



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

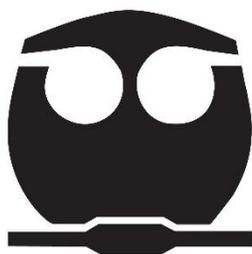
**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MARIAN ARIADNA LÓPEZ LOBATO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.**

**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:** Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz  
**SECRETARIO:** Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar  
**1<sup>er</sup> SUPLENTE:** Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano  
**2<sup>do</sup> SUPLENTE:** Dra. Berenice Ovalle Magallanes

**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:**

---

**Marian Ariadna López Lobato**

## **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 Servicios 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 (UNCG), 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 (IB) de la UNAM, por proporcionar las cepas fúngicas objeto de estudio y por la realización de la caracterización taxonómica.

A la FQ de la UNAM, por el apoyo otorgado a través del Subprograma 127 Formación Básica en Investigación (1 de septiembre de 2018 al 31 de agosto de 2019).

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, mis más sincero agradecimiento por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por todo el apoyo, enseñanza, paciencia y comprensión brindado para la realización del presente proyecto de investigación.

A Alejandra Arista Romero por su valioso apoyo y amistad durante el desarrollo experimental de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 125 por todos los momentos compartidos y su grata compañía. De manera especial al M. en C. Carlos Antonio Fajardo Hernández por todos sus consejos y orientación brindados durante esta etapa.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones, que sin duda enriquecieron la versión final de esta tesis.



## ÍNDICE

	Página
<b>Lista de figuras</b>	II
<b>Lista de tablas</b>	III
<b>Lista de abreviaturas</b>	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Enfermedades infecciosas.	1
1.2 Resistencia microbiana a los antibióticos.	1
1.3 Importancia de los productos naturales para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.	2
1.4 Papel de los hongos en la producción de antibióticos.	4
1.5 El Golfo de California.	6
<b>2. HIPÓTESIS</b>	8
<b>3. OBJETIVOS</b>	8
<b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	9
4.1 Acondicionamiento e identificación microorganismos.	9
4.2 Preparación de los cultivos en pequeña escala y obtención de los extractos orgánicos.	9
4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana.	10
4.4 Preparación de los cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos.	11
4.5 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala.	12
4.6 Estudio químico de los hongos seleccionados.	12
4.6.1 Separación y purificación de la fracción activa O <sub>8</sub> .	13
4.6.2 Separación y purificación de la fracción activa W <sub>8</sub> .	13
4.7 Caracterización estructural de los metabolitos aislados.	14
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	15
5.1 Acondicionamiento de los organismos fúngicos y obtención de los extractos orgánicos en pequeña escala.	15
5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en pequeña escala.	17
5.3 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario de los extractos orgánicos.	18
5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones en mediana escala.	20
5.5 Estudio químico de las fracciones activas seleccionadas.	21
5.5.1 Aislamiento y caracterización de los compuestos <b>1</b> y <b>2</b> a partir de la fracción O <sub>8</sub> .	22
5.5.2 Aislamiento y caracterización del compuesto <b>3</b> a partir de la fracción W <sub>8</sub> .	28
5.5.3 Caracterización del compuesto <b>4</b> a partir de la fracción W <sub>6</sub> .	32
<b>6. CONCLUSIONES</b>	37
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	38

