu\text{g/mL}$) y cáncer de mama ($CL_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$), sin embargo, debido al bajo rendimiento de PR-35 AcOEt/P se optó por realizar su fraccionamiento mediante HPLC y de las fracciones obtenidas, fue imposible el aislamiento de algún compuesto debido a su poco rendimiento.

6. Conclusiones.

I. De los 9 hongos estudiados, el análisis del espaciador de transcripción interno del ADN permitió la identificación taxonómica de una cepa a nivel de orden [Onygenales (ACA-11)], de otra a nivel de familia [*Trichomonosporaceae* (ACA-1)], de 5 a nivel de género [*Acremonium* sp. (ACA-4), *Chrysosporium* sp. (ACA-5 y ACA-12), *Aspergillus* sp. (ACA-9), y *Beauveria* sp. (ACA-13)] y de dos a nivel de especie [*Gymnoascus hyalinosporus* (ACA-16) y *Simplicillium obclavatum* (ACA-17)], mientras que mediante el análisis de las secuencias 16S del ADNr, se clasificaron taxonómicamente las tres cepas bacterianas estudiadas dentro del género *Streptomyces*.

II. El fraccionamiento de los extractos orgánicos en mediana escala y la purificación de las fracciones seleccionadas de las especies estudiadas, permitió el aislamiento y la caracterización estructural, realizada mediante el uso de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de derivación convencionales, de 26 compuestos, de los cuales, nueve resultaron ser entidades químicas novedosas.

III. La especie *Aspergillus* sp. ACA-9 es capaz de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios de tipo peptídico, en particular, es interesante la producción de dioxomorfolinas, ya que son compuestos poco comunes dentro de los productos naturales y de la química sintética.

IV. Las dioxomorfolinas **1**, **3** y **7** fueron evaluadas para conocer su actividad citotóxica y como inhibidores de la Pgp, utilizando para esto células tumorales de adenocarcinoma alveolar con expresión normal (A549) y con sobreexpresión de Pgp (A549/DXR, resistentes a doxorubicina), encontrando que la inhibición esta glicoproteína se llevó a cabo en forma dependiente de la concentración (0.1 y 0.5 μM), resultados que demuestran que la actividad quimioterapéutica de la doxorubicina se favorece cuando es utilizada en conjunto con **1**, **3** y **7**.

V. Los compuestos **6** y **15** fueron evaluados contra las líneas tumorales MDA-MB-435 (melanoma), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y OVCAR3 (cáncer de ovario) resultando inactivos en todos los casos. ($IC_{50} < 25 \mu\text{M}$).

VI. El presente trabajo es el primer estudio químico de *G. hyalinosporus* (ACA-16).

7. Referencias.

- [1] A. Fleming, Br. J. Exp. Pathol. 10 (1929) 226-236.
- [2] The Cambridge World History of Food (Vol. 1); Cambridge University Press, 2000.
- [3] D.A. Dias, S. Urban, U. Roessner, Metabolites 2 (2012) 303-336.
- [4] C.R. Strader, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, J. Nat. Prod. 74 (2011) 900-907.
- [5] B.M. Hover, S.-H. Kim, M. Katz, Z. Charlop-Powers, J.G. Owen, et al., Nat. Microbiol. 3 (2018) 415-422.
- [6] F.E. Koehn, G.T. Carter, Nat. Rev. Drug Discovery 4 (2005) 206-220.
- [7] D.J. Newman, G.M. Cragg, J. Nat. Prod. 79 (2016) 629-661.
- [8] J.C. Nielsen, J. Nielsen, Synth. Syst. Biotechnol. 2 (2017) 5-12.
- [9] L.-A. Giddings, D.J. Newman. In *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles*; Springer International Publishing, Cham, 2015. pp 1-75.
- [10] L. Chen, Q. Yue, Y. Li, X. Niu, M. Xiang, et al., Appl. Environ. Microbiol. 81 (2015) 1550-1558.
- [11] K. Hatano, Y. Morishita, T. Nakai, F. Ikeda, J. Antibiot. 55 (2002) 219-222.
- [12] L. Shao, J. Li, A. Liu, Q. Chang, H. Lin, et al., Appl. Environ. Microbiol. 79 (2013) 1126-1133.
- [13] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P.K. Mehta, 3 Biotech 7 (2017) 1-14.
- [14] G.F. Bills, M. Christensen, M. Powell, G. Thorn. In *Biodiversity of Fungi*; Academic Press, Burlington, 2004. pp 271-302.
- [15] B.B. Larsen, E.C. Miller, M.K. Rhodes, J.J. Wiens, Q. Rev. Biol. 92 (2017) 229-265.
- [16] Y. Roskov, L. Abucay, T. Orrell, D. Nicolson, N. Bailly, et al. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2018 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2018. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X. 2018
- [17] R. Chávez, F. Fierro, R.O. García-Rico, I. Vaca, Front. Microbiol. 6 (2015) 1-7.
- [18] D.L. Hawksworth, A.Y. Rossman, Phytopathology 87 (1997) 888-891.
- [19] CONABIO, *Informe Sobre Biodiversidad*, 2014, [Online], Consultado el 22 de noviembre de 2018
- [20] E. Aguirre-Acosta, M. Ulloa, S. Aguilar, J. Cifuentes, R. Valenzuela, Rev. Mex. Biodiv. 85 (2014) S76-S81.
- [21] R. Mata, M. Figueroa, I. Rivero-Cruz, M.L. Macías-Rubalcava, Planta Med. 84 (2018) 594-605.
- [22] G.D.A. Martin, L.T. Tan, P.R. Jensen, R.E. Dimayuga, C.R. Fairchild, et al., J. Nat. Prod. 70 (2007) 1406-1409.
- [23] J.M. Sánchez López, M. Martínez Insua, J. Pérez Baz, J.L. Fernández Puentes, L.M. Cañedo Hernández, J. Nat. Prod. 66 (2003) 863-864.
- [24] A. Becerril Espinosa, G. Guerra-Rivas, N.E. Ayala-Sánchez, I.E. Soria Mercado, Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 47 (2012) 317-325.
- [25] S. Onofri, A. Anastasi, G. Del Frate, S. Di Piazza, N. Garnerò, et al., Plant Biosyst. 145 (2011) 978-987.
- [26] Á.J. Campos Durán, Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo "*Malbranchea chryso sporoidea* Sigler et Carmichael como fuente de inhibidores de alfa-glucosidasas"; Departamento de Farmacia; Universidad Nacional Autónoma de México, 2017
- [27] L. Espinosa Asuar, Tesis para obtener el grado de Maestría "Análisis de la diversidad de procariones utilizando el gen 16S ribosomal: origen marino de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila"; Instituto de Ecología; Universidad Nacional Autónoma de México, 2005
- [28] W. Minckley, Science Series, University of Texas, El Paso, Texas (2) (1969) 1-65.
- [29] Y. Tapia-Torres, M.D. Rodríguez-Torres, J.J. Elser, A. Islas, V. Souza, et al., Appl. Environ. Microbiol. 82 (2016) 4652-4662.
- [30] V. Souza, J.L. Siefert, A.E. Escalante, J.J. Elser, L.E. Eguiarte, Astrobiology 12 (2012) 641-647.
- [31] A.M. Abdel-Azeem, F.M. Salem, M.A. Abdel-Azeem, N.A. Nafady, M.T. Mohesien, et al. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 3-28.
- [32] A.C. Flores-Gallegos, F. Veana-Hernandez, M. Michel-Michel, F. Lara-Victoriano, R. Rodríguez-Herrera. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 41-51.
- [33] H.A. Raja, A.N. Miller, C.J. Pearce, N.H. Oberlies, J. Nat. Prod. 80 (2017) 756-770.
- [34] J. Soltani. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 275-292.
- [35] V.K. Nadumane, P. Venkatachalam, B. Gajaraj. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 243-255.
- [36] S. Singh. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 191-198.

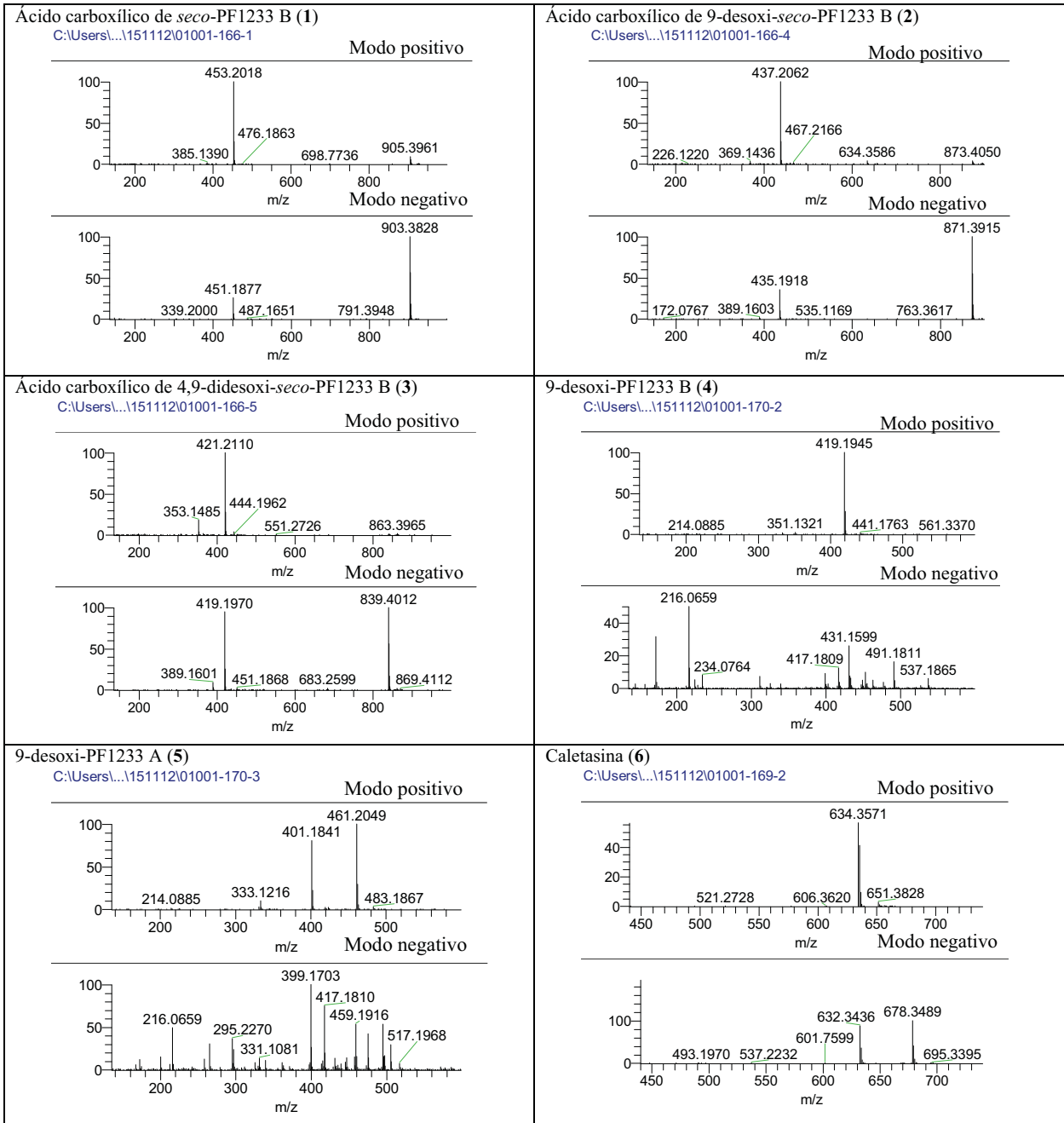
- [37] S.I. Choe, D.C. Sheppard. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 267-274.
- [38] K.D. Mojsov. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 215-222.
- [39] R. Hung, S. Lee Rutgers. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier, Amsterdam, 2016. pp 223-227.
- [40] A. Imoulan, M. Hussain, P.M. Kirk, A. El Meziane, Y.-J. Yao, J. Asia-Pacif. Entomol. 20 (2017) 1204-1212.
- [41] D.M. Gibson, B.G.G. Donzelli, S.B. Krasnoff, N.O. Keyhani, Nat. Prod. Rep. 31 (2014) 1287-1305.
- [42] G.W. Procop *Medically Important Fungi: A Guide to Identification – 5th Edition*; ASM Press, Washington, D.C., 2014; Vol. 45.
- [43] J. Patocka, MMSL 85 (2016) 80-88.
- [44] T. Tronina, A. Bartmańska, M. Milczarek, J. Wietrzyk, J. Popłoński, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 1957-1960.
- [45] T. Barth, R. Conti, M.T. Pupo, L.T. Okano, P.S. Bonato, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 257-266.
- [46] M. Solé, J. Cano, L.B. Pitarch, A.M. Stchigel, J. Guarro, Stud. Mycol. 2002 (2002) 141-152.
- [47] N. Zhou, Y. Zhang, F. Liu, L. Cai, Mycologia 108 (2016) 179-191.
- [48] T. Liu, S.L.F. Meyer, D.J. Chitwood, K.R. Chauhan, D. Dong, et al., J. Agric. Food. Chem. 65 (2017) 3127-3132.
- [49] B. Clark, R.J. Capon, E. Lacey, S. Tennant, J.H. Gill, et al., J. Nat. Prod. 68 (2005) 1226-1230.
- [50] S. Kitchawalit, K. Kanokmedhakul, S. Kanokmedhakul, K. Soyong, Nat. Prod. Res. 28 (2014) 1045-1051.
- [51] J.-H.L. Liu, W. Zhang, X.-H. Li, W.-C. Liu, J.-Y. Yan, et al., Afr. J. Microbiol. Res. 7 (2013) 20-26.
- [52] B.R. Clark, E. Lacey, J.H. Gill, R.J. Capon, J. Nat. Prod. 70 (2007) 665-667.
- [53] B. Clark, R.J. Capon, E. Lacey, S. Tennant, J.H. Gill, J. Nat. Prod. 68 (2005) 1661-1664.
- [54] V. Gaberc-Porekar, H.E. Gottueb, M. Mervič, J. Steroid Biochem. 19 (1983) 1509-1511.
- [55] I. Belič, V. Gaberc-Porekar, H. Sočič, M. Žaelj, Z. Allg. Mikrobiol. 22 (1982) 359-363.
- [56] K.-H. Boehme, C. Hoerhold. German Patent, 1980
- [57] A. Shukla, S. Patil, S. Bharti, Lett. Appl. Microbiol. 15 (1992) 86-88.
- [58] K. Kitano, K. Kintaka, K. Katamoto, K. Nara, Y. Nakao, J. Ferment. Technol. (1975).
- [59] K. Kitano, K. Kintaka, S. Suzuki, K. Katamoto, K. Nara, et al., J. Ferment. Technol. (1975).
- [60] K.F. Hua, J.C. Chou, Y. Lam, Y.L. Tasi, A. Chen, et al., PLoS One 8 (2013) e76754.
- [61] B.R. Clark, R.J. Capon, E. Lacey, S. Tennant, J.H. Gill, Org Lett 8 (2006) 701-704.
- [62] R. Zare, W. Gams, H.C. Evans, Nova Hedwigia 73 (2001) 51-86.
- [63] X. Liang, X.-Y. Zhang, X.-H. Nong, J. Wang, Z.-H. Huang, et al., Tetrahedron 72 (2016) 3092-3097.
- [64] Y. Dai, Y. Lin, X. Pang, X. Luo, L. Salendra, et al., Phytochemistry 154 (2018) 56-62.
- [65] X. Liang, X.-H. Nong, Z.-H. Huang, S.-H. Qi, J. Agric. Food. Chem. 65 (2017) 5114-5121.
- [66] Q.L. Dong, T.Y. Lin, X.Y. Xing, B. Chen, Y. Han, Lett. Appl. Microbiol. 58 (2014) 303-310.
- [67] P. Saetang, V. Rukachaisirikul, S. Phongpaichit, S. Preedanon, J. Sakayaroj, et al., Phytochemistry 143 (2017) 115-123.
- [68] K. Takata, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, T. Shirahata, K. Nonaka, et al., Org. Lett. 15 (2013) 4678-4681.
- [69] T. Fukuda, Y. Sudoh, Y. Tsuchiya, T. Okuda, Y. Igarashi, J. Nat. Prod. 77 (2014) 813-817.
- [70] S. Roy, T. Dutta, T.S. Sarkar, S. Ghosh, SpringerPlus 2 (2013) 382.
- [71] A.E. Glenn, C.W. Bacon, R. Price, R.T. Hanlin, Mycologia 88 (1996) 369-383.
- [72] R.C. Summerbell, C. Gueidan, H.J. Schroers, G.S. de Hoog, M. Starink, et al., Stud. Mycol. 68 (2011) 139-162.
- [73] A.H.S. Onions, B.L. Brady. In *Penicillium and Acremonium*; Springer US, Boston, MA, 1987. pp 1-36.
- [74] R.E. de Lima Procópio, I.R. da Silva, M.K. Martins, J.L. de Azevedo, J.M. de Araújo, J. Infect. Dis. 16 (2012) 466-471.
- [75] K.F. Chater, F1000Res. 5 (2016) 2795-2795.
- [76] H.-L. Ser, L.T.-H. Tan, J.W.-F. Law, K.-G. Chan, A. Duangjai, et al., Front. Microbiol. 8 (2017).
- [77] H.H. Hall, R.G. Benedict, C.F. Wiesen, C.E. Smith, R.W. Jackson, Appl. Microbiol. 1 (1953) 124-129.
- [78] H.F. Arocha-Garza, R. Canales-Del Castillo, L.E. Eguiarte, V. Souza, S. De la Torre-Zavala, PeerJ 5 (2017) e3247-e3247.
- [79] S. Ayers, B.M. Ehrmann, A.F. Adcock, D.J. Kroll, E.J. Carcache de Blanco, et al., J. Pept. Sci. 18 (2012) 500-510.
- [80] S. Saepua, J. Kornsakulkarn, W. Somyong, P. Lanksanacharoen, M. Isaka, et al., Tetrahedron 74 (2018) 859-866.
- [81] N. Kushida, T. Yaguchi, N. Miike. Japan Patent JP2003096080, 2003
- [82] K.V. Rao, A.K. Sadhukhan, M. Veerender, V. Ravikumar, E.V. Mohan, et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 48 (2000) 559-562.
- [83] M.A. Aparicio-Cuevas, I. Rivero-Cruz, M. Sanchez-Castellanos, D. Menendez, H.A. Raja, et al., J. Nat. Prod. 80 (2017) 2311-2318.
- [84] Z.G. Khalil, X.-c. Huang, R. Raju, A.M. Piggott, R.J. Capon, J. Org. Chem. 79 (2014) 8700-8705.

- [85] S. Nakadate, K. Nozawa, H. Horie, Y. Fujii, M. Nagai, et al., *Heterocycles* 68 (2006) 1969-1972.
- [86] M.T. Robey, R. Ye, J.W. Bok, K.D. Clevenger, M.N. Islam, et al., *ACS Chem. Biol.* 13 (2018) 1142-1147.
- [87] S.-Q. Yang, X.-M. Li, X. Li, L.-P. Chi, B.-G. Wang, *Mar. Drugs* 16 (2018) 114.
- [88] T. Miller, T. Grogan, *J. Clin. Oncol.* 9 (1991) 17-24.
- [89] M.A. Aparicio-Cuevas, M.d.C. González, H.A. Raja, I. Rivero-Cruz, S.J. Kurina, et al., *Tett. Lett.* 60 (2019) 1649-1652.
- [90] T. El-Elimat, J. Rivera-Chávez, J.E. Burdette, A. Czarnecki, M.B. Alhawarri, et al., *Fitoterapia* 127 (2018) 201-206.
- [91] J.N. Eloff, *Planta Med.* 64 (1998) 711-713.
- [92] R. Pereda-Miranda, R. Mata, A.L. Anaya, D.B.M. Wickramaratne, J.M. Pezzuto, et al., *J. Nat. Prod.* 56 (1993) 571-582.
- [93] R.T. Dewi, S. Tachibana, A. Darmawan, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 454-460.
- [94] H.H. Sun, C.J. Barrow, D.M. Sedlock, A.M. Gillum, R. Cooper, *J. Antibiot.* 47 (1994) 515-522.
- [95] R.L. Hamill, C. Higgins, H. Boaz, M. Gorman, *Tett. Lett.* 10 (1969) 4255-4258.
- [96] S. Gupta, C. Montllor, Y.S. Hwang, *J. Nat. Prod.* 58 (1995) 733-738.
- [97] J.C. Frisvad, J. Houbraken, S. Popma, R.A. Samson, *FEMS Microbiol. Lett.* 339 (2013) 77-92.
- [98] P. Del Valle, A.-L. Martínez, M. Figueroa, H.A. Raja, R. Mata, *Planta Med.* 82 (2016) 1286-1294.
- [99] J.-P. Jang, J.-H. Jang, N.-K. Soung, H.-M. Kim, S.-J. Jeong, et al., *J. Antibiot.* 65 (2012) 215.
- [100] H.H. Sun, C.J. Barrow, R. Cooper, *J. Nat. Prod.* 58 (1995) 1575-1580.
- [101] T. Fukuda, M. Arai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, et al., *J. Antibiot.* 57 (2004) 110-116.
- [102] X. Wang, X. Gong, P. Li, D. Lai, L. Zhou, *Molecules* 23 (2018) 169.
- [103] J. Wang, D.-M. Zhang, J.-F. Jia, Q.-L. Peng, H.-Y. Tian, et al., *Fitoterapia* 97 (2014) 23-27.
- [104] K. Koch, J. Podlech, E. Pfeiffer, M. Metzler, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 3275-3276.
- [105] G.-B. Xu, X. Pu, H.-H. Bai, X.-Z. Chen, G.-Y. Li, *Nat. Prod. Res.* 29 (2015) 848-852.
- [106] H. Raistrick, C. Stickings, R. Thomas, *Biochem. J.* 55 (1953) 421.
- [107] G. Liu, Y. Qian, P. Zhang, W. Dong, Y. Qi, et al., *Chin. Med. J.* 105 (1992) 394-400.
- [108] A. Solhaug, C. Wisbech, T.E. Christoffersen, L. Hult, T. Lea, et al., *Toxicol. Lett.* 239 (2015) 9-21.
- [109] S. Fraeyman, S. Croubels, M. Devreese, G. Antonissen, *Toxins* 9 (2017) 228.
- [110] K. Vejdvoszky, M. Sack, K. Jarolim, G. Aichinger, M.M. Somoza, et al., *Toxicol. Lett.* 267 (2017) 45-52.
- [111] C. Fernández-Blanco, G. Font, M.-J. Ruiz, *Toxicol. Lett.* 235 (2015) 61-66.
- [112] X. Meng, Z. Mao, J. Lou, L. Xu, L. Zhong, et al., *Molecules* 17 (2012) 11303-11314.
- [113] A.A. Hildebrand, B.N. Kohn, E. Pfeiffer, D. Wefers, M. Metzler, et al., *J. Agric. Food. Chem.* 63 (2015) 4728-4736.
- [114] S.T. Soukup, B.N. Kohn, E. Pfeiffer, R. Geisen, M. Metzler, et al., *J. Agric. Food. Chem.* 64 (2016) 8892-8901.
- [115] R. Pereda-Miranda, D. Rosas-Ramírez, J. Castañeda-Gómez. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Springer Vienna, Vienna, 2010; Vol. 92. pp 77-153.
- [116] T. Amagata, M. Doi, M. Tohgo, K. Minoura, A. Numata, *Chem. Commun.* (1999) 1321-1322.
- [117] T. Amagata, K. Minoura, A. Numata, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1384-1388.
- [118] T. Amagata, M. Tanaka, T. Yamada, Y.P. Chen, K. Minoura, et al., *Tett. Lett.* 54 (2013) 5960-5962.
- [119] T. Amagata, M. Tanaka, T. Yamada, K. Minoura, A. Numata, *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 340-345.
- [120] L. Hammerschmidt, A.H. Aly, M. Abdel-Aziz, W.E.G. Müller, W. Lin, et al., *Biorg. Med. Chem.* 23 (2015) 712-719.
- [121] T. Suga, T. Ishii, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, K. Nonaka, et al., *J. Antibiot.* 65 (2012) 527-529.
- [122] H. Wang, H. Dai, C. Heering, C. Janiak, W. Lin, et al., *RSC Adv.* 6 (2016) 81685-81693.
- [123] J. Thongtan, J. Saenboonrueng, P. Rachtawee, M. Isaka, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 713-714.
- [124] H. Sasaki, T. Hosokawa, Y. Nawata, K. Ando, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 1463-1466.
- [125] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, et al., *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D603-610.
- [126] A. Slominski, I. Semak, A. Pisarchik, T. Sweatman, A. Szczesniewski, et al., *FEBS Lett.* 511 (2002) 102-106.
- [127] T. Shen, Q. Liu, X. Xie, Q. Xu, N. Chen, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 605219.
- [128] P. Gollnick, P. Babitzke, A. Antson, C. Yanofsky, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 47-68.
- [129] K. Yamana, F. Labrie, V. Luu-The, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 2 (2010) 293-299.
- [130] Y. Mikami, K. Takahashi, K. Fukushima, K. Yazawa, T. Arai, et al., *J. Antibiot.* 40 (1987) 385-387.
- [131] Y. Sato, T. Taketomo, Y. Yoshiyama, I. Yokota. Japan Patent JPH04360855 (A), 1992
- [132] P.M. Traxler, O. Wacker, H.L. Bach, J.F. Geissler, W. Kump, et al., *J. Med. Chem.* 34 (1991) 2328-2337.
- [133] C.J. Chang, R.L. Geahlen, *J. Nat. Prod.* 55 (1992) 1529-1560.
- [134] A. Butler, *Science* 281 (1998) 207-210.
- [135] Y. Matsuo, K. Kanoh, J.H. Jang, K. Adachi, S. Matsuda, et al., *J Nat Prod* 74 (2011) 2371-2376.
- [136] P. Cruz-Morales, H.E. Ramos-Aboites, C. Licon-Cassani, N. Selem-Mójica, P.M. Mejía-Ponce, et al., *FEMS Microbiol. Ecol.* 93 (2017).

