



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

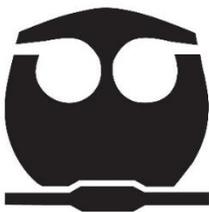
**ESTUDIO QUÍMICO Y POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
ESPECIES SELECTAS DE *PENICILLIUM* Y *ASPERGILLUS***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEJANDRA ARISTA ROMERO



CDMX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Rachel Mata Essayag
VOCAL: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
SECRETARIO: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
1^{er} SUPLENTE: Dra. Berenice Ovalle Magallanes
2^{do} SUPLENTE: Dr. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 125, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM**

Asesor del tema:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sustentante:

Alejandra Arista Romero

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química (FQ), por contribuir en mi formación profesional y académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) por los apoyos económicos CONACyT CB-236564 e INFRA-252226, PAPIIT IN222220 y PAIP-FQ 5000-9145.

A la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), FQ, UNAM, y al Dr. Nicholas H. Oberlies de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU. por su apoyo para la realización de los análisis de RMN y MS.

A la Dra. Patricia Vélez del Instituto de Biología de la UNAM, por proporcionar las cepas fúngicas objeto de estudio y la realización de su caracterización taxonómica.

A las Dras. Rachel Mata y Mabel Fragoso por sus comentarios y observaciones, que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Isabel Rivero por su apoyo y consejo durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 125, por hacer amena mi estancia desde el primer día, por su apoyo académico y personal.

A los M. en C. Carlos Antonio Fajardo Hernández y Rodrigo Villanueva Silva, por su paciencia y ayuda a lo largo de este tiempo y a Marian López por formar un gran equipo y por los resultados obtenidos. A los tres, gracias por su amistad.

Mi más sincera admiración a mi tutor, el Dr. Mario Figueroa. Gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la paciencia, guía y apoyo brindados en todo momento y por la confianza depositada en mí.

ÍNDICE

Página

Lista de figuras	II
Lista de cuadros	III
Lista de abreviaturas	IV
1. Antecedentes	1
1.1 Enfermedades infecciosas en el mundo.	1
1.1.1 Enfermedades infecciosas en México.	2
1.1.2 Resistencia antimicrobiana.	2
1.2 Importancia de los productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos.	3
1.3 Fármacos antimicrobianos de origen natural.	4
1.4 Ventilas hidrotermales en el Golfo de California.	6
1.5 Jal minero “El Fraile” en Taxco, Guerrero.	7
2. Hipótesis	8
3. Objetivos	8
4. Parte experimental	9
4.1 Cultivos en pequeña escala.	9
4.2 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos.	9
4.3 Preparación de extractos orgánicos.	9
4.4 Actividad antimicrobiana.	9
4.5 Cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos.	10
4.6 Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala.	10
4.7 Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas.	11
4.8 Caracterización de los productos obtenidos.	11
5. Resultados y discusión	13
5.1 Acondicionamiento y cultivo de los organismos fúngicos.	13
5.2 Evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos.	13
5.3 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario.	15
5.4 Evaluación biológica de los extractos en mediana escala y fracciones primarias.	18
5.5 Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas seleccionadas.	19
5.6 Caracterización química de los compuestos aislados.	22
5.6.1 Dimetil gliotoxina (1).	22
5.6.2 Fiscalina C (2) y <i>epi</i> -fiscalina C (3).	25
5.6.3 Brefeldina A (4).	31
6. Conclusiones	35
7. Bibliografía	36

Lista de figuras

Figura		Página
1	Principales causas de muerte a nivel mundial (2016).	1
2	Ejemplos de fármacos obtenidos a partir de fuentes naturales.	4
3	Ejemplos de fármacos antimicrobianos de origen natural.	5
4	Zonas de ventilas hidrotermales en el Golfo de California.	6
5	Ubicación geográfica del jal minero “El Fraile”.	7
6	Organismos fúngicos selectos en cajas de Petri con medio APD.	14
7	Ejemplo del cultivo en medio de arroz en pequeña escala del hongo I.	14
8	Cultivo en medio de arroz en mediana escala del hongo 308-P.	16
9	Fraccionamiento por cromatografía en columna de tipo Flash de los extractos de los hongos I y 308-P.	16
10	Ejemplos de metabolitos bioactivos producidos por especies de <i>Aspergillus</i> .	17
11	Ejemplos de metabolitos bioactivos producidos por especies de <i>Penicillium</i> .	18
12	Perfil cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción I-9 (A) ELSD, (B) PDA 254 nm y (C) Separación por HPLC a nivel preparativo.	20
13	Perfil cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción I-10 (A) ELSD, (B) PDA 254 nm y (C) Separación a nivel preparativo.	21
14	Perfil cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción 308-P-14 (A) ELSD y (B) PDA 254 nm.	22
15	Estructura química de la dimetil gliotoxina (1).	22
16	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción I-9. Espectros en el UV, ESI+ y ESI- del compuesto 1.	23
17	Espectro de RMN ¹ H de la dimetil gliotoxina (1) (400 MHz, CD ₃ OD).	24
18	Espectro de RMN ¹³ C de la dimetil gliotoxina (1) (100 MHz, CD ₃ OD).	24
19	Estructura química de la fiscalina C (2).	26
20	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción I-9. Espectros en el UV, ESI+ y ESI- del compuesto 2.	26
21	Espectro de RMN ¹ H de la fiscalina C (2) (400 MHz, CD ₃ OD).	27
22	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción I-10. Espectros en el UV, ESI+ y ESI- del compuesto 3.	29
23	Espectro de RMN ¹ H de la <i>epi</i> -fiscalina C (3) (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	30
24	Estructura química de la <i>epi</i> -fiscalina C (3).	30
25	Estructura química de la brefeldina A (4).	31
26	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción 308-P-14. Espectros en el UV, ESI+ y ESI- del compuesto 4.	31
27	Espectro de RMN ¹ H de la brefeldina A (4) (400 MHz, CD ₃ OD).	33
28	Espectro de RMN ¹³ C de la brefeldina A (4) (100 MHz, CD ₃ OD).	33

Lista de cuadros

Cuadro		Página
1	Condiciones de análisis por cromatografía de tipo Flash.	11
2	Identificación taxonómica de los organismos de estudio.	13
3	Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala.	15
4	Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de los hongos I y 308-P.	17
5	Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en mediana escala y sus fracciones primarias.	18
6	Rendimiento y $UV_{\text{máx}}$ de los compuestos aislados por HPLC a nivel preparativo.	19
7	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de la dimetil gliotoxina (1).	25
8	Datos de RMN ^1H (400 MHz) de la fiscalina C (2) y de la <i>epi</i> -fiscalina C (3).	28
9	Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de la brefeldina A (4).	32

Lista de abreviaturas

δ	Desplazamiento químico	m/z	Relación masa-carga
μg	Microgramo	MeCN	Acetonitrilo
μm	Micrómetro	MeOH	Metanol
μM	Micromolar	mg	Miligramo
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius	MHz	Mega hertz
AcOEt	Acetato de etilo	min	Minuto
APD	Agar papa dextrosa	mL	Mililitro
CD_3OD	Metanol deuterado	mm	Milímetro
CHCl_3	Cloroformo	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
CI_{50}	Concentración media inhibitoria	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
CMI	Concentración mínima inhibitoria	nm	Nanómetro
CV	Volúmenes por columna	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
d	Doblete	psi	Libras por pulgada cuadrada
dd	Doble de doble	q	Quintuplete
ddd	Doble de doble de doble	RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido	rpm	Revoluciones por minuto
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado	s	Singulete
dt	Doble tripleteado	td	Triplete dobleteado
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	TIC	Cromatograma de corriente total de iones
EM, MS	Espectrometría de masas	t_R	Tiempo de retención
ESI	Ionización por la técnica de electrospray	uma	Unidad de masa atómica
FDA	Food and Drug Administration	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
g	Gramo	UV	Espectroscopia en el ultravioleta
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	V	Volt
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por electrospray	YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa
Hz	Hertz		
ITS	Espaciador de transcripción interno		
kV	Kilovolt		
m	Multiplete		

1. ANTECEDENTES

1.1 Enfermedades infecciosas en el mundo

Las enfermedades infecciosas son causadas por organismos patógenos como las bacterias, parásitos, hongos y virus (Fauci, 2001). En el 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a las infecciones de vías respiratorias dentro de las 10 principales causas de muerte en el mundo, además de las enfermedades diarreicas causadas por microorganismos y la tuberculosis (OMS, 2018) (**Figura 1**).

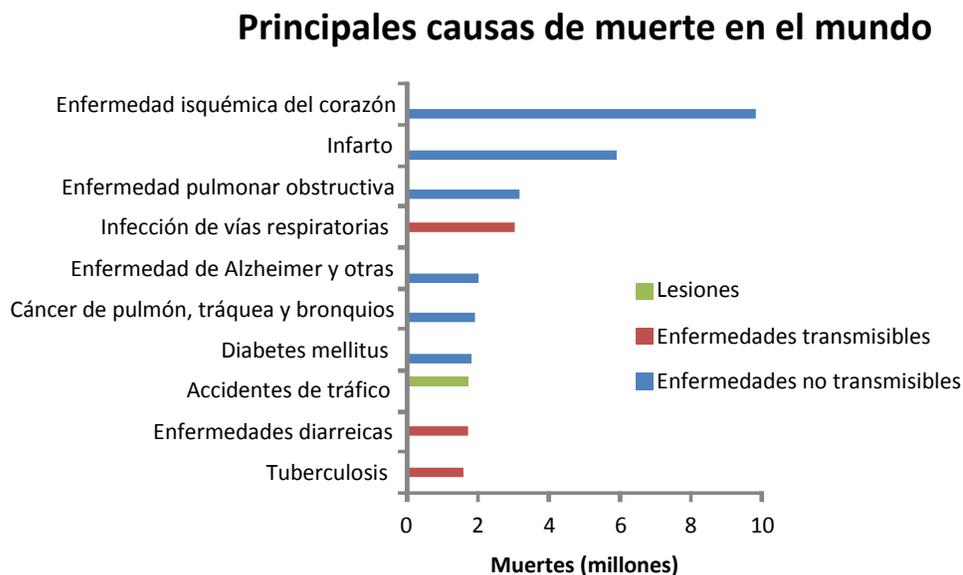


Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial (OMS, 2016).

El aumento en la incidencia de estas enfermedades alrededor del mundo se ha visto influenciado por la aparición de nuevas infecciones y la reemergencia de algunas otras, como el cólera, la tuberculosis, el dengue, la fiebre amarilla y la malaria, que se creían extintas y resurgieron en muchas partes del mundo a finales del siglo pasado (Cohen, 2000). Además, a finales del siglo XX, se demostró una estrecha relación entre algunas enfermedades infecciosas y el desarrollo de padecimientos crónicos, como es el caso del carcinoma gástrico por *Helicobacter pylori*, el cáncer cervicouterino por el virus del papiloma humano, el carcinoma hepatocelular por los virus de la hepatitis B y C, y el sarcoma de Kaposi por el virus del herpes (Cassell, 1998; Fauci, 2001).

Dentro de los principales factores que han propiciado el desarrollo de enfermedades infecciosas en los últimos años podemos encontrar los cambios demográficos, en la tecnología, la industria y el ambiente, además de la adaptación microbiana a las características del mundo actual (Cohen, 2000).

1.1.1 Enfermedades infecciosas en México

A principios del siglo pasado, las primeras causas de mortalidad en México correspondían a enfermedades infecciosas o transmisibles, patrón que se conservó hasta los años cincuenta, cuando las enfermedades crónicas se posicionaron en los primeros lugares. Para el año 2010, las infecciones respiratorias agudas repuntaron hasta la sexta posición de causas de muerte en el centro de la República Mexicana, y en el lugar siete y diez al sur y norte del país, respectivamente. Por otro lado, la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), se posicionó en el lugar once en el sur y trece en el norte (Lozano *et al.*, 2010). Sin embargo, para 2015, enfermedades transmisibles como la influenza y neumonía descendieron al lugar doce de causas de defunción en nuestro país (Soto-Estrada, 2016).

Hasta el año 2014, las principales causas de morbilidad por infecciones fueron las agudas de vías respiratorias, seguido de las infecciones intestinales y las de vías urinarias, siendo el periodo comprendido entre 1994 y 1998, el de mayor incremento en las infecciones respiratorias (Soto-Estrada, 2016).

1.1.2 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos, de acuerdo con la OMS, puede definirse como la capacidad de los microorganismos de impedir que los agentes antimicrobianos actúen contra ellos, trayendo como consecuencia la ineficacia de los tratamientos habituales, así como la persistencia de las infecciones y su transmisión. Este problema apareció aproximadamente en los años treinta en hospitales, cuando se identificaron cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a las sulfonamidas, y de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina. Más tarde, alrededor de 1960, la resistencia a múltiples fármacos fue detectada en enterobacterias (*Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*), y a principios del siglo XXI, la lista de microorganismos que presentaban resistencia a los tratamientos de elección aumentó considerablemente (Levy y Marshall, 2004).

Los genes de resistencia a los antimicrobianos pueden transferirse entre bacterias por medio de elementos genéticos móviles, como lo son los bacteriófagos, plásmidos y transposones. Estos genes suelen estar dirigidos contra un solo tipo de antibiótico, sin embargo, los microorganismos pueden adquirir diferentes genes, desarrollando más de un mecanismo de resistencia. En ausencia de los elementos genéticos antes mencionados, la adquisición de resistencia puede ser progresiva, a través de diversas mutaciones (Levy y Marshall, 2004).

La resistencia a los antibióticos se atribuye al uso excesivo y/o incorrecto de estos medicamentos. Algunos estudios han demostrado que en el 30-50% de los casos, las indicaciones del tratamiento, la elección del agente antibacteriano o la duración del tratamiento no son los apropiados (Ventola, 2015). Por otro lado, la disminución en el desarrollo de nuevas terapias por parte de la industria farmacéutica también juega un papel

importante en el aumento de la resistencia antimicrobiana, pues tan sólo en los últimos 20 años se ha detectado un descenso del 56% en el número de antibióticos aprobados anualmente por la FDA (Butler y Buss, 2006).

Para 2015, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América clasificó algunas bacterias como microorganismos que requerían tratamientos urgentes, muchos de los cuales representaban los agentes infecciosos más comunes y de mayor impacto en la sociedad (Ventola, 2015). En 2017, la OMS publicó la lista de las bacterias que han desarrollado mayor resistencia a los tratamientos actuales, dentro de la cual se encuentran microorganismos en estado crítico como *Pseudomonas aeruginosa* y aquellas de la familia *Enterobacteriaceae*. En riesgo alto están *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp. y *Neisseria gonorrhoeae*, mientras que en riesgo medio tenemos a *Streptococcus pneumoniae* y *Shigella* spp. (OMS, 2017).

1.2 Importancia de los productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos

Los productos naturales han sido la principal fuente para el desarrollo de fármacos durante muchos años contribuyendo a incrementar la esperanza de vida durante el siglo XX (Harvey, 2008; Demain, 2013). Las plantas, hongos, insectos, organismos marinos y bacterias, representan una fuente importante de sustancias con actividad biológica. Existen alrededor de 22,500 compuestos con actividad biológica obtenidos a partir de microorganismos, de los cuales, el 45% lo producen actinobacterias, el 38% por hongos y el 17% otras (Mahajan y Balachandran, 2014).