## Lista de figuras

Figura		Página
<b>1</b>	Diversas fuentes de productos naturales antimicrobianos aprobados por la agencia FDA.	3
<b>2</b>	Ejemplo de productos naturales con actividad antimicrobiana.	4
<b>3</b>	Ejemplo de productos naturales bioactivos obtenidos a partir de organismos fúngicos.	5
<b>4</b>	Mapa del Golfo de California.	7
<b>5</b>	Ensayo de actividad antimicrobiana por microdilución con el colorante MTT.	11
<b>6</b>	Ejemplo de los organismos fúngicos selectos acondicionados en medio APD.	16
<b>7</b>	Ejemplo del cultivo en pequeña escala del hongo W.	16
<b>8</b>	Ejemplo del cultivo en mediana escala del hongo O.	19
<b>9</b>	Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de los extractos de los hongos O y W.	19
<b>10</b>	Cromatogramas por HPLC de la fracción activa O <sub>8</sub> .	22
<b>11</b>	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción O <sub>8</sub> . Espectros en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> y en el UV (PDA) del compuesto <b>1</b> .	23
<b>12</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto <b>1</b> en CD <sub>3</sub> OD.	24
<b>13</b>	Estructura química del ácido 3-hidroxibenzoico ( <b>1</b> ).	25
<b>14</b>	Espectros en el modo ESI <sup>-</sup> y en el UV (PDA) del compuesto <b>2</b> .	26
<b>15</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) y <sup>13</sup> C (150 MHz) del compuesto <b>2</b> en CD <sub>3</sub> OD.	26
<b>16</b>	Estructura química de la aspiroclorina ( <b>2</b> ).	27
<b>17</b>	Cromatogramas por HPLC de la fracción activa W <sub>8</sub> .	28
<b>18</b>	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción W <sub>8</sub> . Espectros en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> y en el UV (PDA) del compuesto <b>3</b> .	29
<b>19</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>3</b> (400 MHz) en CD <sub>3</sub> OD.	30
<b>20</b>	Estructura química de la 1-acetil aszonalenina ( <b>3</b> ).	31
<b>21</b>	Comparación de los cromatogramas por HPLC del exudado del hongo W y la fracción W <sub>6</sub> .	32
<b>22</b>	Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) del exudado del hongo W <sub>6</sub> . Espectros en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> y en el UV (PDA) del compuesto <b>4</b> .	33
<b>23</b>	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) y <sup>13</sup> C (100 MHz) del compuesto <b>4</b> en CDCl <sub>3</sub> .	35
<b>24</b>	Estructura química de la aszonalenina ( <b>4</b> ).	36

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Ejemplo de hongos productores de antibióticos y su mecanismo de acción.	5
2	Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.	12
3	Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos en pequeña escala.	17
4	Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de los hongos O y W.	20
5	Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos y fracciones primarias en mediana escala.	20
6	Datos de RMN del compuesto 1.	24
7	Datos de RMN del compuesto 2.	27
8	Datos de RMN del compuesto 3.	30
9	Datos de RMN del compuesto 4.	36

## Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de Etilo	μg	Microgramo
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo	μL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico	μm	Micrómetro
APD	Agar papa dextrosa	mg	Miligramo
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	mL	Mililitro
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	mm	Milímetro
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado	min	Minuto
CMI	Concentración mínima inhibitoria	nm	Nanómetro
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	OMS	Organización Mundial de la Salud
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia	RMN	Resonancia magnética nuclear
TIC	Cromatograma de corriente total de iones	RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
δ	Desplazamiento químico	RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	rpm	Revoluciones por minuto
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	d	Señal de doblete
ITS	Espaciador transcrito interno	dd	Señal de doble de dobles
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución	dt	Señal de doblete tripleteado
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por electrospray	m	Señal de multiplete
YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa	t	Señal de triplete
°C	Grados Celsius	td	Señal de triplete dobleteado
g	Gramos	s	Señal de singulete
ESI	Ionización por electrospray	TMS	Tetrametilsilano
kV	Kilovolts	t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
psi	Libras por pulgada cuadrada	UV	Ultravioleta
MHz	Megahertz	CFU	Unidades formadoras de colonia
MeOH	Metanol	V	Volts
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado		

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Enfermedades infecciosas.**

A lo largo de la historia de la humanidad, las transiciones epidemiológicas han estado estrechamente relacionadas con las transiciones demográficas. En este sentido, a partir del establecimiento de los “Objetivos del Milenio” por la Organización de las Naciones Unidas en el año 2000, se ha observado una disminución en la prevalencia de las enfermedades infecciosas y las defunciones causadas por éstas, sobre todo de aquellas del sector infantil (Dye, 2014). No obstante, dichas enfermedades continúan siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial; según la Organización Mundial de la Salud, en el 2010, alrededor de 15 millones de personas murieron por enfermedades infecciosas y se estiman 13 millones más para el 2050 (Dye, 2014). Por otra parte, las infecciones de las vías respiratorias inferiores representaron la cuarta causa de muerte en el 2016 a nivel mundial; las diarreas ocasionadas por bacterias como *Escherichia coli* y *Shigella spp.*, virus y parásitos, la novena causa global; y en el décimo lugar se encuentra la tuberculosis, enfermedad infecciosa pulmonar causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que derivó en 1.3 millones de fallecimientos en el 2016 (WHO, 2017 y 2018).