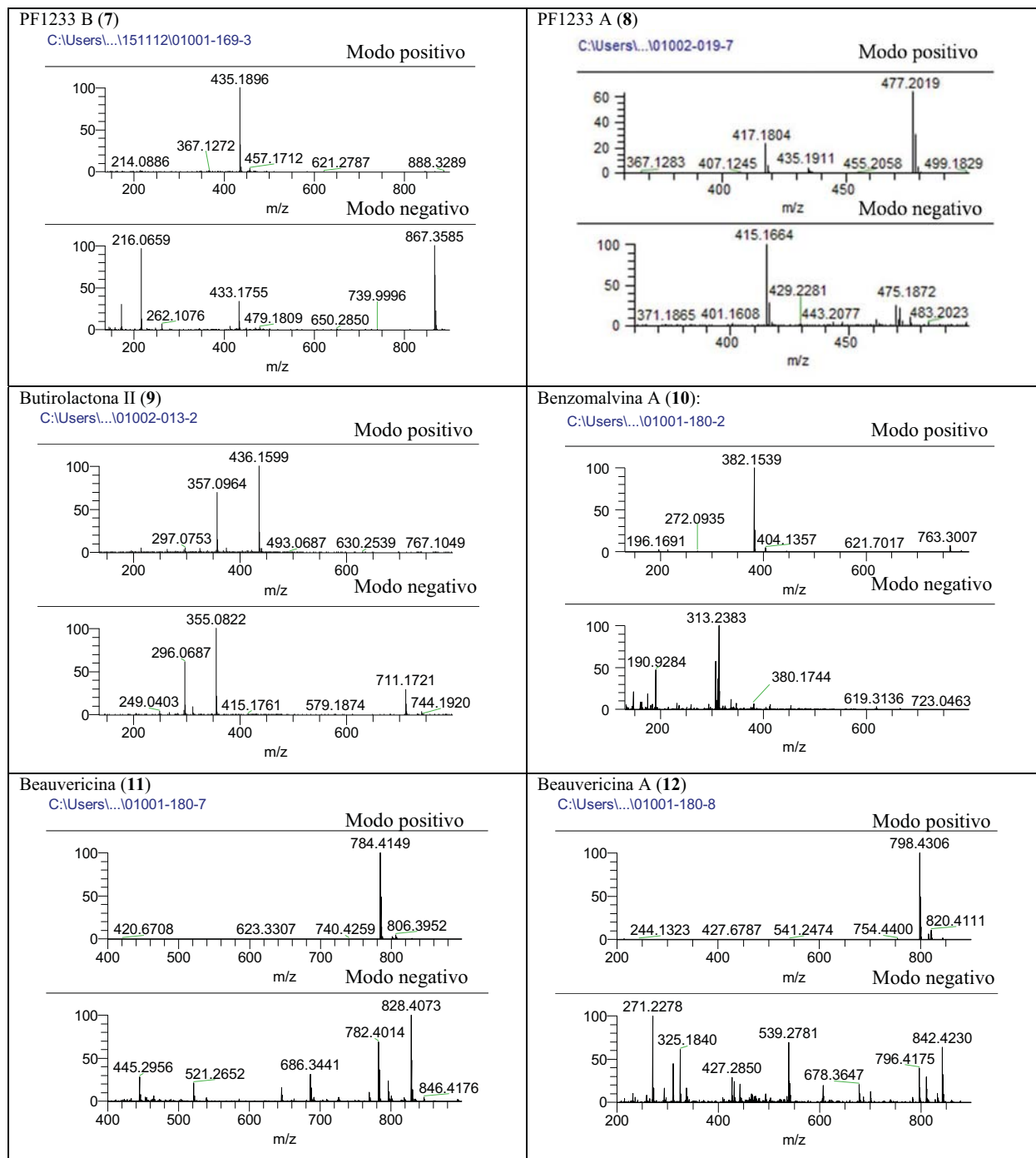
- [137] H. Brockmann, G. Pampus, J. Manegold, Chem. Ber. 92 (1959) 1294.
- [138] S.B. Singh, O. Genilloud, F. Peláez. In *Comprehensive Natural Products II*; Elsevier, Oxford, 2010. pp 109-140.
- [139] H.H.A. El-Aal, E.E. Habib, M.M. Mishrif, J. Egypt. Natl. Cancer Inst. 17 (2005) 308-311.
- [140] S. Khatua, C.N. Nair, K. Ghosh, J. Pediatr. Hematol./Oncol. 26 (2004) 777-779.
- [141] N. Gaspar, D.S. Hawkins, U. Dirksen, I.J. Lewis, S. Ferrari, et al., J. Clin. Oncol. 33 (2015) 3036-3046.
- [142] T. Turan, O. Karacay, G. Tulunay, N. Boran, S. Koc, et al., Int. J. Gynecol. 16 (2006) 1432-1438.
- [143] J.M. Cronan, T.R. Davidson, F.L. Singleton, R.R. Colwell, J.H. Cardellina, Nat. Prod. Lett. 11 (1998) 271-278.
- [144] Z.G. Khalil, P. Cruz-Morales, C. Licon-Cassani, E. Marcellin, R.J. Capon, ISME J. 13 (2019) 147-158.
- [145] A. Bartels, P.G. Jones, J. Liebscher, Synthesis 1 (2003) 0067-0072.
- [146] H. Zhang, X. Ning, H. Hang, X. Ru, H. Li, et al., Org. Lett. 15 (2013) 5670-5673.
- [147] Y.C. Park, S.P. Gunasekera, J.V. Lopez, P.J. McCarthy, A.E. Wright, J. Nat. Prod. 69 (2006) 580-584.
- [148] K. Ienaga, M. Kurohashi, K. Nakamura, T. Nakanishi, T. Ichii, et al., Experientia 44 (1988) 356-357.
- [149] K. Ienaga, K. Nakamura, M. Kurohashi, T. Nakanishi, T. Ichii, Phytochemistry 29 (1990) 35-39.

8. Anexos.

Tabla A 1. Espectros de HRESIMS.



Continuación **Tabla A 1.**



Continuación **Tabla A 1.**

<p>4-<i>O</i>-metil éter de alternariol (13)</p> <p>C:\Users\...\01001-181-1</p> <p>Modo positivo</p> <p>Modo negativo</p>	<p>Alternariol (14)</p> <p>C:\Users\...\01002-177-1</p> <p>Modo positivo</p> <p>Modo negativo</p>
<p>10-(4-<i>O</i>-metil-glucopiranosil) de 4-<i>O</i>-metil éter de alternariol (15)</p> <p>C:\Users\...\01001-182-1</p> <p>Modo positivo</p> <p>Modo negativo</p>	<p>Ácido hirsutílico A (16)</p> <p>C:\Users\...\151112\01001-168-2</p> <p>Modo positivo</p> <p>Modo negativo</p>
<p>Ácido <i>N</i>-formil hirsutílico A (17)</p> <p>C:\Users\...\151112\01001-168-4</p> <p>Modo positivo</p> <p>Modo negativo</p>	<p>Ácido 4',5'-dihidro-4'-hidroxiascoclorínico (18)</p> <p>C:\Users\...\Alex\01002-33-1</p> <p>Modo positivo</p> <p>Modo negativo</p>

Continuación **Tabla A 1.**

<p>Triptófano (19) C:\Users\...\01001-197-6</p> <p style="text-align: right;">Modo positivo</p> <p style="text-align: center;">Modo negativo</p>	<p>Ácido 2-acetamido-3-hidroxi-4-metilbenzóico (20) C:\Users\...\01001-197-8</p> <p style="text-align: right;">Modo positivo</p> <p style="text-align: center;">Modo negativo</p>
<p>4-(2-nitroetil) bencen-1,2-diol (21) J:\01002-148-2</p> <p style="text-align: right;">Modo positivo</p> <p style="text-align: center;">Modo negativo</p>	<p>(E)-4-(2-nitrovinil) bencen-1,2-diol (22) C:\Users\...\01001-148-4</p> <p style="text-align: right;">Modo positivo</p> <p style="text-align: center;">Modo negativo</p>
<p>Actinomicina A₁ (23) C:\Users\...\01001-146-11</p> <p style="text-align: right;">Modo positivo</p> <p style="text-align: center;">Modo negativo</p>	<p>ciclo-(trans-4-hidroxi-L-prolinil)-L-Leucina (24) C:\Users\...\Desktop\01002-141-8</p> <p style="text-align: right;">Modo positivo</p> <p>01002-141-8 #97-164 RT: 0.82-1.41 AV: 23 NL: 1.85E7 T: FTMS + c ESI Full ms [125.00-1000.00]</p>

Continuación **Tabla A 1.**

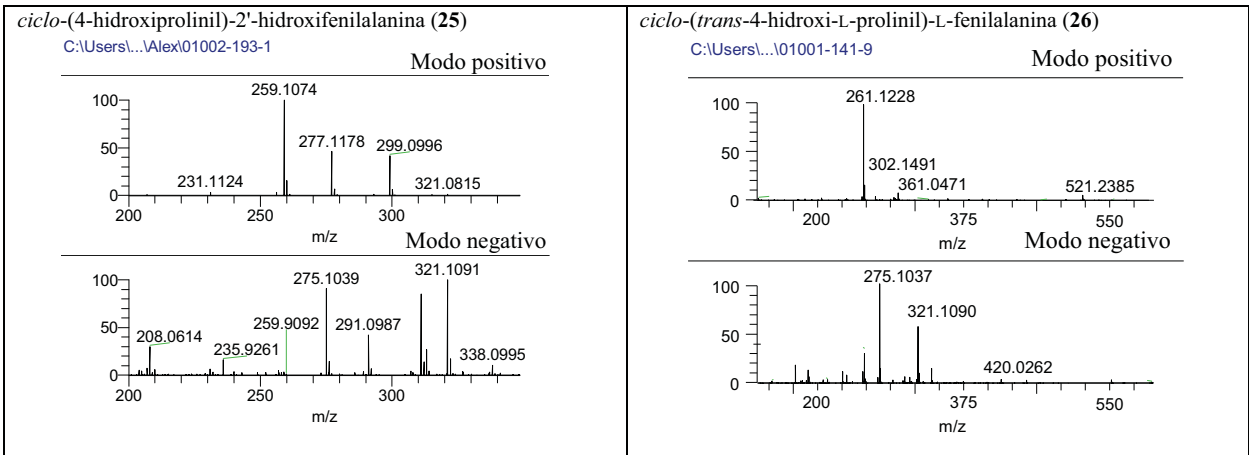
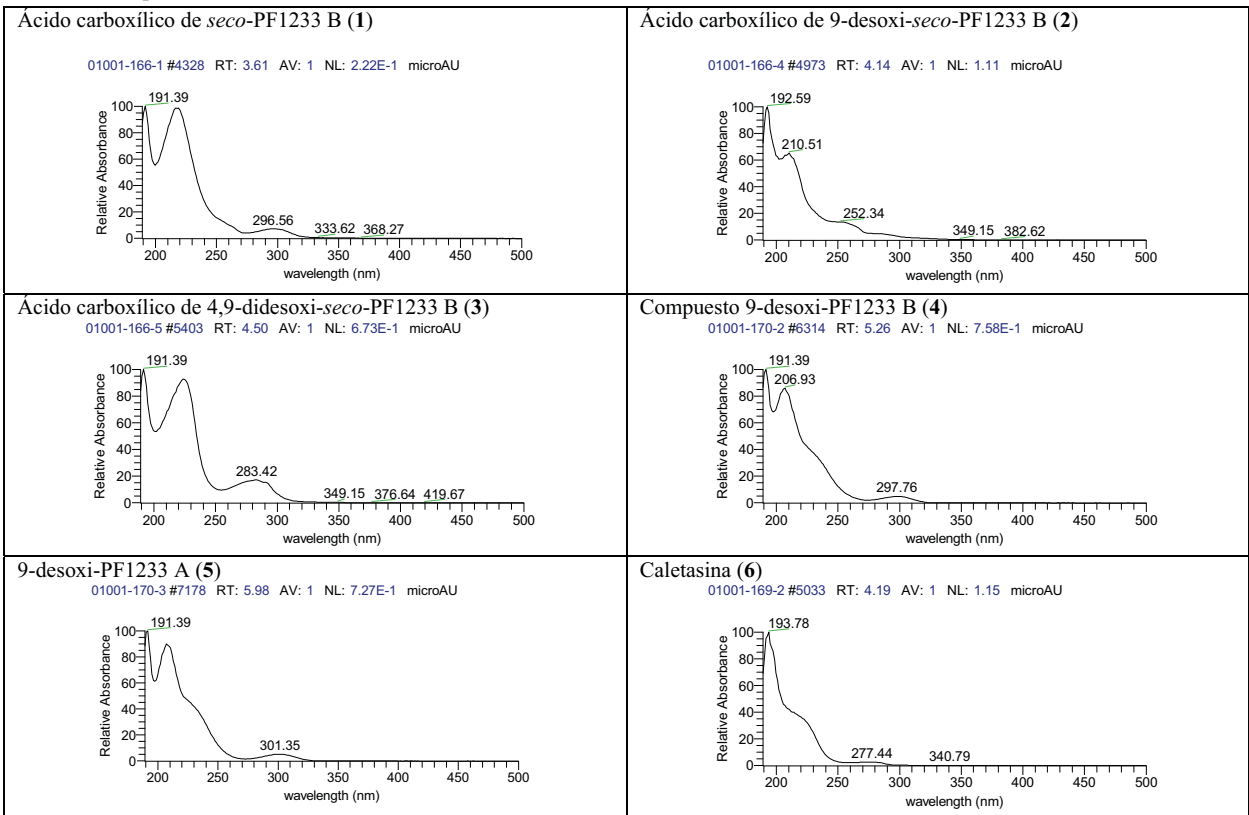
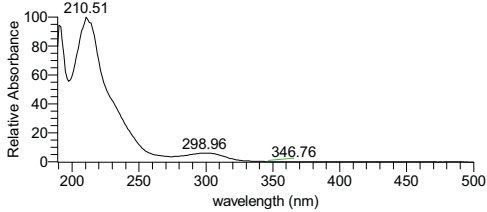
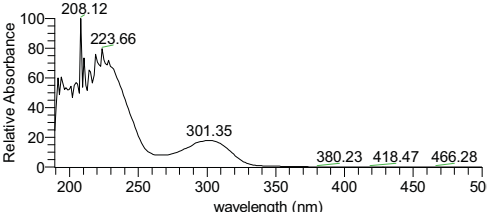
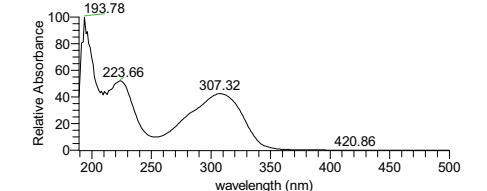
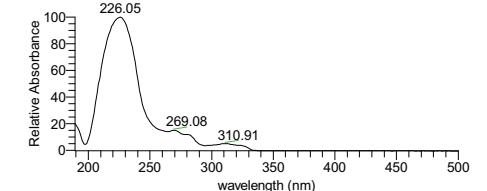
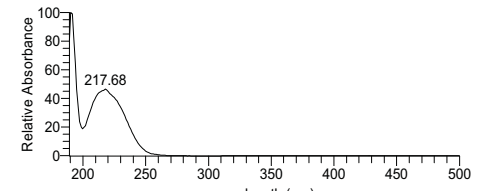
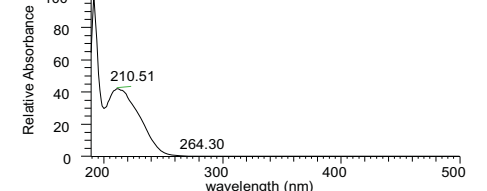
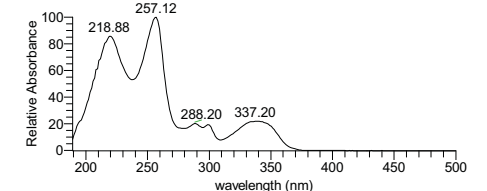
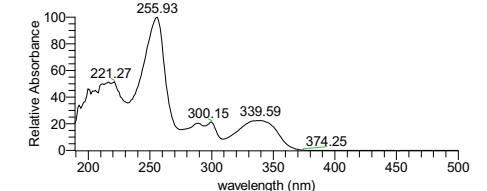
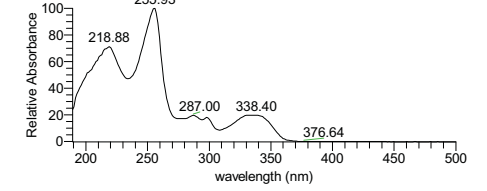
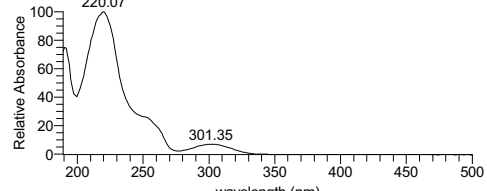


Tabla A 2. Espectros de UV cualitativos.



Continuación **Tabla A 2.**

<p>PF1233 B (7) 01001-169-3 #5558 RT: 4.63 AV: 1 NL: 6.75E-1 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 210.51, 298.96, 346.76</p>	<p>PF1233 A (8) 01002-019-7 #4586 RT: 3.82 AV: 1 NL: 3.14 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 208.12, 223.66, 301.35, 380.23, 418.47, 466.28</p>
<p>Butirolactona II (9) 01002-013-2 #3079 RT: 2.57 AV: 1 NL: 1.88 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 193.78, 223.66, 307.32, 420.86</p>	<p>Benzomalvina A (10) 01001-180-2 #6392 RT: 5.33 AV: 1 NL: 3.68E-1 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 226.05, 269.08, 310.91</p>
<p>Beauvericina (11) 01001-180-7 #8697 RT: 7.25 AV: 1 NL: 7.39E-1 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 217.68, 257.12</p>	<p>Beauvericina A(12) 01001-180-8 2 #9028 RT: 7.52 AV: 1 NL: 1.13 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 191.39, 210.51, 264.30</p>
<p>4-O-metil éter de alternariol (13) 01001-181-1 #4124 RT: 3.44 AV: 1 NL: 4.37E-1 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 218.88, 257.12, 288.20, 337.20</p>	<p>Alternariol (14) 01002-177-1 #4347 RT: 3.62 AV: 1 NL: 1.26E6 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 221.27, 255.93, 300.15, 339.59, 374.25</p>
<p>10-(4-O-metil-glucopiranosil) de 4-O-metil éter de alternariol (15) 01001-182-1 #3325 RT: 2.77 AV: 1 NL: 4.96E-1 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 218.88, 255.93, 287.00, 338.40, 376.64</p>	<p>Ácido hirsutólico A (16) 01001-168-2 #5245 RT: 4.37 AV: 1 NL: 3.44E-1 microAU</p>  <p>Relative Absorbance vs wavelength (nm). Peaks: 220.07, 301.35</p>

Continuación **Tabla A 2.**

<p>Compuesto (17)</p> <p>01001-168-4 #6734 RT: 5.61 AV: 1 NL: 6.13E-1 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>222.46</p> <p>307.32</p>	<p>Acido 4',5'-dihidro-4'-hidroxiacoclorínico (18)</p> <p>01002-33-1 #6201 RT: 5.17 AV: 1 NL: 3.97E-1 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>224.85</p> <p>292.98</p> <p>340.79</p> <p>385.01</p> <p>484.21</p>
<p>Triptófano (19)</p> <p>01001-197-6 #1020 RT: 0.85 AV: 1 NL: 9.79E-1 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>193.78</p> <p>215.29</p> <p>278.64</p> <p>344.37</p> <p>385.01</p> <p>422.06</p> <p>461.50</p>	<p>Acido 2-acetamido-3-hidroxi-4-metilbenzóico (20).</p> <p>01001-197-8 #2585 RT: 2.15 AV: 1 NL: 3.04 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>208.12</p> <p>220.07</p> <p>298.96</p> <p>471.06</p>
<p>4-(2-nitroetil) bencen-1,2-diol (21)</p> <p>01002-148-2 #2463 RT: 2.05 AV: 1 NL: 1.01E6 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>197.37</p> <p>281.03</p> <p>344.37</p> <p>373.06</p>	<p>(E)-4-(2-nitrovinil) bencen-1,2-diol (22)</p> <p>01002-148-4 #3168 RT: 2.64 AV: 1 NL: 1.45E5 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>205.73</p> <p>258.32</p> <p>380.23</p>
<p>Actinomicina A₁ (23)</p> <p>01002-146-11 #7033 RT: 5.86 AV: 1 NL: 2.38E5 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>226.05</p> <p>444.77</p>	<p>Ciclo-(trans-4-hidroxi-L-prolinil)-L-Leucina (24)</p> <p>01002-141-8 #1261 RT: 1.05 AV: 1 NL: 2.17E-1 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>192.09</p>
<p>Ciclo-(4-hidroxi-prolinil)-2'-hidroxifenilalanina (25)</p> <p>01002-193-1 #963 RT: 0.80 AV: 1 NL: 1.39E6 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>192.59</p> <p>257.12</p> <p>484.21</p>	<p>Ciclo-(trans-4-hidroxi-L-prolinil)-L-fenilalanina (26)</p> <p>01002-141-9 #1571 RT: 1.31 AV: 1 NL: 1.08E6 microAU</p> <p>Relative Absorbance</p> <p>wavelength (nm)</p> <p>191.39</p> <p>257.12</p> <p>281.03</p>

Tabla A 3. Resultados de actividad citotóxica de **6** y **15**.

Muestra	IC ₅₀ (μ M) ^a or (nm) ^b		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	OVCAR 3
6 ^a	>25	>25	>25
15 ^a	>25	>25	>25
Taxol ^b	0.52	5.26	4.23

Tabla A 4. Energías y Poblaciones Conformationales de **4**, **5** y **7**.