A lo largo de la historia, podemos encontrar diversos ejemplos de fármacos que han sido obtenidos a partir de fuentes naturales (Barreiro *et al.*, 2012). Uno de los más conocidos, sin duda, es el ácido acetilsalicílico derivado de la salicina aislada de la especie *Salix alba* L., con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Por otro lado, las distintas investigaciones sobre *Papaver somniferum* L. derivaron en el aislamiento de diversos alcaloides incluida la morfina; otros productos de gran importancia para el tratamiento de distintas enfermedades son la digoxina de *Digitalis purpurea* L., la pilocarpina de *Pilocarpus jaborandi* o la quinina aprobada por la FDA en 2004 para el tratamiento de la malaria, la cual fue aislada de *Cinchona succirubra* (Dias *et al.*, 2012). Finalmente, compuestos con actividad antiparasitaria también han sido obtenidos de fuentes naturales, como la berberina que inhibe el crecimiento de los amastigotes de *Leishmania*, o la artemisinina derivada de *Artemisia annua* L. que afecta el desarrollo de *Plasmodium* (Kayser *et al.*, 2003) (**Figura 2**). Más recientemente se ha encontrado una variedad de agentes anticancerígenos con diferentes mecanismos de acción y de origen natural, de donde alrededor del 60% han sido obtenidos de fuentes naturales o sus derivados. Ejemplo de éstos son la doxorrubicina y la bleomicina A, aisladas a partir de especies del género *Streptomyces*, y la vincristina, la vinblastina y el taxol provenientes de *Vinca rosea* y *Taxus brevifolia*, respectivamente (Barreiro *et al.*, 2012, Mahajan, y Balachandran, 2014) (**Figura 2**).

Entre 1981 y 2002, 877 Nuevas Entidades Químicas fueron introducidas, de las cuales el 29% eran productos naturales, análogos de éstos o compuestos sintéticos basados en los mismos, sin embargo, a finales del siglo pasado y principios de este, la investigación farmacéutica en el área de los productos naturales se ha visto disminuida (Koehn y Carter, 2005).

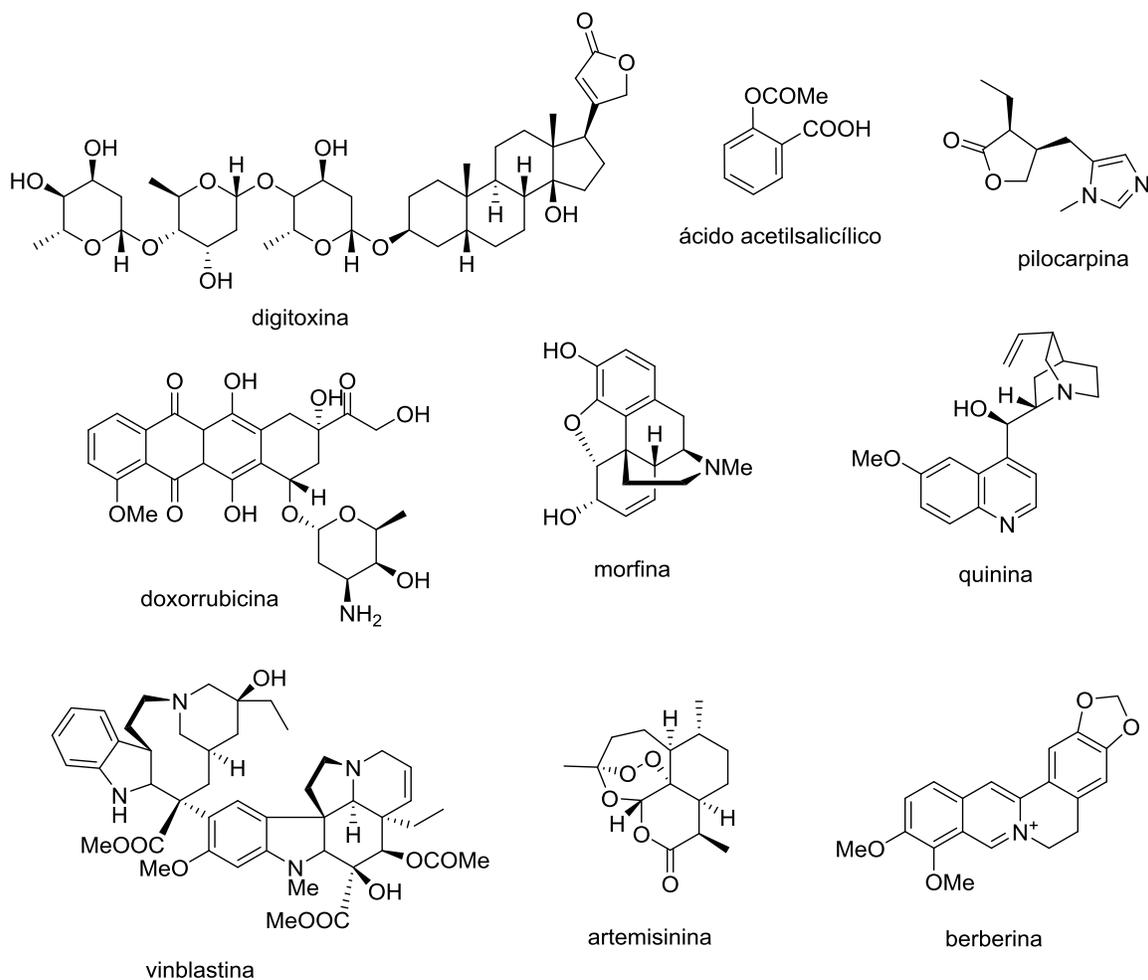


Figura 2. Ejemplos de fármacos obtenidos a partir de fuentes naturales.

1.3 Fármacos antimicrobianos de origen natural

Los fármacos antimicrobianos o antibióticos son compuestos que interfieren con algunas estructuras o procesos esenciales para el crecimiento microbiano y su supervivencia, y son empleados para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Walsh, 2000). De acuerdo con el mecanismo de acción, el efecto verdadero de los antibióticos puede designarse bactericida, si mata a las células del microorganismo, o bacteriostático, si inhibe su crecimiento y proliferación (Walsh, 2016).

Los metabolitos secundarios como moléculas con actividad biológica, confieren a los microorganismos productores ventajas sobre otros organismos (Butler y Buss, 2006). Aproximadamente dos tercios de las terapias antimicrobianas empleadas en la clínica han sido derivadas de productos naturales, y debido a características como la permeabilidad celular, la diversidad estructural química y dianas específicas que en ocasiones están ausentes en los compuestos sintéticos, estos productos siguen siendo la base para el desarrollo de nuevas terapias (Farha y Brown, 2016).

La historia de los antimicrobianos comenzó en la década de los 30 con el descubrimiento de la penicilina (β -lactámico) a partir del género *Penicillium*, dando origen a la “era dorada de los antibióticos”. Más tarde, en 1950, apareció la kanamicina aislada del género *Streptomyces* (Walsh y Wencewics 2016). Otros ejemplos de antibacterianos aislados a partir de microorganismos son la eritromicina, descubierta en 1949 a partir de *Saccharopolyspora erythraea* y de la cual derivaron los también antimicrobianos azitromicina y claritromicina (Peláez, 2006); la tetraciclina, producida por *Streptomyces* (Chopra y Roberts, 2001); la vancomicina, a partir de *Streptomyces orientalis* (Peláez, 2006) y la cefalosporina C, a partir de *Cephalosporium acremonium* (Zaffiri *et al.*, 2012) (**Figura 3**).

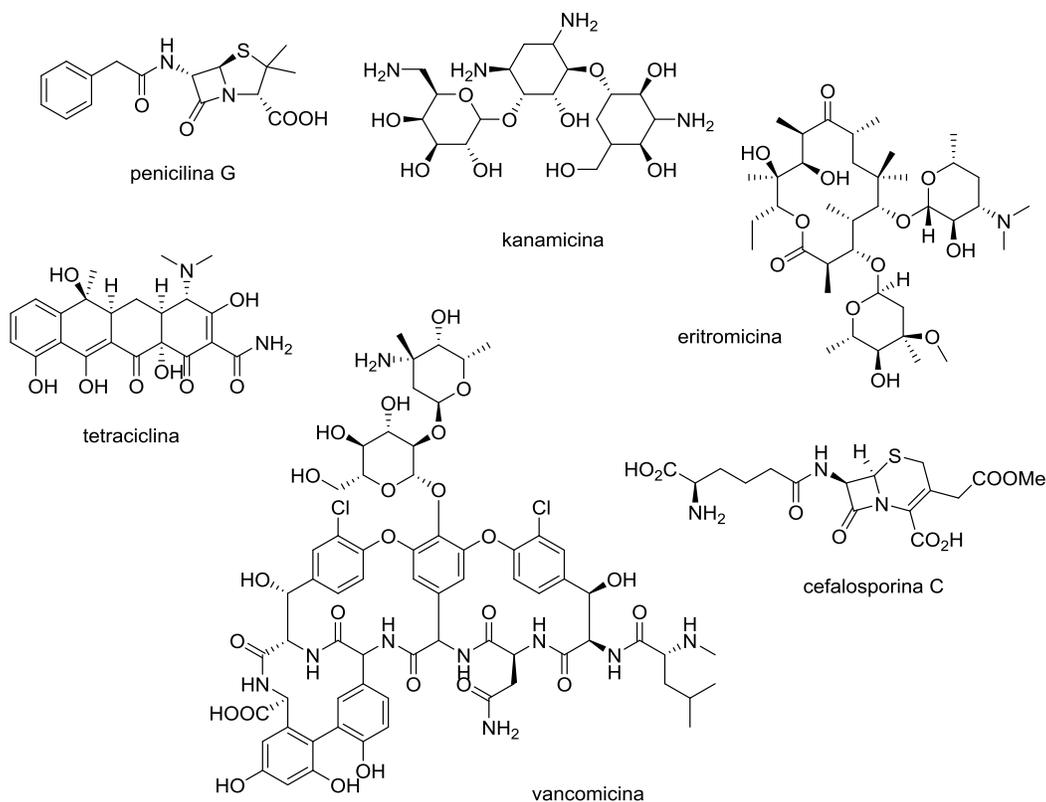


Figura 3. Ejemplo de fármacos antimicrobianos de origen natural.

Debido a que solamente alrededor del 10% de la biodiversidad a nivel mundial ha sido estudiada por su actividad biológica, existe la posibilidad de descubrir muchos más compuestos con esqueletos novedosos y mecanismos de acción únicos (Dias *et al.*, 2012).

1.4 Ventilias hidrotermales en el Golfo de California

Las ventilas hidrotermales marinas son fisuras en el suelo oceánico provocadas por la actividad sísmica constante, de las cuales emana agua calentada geotérmicamente. Se localizan entre los 500 y 4000 m de profundidad y sus fluidos presentan temperaturas de 350 a 405 °C. Estos sistemas están formados por agua rica en sulfatos (SO_4^-) y magnesio, con concentraciones de metales del orden de 10^2 o 10^3 μM , y de gases disueltos más elevadas que las aguas de mar; suelen estar enriquecidos con metano (CH_4) e hidrógeno (H_2), así como con amonio (NH_4^+). Sin embargo, la composición química es diferente en cada sistema y cambiante con el paso del tiempo, y las variaciones de profundidad, temperatura y salinidad permiten un sistema de corrientes complejo, además del acarreamiento de nutrientes desde la profundidad del océano hasta la superficie (Soto y Estradas, 2014; Calmus, 2017). Entre los sistemas hidrotermales recientemente descubiertos en México encontramos los ubicados en la Cuenca Pescadero y a lo largo de la Falla Transformante Pescadero en el Golfo de California (**Figura 4**) (Goffredi *et al.*, 2017).

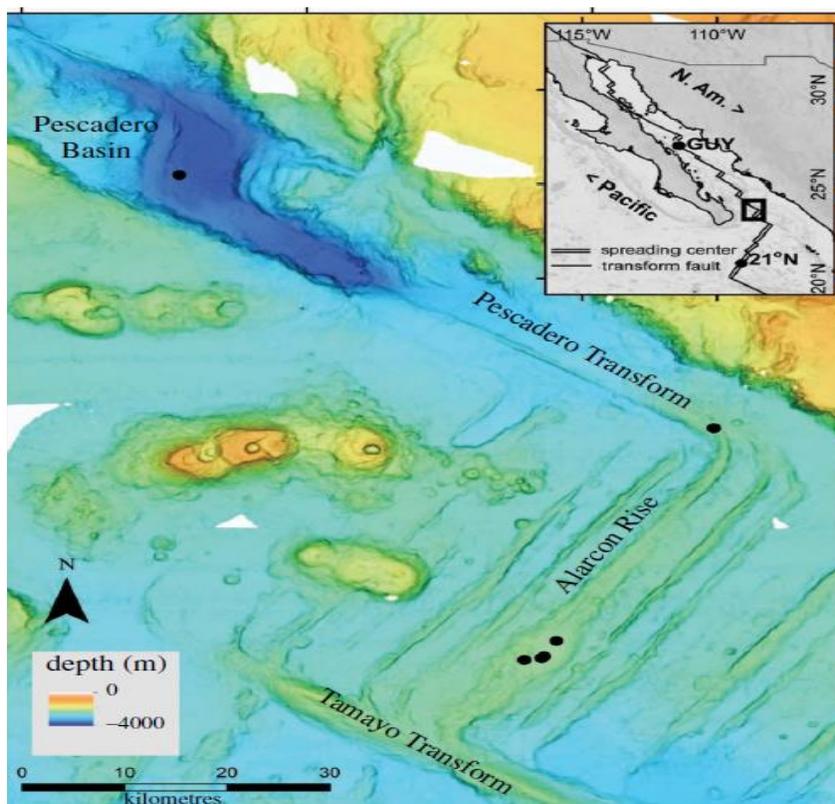


Figura 4. Zonas de ventilas hidrotermales en el Golfo de California.

1.5 Jal minero “El Fraile” en Taxco, Guerrero

Se denomina jal a todo aquel desecho sólido tóxico producido por la industria minera que es generalmente depositado en presas o es empleado como relleno de barrancas. En México, la industria minera se concentra en trece estados, entre ellos Chihuahua, Jalisco, Zacatecas, Hidalgo y Guerrero. La Unidad Minera de Taxco, en Guerrero, se ha caracterizado a lo largo de la historia por su producción de plata (Ag); sin embargo, durante las dos primeras décadas del siglo XX se convirtió en un importante productor de zinc (Zn) y plomo (Pb) (Gómez-Bernal *et al.*, 2010). El jal minero llamado “El Fraile”, ubicado al suroeste de Taxco (**Figura 5**), surgió como resultado de la extracción de metales en la región entre los años de 1940 y 1970 (Talavera, 2016). Su composición química se considera relativamente uniforme, con importantes concentraciones de azufre (S) y carece de materia orgánica y elementos como nitrógeno (N) y fósforo (P), además de poseer un contenido limitado de humedad debido a las partículas que lo forman. El clima predominante de la zona es templado subhúmedo con lluvias en verano, y la temperatura oscila entre 12 y 26 °C (Montero, 2019).



Figura 5. Ubicación geográfica del jal minero “El Fraile”.

2. HIPÓTESIS

El estudio químico biodirigido de especies fúngicas obtenidas de hábitats poco explorados de México permitirá la obtención de metabolitos secundarios con potencial terapéutico como agentes antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue realizar un estudio químico biodirigido de especies fúngicas selectas obtenidas a partir de muestras de sedimento marino de las ventilas hidrotermales del Golfo de California y de suelo del jal minero "El Fraile", para la obtención de compuestos con actividad antibacteriana.