Confórmero	Δ_{EMFF94} ^a	% _{MMFF94} ^b	ΔE_{OPT} ^c	% _{OPT} ^d	$\Delta_{GB3PW91}$ ^e	% _{B3PW91} ^d
4a	0.41	8.37	0.01	27.47	0.00	50.52
4b	0.00	16.72	0.00	27.77	0.48	22.47
4c	0.99	3.16	1.10	4.35	1.18	6.94
4d	2.83	0.14	1.36	2.78	1.50	4.00
4e	1.13	2.49	0.62	9.80	1.51	3.96
4f	0.73	4.86	0.63	9.67	1.54	3.76
4g	0.76	4.67	1.08	4.46	1.57	3.58
4h	4.39	0.01	2.07	0.84	1.75	2.65
4i	2.79	0.15	1.40	2.60	1.88	2.12
5a	0.78	4.04	0.00	36.00	0.00	46.06
5b	0.00	15.05	0.64	12.22	0.64	15.61
5c	0.16	11.43	0.53	14.74	0.79	12.12
5d	1.45	1.31	0.68	11.46	0.80	12.01
5e	1.08	2.45	0.91	7.75	1.05	7.82
5f	0.86	3.53	1.21	4.66	1.47	3.83
5g	3.15	0.05	1.53	2.71	1.71	2.55
7a	5.72	0.01	0.00	40.52	0.00	50.53
7b	0.00	20.18	0.77	11.02	0.79	13.34
7c	5.70	0.01	1.08	6.55	0.94	10.38
7d	5.75	0.01	1.07	6.61	1.02	9.08
7e	6.04	0.01	0.62	14.28	1.07	8.35
7f	7.94	0.01	1.47	3.37	1.47	4.23
7g	0.61	7.17	1.92	1.59	1.89	2.08
7h	0.31	11.94	1.84	1.83	1.91	2.01

^aEnergía de mecánica molecular relativa a 142.99, 120.70 y 143.18 kcal/mol para **4**, **5** y **7**, respectivamente. ^bPoblación de mecánica molecular en %. ^cEnergía para las estructuras optimizadas; datos relativos a -864638.3, -960663.1 y -912086.7 kcal/mol para **4**, **5** y **7**, respectivamente. ^dPoblación conformacional. ^eEnergía libre relativa a -864896.4, -960383.6 y -911825.7 kcal/mol para **4**, **5** y **7**, respectivamente.

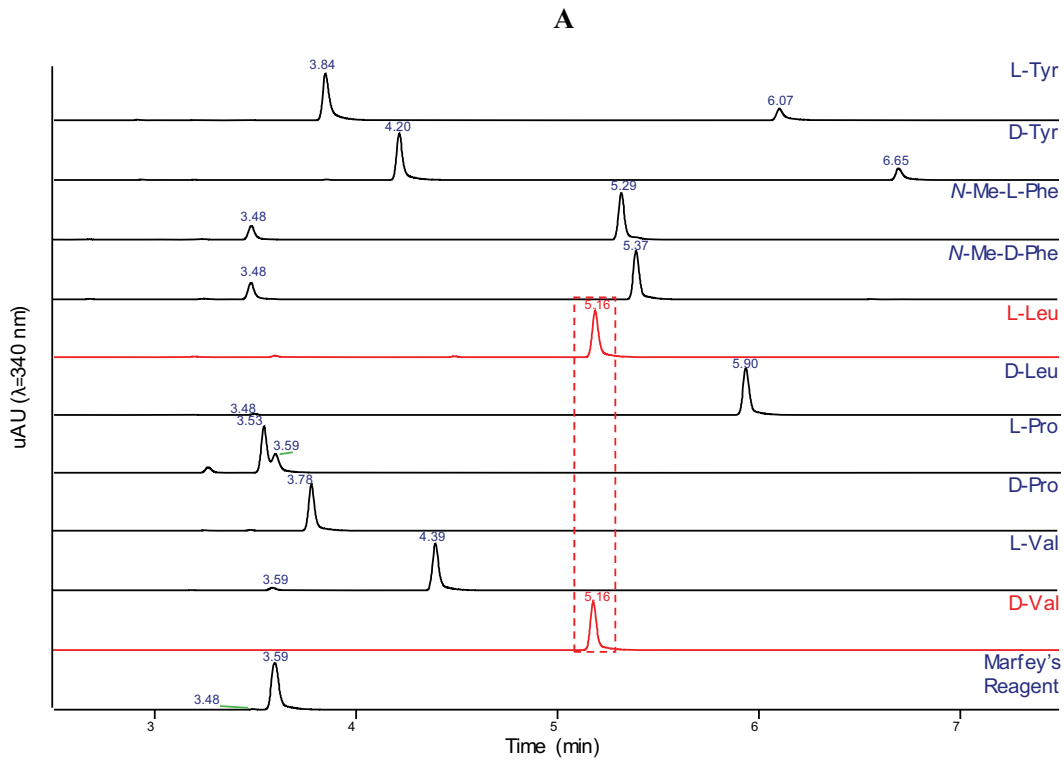


Figura A 1. A) Perfiles de aminoácidos individuales (aminoácidos con tiempos de retención similares señalados en rojo). **B)** Perfiles de MS de los aminoácidos derivatizados D-Val y L-Leu vs. el producto de hidrólisis de **6** a un tiempo de retención de 5.21 min.

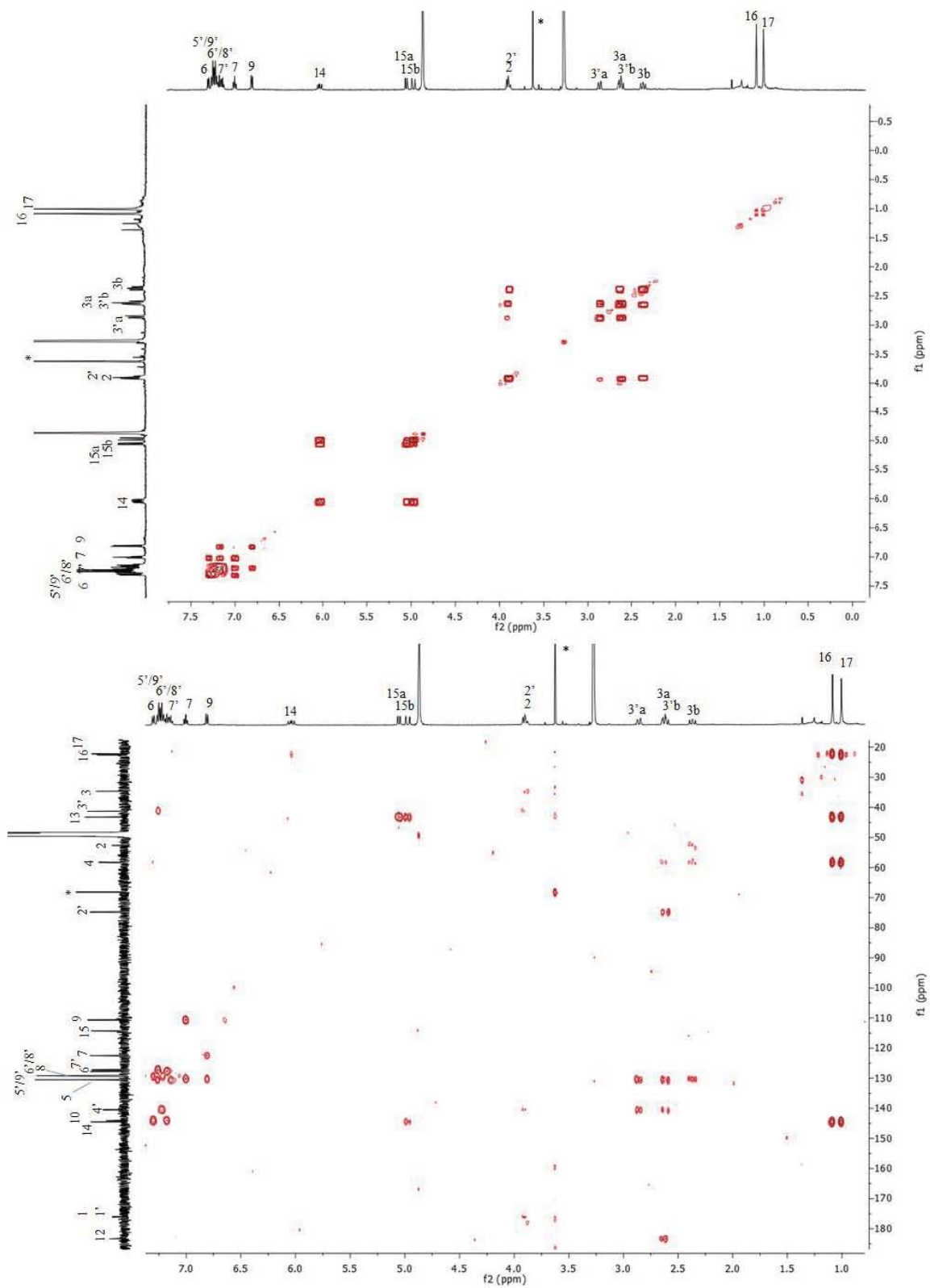


Figura A 2. Espectros COSY (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 2.

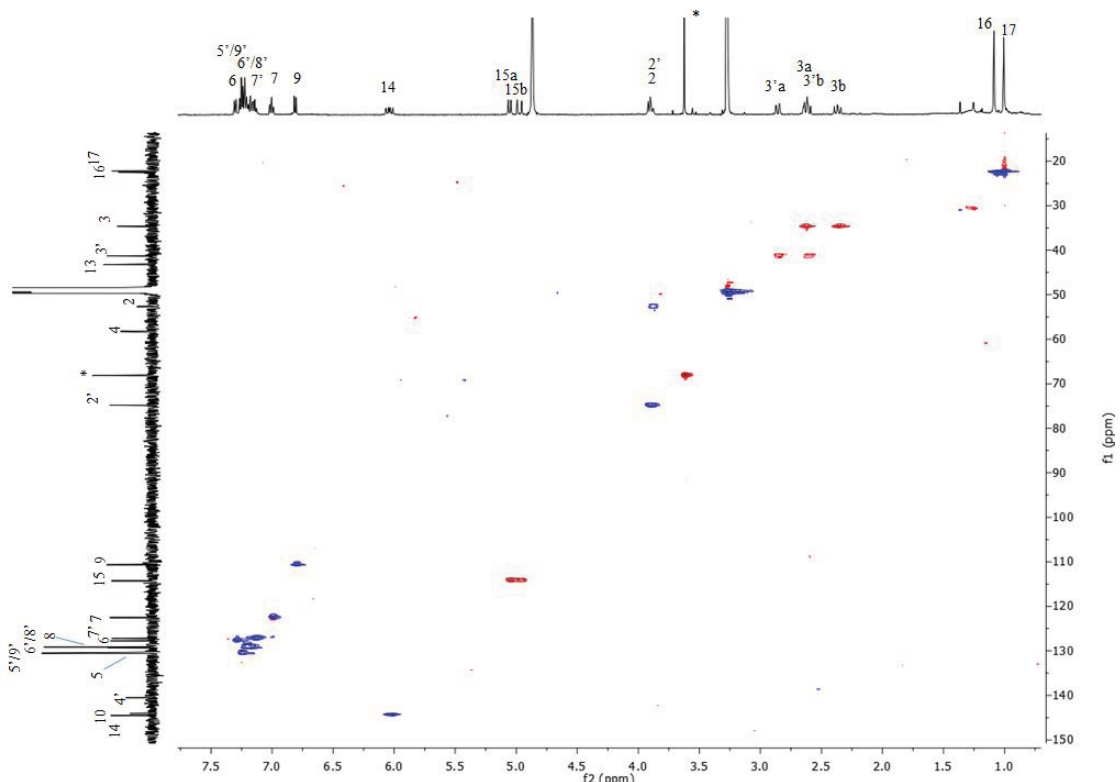


Figura A 3. Espectro HSQC del compuesto 2.

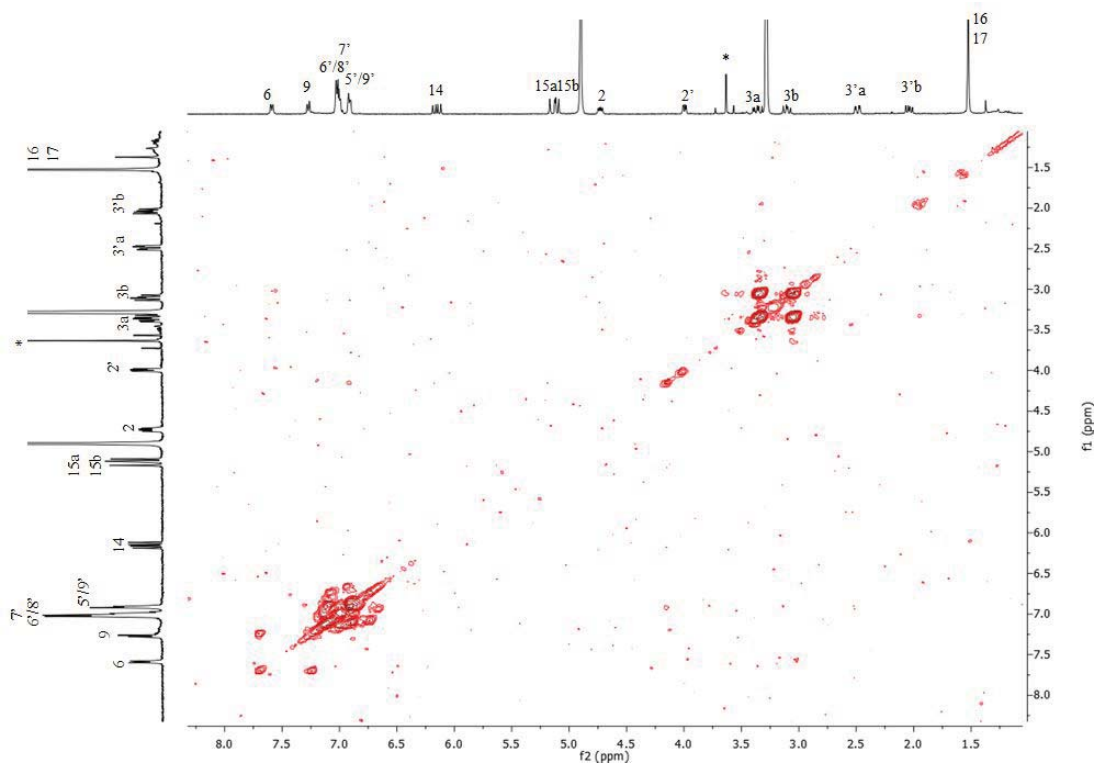


Figura A 4. Espectro COSY del compuesto 3.

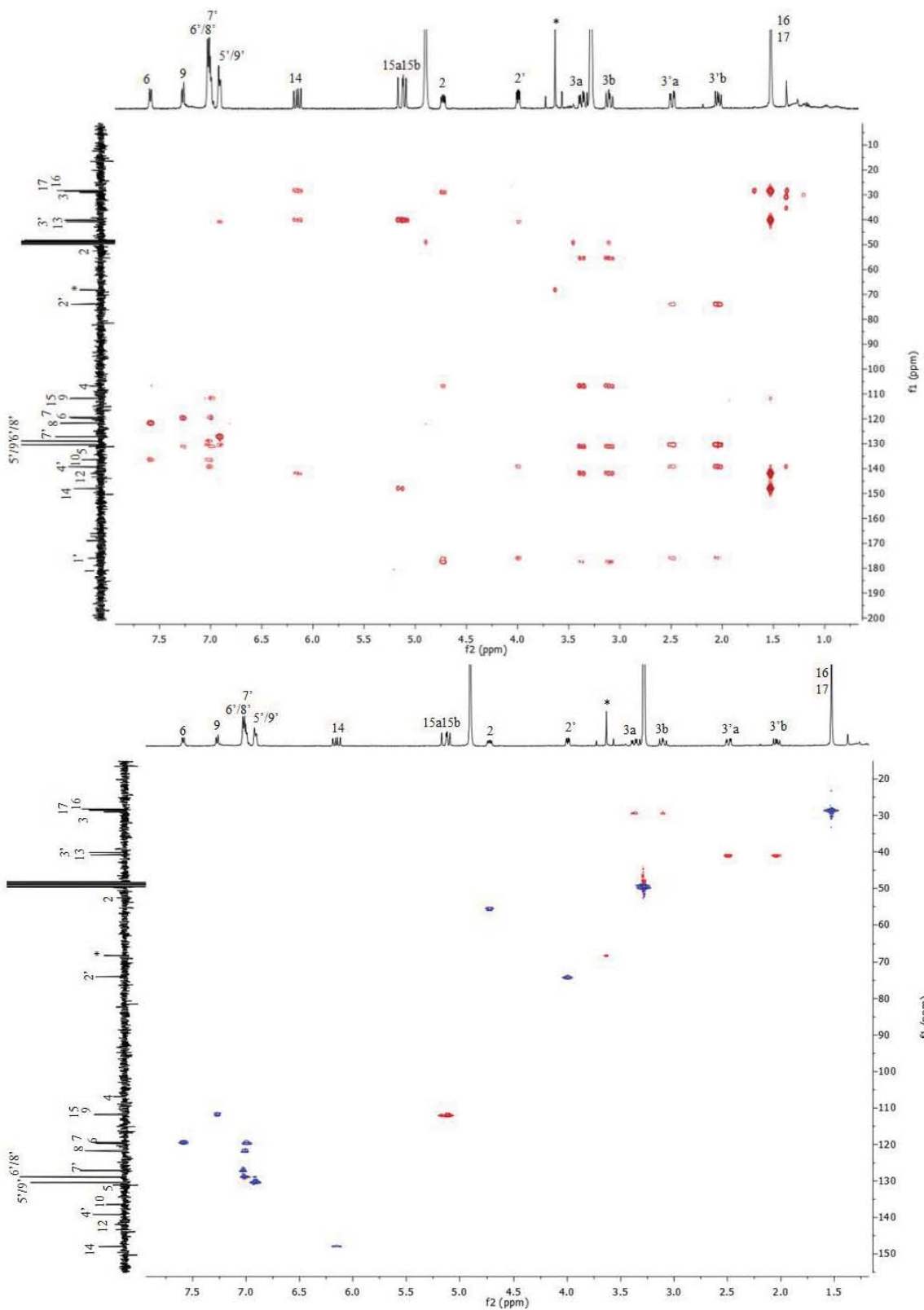


Figura A 5. Espectros HMBC (arriba) y HSQC (abajo) del compuesto 3.

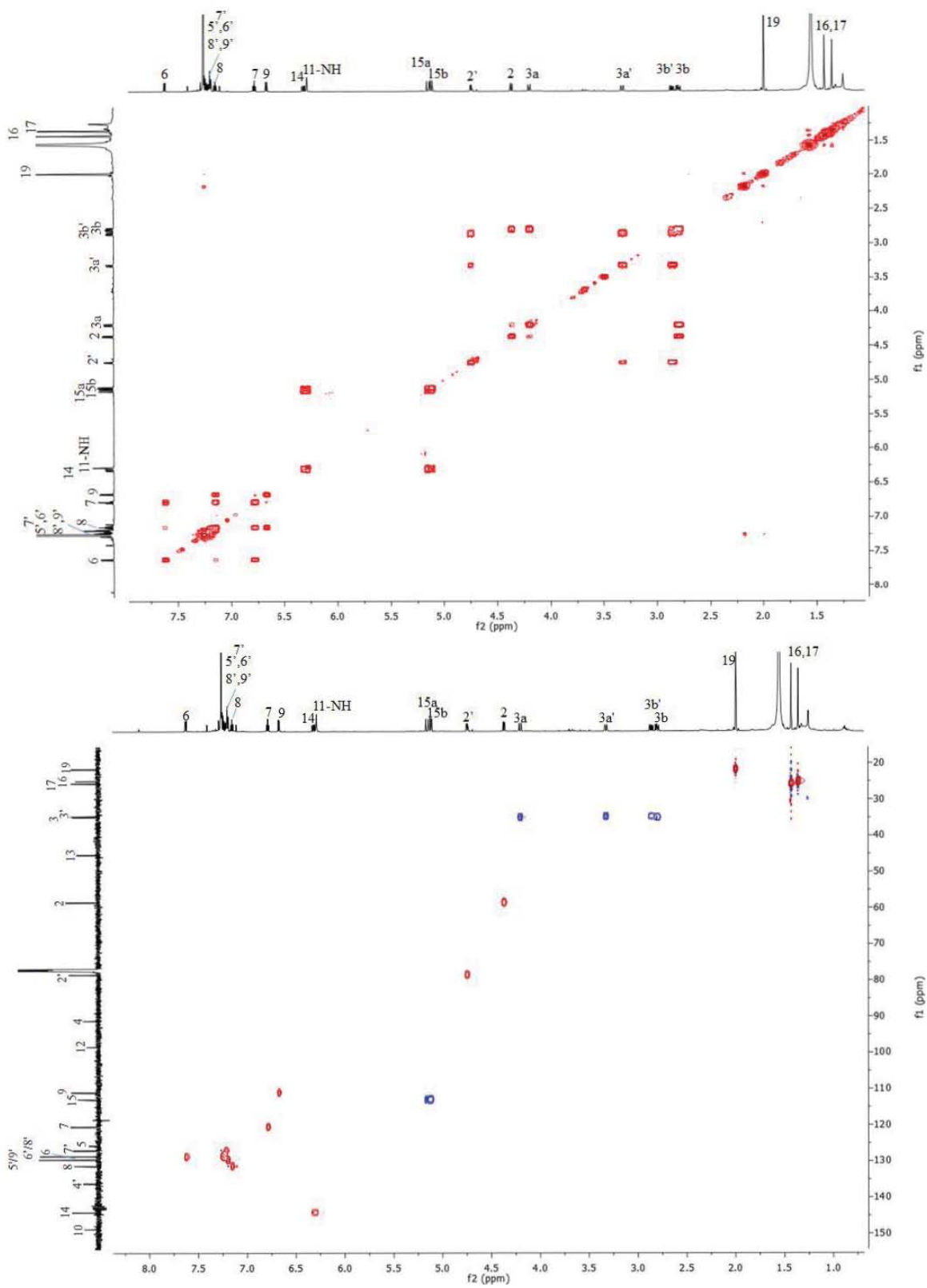


Figura A 6. Espectros COSY (arriba) y HSQC (abajo) del compuesto 5.

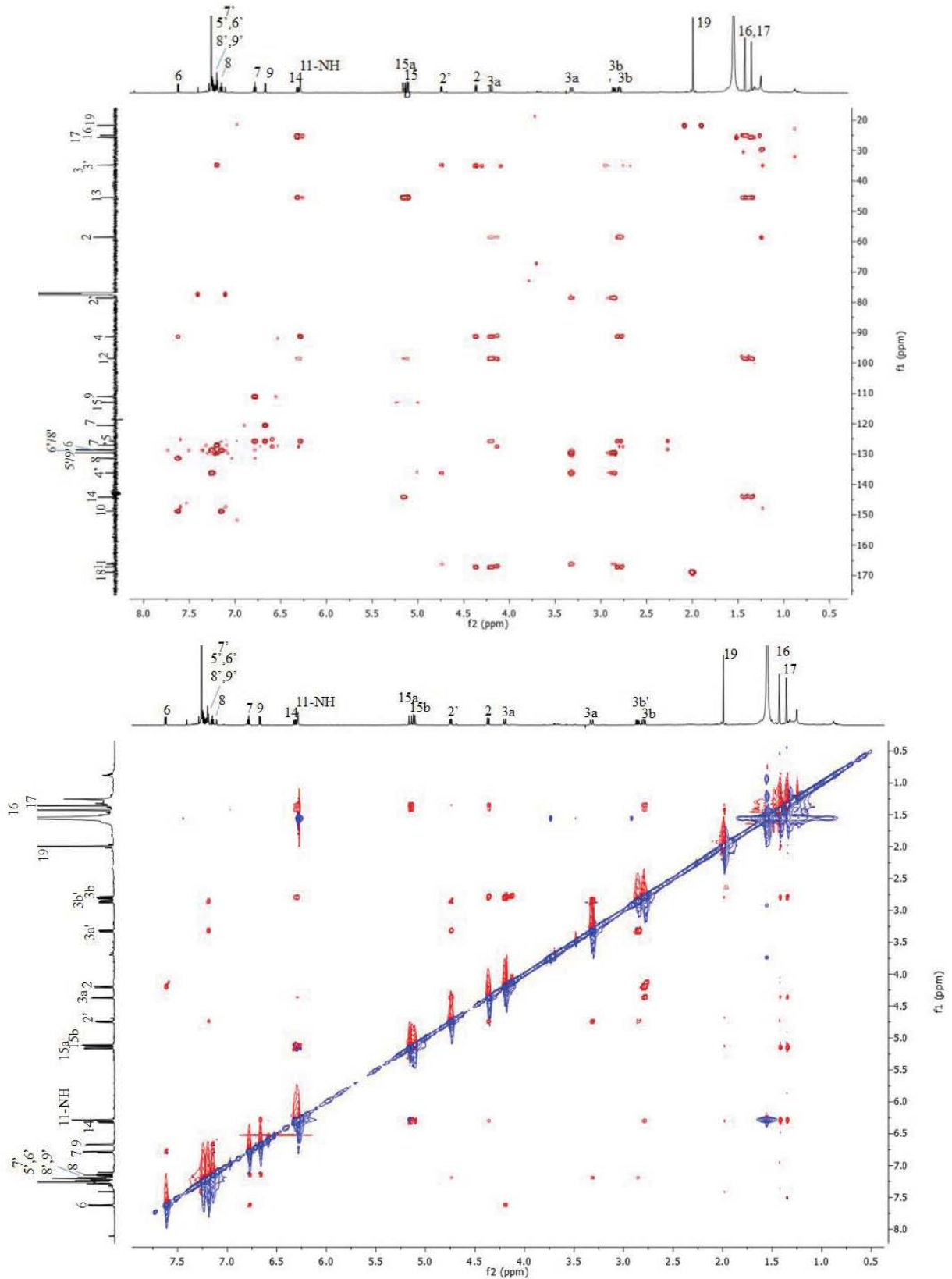


Figura A 7. Espectros HMBC (arriba) y NOESY (abajo) del compuesto 5.

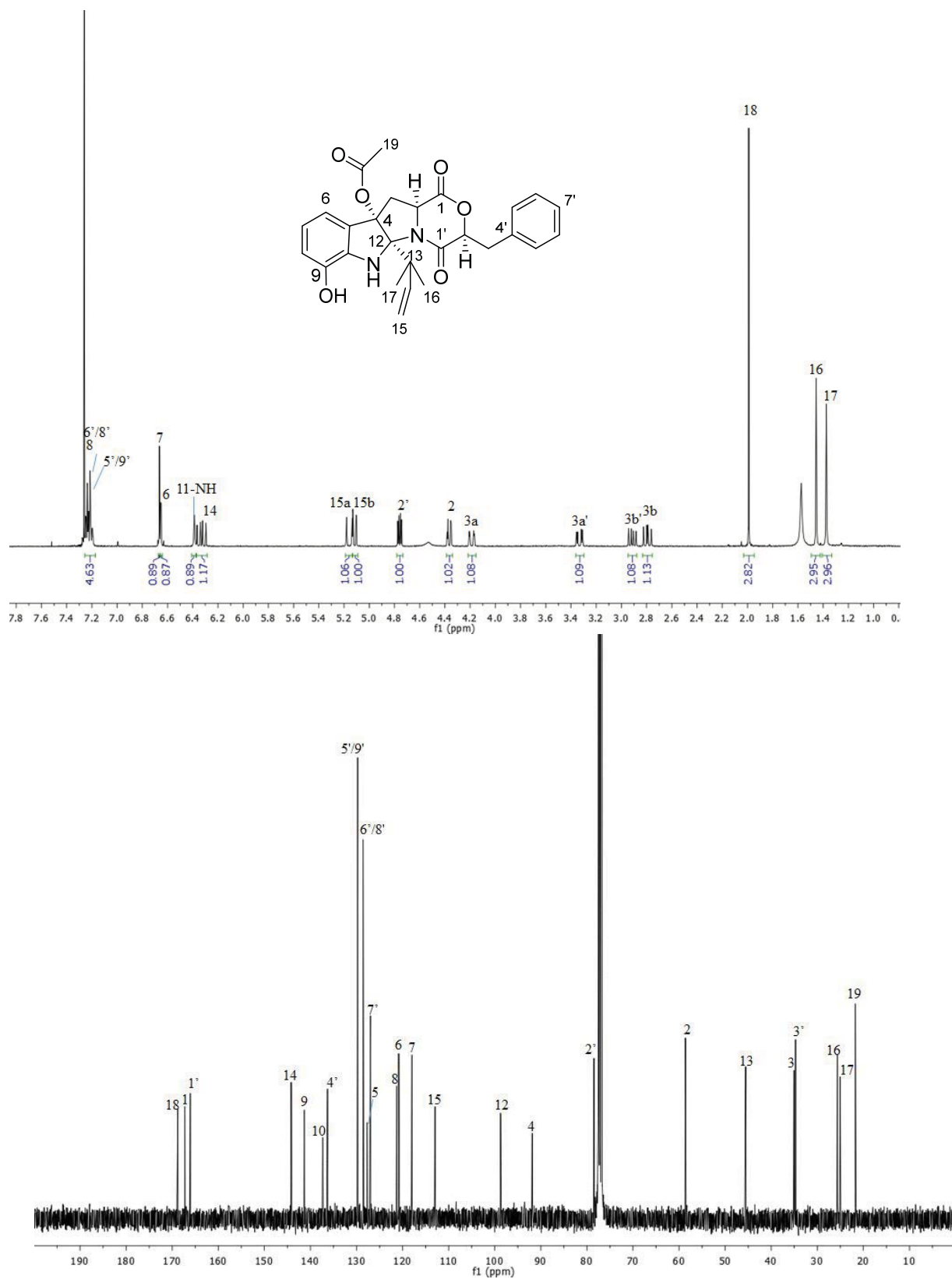


Figura A 8. Espectros de RMN ^1H (arriba) y ^{13}C (abajo) del compuesto **8** (CDCl_3 , 400 y 100 MHz, respectivamente).

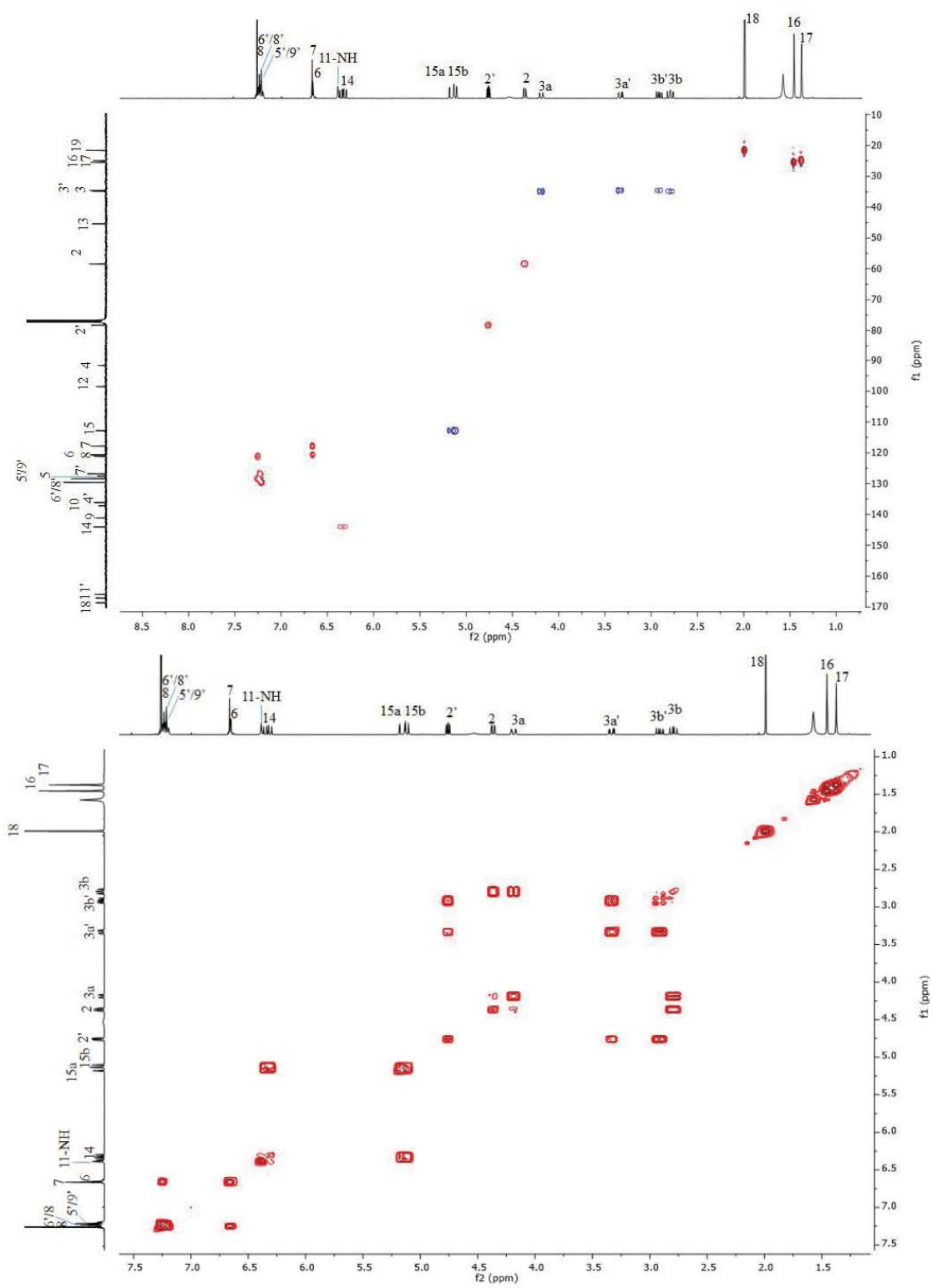


Figura A 9. Espectros HSQC (arriba) y COSY (abajo) del compuesto 8.

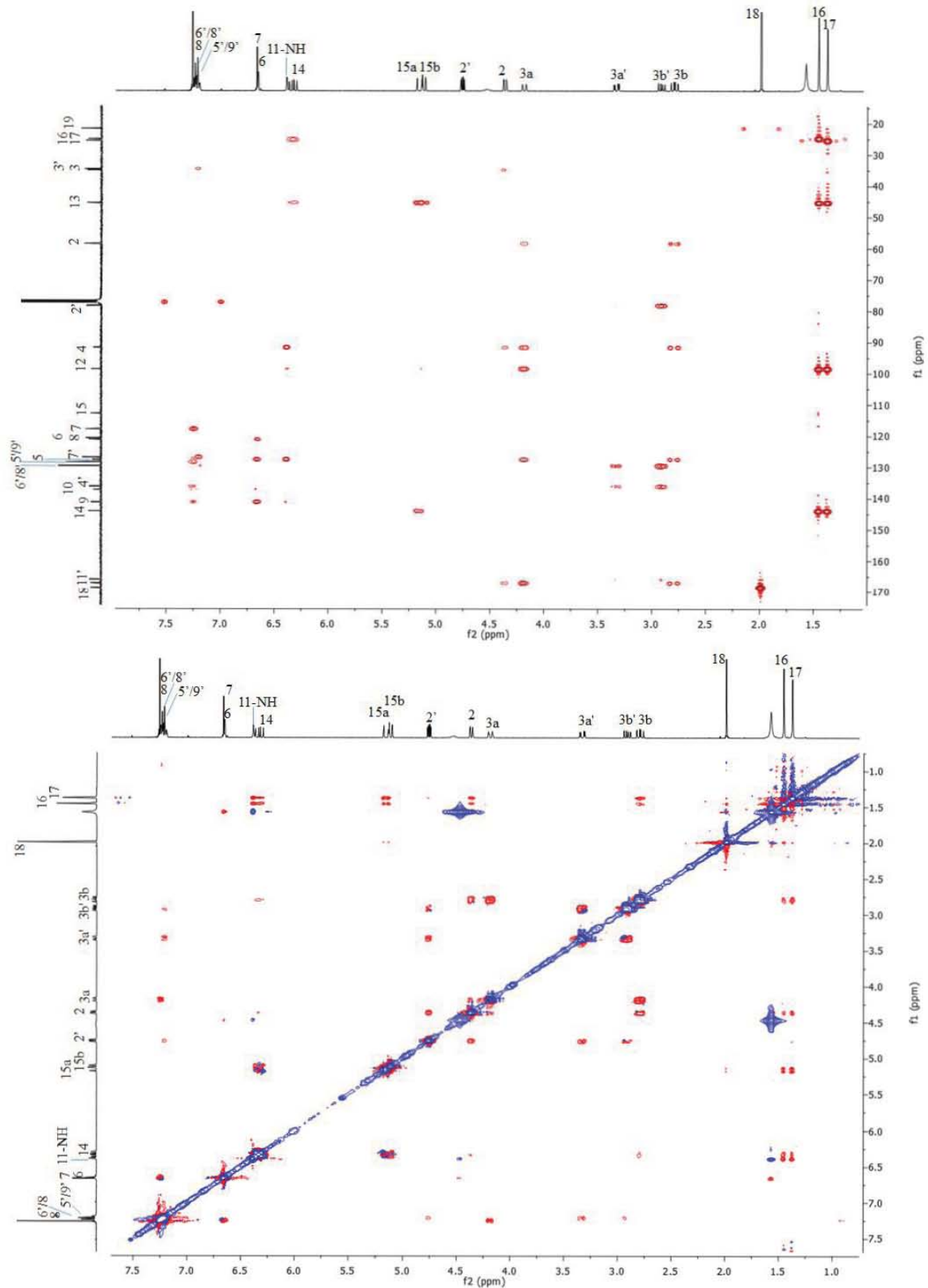


Figura A 10. Espectros HMBC (arriba) y NOESY (abajo) del compuesto **8**.

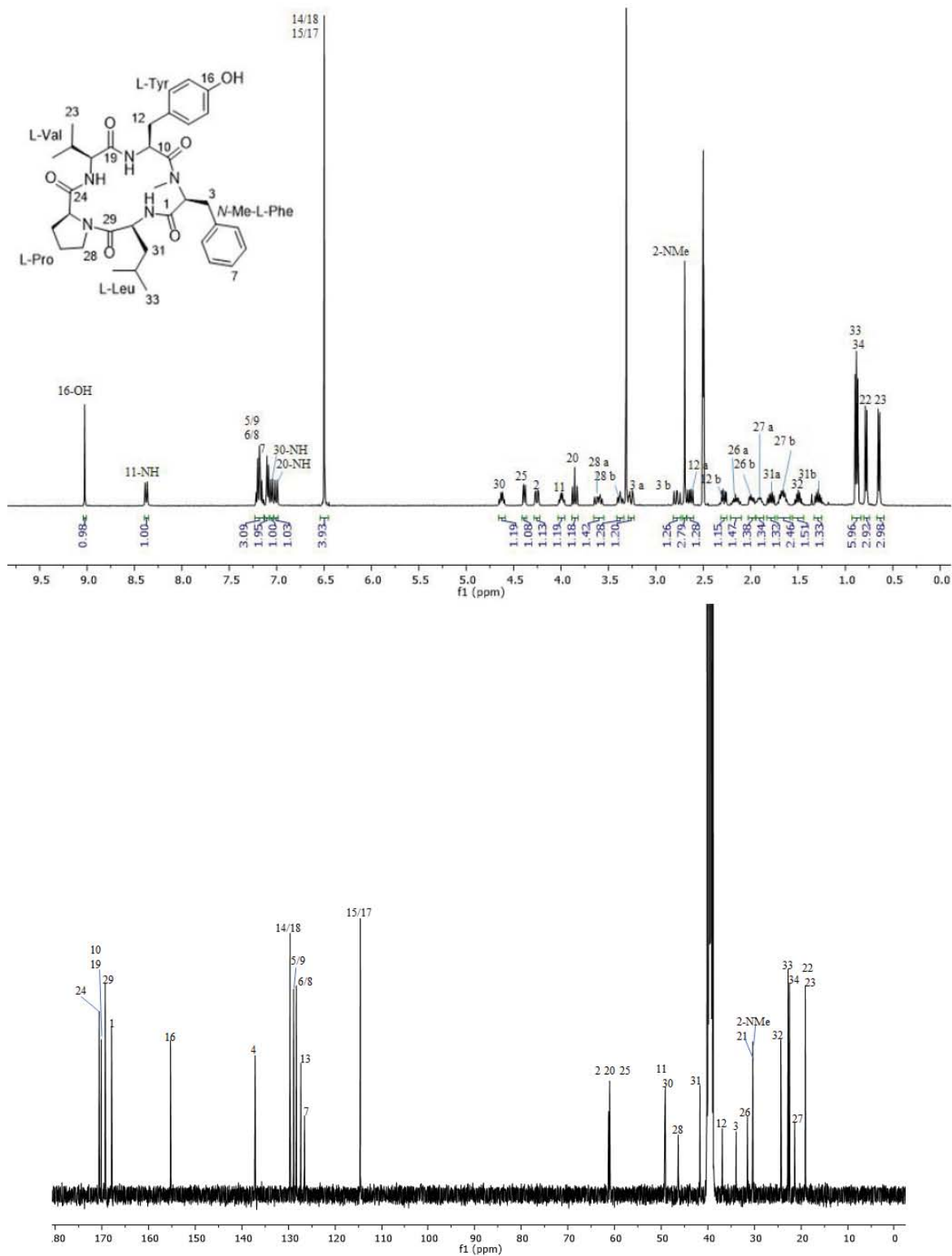


Figura A 11. Espectros de RMN ^1H (arriba) y ^{13}C (abajo) para el compuesto 6 (DMSO- d_6 , 400 MHz).

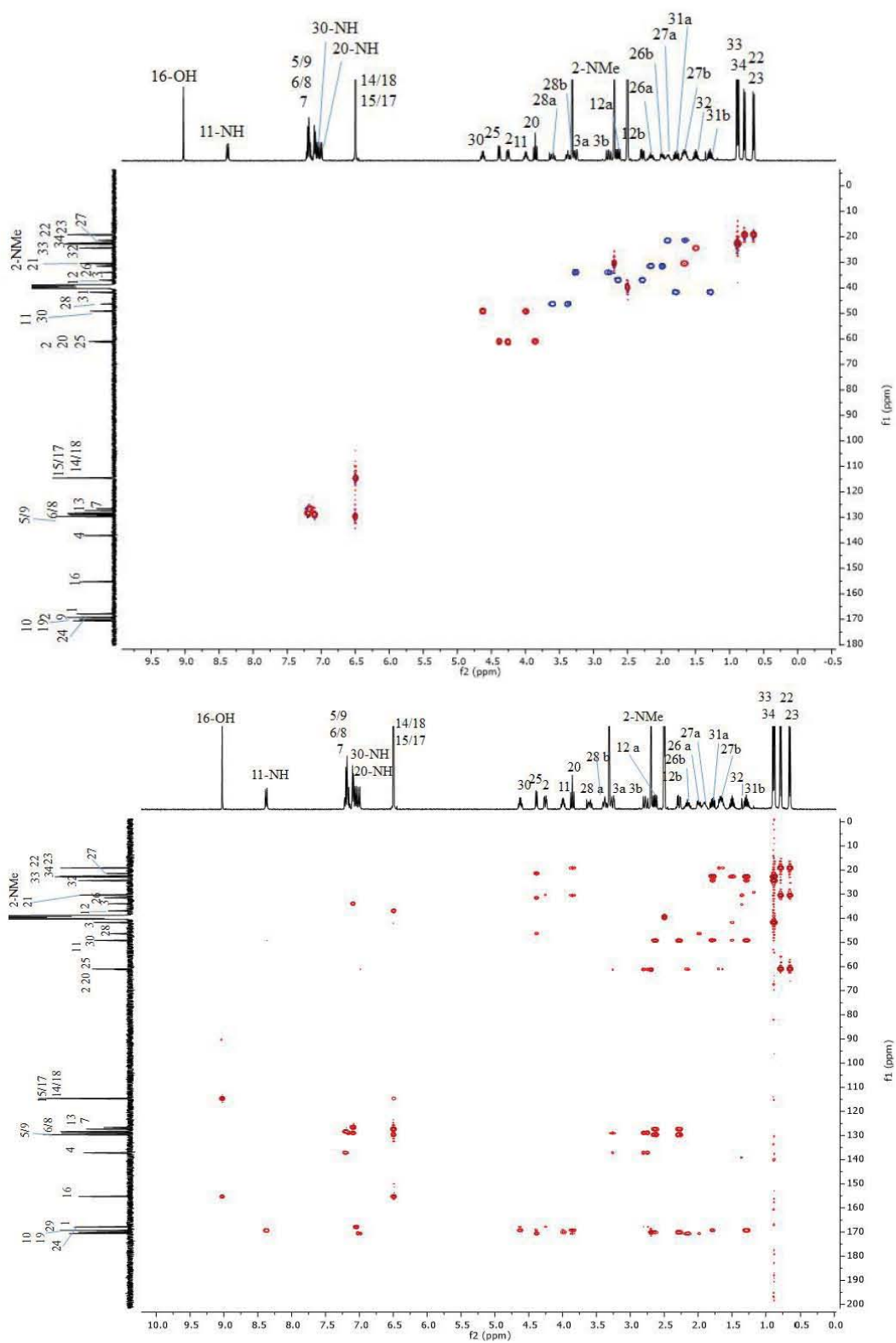


Figura A 12. Espectros HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 6.

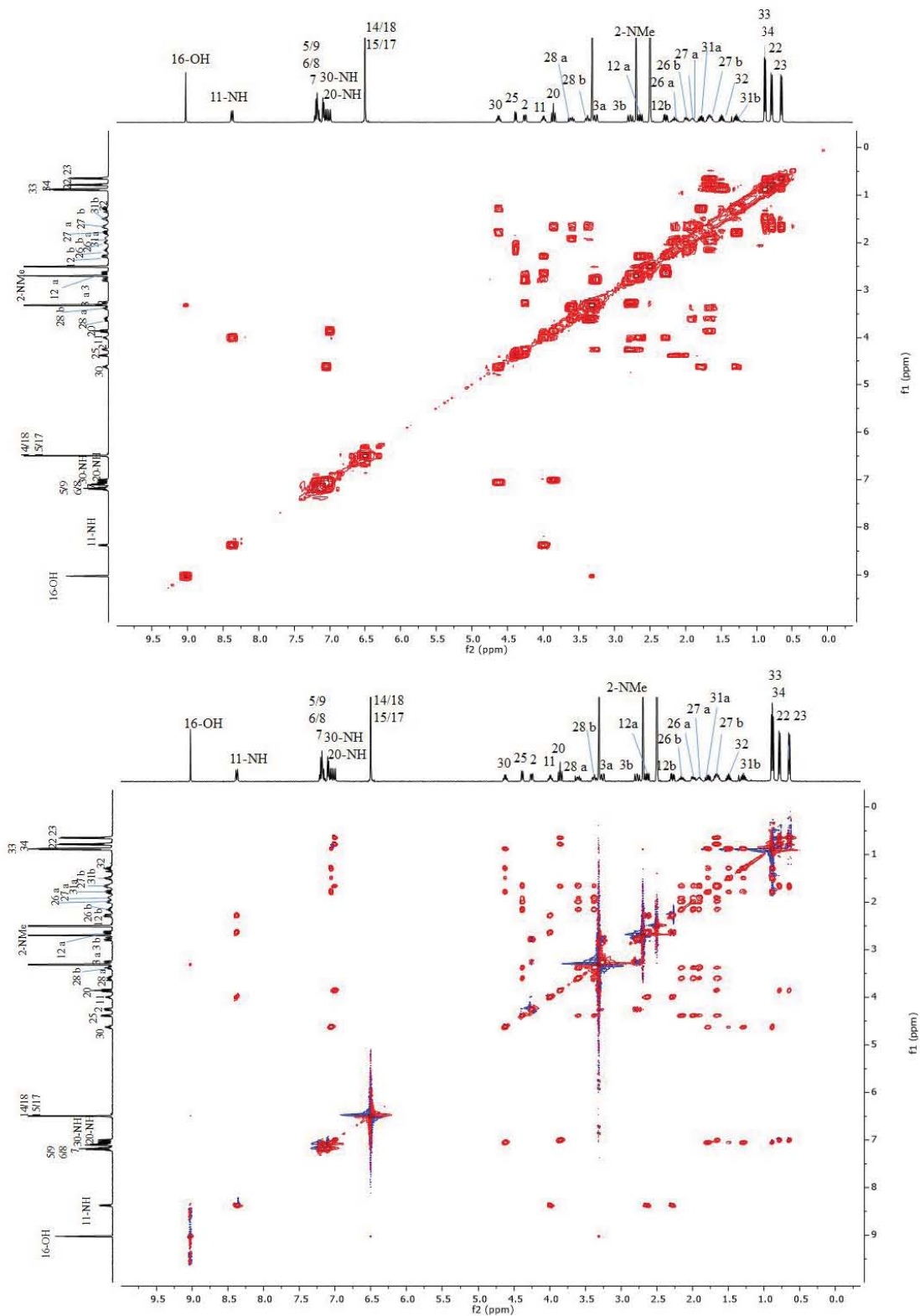


Figura A 13. Espectros COSY (arriba) y TOCSY (abajo) del compuesto 6.