Para cumplir con dicho objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar el acondicionamiento de una serie de hongos obtenidos de estas fuentes naturales.
2. Preparar los cultivos en pequeña escala y obtener los extractos orgánicos correspondientes mediante procesos de maceración y reparto.
3. Realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos contra distintos organismos Gram (+), Gram (-) y una levadura.
4. Preparar los cultivos en mediana escala con base en los resultados obtenidos durante la evaluación biológica.
5. Realizar el fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala y establecer su potencial antimicrobiano.
6. Realizar el aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las fracciones activas, mediante el uso de técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Cultivos en pequeña escala

El acondicionamiento de los organismos fúngicos objeto de estudio se realizó mediante la transferencia de las cepas tipo a cajas de Petri con medio APD (agar papa dextrosa), y cultivadas a temperatura ambiente (por duplicado) hasta observar un crecimiento uniforme. Una vez verificada su pureza y viabilidad, los cultivos fueron transferidos a medio líquido YESD (15 mL), compuesto por 2% peptona de soya, 2% dextrosa y 1% extracto de levadura, en donde permanecieron por 5 días a temperatura ambiente y en agitación (100 rpm). Posteriormente, cada inóculo fue transferido a un medio de arroz estéril (15 g de arroz y 30 mL de agua), y se dejó crecer por 21 días a temperatura ambiente con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas. Todas las cepas objeto de estudio fueron proporcionadas por la Dra. Patricia Vélez del Instituto de Biología de la UNAM.

4.2 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos

La identificación taxonómica de los hongos estudiados se realizó mediante el análisis de sus características morfológicas y genéticas del espaciador de transcripción interno del RNA ribosomal (ITS). Una vez obtenidas las secuencias, se realizó su análisis comparativo con aquellas descritas en la base de datos del National Center of Biotechnology Information de los Estados Unidos. Los análisis genéticos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Patricia Vélez del Instituto de Biología de la UNAM.

4.3 Preparación de extractos orgánicos

A partir de los cultivos obtenidos mediante el procedimiento descrito en el inciso 4.1, se obtuvieron los extractos orgánicos empleando la técnica de maceración [60 mL de CHCl₃-MeOH (1:1), fragmentado del medio y agitación a 100 rpm por 8 horas]. Transcurrido este tiempo, los cultivos se filtraron al vacío y la biomasa se lavó con 50 mL de la mezcla CHCl₃-MeOH (1:1). Al filtrado obtenido se adicionaron 60 mL de CHCl₃ y se agregó agua destilada hasta completar un volumen final de 200 mL. La mezcla se mantuvo en agitación por 30 min y posteriormente se transfirió a un embudo de separación: la fase acuosa fue sometida a un segundo reparto con 60 mL de CHCl₃ y las fases orgánicas se reunieron y concentraron a presión reducida. El extracto seco se resuspendió en 60 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se desengrasó con 30 mL de *n*-hexano mediante un reparto. Finalmente, la fase de MeCN-MeOH (1:1) se llevó a sequedad a presión reducida.

4.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de todos los extractos y fracciones se determinó utilizando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-

difeniltetrazol (MTT), contra los microorganismos de prueba Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC259233) y *Bacillus subtilis* (ATCC6633), Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) y *Salmonella typhi* (ATCC9992), y la levadura *Candida albicans*. Todos los organismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Como medios de cultivo se emplearon los caldos Müeller-Hinton para las bacterias y papa dextrosa para la levadura. Los controles positivos empleados fueron ampicilina para *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhi*, vancomicina para *B. subtilis*, gentamicina para *P. aeruginosa*, y nistatina para *C. albicans*.

De manera general, los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos y las muestras se analizaron por triplicado a las concentraciones finales de 20 y 200 µg/mL, disueltas en una solución de medio de cultivo con 10% de DMSO. La suspensión de los microorganismos de prueba se ajustó aproximadamente a 1×10^8 células/mL (0.5% del estándar turbidimétrico de McFarland). Todos los microorganismos fueron incubados por 24 horas a 37°C con las muestras de prueba, y una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 10 µL de la solución reveladora de MTT (5 mg/mL en MeOH) a cada pozo y la placa se incubó por 30 min más a 37°C. Los resultados se determinaron mediante el cambio de color del revelador de amarillo a morado.

4.5 Cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos

Con base en los resultados de la actividad antimicrobiana, se seleccionaron a los organismos fúngicos con mayor actividad (hongo I y 308-P) para su cultivo en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos correspondientes. Estos procesos se realizaron siguiendo la metodología descrita anteriormente con las siguientes modificaciones: los inóculos se prepararon en 50 mL de medio YESD y los cultivos en medio sólido con 100 g de arroz y 200 mL de agua (por duplicado); para la obtención de los extractos se emplearon 500 mL de la mezcla MeOH-CHCl₃ (1:1) y 300 mL de CHCl₃ tras la filtración, además el volumen final se ajustó a 1000 mL con agua destilada; y el desengrase final se realizó con 150 mL de de *n*-hexano.

4.6 Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala

El fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala se realizó mediante cromatografía en columna de tipo Flash, en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen (Teledyne ISCO., Nebraska, EE.UU.), equipado con una bomba binaria y los detectores de UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel, Teledyne) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre diferentes mezclas de *n*-hexano, CHCl₃, AcOEt y MeOH. Las condiciones empleadas para el fraccionamiento de cada extracto se presentan en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Condiciones de análisis por cromatografía de tipo Flash.						
Extracto	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de equilibrio	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes por columna
I	0.45	12	2.0	15	30	95.9
308-P	1.96	40	2.0	15	40	53.3

4.7 Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas

Con base en los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos en mediana escala y sus respectivas fracciones primarias, se seleccionaron aquellas con la mejor actividad antimicrobiana para la separación y purificación de sus componentes mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítico y preparativo. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp., Massachusetts, EE.UU.) equipado con un detector PDA ($\lambda_{\text{máx}}$ 190-500 nm) y otro de ELSD (ganancia 100, presión de N₂ 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de 75±5°C). El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizaron empleando el programa Empower versión 3.0 (Waters). La obtención de los perfiles cromatográficos y la optimización de las condiciones analíticas para la separación y purificación de los constituyentes presentes en las muestras, se realizó con una columna Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex, California, EE.UU.) y con una fase móvil compuesta por ácido fórmico acuoso (0.1%) y MeCN y diferentes gradientes. Una vez establecidas las condiciones óptimas con una resolución tal que permitiera el aislamiento de los compuestos mayoritarios, se escaló el sistema de análisis a nivel preparativo empleando una columna Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 21.2 mm, Phenomenex).

4.8 Caracterización de los productos obtenidos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C se registraron en el equipo VARIAN VNRMS 400 (Varian Inc., California, EE.UU.). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y se emplearon los disolventes CD₃OD y DMSO-*d*₆ para los registros. Los espectros de masas (MS) se registraron en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (UPLC; Acquity, Waters) con detector de PDA, acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución de ionización por electrospray (HRESIMS-MS/MS; Q Exactive marca ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-). Todos los análisis se registraron a una temperatura de 40°C empleando una columna Acquity BEH C₁₈ (1.7 µm, 2.1 × 10 mm, Waters) y una mezcla binaria de MeCN (A)-ácido fórmico (0.1%) (B), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% A e incrementando la composición hasta 100% A durante 8 min, manteniendo composición isocrática por 1.5 min y regresando a condiciones iniciales en 0.5 min. La detección se realizó mediante un barrido desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm. Las condiciones del espectrómetro de masas en ESI+ fueron: temperatura del capilar:

275 °C y 4.5 kV de voltaje para la fuente, 20 V para el voltaje del capilar y 95 V para la lente del tubo; y en ESI⁻: temperatura del capilar: 275 °C y 3.5 kV de voltaje para la fuente, 42 V para el voltaje del capilar y 110 V para la lente del tubo. Se empleó N₂ como gas acarreador a 25 unidades arbitrarias de flujo, y el control del instrumento y el análisis de datos se realizaron con el programa Xcalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific). Para cada uno de los análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de Dioxano- MeOH (1:1).

El registro de los espectros de RMN y MS se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), Facultad de Química, UNAM, y en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de especies fúngicas aisladas de áreas poco exploradas de México. En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos del acondicionamiento de los organismos objeto de estudio y de la evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala. Posteriormente se describirán los resultados correspondientes al estudio químico biodirigido de las especies fúngicas seleccionadas.

5.1 Acondicionamiento y cultivo de los organismos fúngicos

Se realizó la resiembra en condiciones axénicas de 19 organismos fúngicos (**Figura 6**) obtenidos de muestras de sedimento de aguas profundas de las ventilas hidrotermales del Golfo de California y suelo del jal minero “El Fraile”, a partir de los cultivos proporcionados por la Dra. Patricia Vélez del Instituto de Biología de la UNAM. Dichos organismos fueron caracterizados taxonómicamente con base en su morfología y los resultados moleculares de ITS siguiendo la metodología descrita en el **inciso 4.2 (Cuadro 2)**. Posteriormente, cada aislamiento se cultivó en medio sólido (**inciso 4.1 y Figura 7**) y se prepararon los correspondientes extractos orgánicos.

Cuadro 2. Identificación taxonómica de los organismos de estudio.			
Clave	Género o especie	Clave	Género o especie
A	<i>Aspergillus</i> sp.	P	<i>Penicillium</i> sp.
B	<i>Zopfiella</i> sp.	PCSI-A	<i>Cercophora</i> sp.
C	<i>Aspergillus</i> sp.	Q	<i>Talaromyces</i> sp.
D	<i>Lepidosphaeria nicotidae</i>	R	<i>Aspergillus</i> sp.
E	ND	S	<i>Aspergillus</i> sp.
F	ND	T	<i>Aspergillus</i> sp.
H	<i>Talaromyces</i> sp.	W	<i>Aspergillus</i> sp.
I	<i>Aspergillus</i> sp.	308-G	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
M	<i>Penicillium</i> sp.	308-P	<i>Penicillium</i> sp.
O	<i>Aspergillus</i> sp.		

ND: no identificado.

5.2 Evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos

En el **Cuadro 3** se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos en pequeña escala de las 19 cepas fúngicas analizadas. Se consideraron como criterios de actividad la inhibición parcial o total de las muestras a una o ambas concentraciones de prueba contra los distintos microorganismos. Los extractos de los hongos I, O, R, T, W y 308-P resultaron ser los que mostraron la mejor actividad al inhibir de manera total a 200 µg/mL

el crecimiento de al menos un microorganismo. De manera general, todos los extractos, excepto el 308-P mostraron actividad contra bacterias Gram (+), así como Gram (-), sin embargo, este último extracto presentó inhibición total a ambas concentraciones evaluadas contra *C. albicans*.

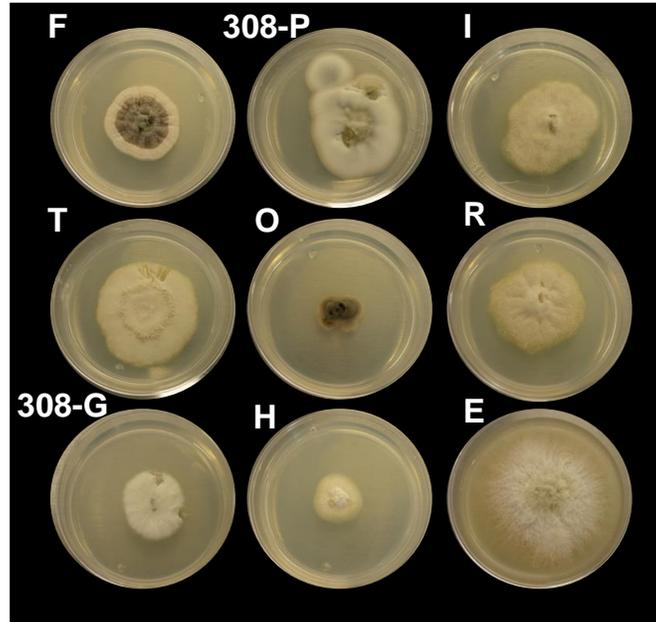


Figura 6. Organismos fúngicos selectos en cajas de Petri con medio APD.

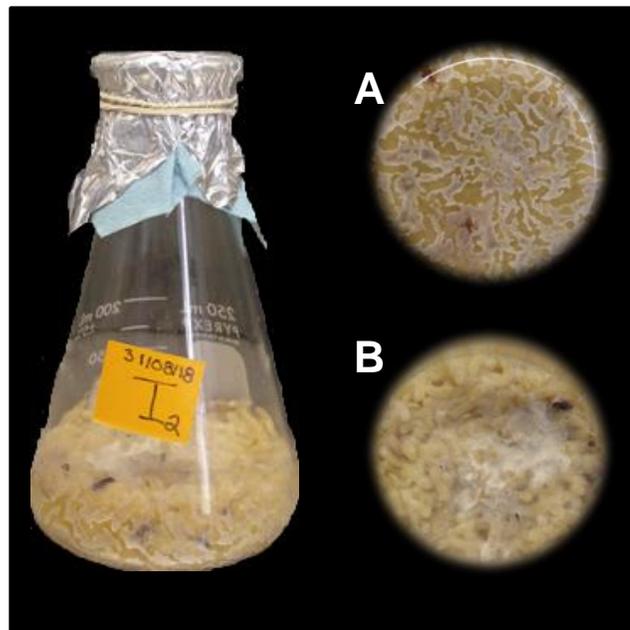


Figura 7. Ejemplo del cultivo en medio de arroz en pequeña escala del hongo I: reverso (A) y anverso (B).

Cuadro 3. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala.

Extracto	Peso (mg)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
A	324.5						
B	533.0						
C	143.7						
D	62.1						
E	197.0						
Exudado E	7.2						
F	325.0						
H	151.0						
I	55.5						
M	368.2						
O	102.0						
P	62.3						
PCSI-A	101.7						
Q	1951.2						
R	63.0						
S	203.3						
Exudado S	46.9						
T	72.4						
W	255.3						
308-G	65.4						
308-P	308.3						
Blanco de arroz	72.1						
Control positivo CMI (µg/mL)		6.3	7.8	0.1	3.1	0.8	2.5

Inhibición total a 200 y 20 µg/mL
Inhibición total a 200 e inhibición parcial a 20 µg/mL
Inhibición total a 200 µg/mL
Inhibición parcial a 200 y 20 µg/mL
Inhibición parcial a 200 µg/mL
Sin inhibición

5.3 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario

Con base en los resultados antes descritos (**Cuadro 3**), se seleccionaron los hongos con claves I y 308-P, identificados taxonómicamente como pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, respectivamente, para su estudio químico biodirigido. Los organismos fúngicos de estos géneros han sido importantes productores de metabolitos secundarios bioactivos, muchos de los cuales han revolucionado la terapéutica de distintas enfermedades y otros han servido de base para el desarrollo de nuevas moléculas más

eficaces y menos tóxicas. En la **Figura 8** se muestra la apariencia física de un cultivo fúngico en mediana escala en medio sólido (especie 308-P). Una vez preparados los extractos orgánicos de cada cultivo (**inciso 4.5**; 485.9 y 2029.0 mg de extracto para los hongos I y 308-P, respectivamente), se realizó su fraccionamiento primario mediante una cromatografía de tipo Flash y los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 9** y en el **Cuadro 4**.

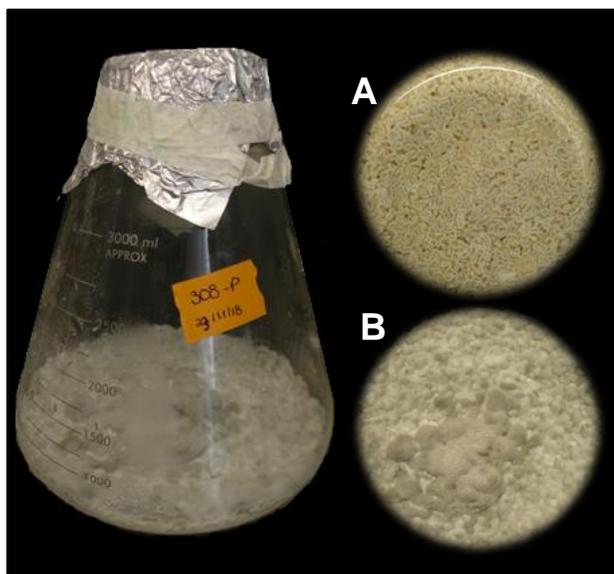


Figura 8. Cultivo en medio de arroz en mediana escala del hongo 308-P: reverso (A) y anverso (B).

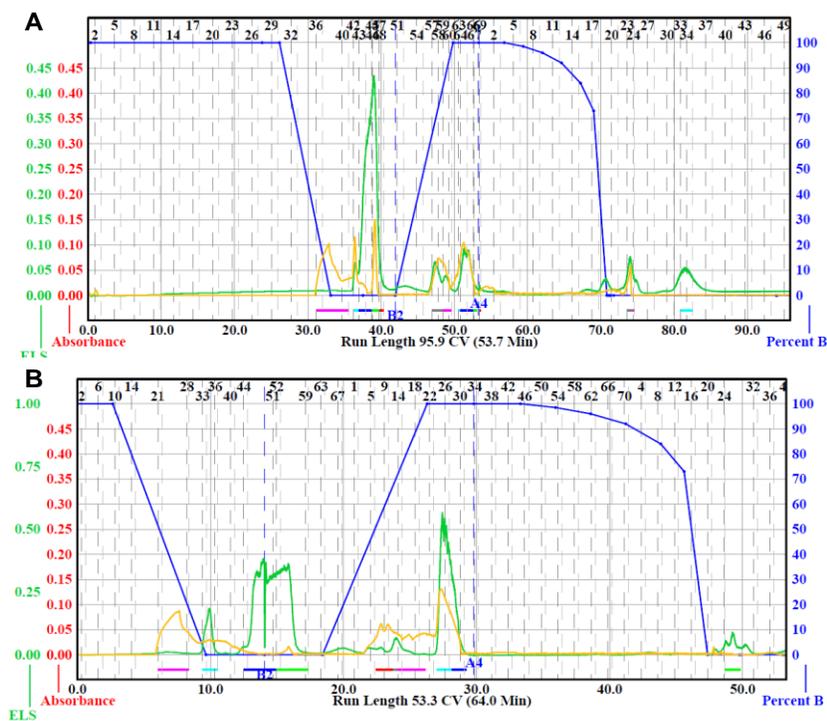


Figura 9. Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de los extractos de los hongos I (A) y 308-P (B). Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELSD y PDA, y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl₃-AcOEt-MeOH).

Cuadro 4. Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de los hongos I y 308-P.							
Hongo I				Hongo 308-P			
Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
1 (1-35)	1.7	8 (59-61)	17.2	1 (1-30)	3.8	10 (77-78)	14.4
2 (36-41)	1.8	9 (62-68)	57.9	2 (31-41)	34.7	11 (79-80)	17.4
3 (42)	2.9	10 (69-87)	65.4	3 (42-44)	8.6	12 (80-87)	266.2
4 (43-45)	66.1	11 (88-90)	34.2	4 (45-47)	0.6	13 (88-93)	29.1
5 (46)	28.8	12 (91-97)	59.1	5 (48)	38.6	14 (94-130)	621.8
6 (47-55)	8.2	13 (98-119)	83.7	6 (49)	201.7	15 (131-152)	64.4
7 (56-58)	15.2			7 (50-59)	211.8	16 (153-155)	7.8
Cantidad recuperada			442.2	8 (60-72)	21.0	17 (156-158)	7.1
Recobro			96.5 %	9 (73-76)	13.5	18 (159-180)	217.1
				Cantidad recuperada			1779.6
				Recobro			90.7%

El género *Aspergillus* lo componen alrededor de 300 especies distribuidas en todo el mundo (Aparicio-Cuevas *et al.*, 2017). Una de las características morfológicas más distintivas de las especies de este género es su cabeza aspergilar y su reproducción asexual mediante la producción de conidios (Houbraken *et al.*, 2014). Muchas de estas especies resultan patógenas para plantas, animales y humanos, por ejemplo *A. fumigatus* y *A. terreus*, o producen aflatoxinas como *A. flavus* y *A. ochraceus*, además de producir una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos como la fumagilina y la lovastatina (Frisvad y Larsen, 2015) (**Figura 10**). Finalmente, otras especies son utilizadas por sus aplicaciones industriales en la producción de alimentos, bebidas y algunas enzimas, como lo son *A. niger*, *A. aculeatus* y *A. oryzae* (Abdel-Azeem *et al.*, 2016).

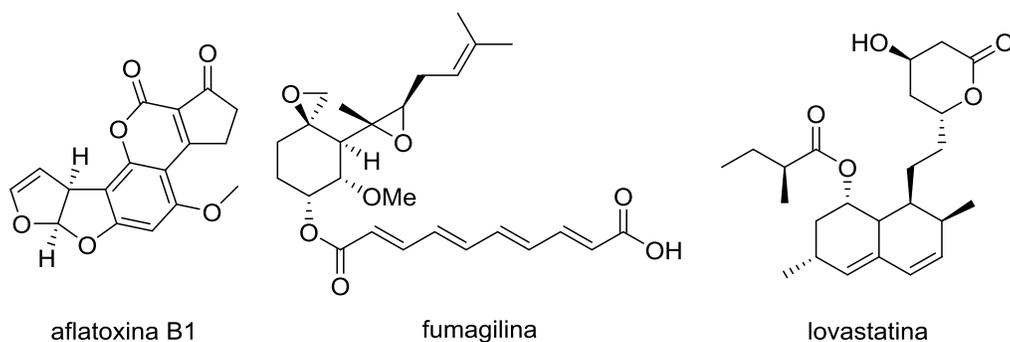


Figura 10. Ejemplos de metabolitos bioactivos producidos por especies de *Aspergillus*.

Por otro lado, el género *Penicillium*, también cosmopolita, lo componen más de 350 especies que juegan un papel importante en los distintos ecosistemas, las actividades agrícolas y en aplicaciones biotecnológicas, todas de un alto impacto económico. Su principal función en la naturaleza es la descomposición de materia orgánica; otras especies se emplean para la

producción de fármacos como la penicilina, la griseofulvina y la andrastina A (*P. chrysogenum*, *P. griseofulvum* y *P. albocoremium*, respectivamente) (**Figura 11**); o en los procesos de producción de quesos (*P. roqueforti*) (Refai *et al.*, 2015). Finalmente, su principal característica morfológica es la presencia de conidióforos.

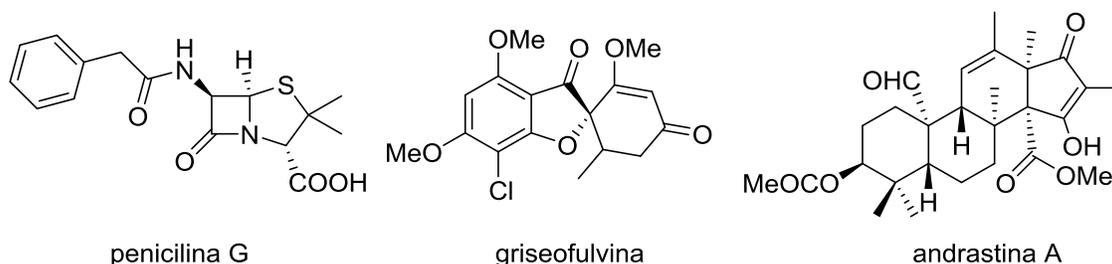


Figura 11. Ejemplos de metabolitos bioactivos producidos por especies de *Penicilium*.

5.4 Evaluación biológica de los extractos en mediana escala y fracciones primarias

Una vez realizado el fraccionamiento primario de los extractos, se realizó la evaluación biológica de las fracciones y extractos siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Los resultados de este análisis se resumen en el **Cuadro 5**. Cabe mencionar que las fracciones con peso menor a 2.0 mg fueron descartadas para la evaluación.

Cuadro 5. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos en mediana escala y sus fracciones primarias.

Extracto o fracción	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
I (ext. ME)					
I-3					
I-4					
I-5					
I-6					
I-7					
I-8					
I-9					
I-10					
I-11					
I-12					
I-13					
308-P (ext. ME)					
308-P-1					
308-P-2					
308-P-3					
308-P-5					
308-P-6					

308-P-7					
308-P-8					
308-P-9					
308-P-10					
308-P-11					
308-P-12					
308-P-13					
308-P-14					
308-P-15					
308-P-16					
308-P-17					
308-P-18					
Control positivo CMI (µg/mL)	7.8	0.1	3.1	0.8	2.5

Se emplearon los mismos criterios de actividad indicados en el **Cuadro 3**. Ninguna muestra presentó actividad contra *P. aeruginosa*.

5.5 Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas seleccionadas

Con base en los resultados de actividad biológica, se seleccionaron algunas fracciones primarias para la separación de los componentes presentes mediante HPLC. Enseguida se obtuvieron los perfiles cromatográficos de dichas fracciones a nivel analítico, estos perfiles se optimizaron hasta lograr una resolución que permitiera la purificación de los metabolitos. Así, a partir de la fracción I-9 se logró el aislamiento de los compuestos **1** y **2** (**Figura 12**). De la fracción I-10 se aisló el compuesto **3** y cantidades adicionales del producto **2** (**Figura 13**). Finalmente, el perfil cromatográfico de la fracción 308-P-14 (**Figura 14**), reveló que ésta contenía sólo un componente mayoritario, el producto **4**. Las cantidades obtenidas de cada metabolito, así como sus tiempos de retención y máximos en el UV, se presentan en el **Cuadro 6**.

Compuesto	t _r (min)	UV _{máx}	Peso (mg)
1	9.1	200, 266	13.6
2	14.1	224, 306	3.0
3	11.8	203, 227, 305	2.8
4	19.0	235	621.8

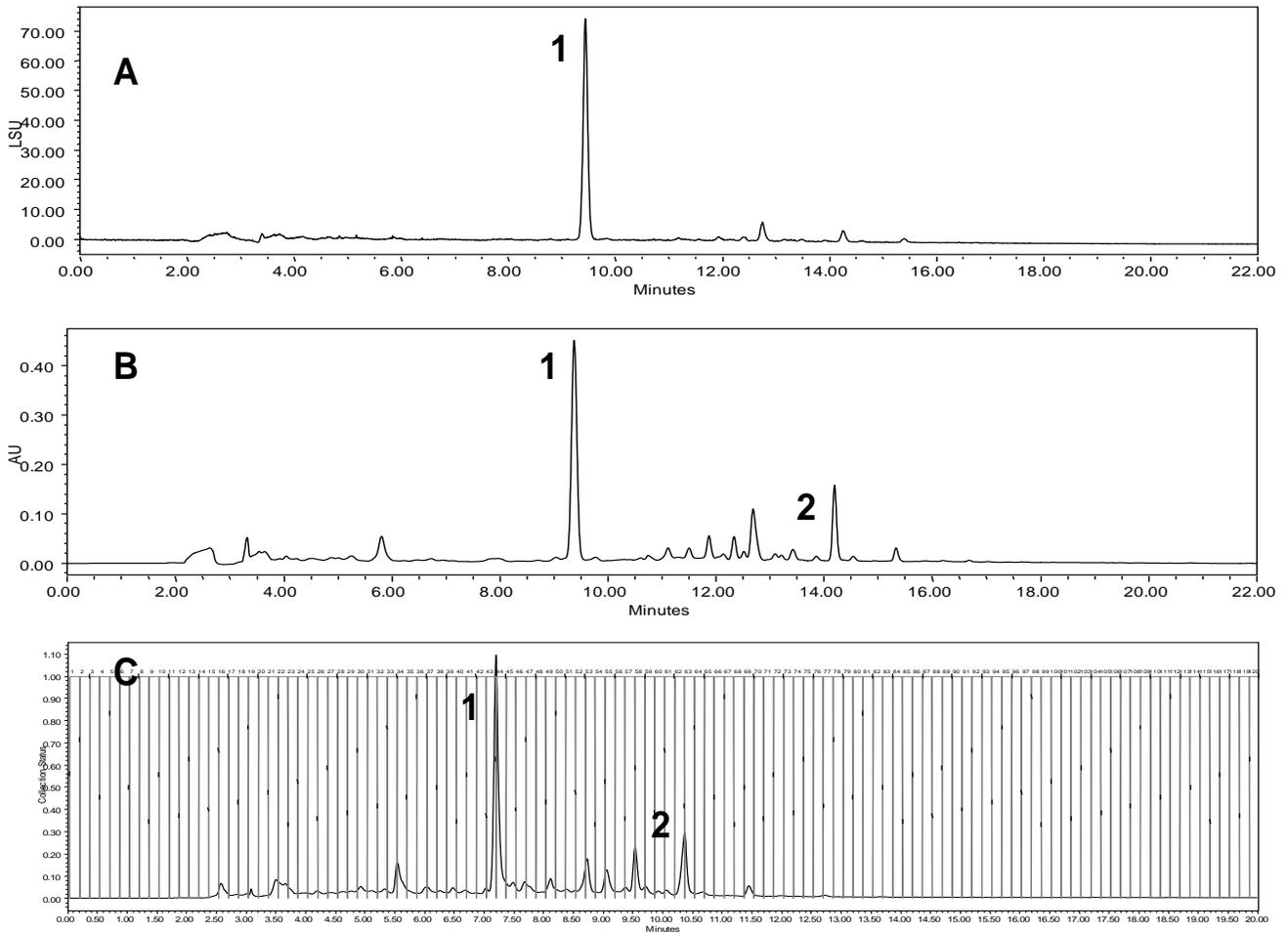


Figura 12. Perfil cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción I-9: **(A)** ELSD y **(B)** PDA 254 nm. Gradiente de elución: 30 a 100% de MeCN en 15 min y 5 min 100% de MeCN (en ácido fórmico acuoso 0.1%); tiempo de corrida, 20 min; flujo, 1 mL/min. **(C)** Separación por HPLC a nivel preparativo (PDA 254 nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 21.24 mL/min y tiempo de recolección por fracción de 10 s.