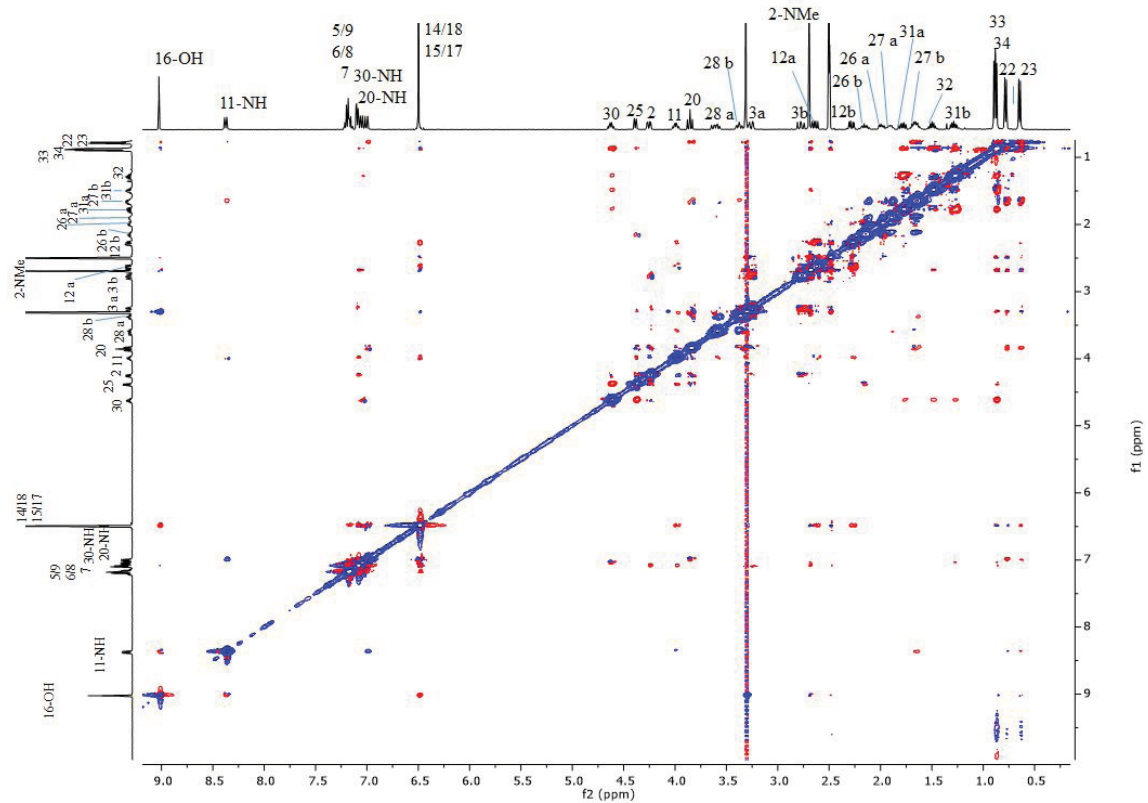


Figura A 14. Espectro NOESY del compuesto 6.

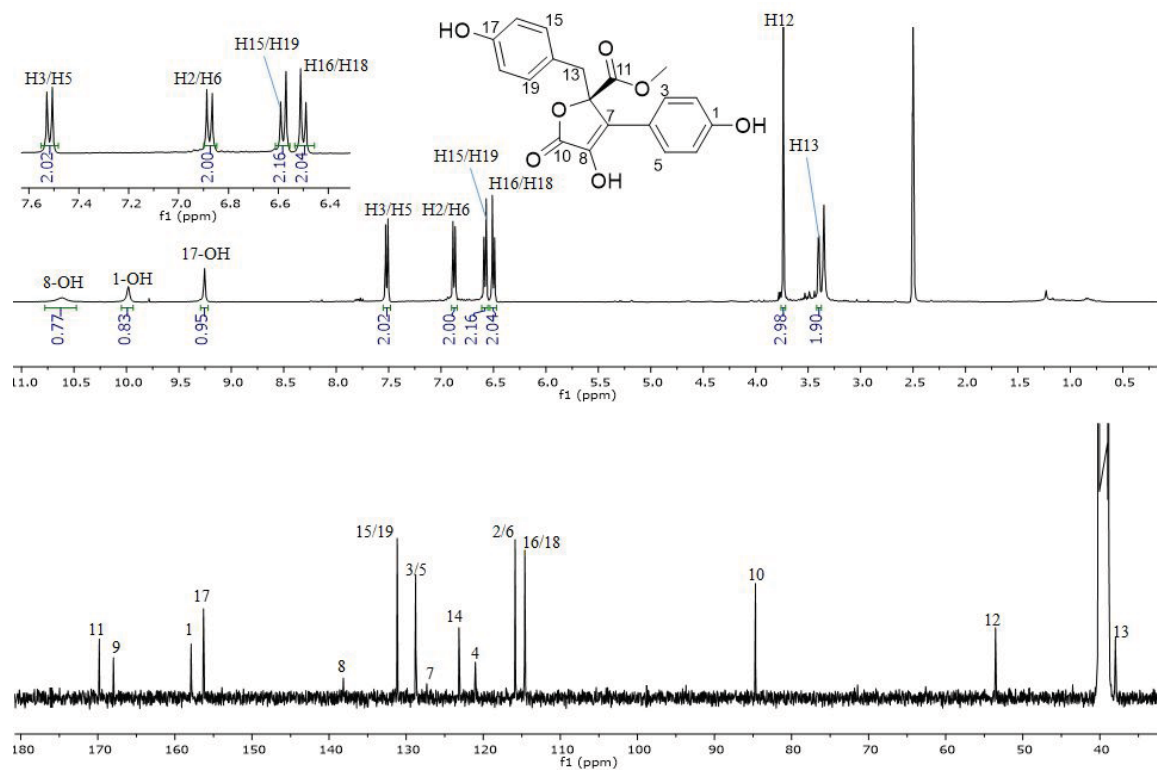


Figura A 15. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 9 (DMSO- d_6 , 400 y 100 MHz, respectivamente).

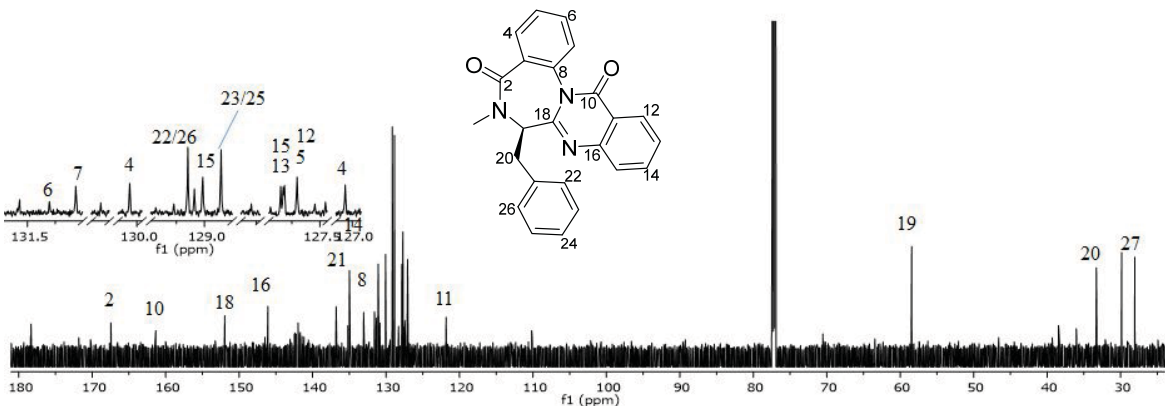
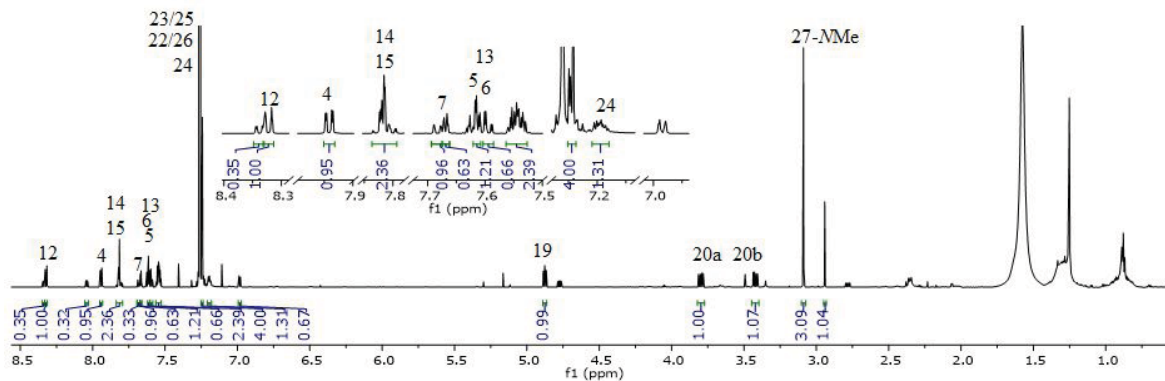


Figura A 16. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **10** (CDCl_3 , 700 y 175 MHz, respectivamente).

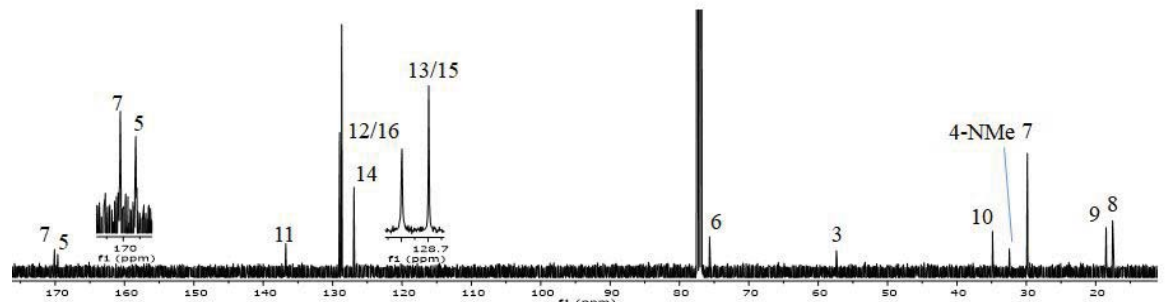
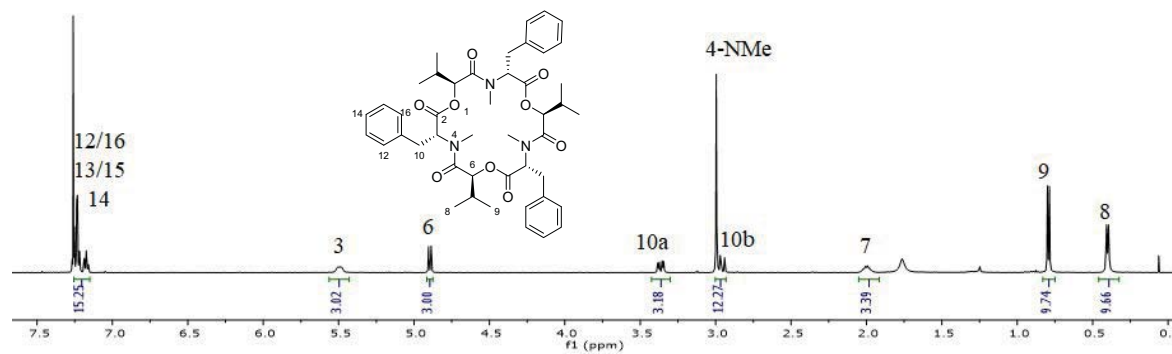


Figura A 17. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **11** (CDCl_3 , 500 y 125 MHz, respectivamente).

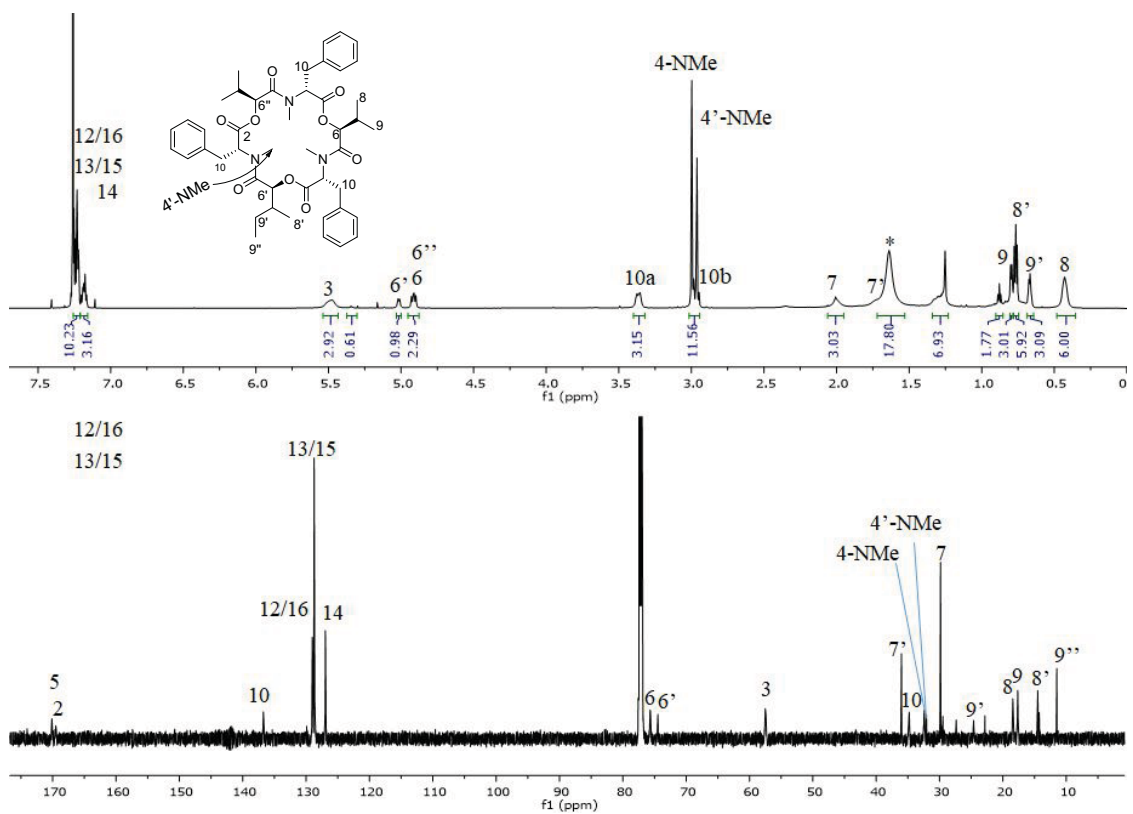


Figura A 18. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **12** (CDCl_3 , 500 y 125 MHz, respectivamente).

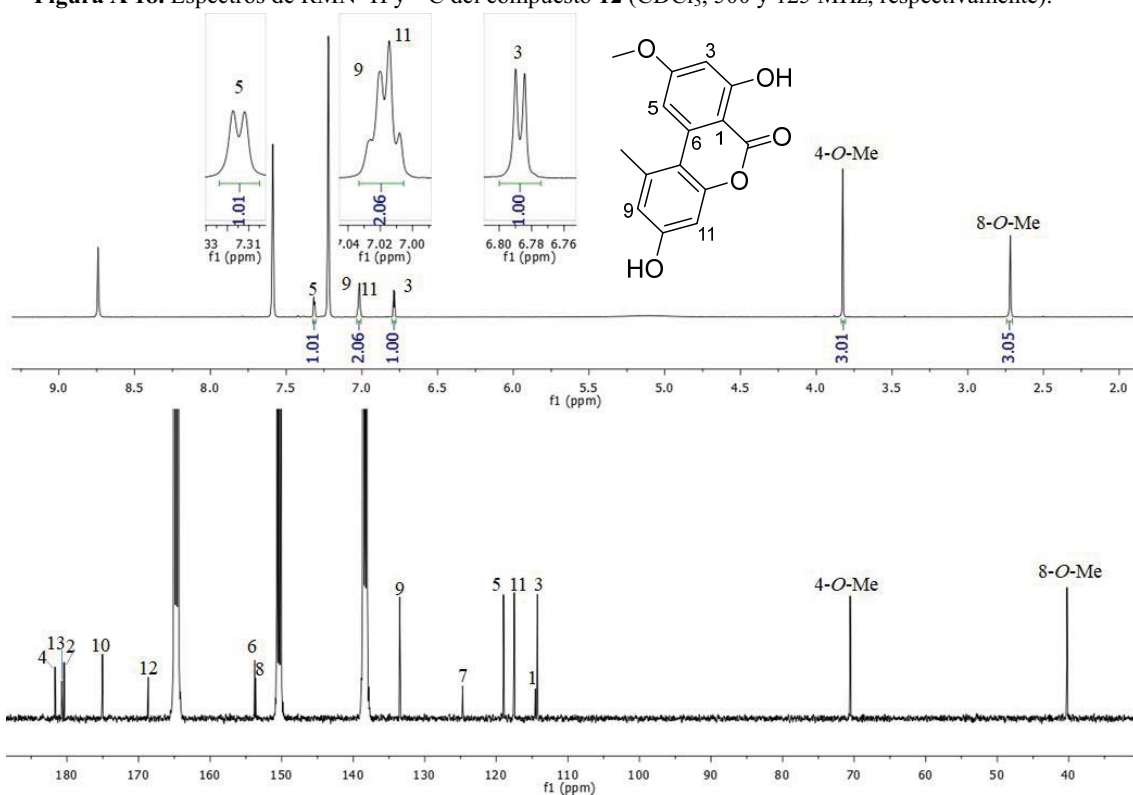


Figura A 19. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **13** ($\text{piridina-}d_5$, 400 y 100 MHz, respectivamente).

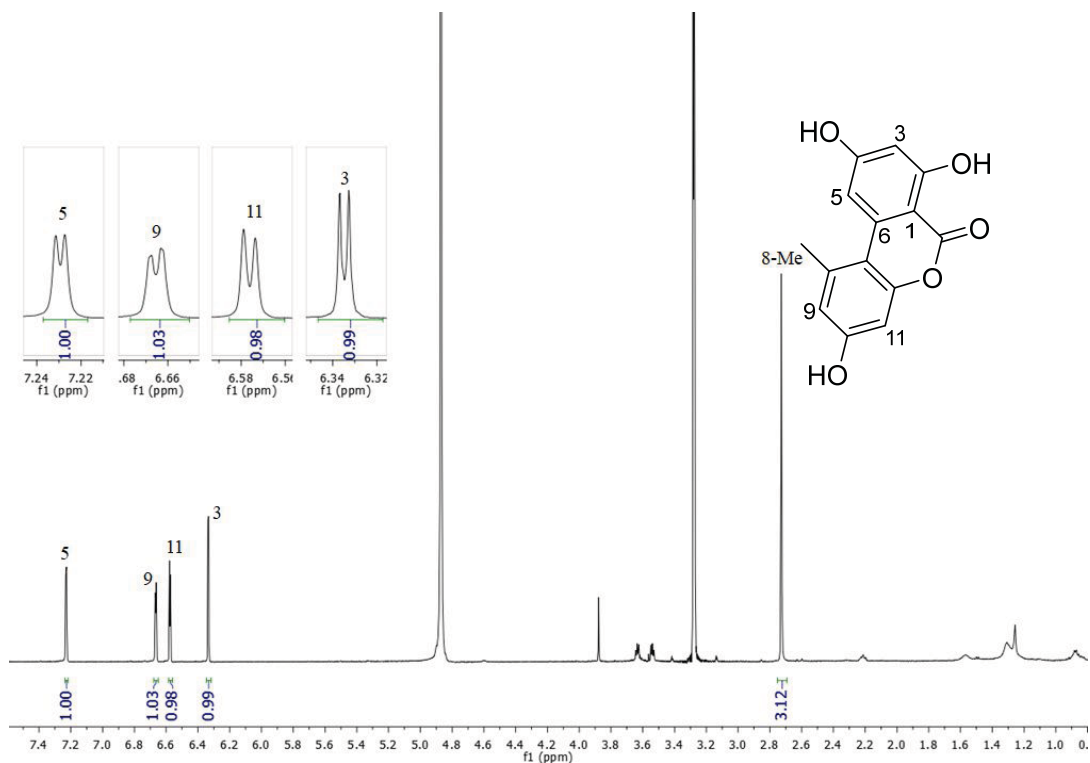


Figura A 20. Espectro de RMN ^1H del compuesto **14** (CD_3OD , 500 MHz).

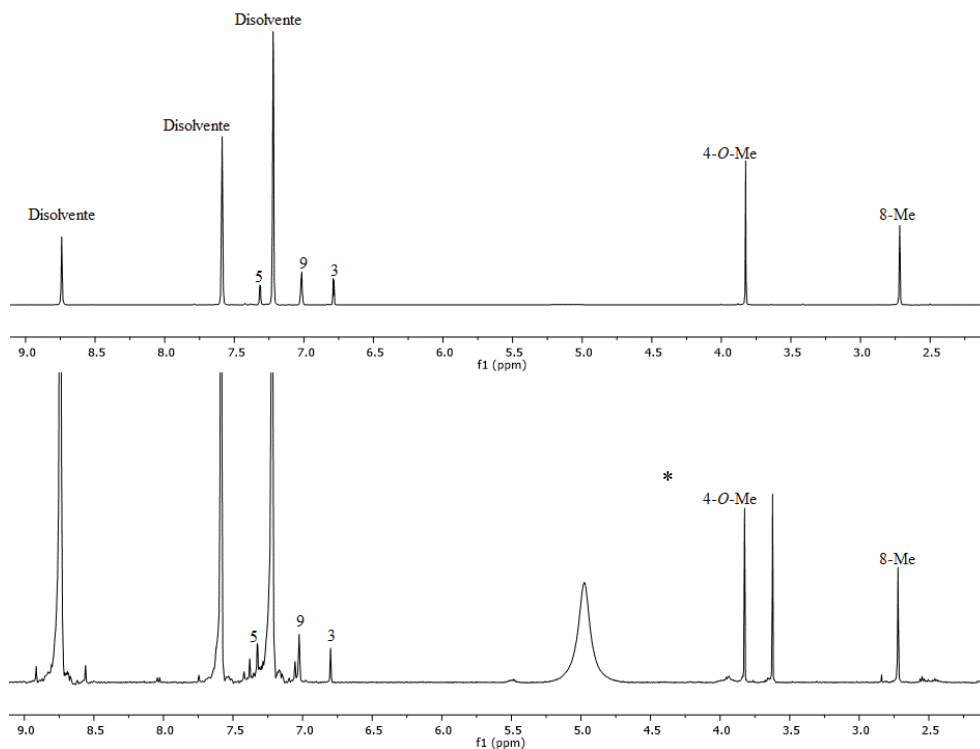


Figura A 21. Comparación de espectros de RMN ^1H del compuesto **13** (arriba) y de la fase orgánica obtenida de la hidrólisis de **15** (abajo) (piridina- d_5 , 400 y 500 MHz, respectivamente). *Impureza procedente de la reacción de hidrólisis.