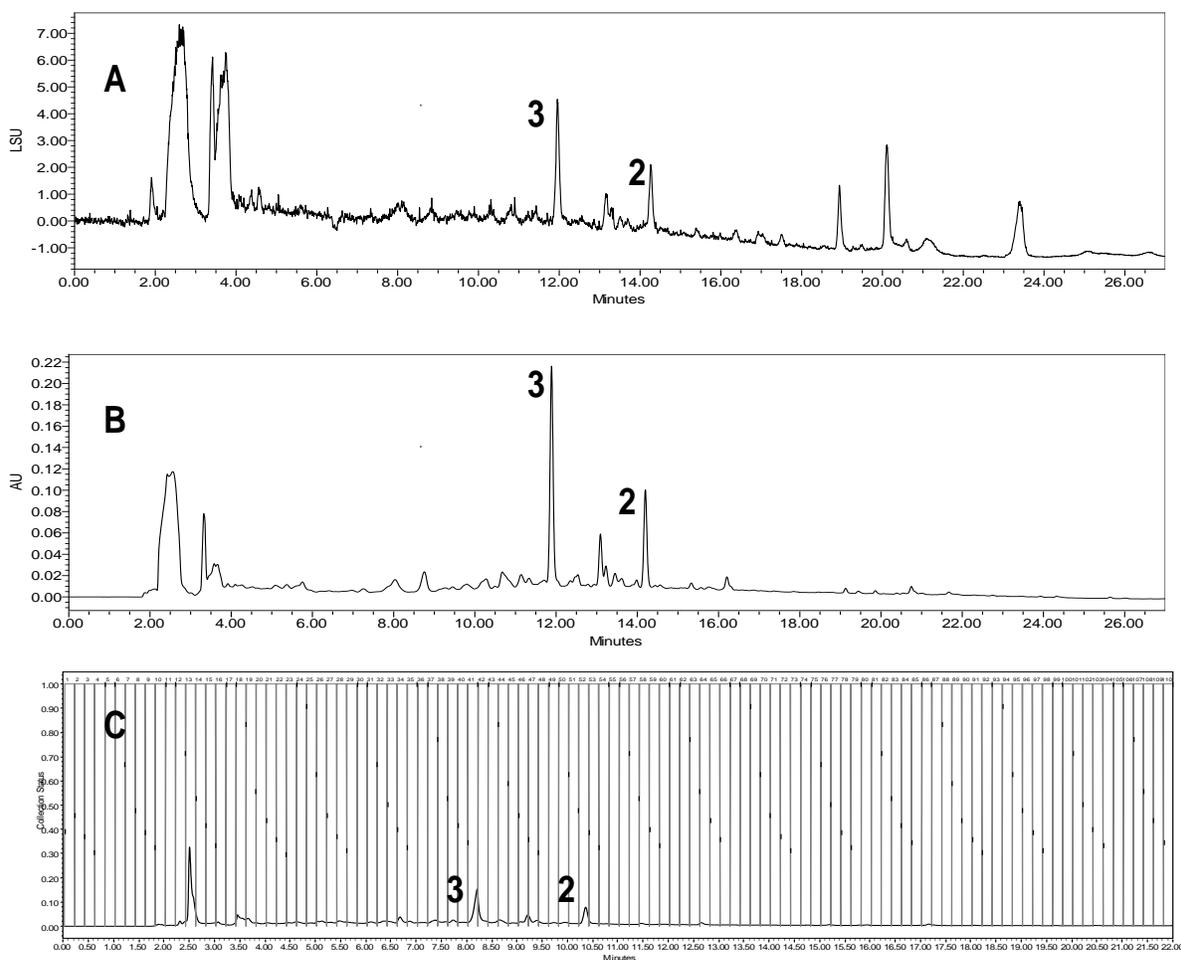


Figura 13. Perfil cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción I-10: **(A)** ELSD y **(B)** PDA 254 nm. Gradiente de elución: 30 a 100% de MeCN en 15 min y 2 min 100% MeCN (en ácido fórmico acuoso 0.1%); tiempo de corrida, 22 min; flujo, 1 mL/min. **(C)** Separación por HPLC a nivel preparativo (PDA 254 nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 21.24 mL/min y tiempos de recolección por fracción de 12 segundos.

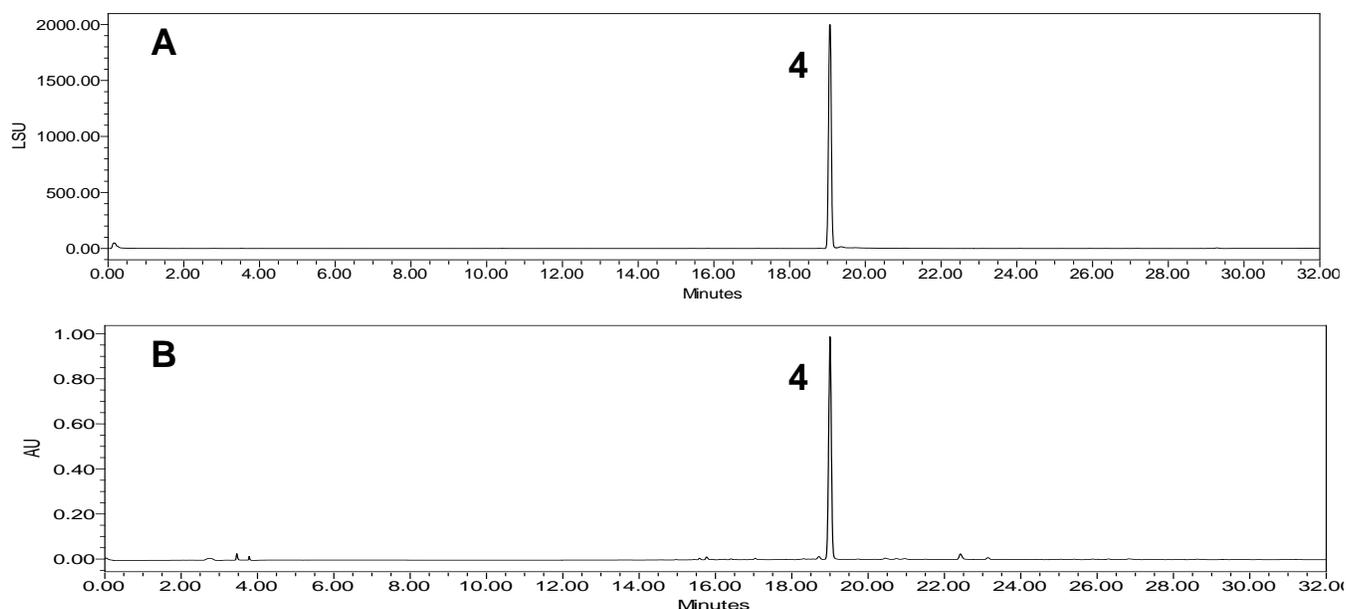


Figura 14. Perfil cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción 308-P-14: **(A)** ELSD y **(B)** PDA 254 nm. Gradiente de elución: isocrático 5 min 15% de MeCN, gradiente 15 a 100% de MeCN en 15 min, 5 min 100% MeCN (en ácido fórmico acuoso 0.1%) e isocrático 7 min 15% MeCN; tiempo de corrida, 32 min; flujo, 21.24 mL/min.

5.6 Caracterización química de los compuestos aislados

5.6.1 Dimetil gliotoxina (1)

El compuesto **1** se aisló como un sólido amorfo amarillo. Los espectros obtenidos mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (t_R 3.1 min; **Figura 16**) mostraron relaciones m/z de 357.0930, 379.0748 y 355.0773 una para los iones $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M-H]^-$, respectivamente, permitiendo establecer la fórmula molecular como $C_{15}H_{20}N_2O_4S_2$, consistente con 7 grados de insaturación.

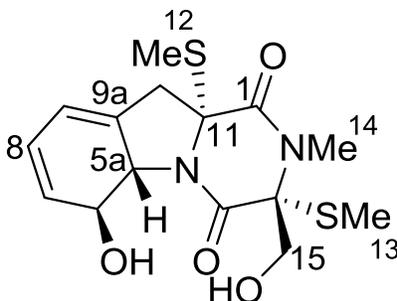


Figura 15. Estructura química de la dimetil gliotoxina (**1**).

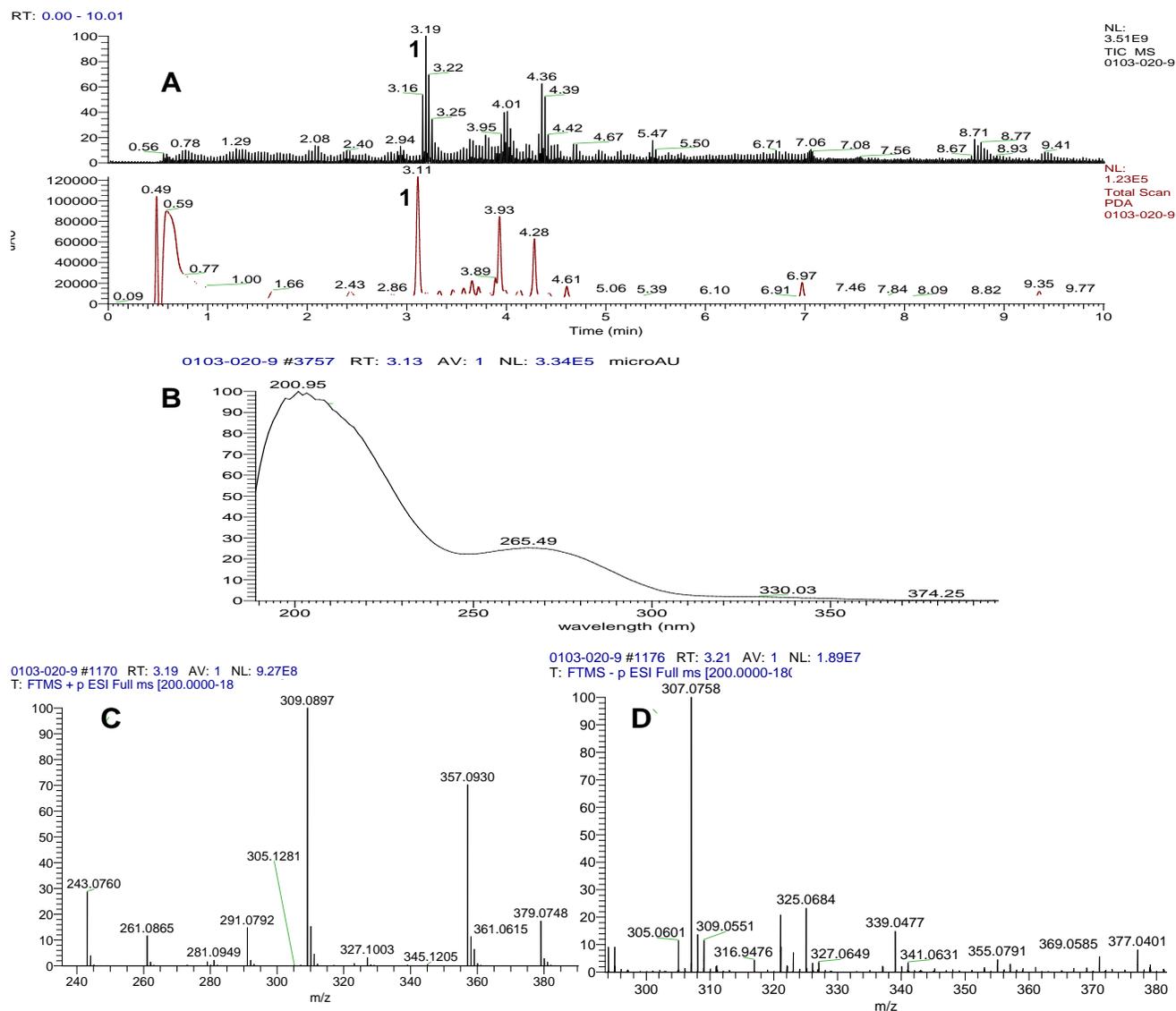


Figura 16. Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción I-9 (A). Espectros en el UV (B), ESI+ (C) y ESI- (D) del compuesto 1.

El análisis detallado de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Figuras 17-18 y Cuadro 7) permitió identificar las siguientes características estructurales en el producto 1:

- En δ_{H} 2.25 y 2.28 se observan dos señales de tipo singlete correspondientes a los metilos $\text{H}_3\text{-12}$ y $\text{H}_3\text{-13}$ unidos a un átomo de S, además de una señal en δ_{H} 3.12, asignable al N-CH_3 en la posición 2.
- En δ_{H} 3.87 (d, $J = 11.5$ Hz) y 4.26 (d, $J = 11.5$ Hz) se observa un sistema de spin correspondiente a un hidroximetileno en la posición 15.
- En δ_{H} 5.68 (d, $J = 9.7$ Hz), 5.93 (m) y 5.99 (m) se identificaron las señales asignables a los protones vinílicos H-7, H-8 y H-9, respectivamente.

- En δ_H 4.93 y 4.89 se observan dos señales de tipo multiplete de grupos metinos unidos a heteroátomos (H-5a y H-6).
- En δ_H 2.94 (m) y 3.13 (d, $J = 15.3$) se observan dos señales atribuibles a un metileno (H2-10).
- En δ_C 166.4 (C-1) y 167.0 (C-4) se observan señales de dos grupos carbonilo de amida; en δ_C 69.1 (C-5a) y 74.3 (C-6) dos metinos unidos a heteroátomos; en δ_C 38.2 (C-10) y 63.2 (C-15) dos metilenos, uno de ellos base de oxígeno; en δ_C 13.7 (C-12), 12.1 (C-13) y 27.7 (C-14) tres metilos sobre heteroátomo; en δ_C 129.3 (C-7), 123.4 (C-8) y 119.4 (C-9) tres vinílicos; y δ_C 72.9 (C-3), 132.6 (C-9a) y 71.7 (C-11) tres carbonos cuaternarios.

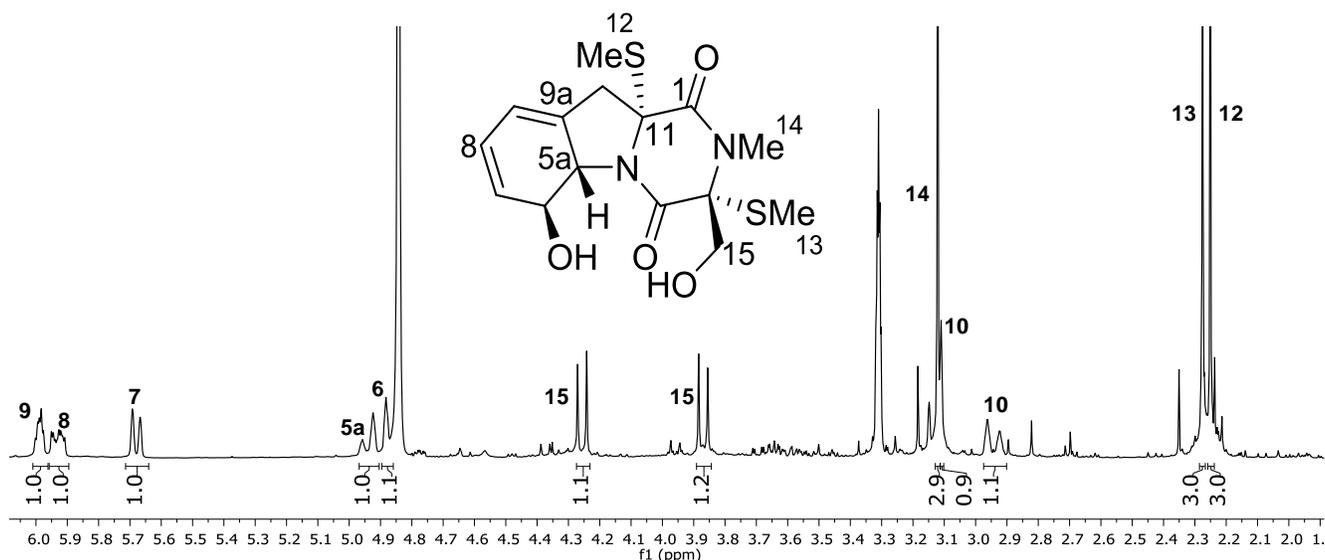


Figura 17. Espectro de RMN 1H de la dimetil gliotoxina (**1**) (400 MHz en CD_3OD).