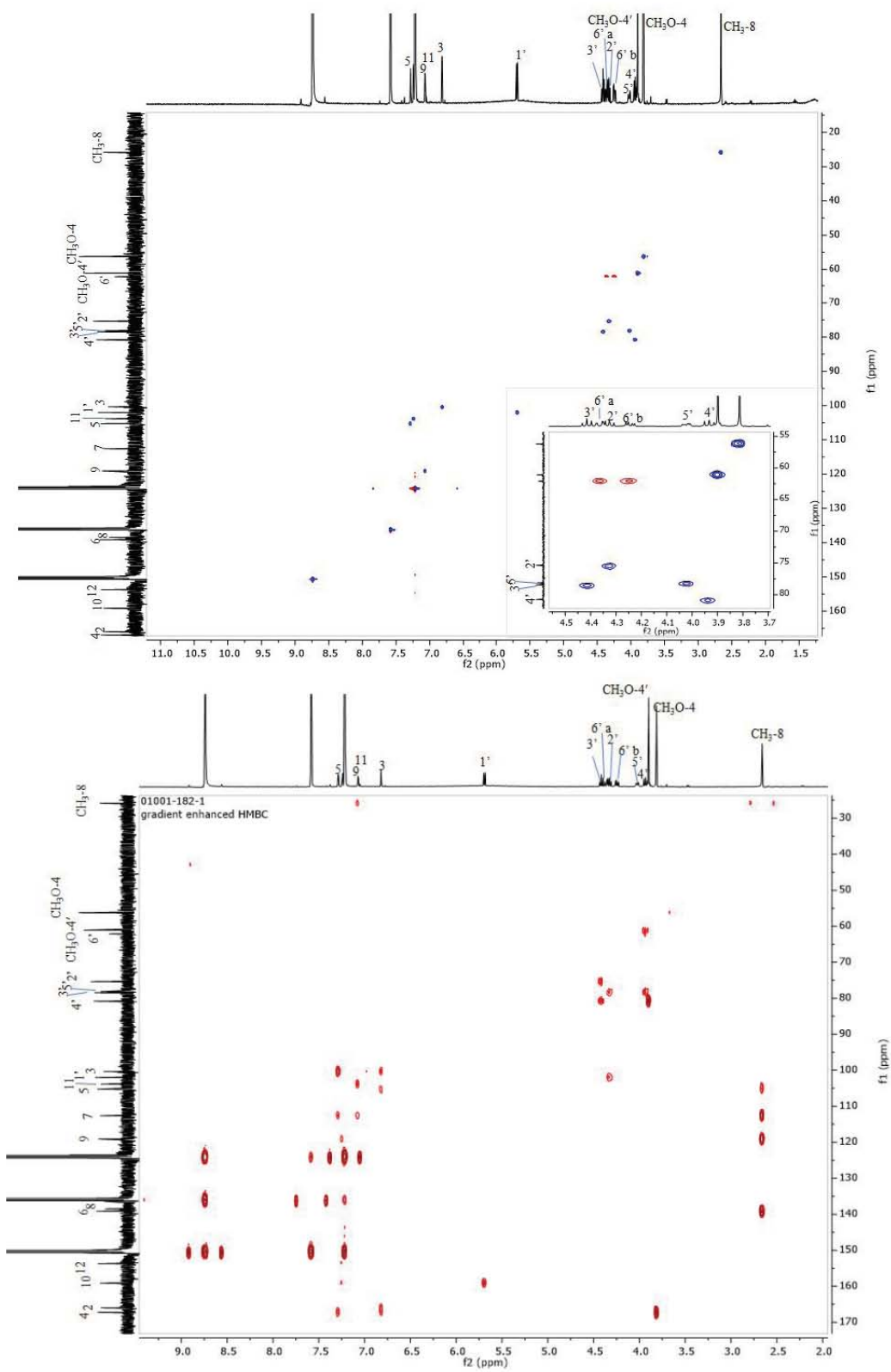


Figura A 22. Espectros HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 15.

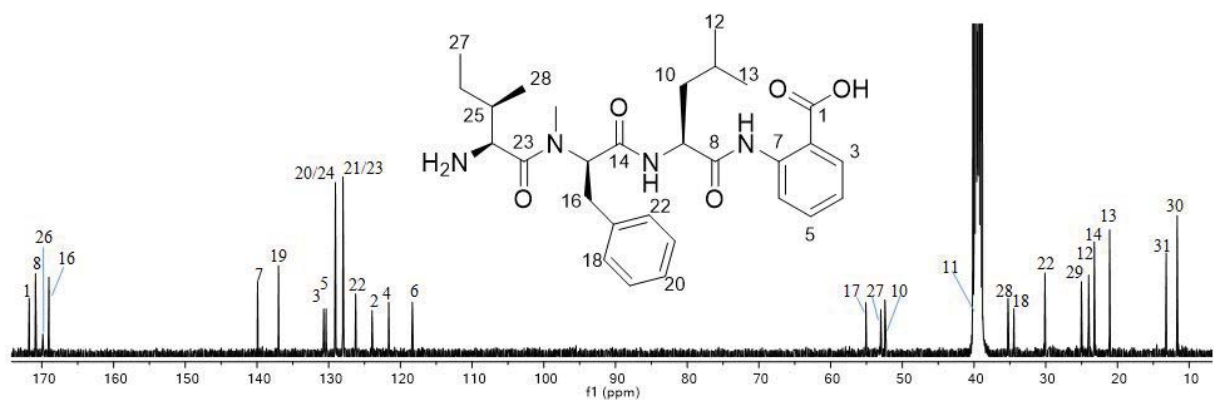
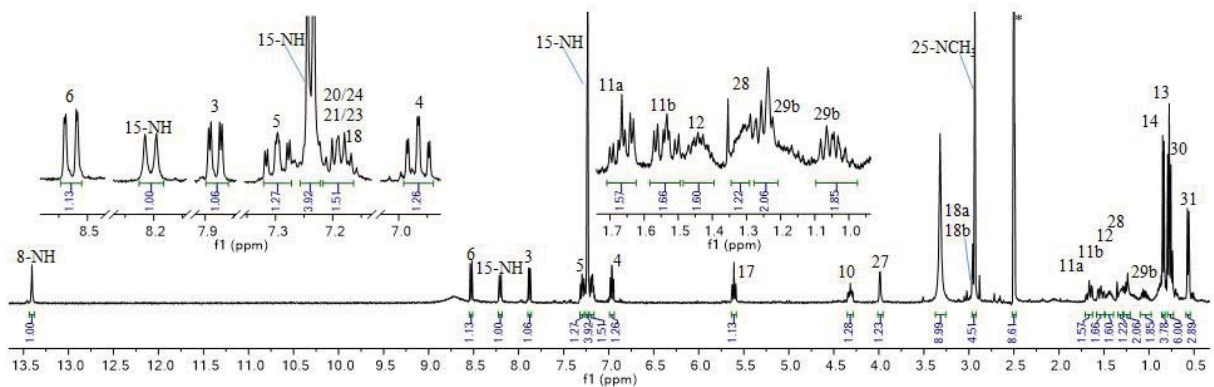


Figura A 23. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **16** ($\text{DMSO-}d_6$, 400 y 100 MHz, respectivamente).

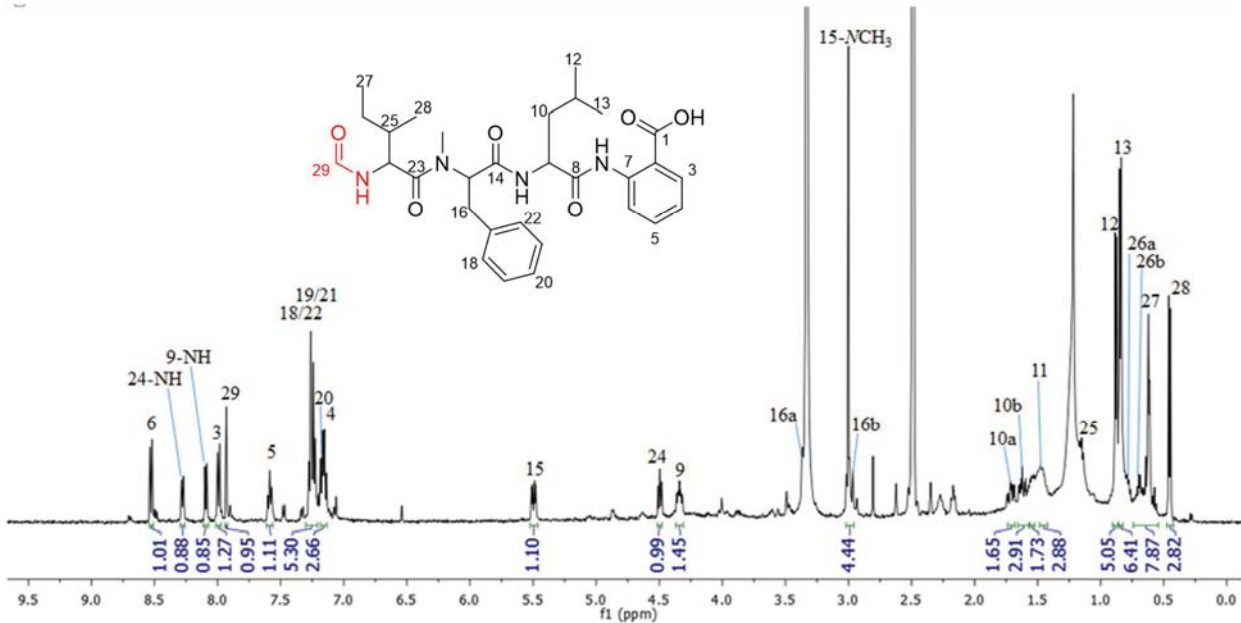


Figura A 24. Espectro RMN ^1H del compuesto **17** ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz).

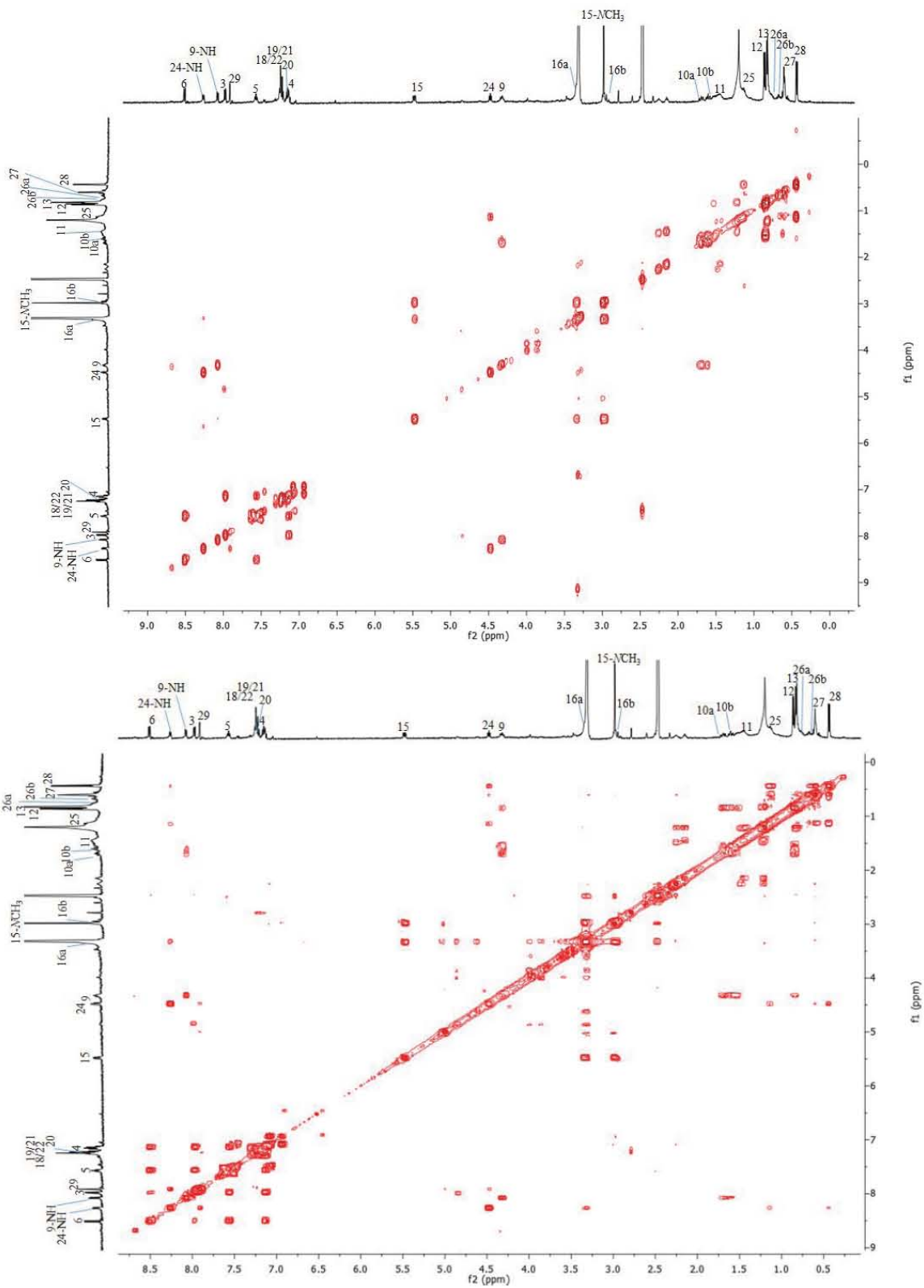


Figura A 25. Espectros COSY (arriba) y TOCSY (abajo) del compuesto 17.

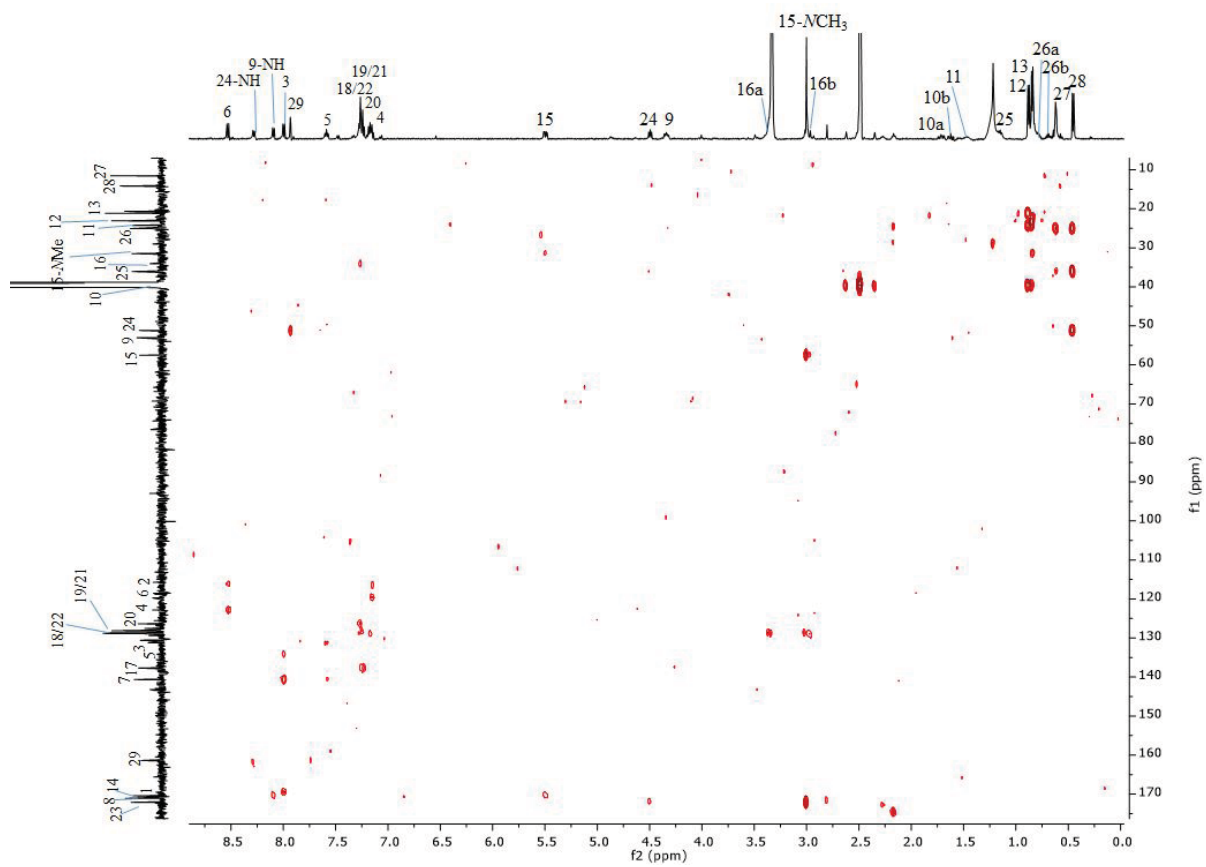


Figura A 26. Espectro HMBC del compuesto 17 (DMSO-*d*₆).

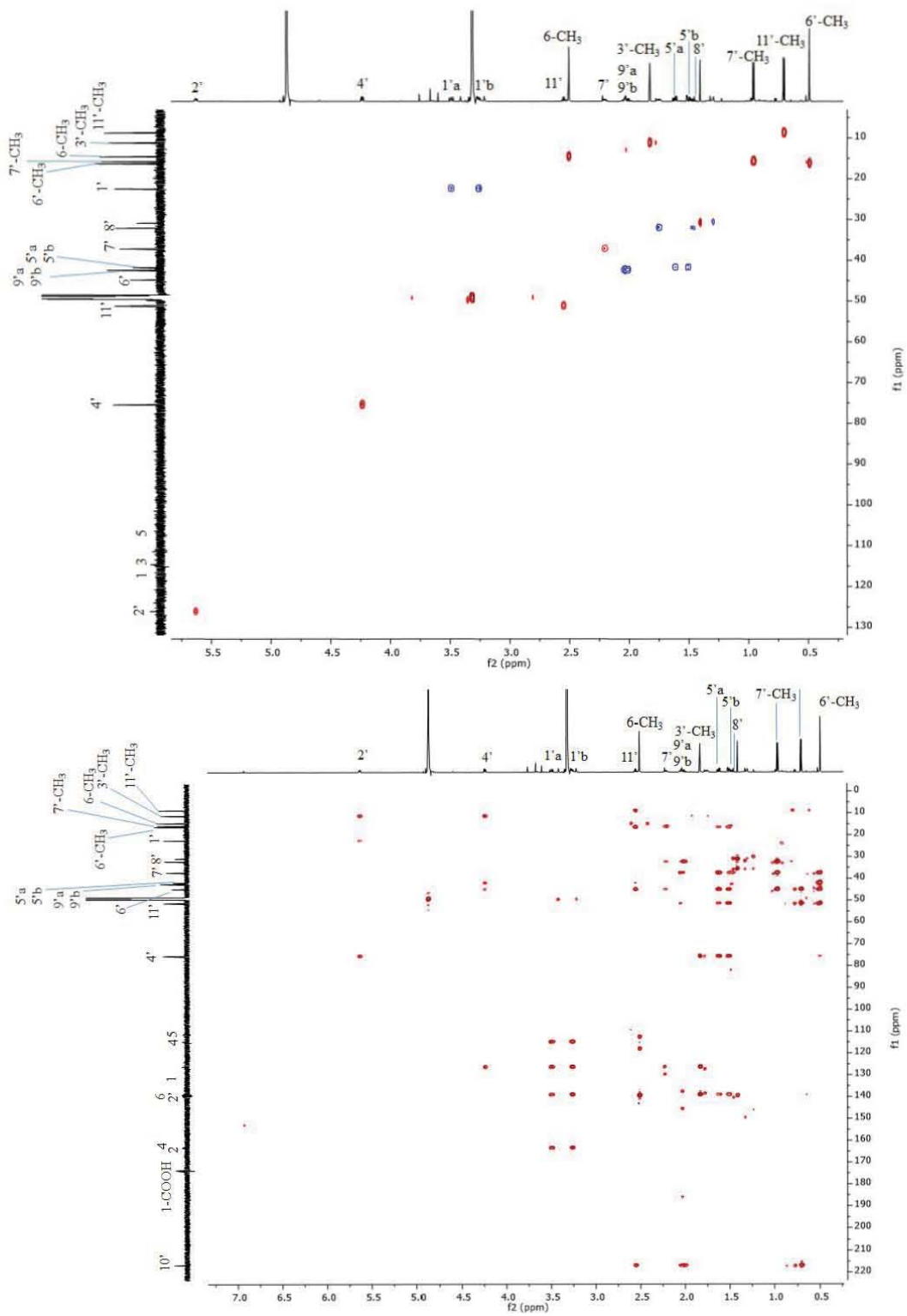


Figura A 27. Espectros HSQC (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 18.

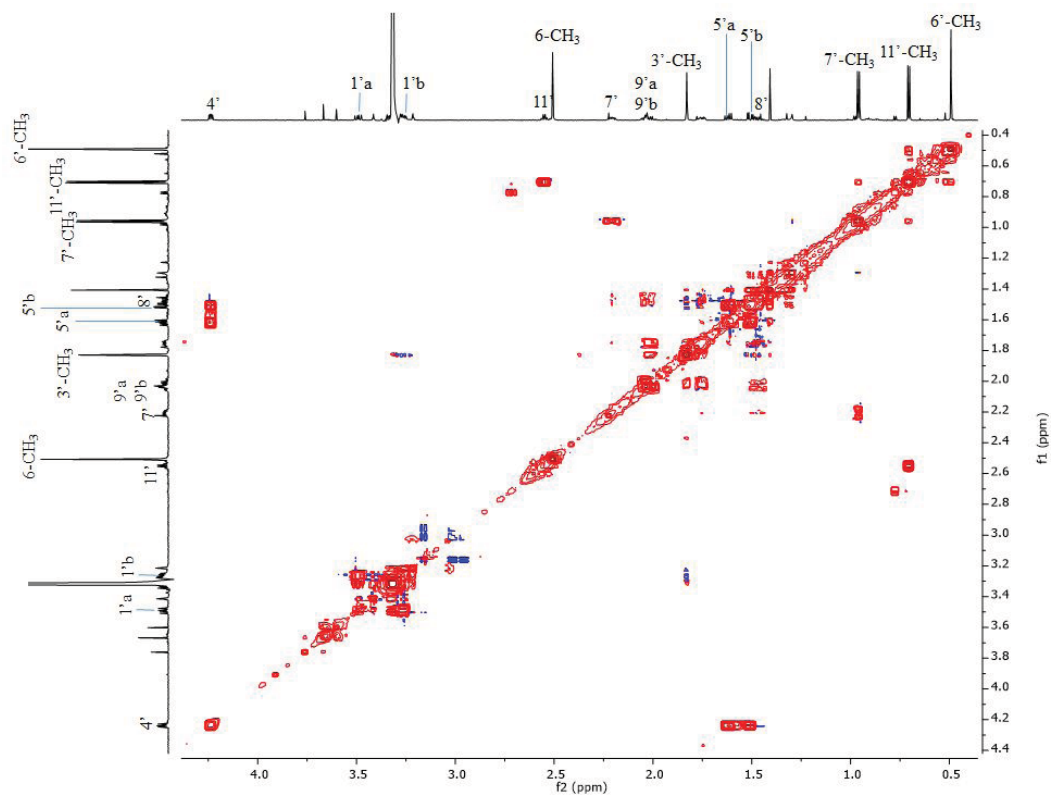


Figura A 28. Espectro COSY del compuesto 18.

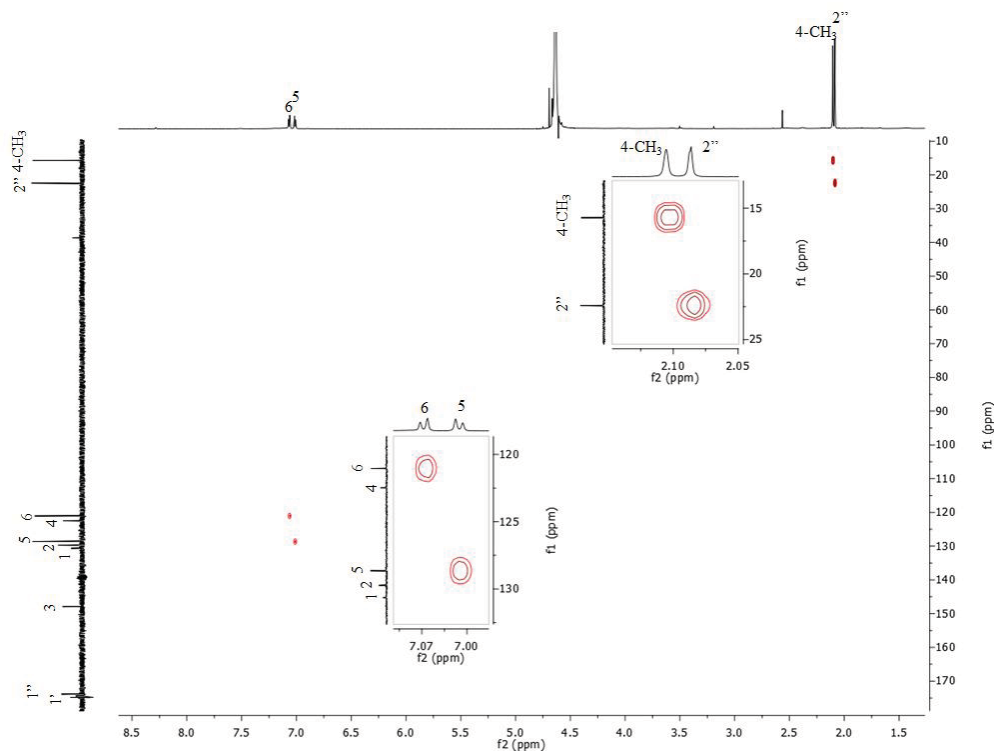


Figura A 29. Espectro HSQC compuesto 20.