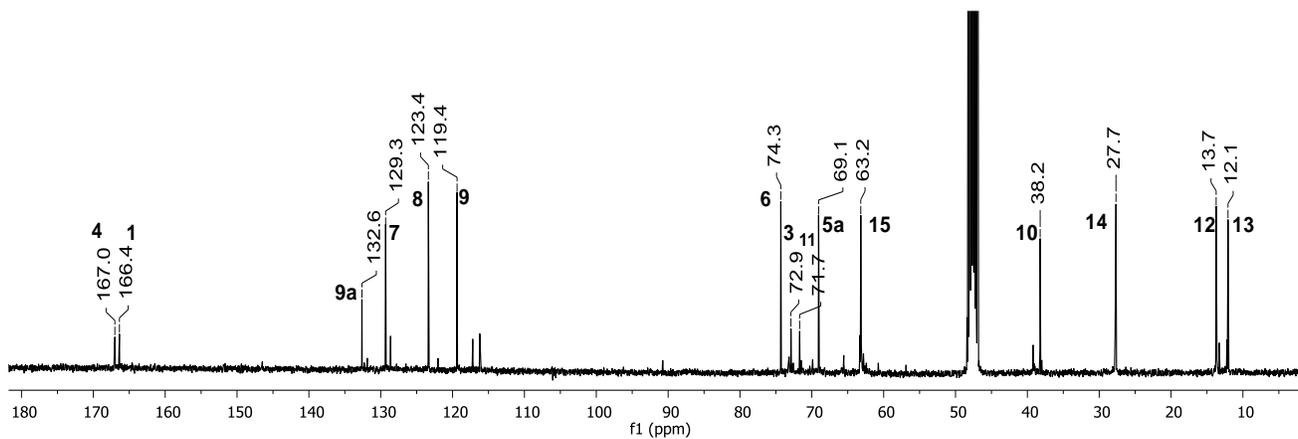


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C de la dimetil gliotoxina (**1**) (100 MHz en CD_3OD).

Cuadro 7. Datos de RMN ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) de la dimetil gliotoxina (1).				
Posición	1 ^a		Dimetil gliotoxina ^b	
	δ _c	δ _H , mult. (J en Hz)	δ _c	δ _H , mult. (J en Hz)
1	166.4		167.7	
3	72.9		74.4	
4	167.0		168.6	
5a	69.1	4.93, m	70.6	4.92, m
6	74.3	4.89, m	75.9	4.84, m
7	129.3	5.68, d (9.7)	130.9	5.68, d (9.6)
8	123.4	5.93, m	124.9	5.92, m
9	119.4	5.99, m	120.9	5.98, m
9a	132.6		134.2	
10	38.2	3.13, d (15.3) 2.94, m	39.8	3.12, d (16.4) 2.94, d (16.4)
11	71.7		73.2	
12	13.7	2.25, s	15.3	2.25, s
13	12.1	2.28, s	13.6	2.27, s
14	27.7	3.12, s	29.2	3.12, s
15	63.2	3.87, d (11.5) 4.26, d (11.5)	64.8	3.87, d (11.5) 4.26, d (11.5)

^aCD₃OD y δ en ppm; ^bRodrigues *et al.*, 2015.

El análisis de las constantes espectroscópicas y espectrométricas antes descritas, aunado a la búsqueda en bases de datos especializadas, permitió identificar al compuesto **1** como la dimetil gliotoxina o bisdetiobis(metiltilio)gliotoxina (Rodrigues *et al.*, 2015). Este producto natural fue aislado por primera vez del hongo *Gliocladium deliquescens* en 1979, y en años posteriores de las especies *A. fumigatus* y *Penicillium terlikowskii* (Afiyatulloev *et al.*, 2005). Además, se ha descrito su actividad biológica como un potente agente antibacteriano contra *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) (Li *et al.*, 2006), inhibidor del factor de activación plaquetario (Okamoto *et al.*, 1986), antiparasitario contra *Trypanosoma brucei* con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 40.2 μM (Watts *et al.*, 2010) y citotóxico contra numerosas líneas celulares (Sun *et al.*, 2011).

5.6.2 Fiscalina C (2) y epi-fiscalina C (3)

El compuesto **2** se aisló como un sólido amorfo amarillo. Su fórmula molecular C₂₇H₂₉N₅O₄, que permite 16 grados de insaturación (**Figura 19**) fue establecida a partir de los iones 488.2285 [M+H]⁺ y 486.2147 [M-H]⁻ observados en el espectro de masas obtenido mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (t_R 4.36 min; **Figura 20**).

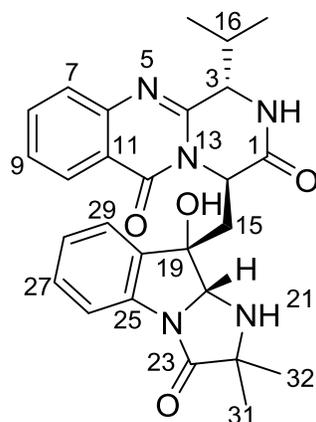


Figura 19. Estructura química de la fiscalina C (2).

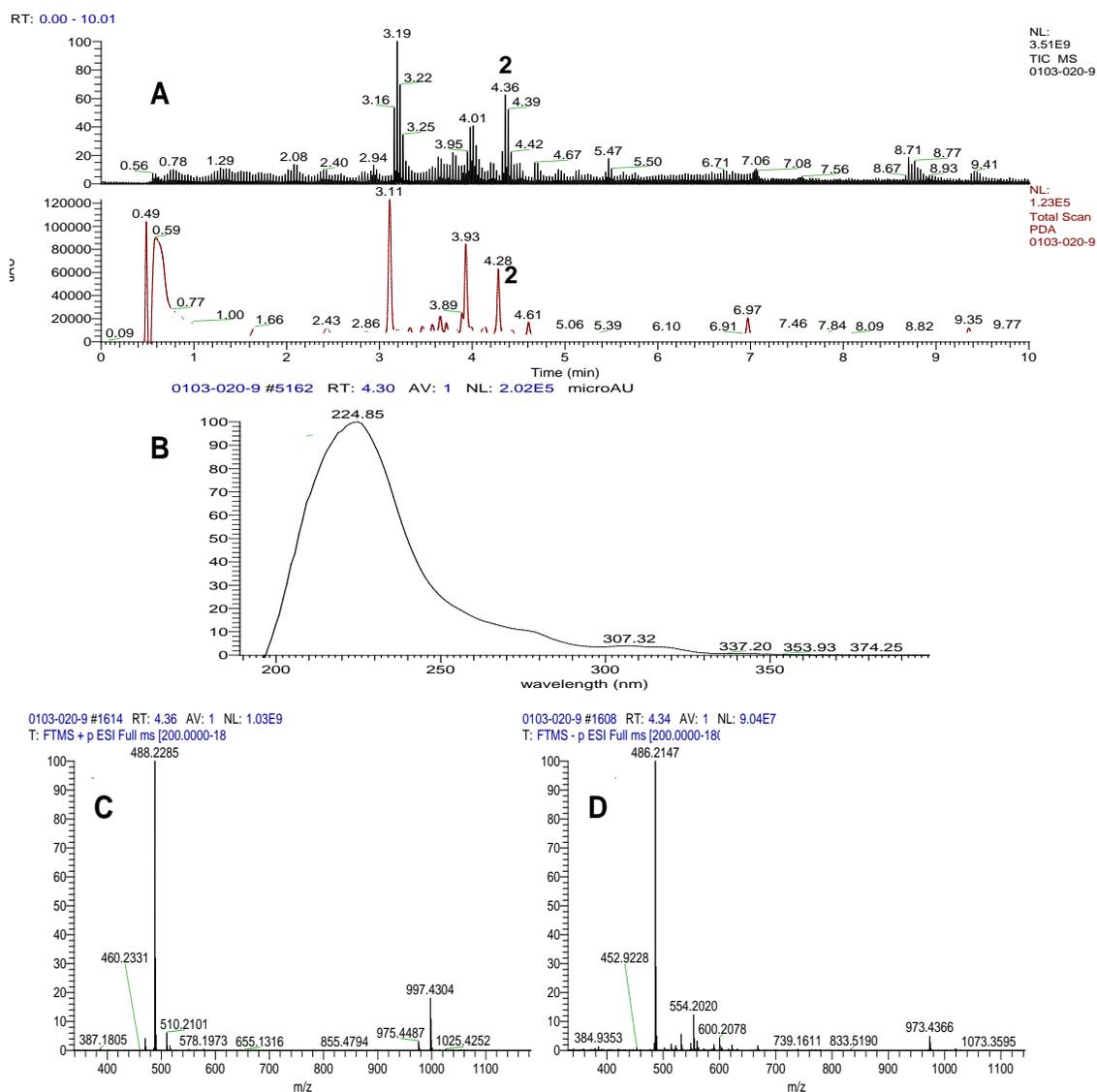


Figura 20. Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción I-9 (A). Espectros en el UV (B), ESI⁺ (C) y ESI⁻ (D) del compuesto 2.

Cuadro 8. Datos de RMN ^1H (400 MHz) de la fiscalina C (2) y de la <i>epi</i> -fiscalina C (3).				
	2^a	Fiscalina C^b	3^c	<i>epi</i>-Fiscalina C^b
Posición	δ_{H} , mult. (J en Hz)		δ_{H} , mult. (J en Hz)	
2		8.46, s	9.07, d (4.7)	9.12, d (4.5)
3	4.75, d (2.0)	4.75, d (1.7)	4.03, m	4.03, dd (8.9, 4.5)
7	7.69, d (8.3)	7.66, d (8.0)	7.70, d (7.7)	7.70, d (7.7)
8	7.85, dd (8.3, 7.1)	7.84, dd (8.0, 7.5)	7.88, ddd (8.4, 7.1, 1.5)	7.88, dd (7.7, 7.7)
9	7.54, dd (8.9, 7.0)	7.54, dd (8.0, 7.5)	7.58, ddd (8.1, 7.1, 1.2)	7.58, dd (8.0, 7.7)
10	8.25, dd (7.9, 1.5)	8.16, dd (8.0, 1.0)	8.21, dd (8.0, 1.5)	8.20, d (8.0)
14	5.46, dd (7.3, 3.1)	5.36, dd (7.8, 3.3)	5.35, dd (8.3, 2.9)	5.35, dd (8.1, 2.4)
15	3.10, dd (15.0, 3.1) 3.07, dd (12.8, 2.8)	2.86, dd (14.6, 3.6) 2.74, dd (14.6, 3.6)	2.85, dd (14.8, 3.1) 2.40, dd (14.7, 8.4)	2.85, dd (14.7, 2.8) 2.41, dd (14.7, 8.4)
16	2.92, dd (14.9, 7.5)	2.97, m	2.19, m	2.19, m
17	0.95, d (6.8)	0.90, d (7.3)	1.05, d (6.7)	1.04, d (6.4)
18	1.21, d (7.3)	1.17, d (7.3)	1.07, d (6.7)	1.06, d (6.4)
20	4.96, s	4.96, s	5.65, s	5.42, s
21		8.36, s		
26	7.36, m	7.35, m	7.39, d (7.4)	7.36, d (7.5)
27	7.34, m	7.33, m	7.34, dd (7.1, 8.1)	7.37, dd (7.5, 7.5)
28	7.17, dt (7.5, 1.2)	7.13, m	7.12, dt (7.3, 1.5)	7.13, dd (7.5, 7.5)
29	7.41, d (7.3)	7.45, d (7.5)	7.46, d (7.4)	7.46, d (7.5)
31	0.85, s	0.91, s	1.31, s	1.31, s
32	1.12, s	1.11, s	1.39, s	1.39, s

^aCD₃OD, ^bButtachon *et al.*, 2012, ^cDMSO- *d*₆ y δ en ppm.

El análisis detallado antes descrito y la revisión en la literatura especializada, permitió identificar al compuesto **2** como la fiscalina C (Buttachon *et al.*, 2012). Este producto natural ha sido aislado a partir de *Neosartorya fischeri* (Wong *et al.*, 1992) y *N. siamensis* (Buttachon *et al.*, 2012) y tiene una importante actividad antimalárica y anticancerígena (Sawadsitang *et al.* 2015), además de presentar un efecto de sinergismo contra MRSA al combinarse con el antibiótico oxacilina (Long *et al.*, 2018). También es un inhibidor de la sustancia P, la cual actúa como neurotransmisor e inmunomodulador, por lo que podría emplearse en la terapéutica como un agente analgésico y/o antiinflamatorio (Wong *et al.*, 1992).

Por otra parte, el compuesto **3**, presentó una relación *m/z* en 488.2284 [M+H]⁺ y 486.2147 [M-H]⁻, que corresponde con la misma fórmula molecular C₂₇H₂₉N₅O₄, calculada para el producto **2** (Figura 22). El análisis comparativo de los espectros de RMN de ^1H de los productos **2** y **3** (Figura 23 y Cuadro 8) son muy similares pero no idénticos, difiriendo principalmente en el desplazamiento químico de las señales asignadas a los protones H-16 (δ_{H} 2.19, m), H₃-31 (δ_{H} 1.31, s) y H₃-32 (δ_{H} 1.39, s) y la señal del grupo NH en δ_{H} 9.07 (d, *J* = 4.7 Hz), además de la diferente multiplicidad que presenta la señal en δ_{H} 4.03 (m, H-3) en el producto **3**. Esta observación, aunada al análisis de los espectros de masas, confirmó que el

compuesto **3** es un estereoisómero del producto **2** en la posición C-3. Así, la estructura de **3** fue establecida como la *epi*-fiscalina C (Buttachon *et al.*, 2012) (**Figura 24**).

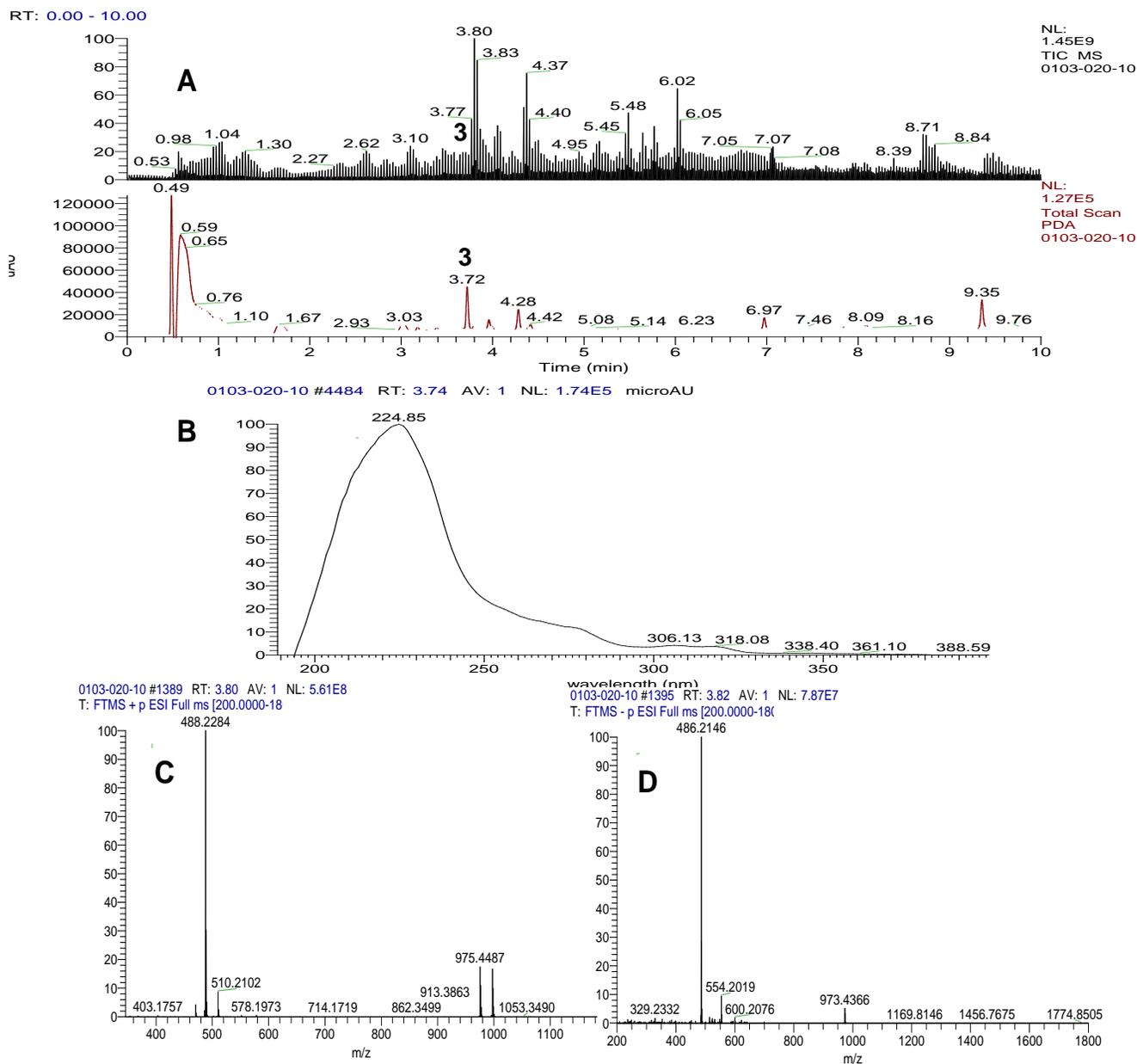


Figura 22. Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción I-10 (A). Espectros en el UV (B), ESI+ (C) y ESI- (D) del compuesto **3**.

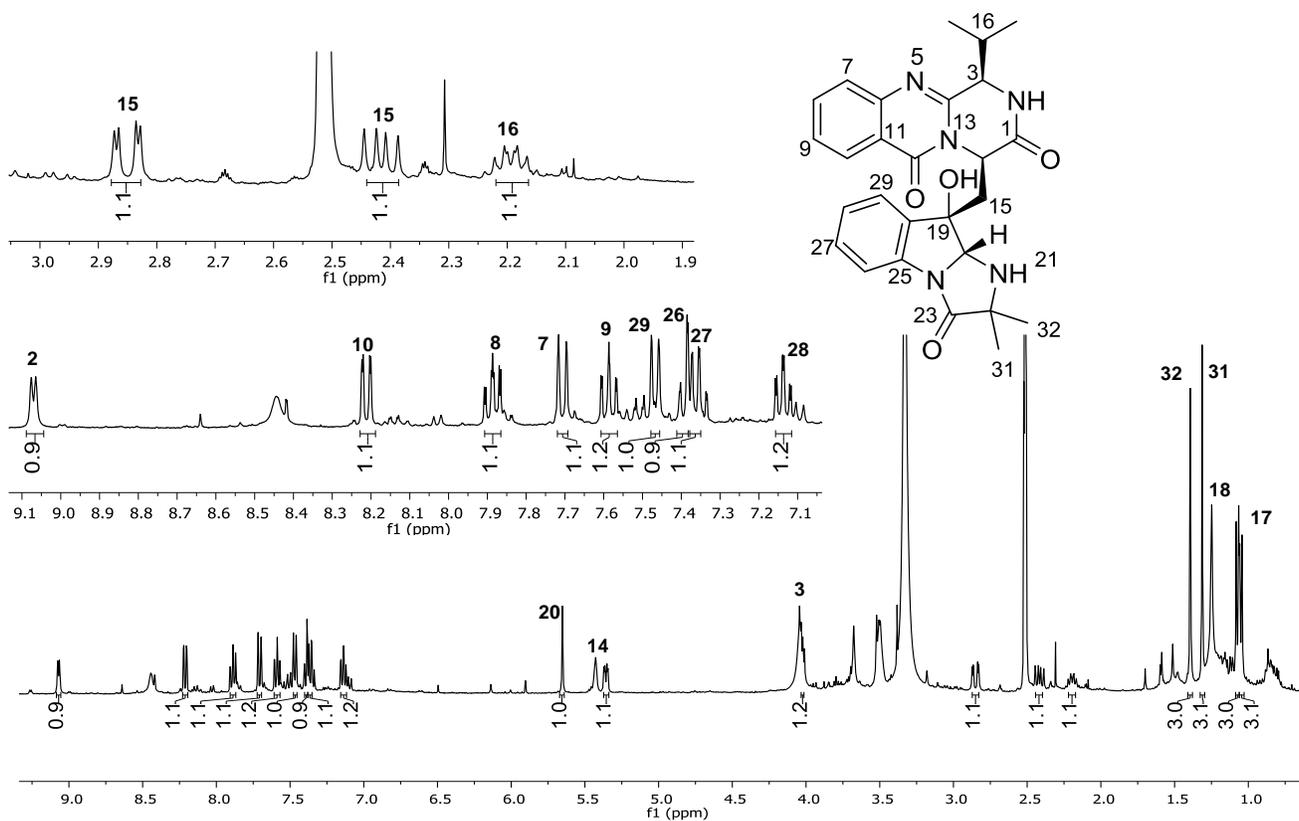


Figura 23. Espectro de RMN ^1H de la *epi*-fiscalina C (**3**) (400 MHz, DMSO-d_6).

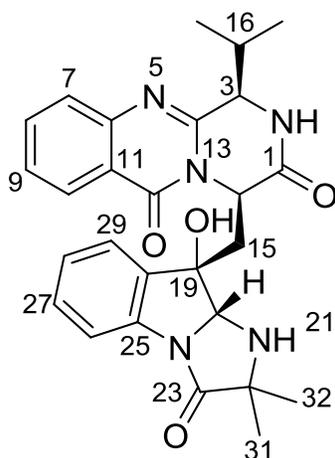


Figura 24. Estructura química de la *epi*-fiscalina C (**3**).

La *epi*-fiscalina C (**3**), ha sido aislada previamente de las especies *Nesartorya siamensis* (Buttachon *et al.*, 2012) y *Xylaria cubensis* (Sawadsitang *et al.*, 2015), y presenta, además de las mismas actividades que su estereoisómero **2**, actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares humanas de cáncer: A375 (melanoma maligno), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y HCT116 (carcinoma de colon) (Prata-Sena *et al.*, 2016).

5.6.3 Brefeldina A (4)

El compuesto **4** (**Figura 25**) es un metabolito secundario de tipo macrólida, con una fórmula molecular de C₁₆H₂₄O₄ [*m/z* 281.1741 [M+H]⁺] (**Figura 26**).

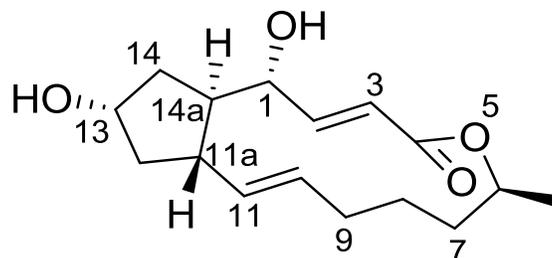


Figura 25. Estructura química de la brefeldina A (**4**).

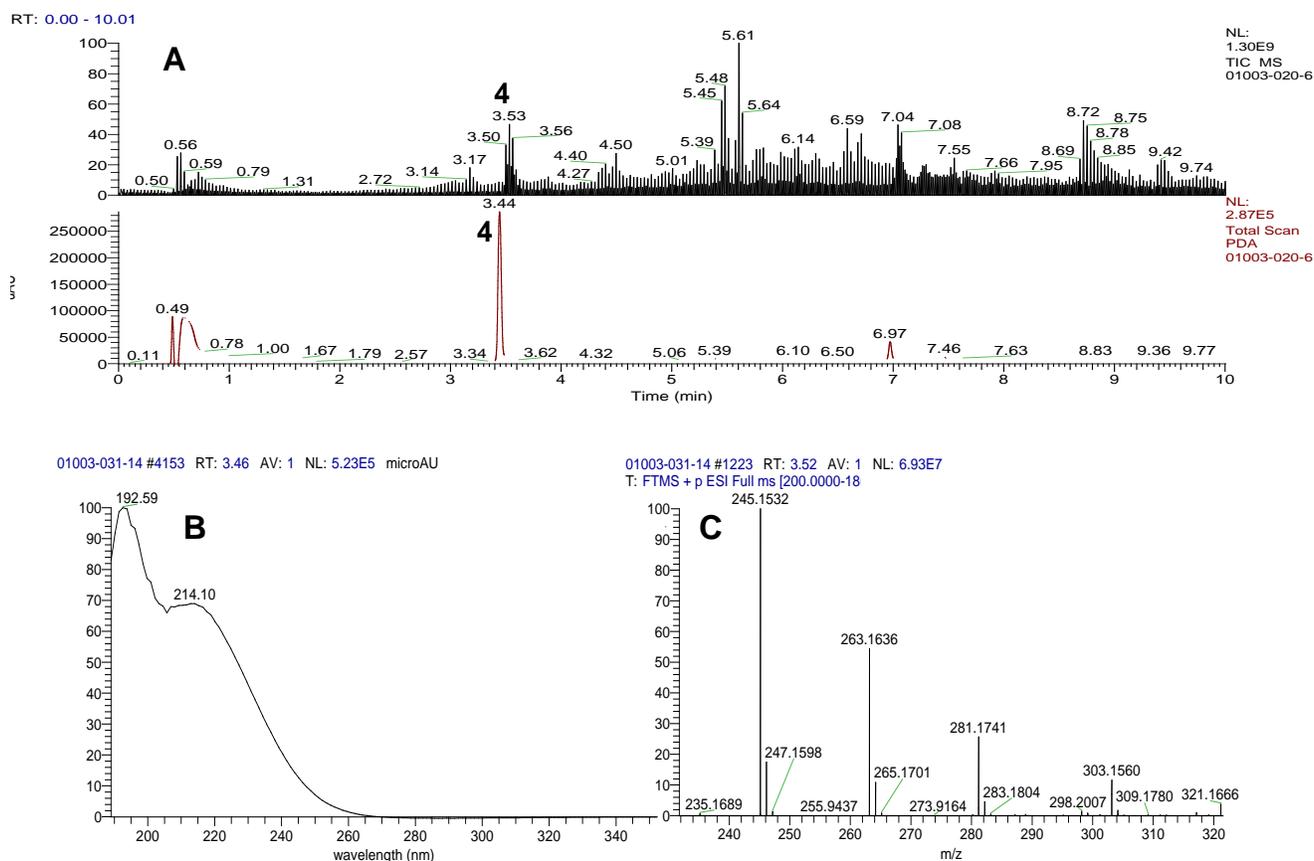


Figura 26. Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción 308-P-14 (**A**). Espectros en el UV (**B**), ESI+ (**C**) y ESI- (**D**) del compuesto **4**.

El conjunto de señales observadas en los espectros de RMN se resumen a continuación (**Cuadro 9**):

- En δ_H 7.46 (dd, $J = 15.6, 3.0$ Hz), 5.80 (dd, $J = 15.6, 1.9$ Hz), 5.76 (ddd, $J = 15.0, 10.3, 4.7$ Hz) y 5.28 (dd, $J = 15.1, 9.6$ Hz) se observan cuatro señales correspondientes a dos dobles ligaduras.

- En δ_H 0.91, 1.45, 1.58, 1.77 y 2.13, se observan cinco señales múltiples congruentes con la presencia de cinco grupos metileno en la molécula.
- Finalmente, en δ_H 4.04 (ddd, $J = 9.5, 3.1, 2.0$ Hz), 4.22 (m) y 4.80 (m) se observan tres grupos de señales asignables a grupos metino base de oxígeno.
- Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C en δ_C 75.3 (C-1), 71.9 (C-13) y 71.6 (C-6) también se observan tres señales diagnósticas para carbonos base de oxígeno, además de una señal para un grupo carbonilo de éster en δ_C 167.0 (C-4).
- Otras señales que se observan en el espectro de RMN ^{13}C corresponden a cuatro carbonos de doble ligadura [δ_C 116.4 (C-3), 130.1 (C-10), 136.8 (C-11) y 153.8 (C-2)], cinco grupos metileno [δ_C 26.7 (C-8), 31.6 (C-9), 33.6 (C-7), 40.5 (C-14) y 42.7 (C-12)], dos metinos adicionales [δ_C 44.1 (C-11a) y 51.8 (C-14a)] y un grupo metilo [δ_C 19.7 (C-15)].

Cuadro 9. Datos de RMN 1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de la brefeldina A (4).

Posición	4 ^a		Brefeldina A ^b	
	δ_C	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C	δ_H , mult. (J en Hz)
1	75.3	4.04, ddd (9.5, 3.1, 2.0)	76.6	4.02, ddd (9.5, 3.1, 2.0)
2	153.8	7.46, dd (15.6, 3.0)	155.2	7.45, dd (15.5, 3.0)
3	116.4	5.80, dd (15.6, 1.9)	117.8	5.80, dd (15.5, 2.0)
4	167.0		168.4	
6	71.6	4.80, m	73.0	4.79-4.75, m
7	33.6	1.45, m	35.0	1.46-1.40, m
8	26.7	0.91, m	28.0	0.89-0.85, m
9	31.6	1.77, m	33.0	1.88-1.72, m
10	130.1	5.76, ddd (15.0, 10.3, 4.7)	131.4	5.70, ddd (15.0, 10.5, 4.5)
11	136.8	5.28, dd (15.1, 9.6)	138.1	5.27, dd (15.6, 5.5)
11a	44.1	2.39, q	45.5	2.37, q
12	42.7	1.58, m	44.1	1.58-1.50, m
13	71.9	4.22, m	73.2	4.21-4.18, m
14	40.5	2.13, m	41.8	2.10, ddd (13.5, 8.4, 5.2)
14a	51.8	2.0, m	53.2	2.02-1.97, m
15	19.7	1.24, d (6.3)	21.1	1.23, d (6.3)

^aCD₃OD y δ en ppm; ^bTrost y Crawly, 2004.

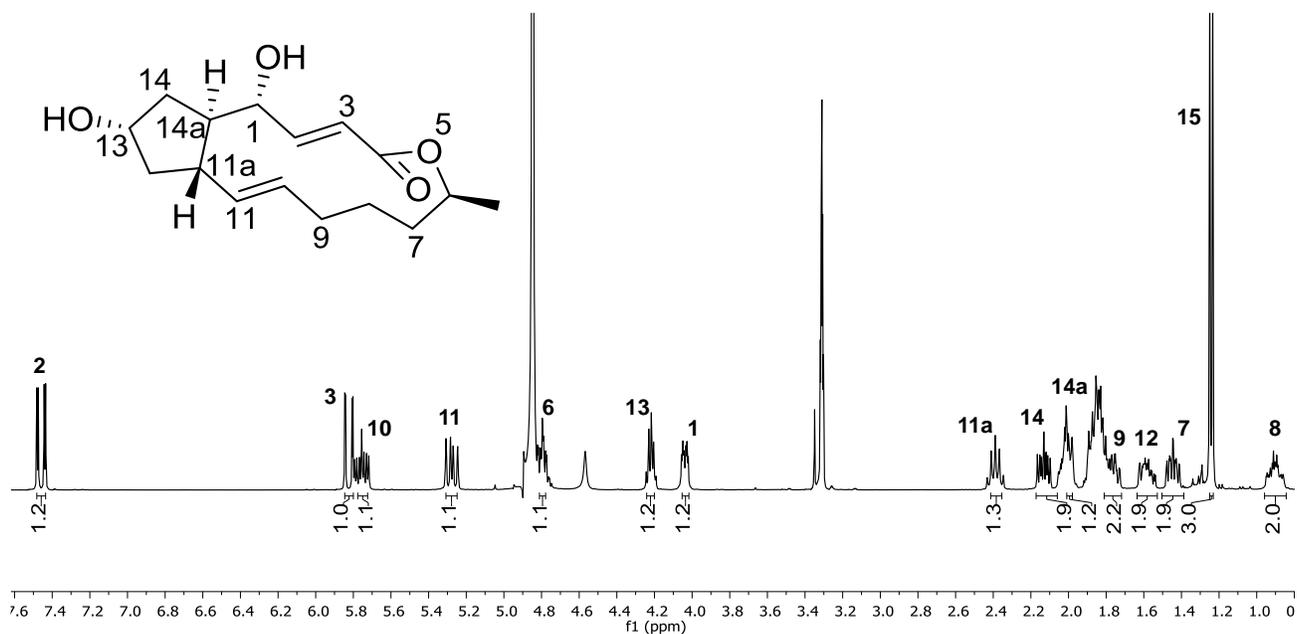


Figura 27. Espectro de RMN ^1H de la brefeldina A (**4**) (400 MHz, CD_3OD).