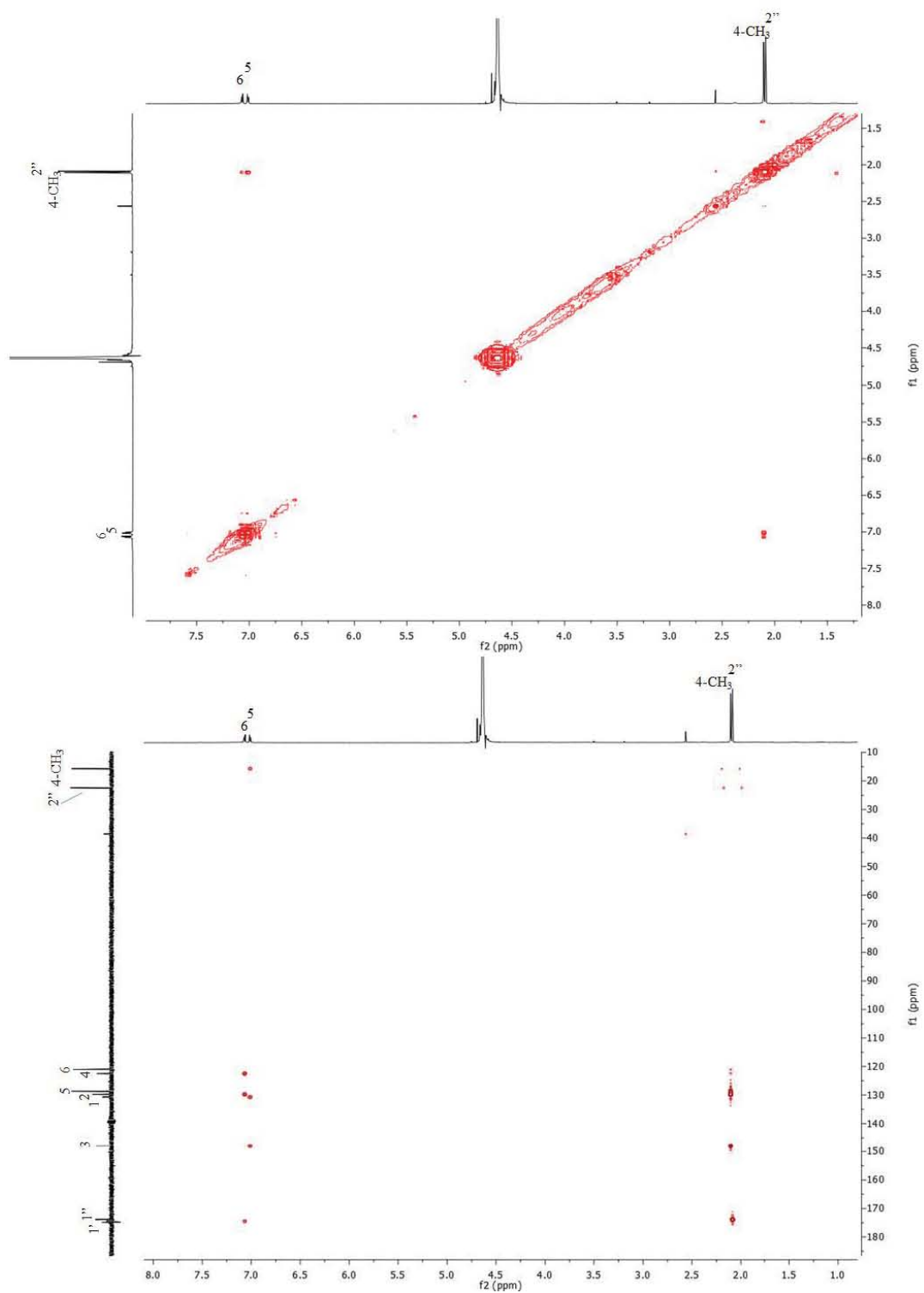


Figura A 30. Espectro COSY (arriba) y HMBC (abajo) del compuesto 20.

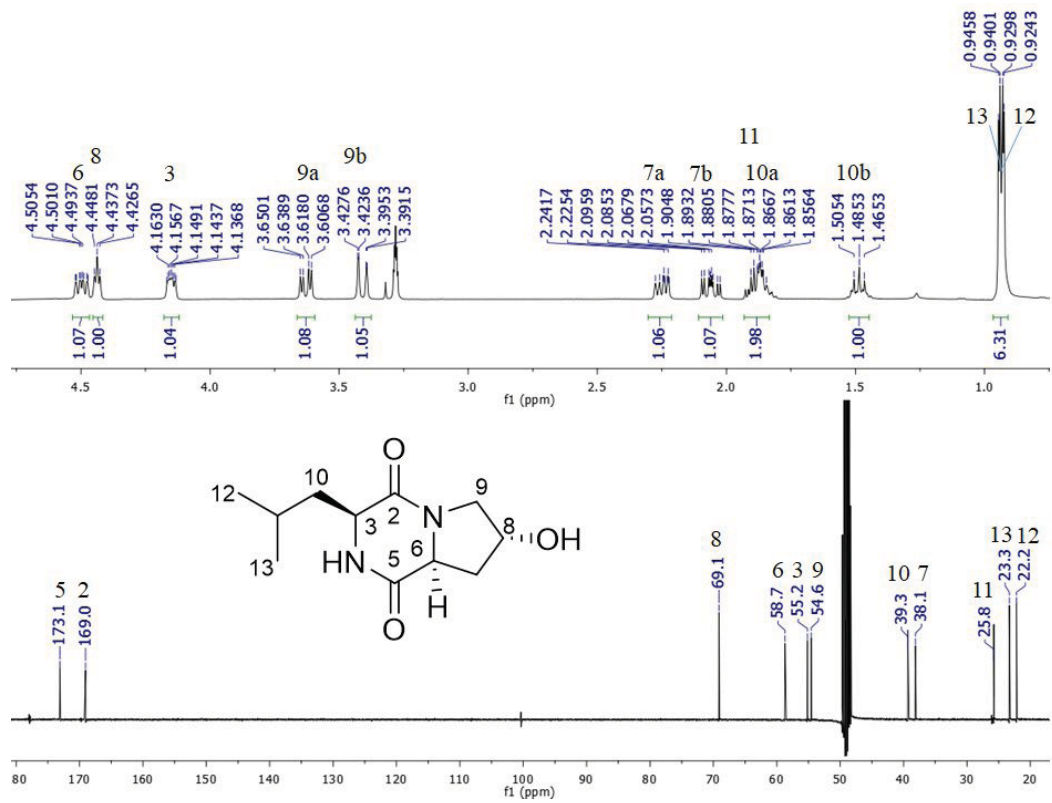


Figura A 31. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 24. (CD_3OD , 400 y 100 MHz).

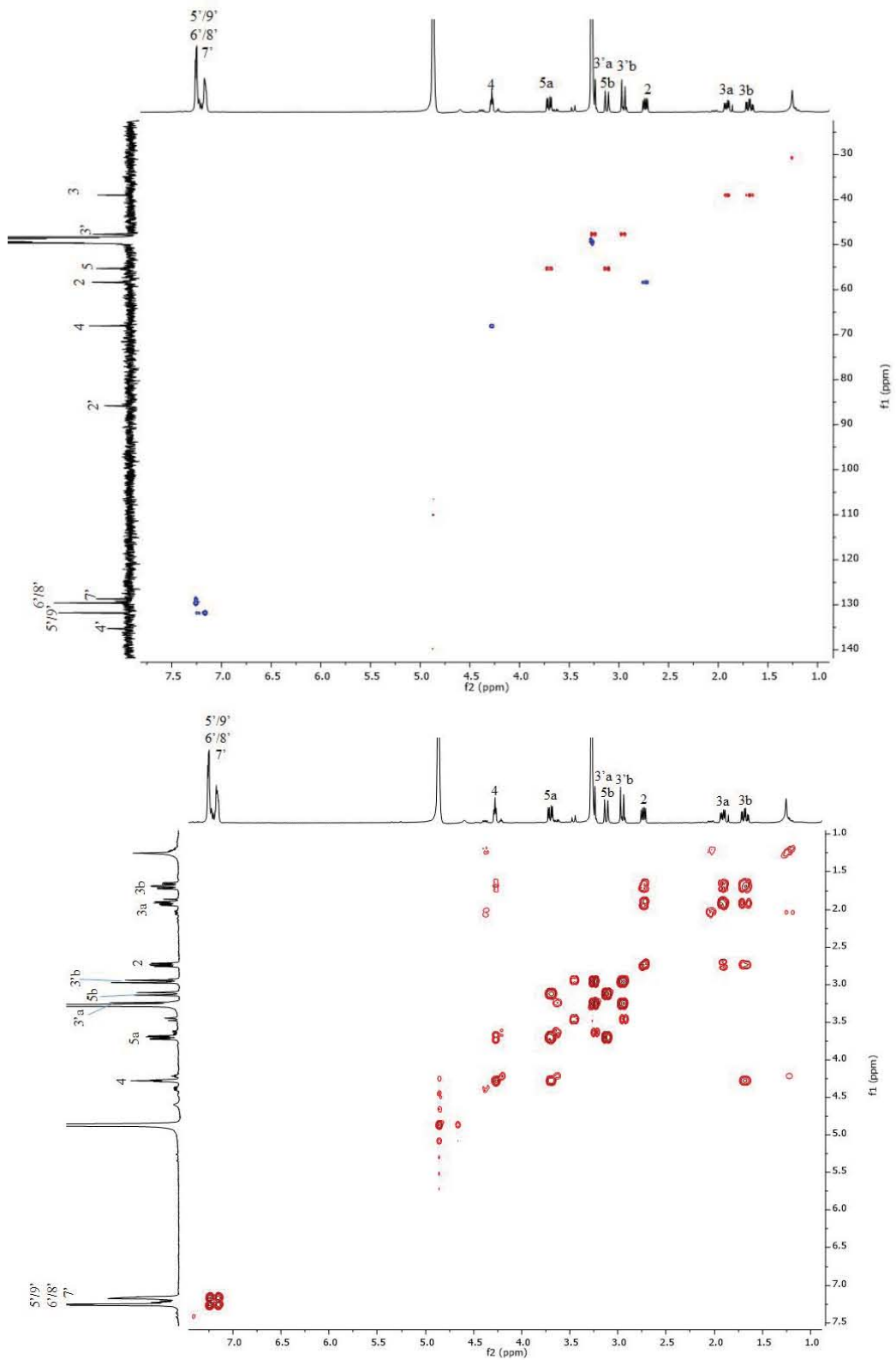


Figura A 32. Espectro HSQC (arriba) y COSY (abajo) del compuesto 25.

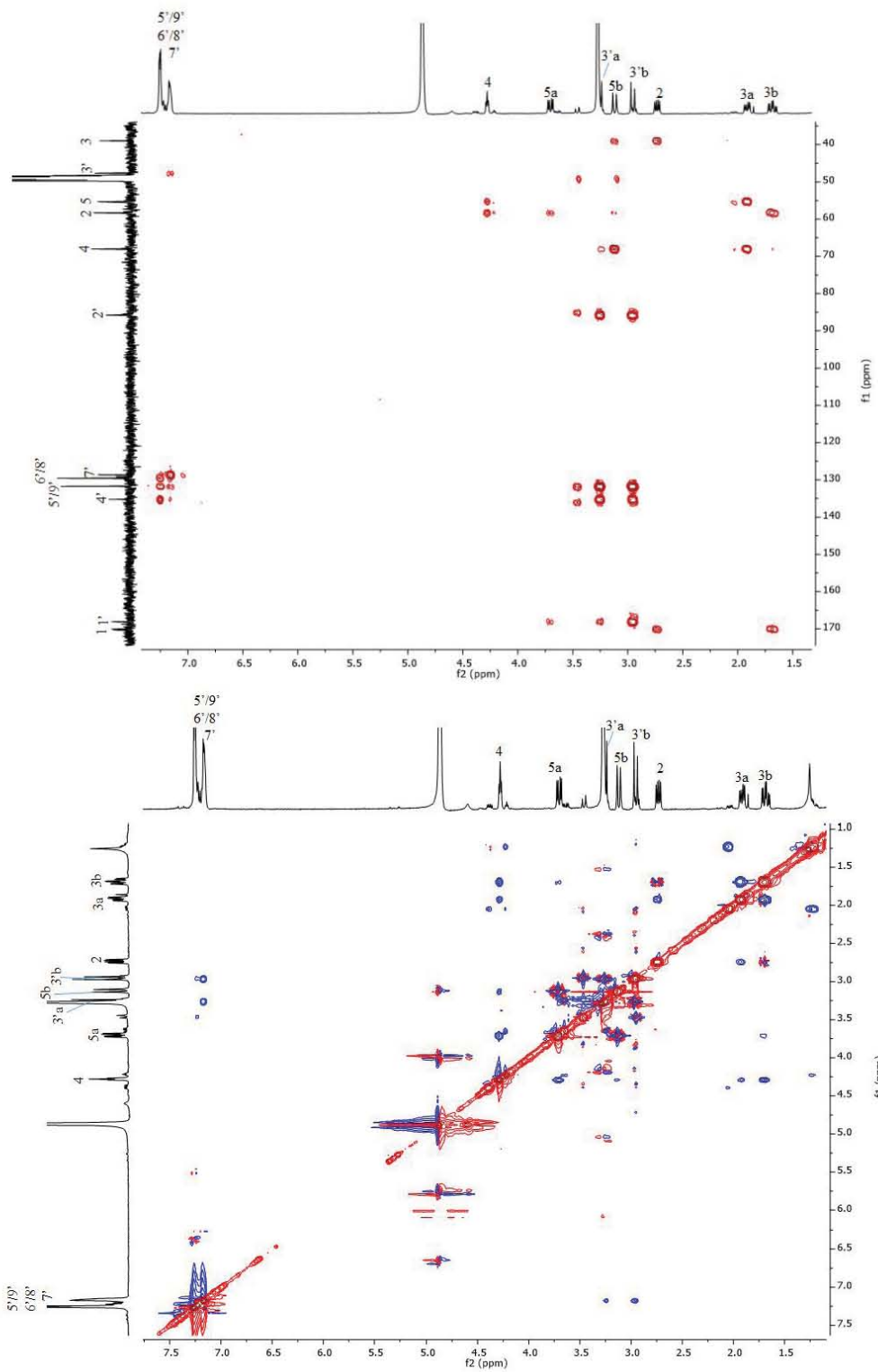


Figura A 33. Espectros HMBC (arriba) y NOESY (abajo) del compuesto 25.

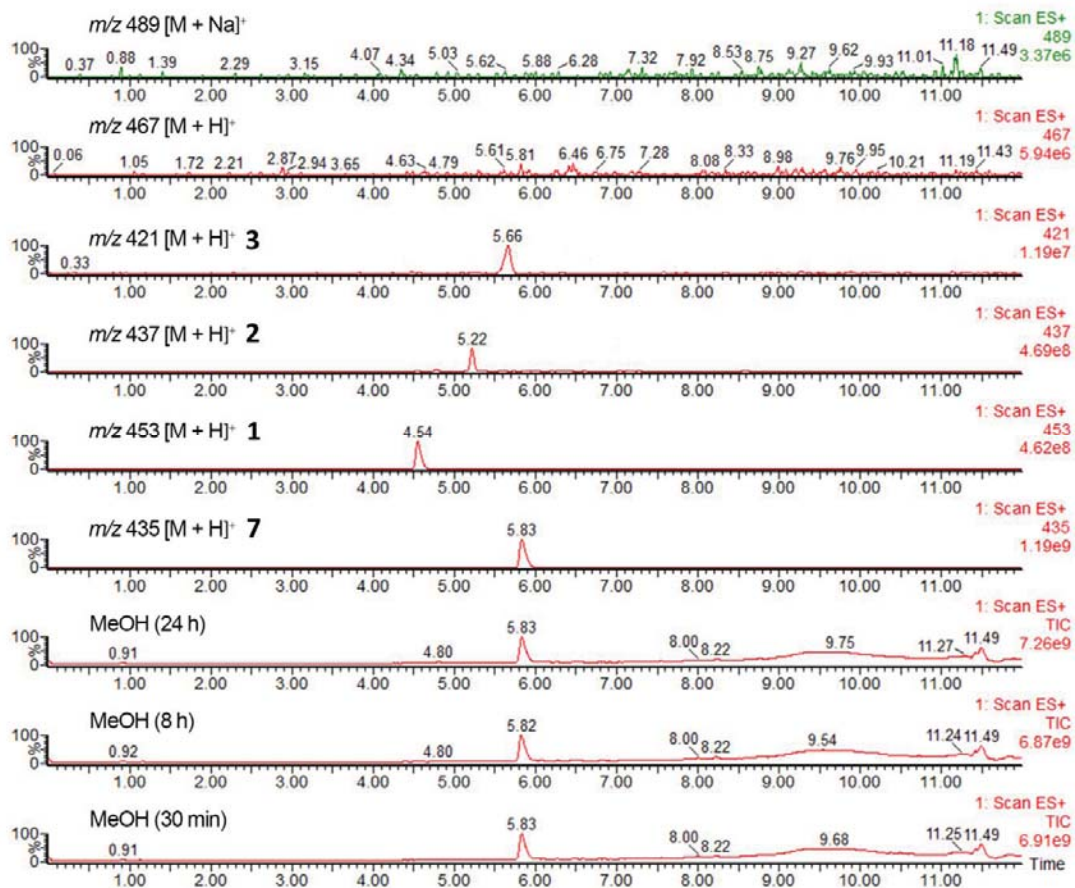


Figura A 34. Análisis por UPLC-ESIMS de 7 en condiciones de metanólisis. De abajo hacia arriba: reacción de 7 por 30 min, 8 y 24 h; Extracción selectiva de los iones moleculares de 1-3 y 7; y búsqueda de los iones m/z 489 $[M + Na]^+$ y 467 $[M + H]^+$ para el éster metílico de *seco*-PF 1233 B en la reacción 7 por 24 h.

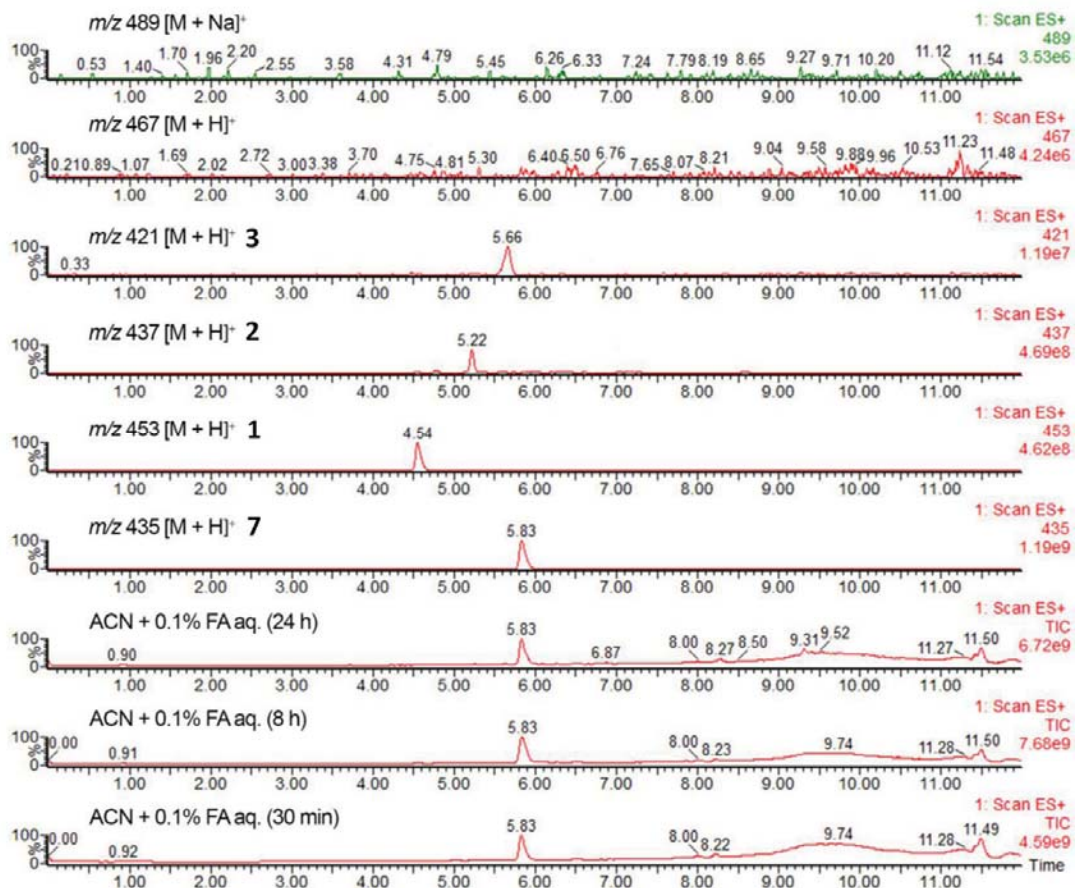


Figura A 35. Análisis por UPLC-ESIMS de 7 en condiciones de hidrólisis. De abajo hacia arriba: reacción de 7 por 30 min, 8 y 24 h; Extracción selectiva de los iones moleculares de 1-3 y 7; y búsqueda de los iones m/z 489 $[M + Na]^+$ y 467 $[M + H]^+$ para el éster metílico de *seco*-PF 1233 B en la reacción 7 por 24 h.

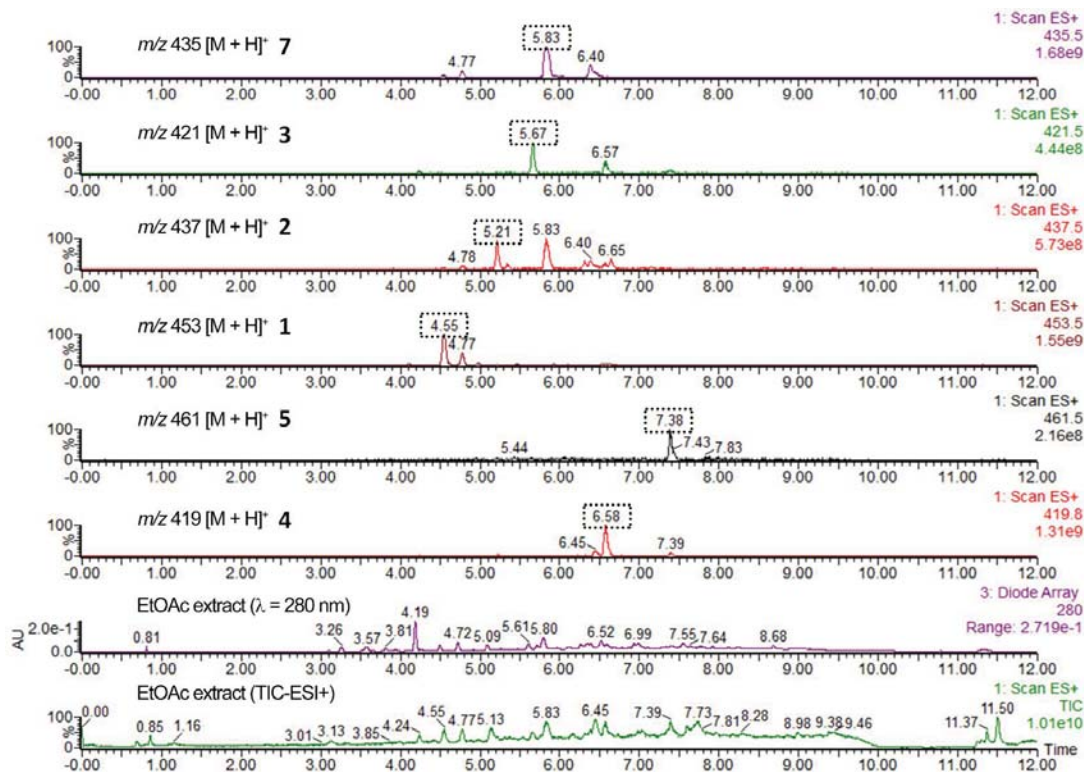


Figura A 36. Extracción selectiva de los iones de los compuestos 1-5 y 7 en un extracto obtenido a partir de *Aspergillus* sp. ACA-9 utilizando sólo AcOEt como disolvente de extracción.

Trabajos presentados en congresos.

New diketomorpholines from a facultative marine-derived *Aspergillus* sp. (ACA-9)

Manuel A. Aparicio-Cuevas,^a Isabel Rivero-Cruz,^a María C. González,^b Huzefa A. Raja,^c Mario Figueroa^a

^aDepartamento de Farmacia, Facultad de Química, and ^bInstituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico, ^cDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, North Carolina 27402, United States



As part of our continuing search for novel bioactive fungal compounds, the facultative marine-derived *Aspergillus* sp. (ACA-9) was isolated from a transition zone between land and the sea at the Acapulco Bay, in Guerrero, Mexico (Figure 1).¹

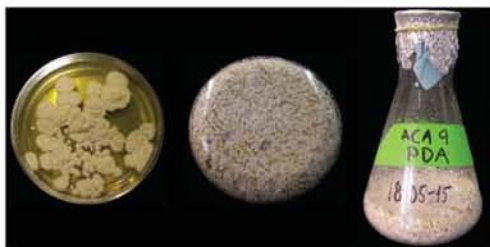


Figure 1. Geographical location of the sampling site and fungal strain *Aspergillus* sp. (ACA-9) grown in PDA and rice media.

The fungal identification of this strain was initially assessed by nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) barcoding.² Based on BLAST search, ACA-9 showed identities to taxa with *Aspergillus* section *Terrei*.³ To further illustrate the phylogenetic position of ACA-9, we sequenced calmodulin and performed a BLAST search with RefSeq database (Figure 2). The top 18 taxa, which showed high coverage and percent identity values, were downloaded, aligned, and analyzed via ML. ACA-9 is nested within previously described species in *Aspergillus* sect *Terrei*, however, it showed an isolated position with this section.⁴

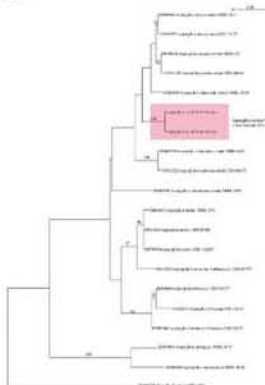


Figure 2. Phylogram of the most likely tree ($-lnL = 3463.77$) from a PHYML analysis of 20 taxa based on calmodulin sequence data (580 bp); sequenced using primers cmd5 and cmd6. Numbers on the branches refer to ML bootstrap support values $\geq 70\%$ based on 1000 replicates. Classification following Samson et al. 2011 is shown on the right. Bar indicates nucleotide substitutions per site.

Extensive fractionation by silica gel chromatography and reversed-phase HPLC of a defatted CHCl_3 -MeOH extract, from the grain-based culture, yielded five new diketomorpholine (DKM) derivatives (1–5), together with shornephine A (6) (Figure 3).⁵ Their structures were elucidated using a set of spectroscopic (400, 500, and 700 MHz NMR) and spectrometric (UPLC-ESI/HRMS-MS/MS) techniques.

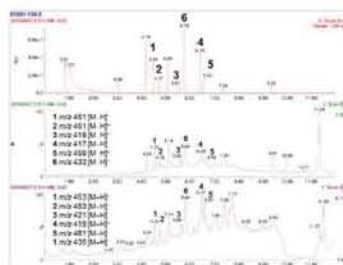
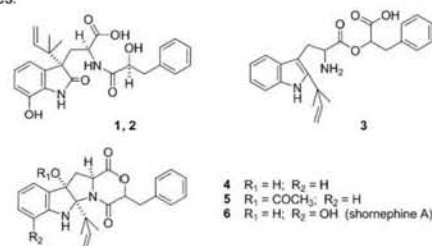


Figure 3. UPLC-ESIMS analysis of the defatted organic extract of *Aspergillus* sp. (ACA-9): PDA chromatogram (red), and TIC in negative (green) and positive (purple) modes.

Shornephine A (6) and its artifact *seco*-methyl ester derivative were previously obtained from an Australian marine sediment-derived *Aspergillus* sp. (CMB-M081F).⁵ To the best of our knowledge, this is the second report of natural products with a DKM scaffold. These compounds were not active against an array of bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*) and fungi (*Candida albicans* and *Aspergillus terreus*), or human colon (HCT-15), cervix (HeLa), and breast (MCF-7 and MDA-MB-231) cancer cell lines. On the other hand, compound 6 showed to be a non cytotoxic inhibitor of P-glycoprotein (P-gp)-mediated drug efflux in multidrug-resistant human colon cancer cells.⁵ The establishment of the absolute configurations of 1–5 by VCD analysis and their *in vitro* activity as potential P-gp inhibitors is ongoing.

References

- Velez P. et al. *Fungal Ecol.* 2013; 6:513–521
- Schoch C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109:6241–6246
- Samson R.A. et al. *Stud. Mycol.* 2011; 69:39–55
- Samson R.A. et al. *Stud. Mycol.* 2014; 78:141–173
- Khalil Z.G. et al. *J. Org. Chem.* 2014; 79:8700–8705

Acknowledgments

We thank the Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for research support via grants PAIP 5000-9145 and CB 236564 and INFR-252226, respectively.



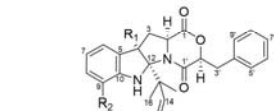
Dioxomorpholines and Derivatives from a Marine-Facultative *Aspergillus* sp. (MEXU 27854)

Manuel A. Aparicio-Cuevas and Mario Figueroa

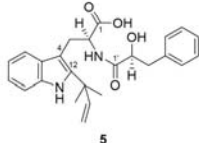
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico



During our search for new bioactive secondary metabolites from unexplored sources, two new dioxomorpholines **1** and **2**, three new derivatives **3–5**, and the known compound PF1233 B (**6**) or shornephine A, were isolated from a marine-facultative *Aspergillus* sp. (MEXU 27854). Their structures were established by 1D- and 2D-NMR and HRESIMS data analysis. Absolute configuration of **1** and **2** was elucidated by comparison of experimental and DFT-calculated VCD spectra. Compounds **3**, **5** and **6** were non-cytotoxic to a panel of human cancer cell lines with different functional status for the tumor-suppressor protein p53, but were inhibitors of P-glycoprotein reversing multidrug resistance in a doxorubicin-resistant cell line.



- 1: R₁ = OH R₂ = H
- 2: R₁ = OCOCH₃ R₂ = H
- 6: R₁ = OH R₂ = OH (PF1233 B or shornephine A)^{1,2}
- 7: R₁ = OCOCH₃ R₂ = OH (PF1233 A)¹



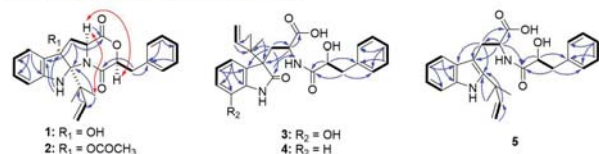
Aspergillus sp. (MEXU 27854)

- 3: R₃ = OH R₄ = OH
- 4: R₃ = H R₄ = OH
- 8: R₃ = OH R₄ = OMe (seco-shornephine A methyl ester)²

¹H and ¹³C NMR data for compounds 1–5.

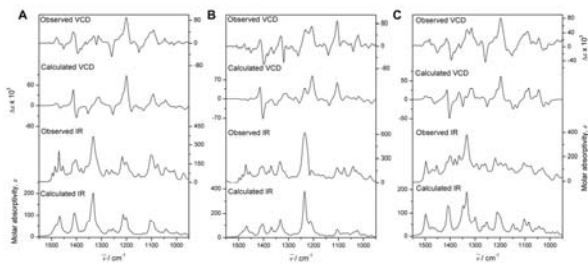
position	δ_c (ppm)					position	δ_c (ppm)				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
2	4.34, dd (10.3, 1.7)	4.35, dd (10.4, 1.7)	3.99, dd (10.6, 2.3)	3.92, dd (10.3, 2.3)	4.75, dd (10.4, 5.3)	1	167.4	167.0	176.3	175.5	177.5
3	3.29, dd (13.7, 1.7)	4.19, dd (14.0, 1.7)	2.59, dd (14.2, 2.3)	2.83, dd (14.2, 2.3)	3.39, dd (14.6, 5.3)	2	57.2	58.4	51.8	51.3	55.7
6	2.83, dd (13.7, 10.3)	2.78, dd (14.0, 10.4)	2.39, dd (14.2, 10.6)	2.38, dd (14.2, 10.3)	3.12, dd (14.6, 10.4)	3	38.9	34.8	34.0	33.3	29.0
7	7.29, d (7.5)	7.61, d (7.4)	6.72, d (7.8)	7.32, d (7.4)	7.65, dd (7.6, 1.4)	4	88.0	91.1	58.6	56.6	106.8
8	6.82, dd (7.5, 1.2)	6.77, d (7.4)	6.80, d (7.8)	7.02, d (7.4)	7.03, m (7.5, 1.2)	5	128.9	125.6	131.1	128.9	131.1
9	6.68, d (7.5)	6.66, d (7.8)	6.83, d (7.4)	7.19, d (7.4)	7.03, m (7.5, 1.4)	6	124.8	128.6	116.2	126.4	119.7
11-NH	8.29, bs	6.28, bs	6.06, dd	6.06, dd	6.17, dd	7	120.7	120.3	123.2	121.2	119.4
14	6.36, dd (17.8, 10.9)	6.30, dd (17.6, 10.7)	6.08, dd (17.4, 10.5)	6.06, dd (17.2, 10.9)	6.17, dd (17.4, 10.5)	8	131.0	131.1	118.8	127.9	121.7
15	5.19, dd (17.8, 1.2)	5.14, dd (17.6, 1.2)	5.10, dd (10.5, 1.2)	5.07, dd (10.9, 1.2)	5.16, dd (17.4, 1.2)	9	111.1	110.9	142.9	109.3	111.6
16	5.12, dd (10.9, 1.2)	5.10, dd (10.7, 1.2)	5.03, dd (17.4, 1.2)	4.97, dd (17.2, 1.2)	5.12, d (10.5, 1.2)	10	147.8	148.7	131.4	142.7	136.4
19	1.37, s	1.42, s	1.12, s	1.10, s	1.54, s	12	84.7	86.3	183.1	182.0	141.9
17	1.98, s	1.35, s	1.04, s	1.02, s	1.54, s	13	45.0	45.2	43.2	41.9	40.1
2 ^b	4.77, dd (8.5, 3.4)	4.73, dd (8.0, 3.4)	3.98, dd (10.5, 2.3)	3.93, dd (10.3, 2.3)	4.01, dd (8.5, 3.4)	14	143.9	144.0	144.3	143.2	148.0
3 ^b	3.33, dd (14.9, 3.4)	3.31, dd (15.4, 3.4)	2.90, dd (14.2, 2.3)	2.87, dd (14.3, 2.3)	2.51, dd (14.0, 3.4)	15	113.9	112.8	114.3	112.9	111.9
5 ^b	2.88, dd (14.9, 8.5)	2.86, dd (15.4, 9.0)	2.85, dd (14.2, 10.5)	2.83, dd (14.3, 10.3)	2.08, dd (14.0, 8.5)	16	23.3	24.9	22.3	21.2	28.6
5 ^b /6 ^b	7.22, m	7.19, d (7.4)	7.26, d (7.3)	7.27, d (7.4)	6.93, m	17	26.1	25.5	22.4	20.9	28.3
7 ^b	7.21, m	7.20, m	7.16, dd (7.3)	7.23, d (7.4)	7.03, m	18	168.7				
						19	21.6				

^a500 and ^b700 MHz in CDCl₃; ^c400 and ^d500 MHz in CD₂O. *Not observed.

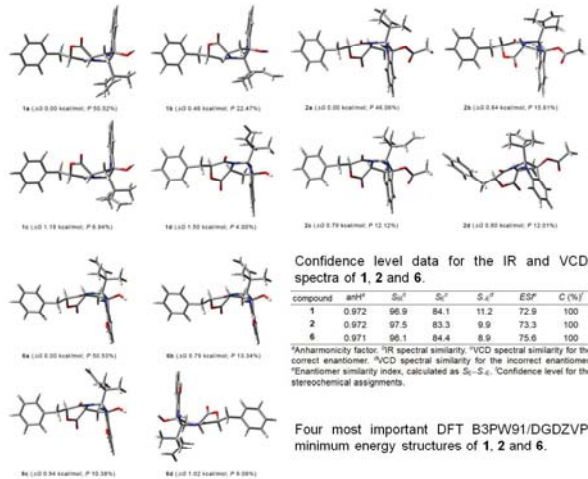


Selected key COSY (→), HMBC (→) and NOESY (→) correlations of compounds 1–5.

¹Kushida, N.; Yaguchi, T.; Miike, N. Japan Patent JP2003096080, 2003.
²Khalil, Z. G.; Huang, X. C.; Raju, R.; Piggott, A. M.; Capon, R. J. J. Org. Chem. 2014, 79, 8700–8705.



Comparison of the experimental and B3PW91/DGDZVP calculated VCD and IR spectra of (2S,4S,12R,1'S)-**1** (A), (2S,4S,12R,1'S)-**2** (B) and (2S,4S,12R,1'S)-**6** (C).

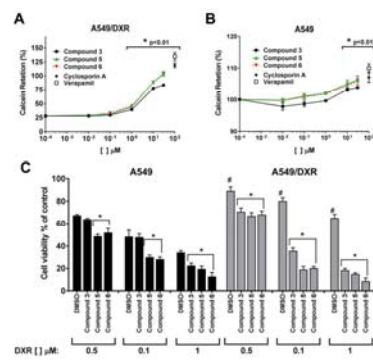


Confidence level data for the IR and VCD spectra of **1**, **2** and **6**.

compound	anH ^a	S _u ^b	S _v ^b	S _w ^b	ESP	C (%) ^c
1	0.972	96.9	84.1	11.2	72.9	100
2	0.972	97.5	83.3	9.9	73.3	100
6	0.971	96.1	84.4	8.9	75.8	100

^aAnharmonicity factor. ^bIR spectral similarity. ^cVCD spectral similarity for the correct enantiomer. ^dVCD spectral similarity for the incorrect enantiomer. ^eEnantiomer similarity index, calculated as S_v-S_w. ^fConfidence level for the stereochemical assignments.

Four most important DFT B3PW91/DGDZVP minimum energy structures of **1**, **2** and **6**.



Effect of **3**, **5** and **6** on calcein-AM efflux from (A) A549/DXR and (B) A549 cells. Verapamil (50 µg/mL) and cyclosporin A (25 µg/mL) were used as positive controls. (C) Activity of **3**, **5** and **6** on DXR sensitivity in A549 and Pgp overexpressing A549/DXR cells. Cells were treated with different concentrations of DXR alone or in combination with 10 µM of each compound for 72 h. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments (**p*-value < 0.01 relative to DMSO treated samples; # *p*-value < 0.01 when A549/DXR cells treated with DXR in presence of vehicle DMSO are compared to its corresponding condition in A549 parental cells).

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by grants from CONACyT-CB 236564 and -INFRA 252226, DGAPA-UNAM 205017, and PAIP-UNAM 5000-9145. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the Mizli supercomputing system. M.A.A.-C. acknowledges a fellowship from CONACyT (274048) to pursue graduate studies.

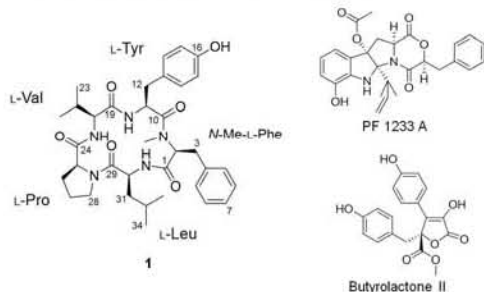


A New Cyclopentapeptide Isolated from the Marine-Facultative *Aspergillus* sp. (MEXU 27854)



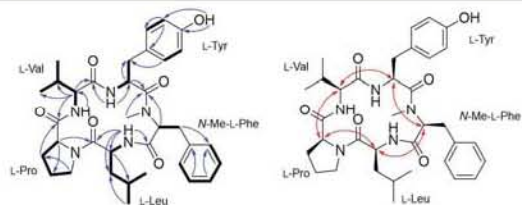
Manuel A. Aparicio-Cuevas¹, Tyler Graf², Nicholas Oberlies², and Mario Figueroa¹
¹Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico.
²Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro, Greensboro, NC, 26170.

Reinvestigation of the marine-facultative *Aspergillus* sp. (MEXU 27854)¹ yielded a new *N*-methyl amino acid-containing cyclopentapeptide (**1**), along with the known dioxomorpholine PF 1233A² and the butyrolactone II³. Their structures were established by 1D and 2D NMR and spectrometric analyses, and the absolute configuration of **1** was elucidated via the Marfey's method on a UPLC-PDA-HRESIMS system and by MS/MS analysis.

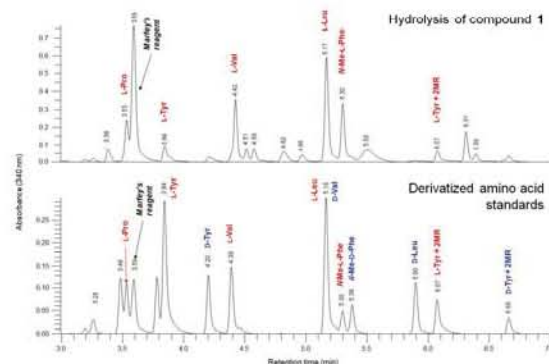


1D and 2D NMR data for compound **1** (400 MHz, DMSO-*d*₆).

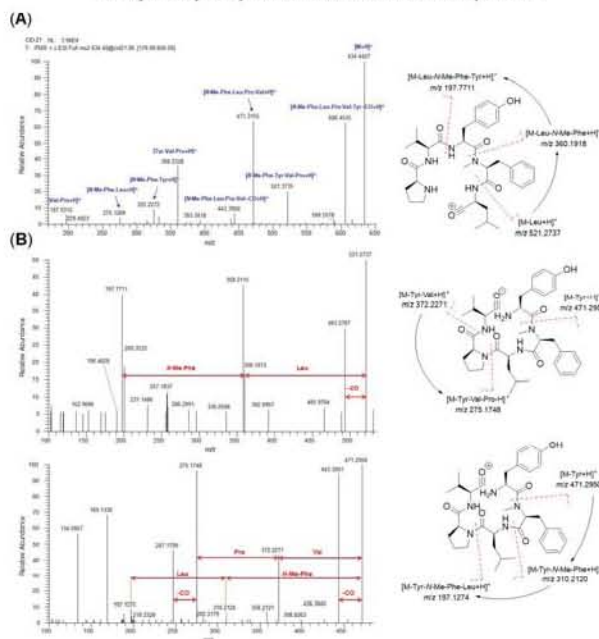
proton	δ, in ppm	Δ, in ppm, mult. J, in Hz	COSEY	TOCSY	HMBC (H → ¹³ C)
1	167.9		N-Me-L-Phe		
2	61.3	4.26, dd (11.5, 3.3)		3a, 3b	1, 2, 20Me, 3, 10
3	53.8	a 2.35, dd (14.3, 3.3) b 2.78, dd (14.3, 11.5)		2, 3a	2, 4, 5, 9
4	137.2				
5/9	128.9	7.09, m		6/8	3, 6/8, 7
6/8	128.4	7.19, m		5/9, 7	4, 5/9, 7
7	126.8	7.17, m		5/9	5/9, 6/8
2-NMe	30.4	2.70, s			2, 10
10	170.1		L-Tyr		
11	49.2	3.96, ddd (8.7, 8.2, 5.3)	11-NH, 12	11-NH, 12	10, 12, 19
12	38.9	a 2.64, dd (14.0, 8.2) b 2.28, dd (14.0, 5.3)		11	10, 11, 13, 14/18
13	127.4				
14/18	129.7	6.50, s		15/17	12, 13, 15/17, 18
15/17	119.6	6.32, s		14/18	13, 14/18, 16
16	155.3				
15-NH		8.36, d (8.7)		11	11, 12
18-OH		6.02, s			15/17
19	169.3		L-Val		
20	61.0	3.86, t (9.7)	20-NH, 21	20-NH, 21, 22, 23	19, 21, 22, 23, 24
21	30.5	1.66, m	20, 22, 23	20, 20-NH, 22, 23	20, 22, 23
22	15.44	0.78, d (8.6)	21	20, 20-NH, 21, 22	20, 21, 23
23	19.12	0.65, d (6.6)	21	20, 20-NH, 21, 22	20, 21, 22
20-NH		7.00, d (9.7)	20	20, 21, 22, 23	20, 24
24	170.6		L-Pro		
25	61.0	4.39, dd (8.1, 0.8)	26	26, 27, 28	24, 26, 27, 29
26	31.5	a 2.16, m b 1.99, m	25, 27	25, 26, 27, 28	24, 25, 27, 28
27	21.4	a 1.90, m b 1.66, m	26, 28	25, 26, 27, 28	25, 26, 28
28	46.3	a 3.61, m b 3.38, m	27	25, 26, 27, 28	26, 27
29	169.3		L-Leu		
30	49.1	4.62, m	30-NH, 31	30-NH, 31, 32, 33, 34	1, 29, 31
31	41.7	a 1.79, m b 1.29, m	30, 32	30, 30-NH, 31, 32, 33, 34	29, 30, 33, 34
32	24.4	1.48, m	31, 33, 34	30, 30-NH, 31, 33, 34	30, 31, 33, 34
33	22.8	0.89, d (5.1)	32	30, 30-NH, 31, 32, 34	31, 33
34	22.9	0.97, d (5.1)	32	30, 30-NH, 31, 32, 33	31, 33
30-NH		7.05, d (8.4)	30	30, 31, 32, 33, 34	1, 29, 30



Selected key COSY (→), HMBC (⇌) and NOESY (↔) correlations of compound **1**.



Marfey's analysis by UPLC-PDA-HRESIMS of compound **1**.



(A) Full-scan HRMS (single scan) of compound **1** and (B) HR-MS/MS spectra by HCD showing the aminoacid losses from the *m/z* 521.2737 [M-Leu+H]⁺ (top) and *m/z* 471.2950 [M-Tyr+H]⁺ ions.

Acknowledgments. This work was supported by grants from CONACyT-CB 236564 and -INFRA 252226, DGAPA-UNAM 205017, and PAIP-UNAM 5000-9145. M.A.A.-C. acknowledges a fellowship from CONACyT (274048) to pursue graduate studies and to Drs. M.F. and N.H.O. for authorizing the research stay that allowed this work to be done.

References. ¹Kushida, N.; Yaguchi, T.; Milko, N. Japan Patent JP2003096080, 2003; ²Rao, K. V.; Sadhukhan, A. K.; Veerender, M.; Ravikumar, V.; Mohan, E. V. S.; Dhanvantri, S. D.; Sitarankumar, M.; Moses Babu, J.; Vyas, K. & Reddy, G. O. 2000, Chem. Pharm. Bull., 48(4), 559-562; ³Aparicio-Cuevas, M. A.; Rivero-Cruz, I.; Sánchez-Castellanos, M.; Menéndez, D.; Raja, H. A.; Joseph-Nathan, P.; Gonzalez, M. D. C. & Figueroa, M. 2017, J. Nat. Prod. 80(8), 2311-2318.