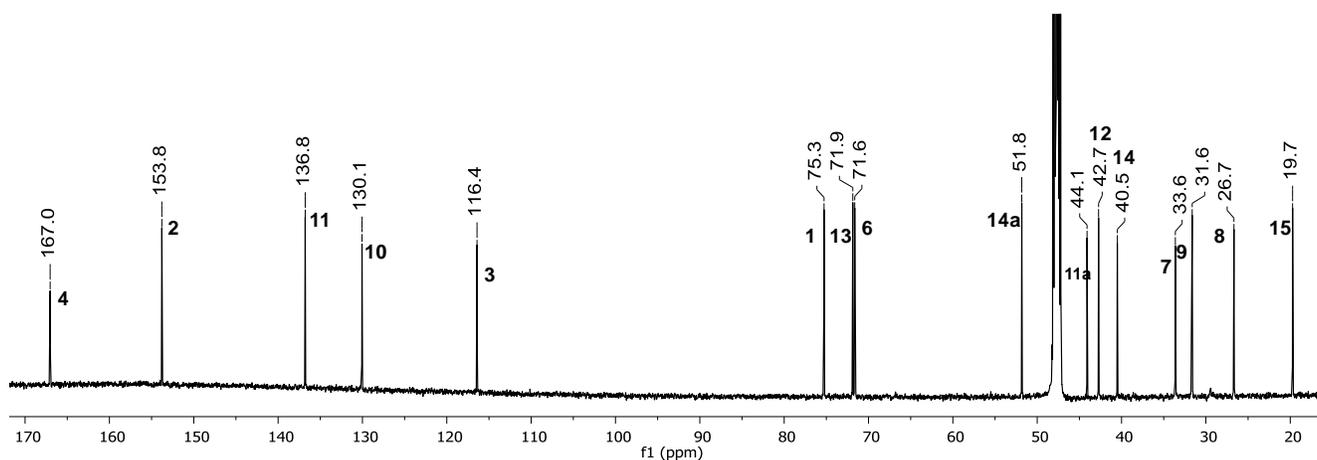


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C de la brefeldina A (**4**) (100 MHz, CD_3OD).

En conjunto, el grupo de señales descritas junto con las constantes espectroscópicas descritas en la literatura científica especializada permitieron establecer la estructura del compuesto **4** como la (5*E*,13*E*)-(2*S*,3*aR*,4*R*,9*S*)-2,4-dihidroxi-9-metil-1,2,3,3*a*,4,9,10,11,12,14*a*-decahidro-8-oxa-ciclopentaciclotridecen-7-ona, designada con el nombre trivial de brefeldina A (Anadu *et al.*, 2006).

La brefeldina (**4**) ha sido aislada de *Penicillium decumbens*, *Alternaria carthami* y *P. brefeldianum* (Anadu *et al.*, 2006; Tietjen *et al.*, 1983). Diversos estudios biológicos han permitido evidenciar sus propiedades antitumorales, antivirales, antimicrobianas, antifúngicas y citotóxicas contra las líneas celulares K562, CCRF-CEM, HL60 de leucemia, PC14 de carcinoma pulmonar, MKN-1, KATOIII de carcinoma gástrico, HeLA S₃ carcinoma cervicouterino y OST de osteosarcoma (Ishii *et al.*, 1989; Anadu *et al.*, 2006; Trisuwan *et al.*,

2009; Schrader *et al.*, 2010). También, se ha descrito² su actividad inhibitoria de la secreción de proteínas en eucariotes, por lo que **4**, ha sido empleada como herramienta de investigación en el estudio del transporte de proteínas de *Plasmodium falciparum* hacia los eritrocitos del hospedero (Benting *et al.*, 1994).

6. CONCLUSIONES

- Se realizó el acondicionamiento de 19 taxones fúngicos, su cultivo en pequeña escala y la preparación de sus respectivos extractos orgánicos.
- A partir de los resultados de evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución con el colorante MTT [(Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] sobre una batería de seis microorganismos de prueba, se seleccionaron a dos organismos fúngicos que presentaron la mejor actividad para su estudio químico.
- El estudio químico de la primer especie identificada como perteneciente al género *Aspergillus* permitió el aislamiento de los metabolitos dimetil gliotoxina (1), fiscalina C (2) y *epi*-fiscalina C (3).
- Por otra parte, a partir de la segunda especie seleccionada, perteneciente al género *Penicillium*, se logró el aislamiento de la brefeldina A (4).
- Con base en lo descrito en la literatura, los productos 1-4 son los responsables o deben contribuir significativamente a la actividad antimicrobiana observada en los extractos fúngicos, con lo que se comprueba la hipótesis planteada.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Azeem, A.M., Salem, F.M., Abdel-Azeem, M.A., Nafady, N.A., Mohesien, M.T. y Soliman, E.A., **2016**. Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats, *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, 1a edición, p.3-28.
- Afiyatullof, Sh.Sh., Kalinovskii, A.I., Pivkin, M.V., Dmitrenok, P.S. y Kuznetsova, T.A., **2005**. Alkaloids from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigates*, *Chemistry of Natural Compounds*, 41(2), 236-238.
- Anadu, N.O., Davisson, V.J., y Cushman, M., **2006**. Synthesis and anticancer activity of brefeldin A ester derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 3897-3905.
- Aparicio-Cuevas, M.A., Rivero-Cruz, I., Sánchez-Castellanos, M., Menéndez, D., Raja, H.A., Joseph-Nathan, P., González, M., Figueroa, M., **2017**. Dioxomorpholines and derivatives from a marine-facultative *Aspergillus* species, *Journal of Natural Products*, 80(8), 2311-2318.
- Barreiro, E. J., Fraga, C.A. y Lima, L.M., **2012**. Natural products as lead compounds in medicinal chemistry, *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*, Wiley, EE.UU., 4a edición. 81-126.
- Benting, J., Mattei, D. y Lingelbach, K., **1994**. Brefeldin A inhibits transport of the glycoprotein-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte, *Biochemical Journal*, 300, 821-826.
- Butler, M.S., y Buss, A. D., **2006**. Natural products: The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 919-929.
- Buttachon, S., Chandrapatya, A., Manoch, L., Silva, A., Gales, L., Bruyère, C., Kiss, R. y Kijjoa, A., **2012**. Sartorymesin, a new indole alkaloid, and new analogues of tryptovaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* (KUFC 6349), *Tetrahedron*, 68, 3253-3262.
- Calmus, T., Burquez, A. y Martínez-Yrizar, A., **2017**. El Golfo de California: un océano joven, región megadiversa, vínculo entre tectónica y ecología, *Ciencia UANL*, 20(85), 59-64.
- Cassel, G. H., **1998**. Infectious causes of chronic inflammatory diseases and cancer, *Emerging Infectious Diseases*, 4 (3), 475-487.
- Chopra, I. y Roberts, M., **2001**. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260.
- Cohen, M. **2000**. Changing patterns of infectious disease, *Nature*, 406, 752-767.
- Demain, A. L., **2013**. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41 (2), 185-201.
- Dias, D.A., Urban, S. y Roessner, U., **2012**. A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites*, 2, 303-336.
- Farha, M.A. y Brown, E.D., **2016**. Strategies for target identification of antimicrobial natural products, *Natural Products Reports*, 33, 668-680.

- Fauci, A. S. **2001**. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 675-685.
- Frisvad, J.C. y Larsen, T.O., **2015**. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7859-7877.
- Goffredi, S., Johnson, S., Tunnicliffe, V., Caress, D., Clague, D., Escobar, E., Lundsten L., Paduan, J., Rouse, G., Salcedo D., Soto, L., Spelz-Madero, R., Zierenberg, R. y Vrijenhoek, R., **2017**. Hydrothermal vent fields discovered in the southern Gulf of California clarify role of habitat un augmenting regional diversity, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284, 1-11.
- Gómez-Bernal, J., Santana-Carrillo, J., Romero-Martin, F., Armienta-Hernández, M., Morton-Bermea, O. y Ruiz-Huerta, E., **2010**. Plantas de sitios contaminados con desechos mineros en Taxco, Guerrero, México, *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87, 131-133.
- Harvey, A. L. **2008**. Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 13, 894-900.
- Houbraken, J., De Vries, R.P. y Samson, R.A., **2014**. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species, *Advances in Applied Microbiology*, 86, 199-249.
- Ishii, S., Nagasawa, M. Kariya, Y. y Yamamoto, H., **1989**. Selective cytotoxic activity of brefeldin A against human tumor cell lines, *Journal of Antibiotics*, 42,(12), 1877-1878.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F. y Croft, S.L., **2003**. Natural products as antiparasitic drugs, *Parasitology Research*, 90, S55-S62.
- Koehn, F.E. y Carter, G.T., **2005**. The evolving role of natural products in drug discovery, *Nature Reviews*, 4, 206- 220.
- Levy, S. B. y Marshall, B, **2004**. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10 (12s), S122-S129.
- Li, X., Kim, S., Nam, K.W., Kang, J.S. y Son, B.W., **2006**. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*, *Journal of Antibiotics*, 59(4), 248-250.
- Long, S., Resende, D., Kijjoa, A., Silva, A., Pina, A., Fernández-Marcelo, T., Vasconcelos, M.H., Sousa, E. y Pinto, M.M., **2018**. Antitumor activity of quinazolinone alkaloids inspired by marine natural products, *Marine Drugs*, 16(261), 1-18.
- Lozano, R., Gómez, H., Pelcastre, B. E., Ruelas, M. G., Montañez, J.C., Franco, F., González y J., Campuzano, J., **2010**. Carga de la enfermedad en México 1990-2010: Nuevos resultados y desafíos. *Salud pública*, 57 (3).
- Mahajan, G. y Balachandran, L., **2014**. Biodiversity in production of antibiotics and other bioactive compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 147 (3), 37-58.
- Mahajan, G. y Balachandran, L., **2014**. Biodiversity in production of antibiotics and other bioactive compounds, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 147, 37-52.

- Montero, R., **2019**. Descripción de la dinámica del azufre en el Jal Minero “El Fraile” en Taxco de Alarcón, estado de Guerrero (Tesis de Licenciatura), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México, México.
- Newmann, D.J. y Cragg, G.M., **2016**. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Okamoto, M., Yoshida, K., Uchida, I., Nishikawa, M., Kohsaka, M. y Aoki, H., **1986**. Studies of platelet activating factor (PAF) antagonists from microbial products. I. bisdethiobis(methylthio)gliotoxin and its derivatives, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 340-344.
- Peláez, F., **2006**. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 981-990.
- Piit, J., y Taylor, J.W., **2014**. *Aspergillus*, its sexual states and the new international code of nomenclature, *Mycologia*, 106(5), 1051-1062.
- Prata-Sena, M., Ramos, A.A., Buttachon, S., Castro-Carvalho, B., Marques, P., Dethoup, T., Kijjoa, A. y Rocha, E., **2016**. Cytotoxic activity of secondary metabolites from marine-derived fungus *Neosartorya siamensis* in human cancer cells, *Phytotherapy Research*, 1-10.
- Refai, M., El-Yazid, H.A. y Tawakkol, W., **2015**. Monograph on the genus *Penicillium*, 1-158.
- Rodrigues, B., Sahm, B., Jimenez, P., Pinto, F., Mafezoli, J., Mattos, M., Rodrigues-Filho, E., Pfenning, L., Abreu, L., Costa-Lotufo, L. y Oliveira, M., **2015**. Bioprospection of cytotoxic compounds in fungal strains recovered from sediments of the Brazilian coast, *Chemistry & Biodiversity*, 12, 432-442.
- Sawadsitang, S., Mongkolthanaruk, W., Suwannasai, N. y Sodngam, S., **2015**. Antimalarial and cytotoxic constituents of *Xylaria* cf. *cubensis* PK108, *Natural Product Research*, 1-4.
- Schrader K., Andolfi, A., Cantrell, C., Cimmino S., Osbrink, W., Wedge, D. y Evidente, A., **2010**. A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential natural products for pest management, *Chemistry & Biodiversity*, 7, 2261- 2278.
- Soto, L. y Estradas, A., **2014**. La exploración en el mar profundo de ambientes extremos: sistemas hidrotermales, La frontera final: el océano profundo, SEMARNAT, 85-105.
- Soto-Estrada, G., **2016**. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad, *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59, 8-22.
- Sun, Y., Takada, K., Takemoto, Y., Yoshida, M., Nogi, Y., Okada, S. y Matsunaga, S., **2011**. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities, *Journal of Natural Products*, 75, 111-114.
- Talavera, O., Ruiz, J., Díaz, E., Ramírez, A., Cortés, A., Salgado S. y Rivera, R., **2016**. Water-rock-tailings interactions and sources of sulfur and metals in the subtropical mining region of Taxco, Guerrero (southern Mexico): A multi-isotopic approach, *Applied Geochemistry*, 66, 73-81.

- Tietjen, K.G., Schaller, E. y Matern, U., **1983**. Phytotoxin from *Alternaria carthami* Chowdhury: structural identification and physiological significance, *Physiological Plant Pathology*, 23, 387-400.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Preedanon, S. y Sakarayoj, J., **2009**. Lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F44, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(10), 1100-1102.
- Trost, B.M., y Crawley, M.L., **2004**. A "chiral aldehyde" equivalent as a building block towards biologically active targets, *Chemistry European Journal*, 10, 2237-2252.
- Ventola, C.L., **2015**. The antibiotic resistance crisis. Part 1: causes and threats. *P&T*, 40 (4), 277- 283.
- Walsh, C., **2000**. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406 (6797), 775-781.
- Walsh, C., Wencewicz, T., **2016**. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities, American Society for Microbiology, ASM Press, EE.UU. 1a edición, 17-32.
- Watts, K.R., Ratnam, J., Ang, K., Tenney, K., Compton, J.E., McKerrow, J. y Crews, P., **2010**. Assessing the trypanocidal potential of natural and semi-synthetic diketopiperazines from two deep water marine-derived fungi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2566-2574
- Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E. y Ziemert, N., **2016**. Antibiotic drug discovery, *Microbial Biotechnology*, 9(5), 541-548.
- Wong, S., Musza, L., Kydd, G., Kulling, R., Gillum, A. y Cooper, R., **1992**. Fiscalins: new substance P inhibitors produced by the fungus *Neosartorya fischeri*, *Journal of Antibiotics*, 46(4), 545-553.
- World Health Organization. **2017**. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Sitio web: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
- World Health Organization. **2018**. Las 10 principales causas de defunción. Sitio web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>".
- Zaffiri, L., Gardner, J y Tolerdo-Pereyra L. H., **2012**. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins, *Journal of Investigative Surgery*, 25(2), 67-77.