En México, de acuerdo con el INEGI, las infecciones respiratorias ocuparon el noveno lugar dentro de las 10 primeras causas de muerte en el 2017, y las enfermedades infecciosas agudas de vías respiratorias, las intestinales y las de vías urinarias, ocupan las tres primeras causas de morbilidad en el país (INEGI, 2018).

### **1.2 Resistencia microbiana a los antibióticos.**

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 y la introducción de distintos antibióticos en los sistemas de salud, se ha facilitado el tratamiento de las enfermedades infecciosas y se ha reducido significativamente la mortalidad infantil (Li y Webster, 2018). Desafortunadamente, el uso indebido de estas sustancias en la medicina, agricultura, acuicultura y ganadería ha provocado un aumento en la resistencia microbiana a uno o más antimicrobianos en la mayoría de las especies patógenas. Algunas de las especies cuya resistencia es más preocupante

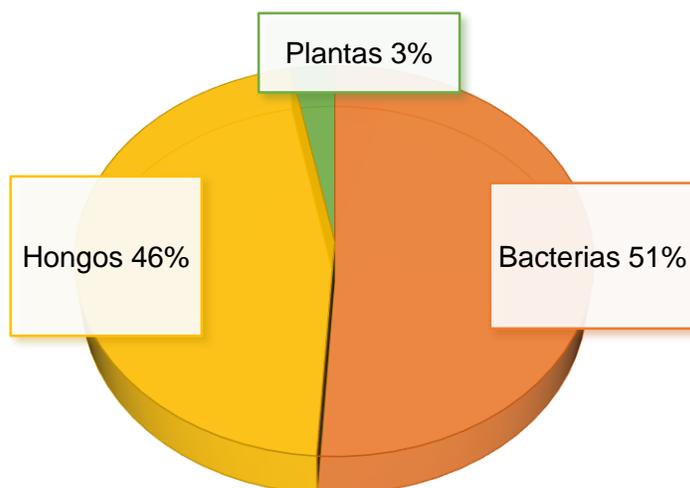
desde el punto de vista de la salud pública son *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, por mencionar algunas (WHO, 2018). Existen dos tipos de resistencia, la intrínseca o natural como resultado de características inherentes funcionales o estructurales de ciertos microorganismos, y la adquirida, que ocurre cuando el microorganismo obtiene dicha resistencia mediante mutaciones o por la incorporación de genes de resistencia a antibióticos mediante plásmidos o transposones (Chellat *et al.*, 2016).

Hoy en día, la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo mundial; alrededor de 700,000 personas mueren cada año a causa de infecciones bacterianas por cepas resistentes y se estima que para el año 2050, dichas infecciones cobren la vida a 10 millones de personas por año si no se encuentran soluciones proactivas para frenar el rápido aumento de este fenómeno (O'Neill, 2016; OMS, 2018). Actualmente se han implementado algunas estrategias para minimizar el efecto de la resistencia bacteriana, como el uso racional de los antibióticos, el incremento en los planes de educación médica, el establecimiento de programas de vigilancia, cumplimiento estricto de las medidas de prevención y control de las infecciones intrahospitalarias, entre otras (Pérez-Cano, y Robles-Contreras, 2013). Así mismo, es importante continuar con la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos, especialmente aquellos con nuevos o múltiples mecanismos de acción. En este sentido, las fuentes naturales ofrecen la mejor alternativa para la obtención de dichas moléculas, en especial, a partir de organismos obtenidos de ecosistemas inexplorados o que cuenten con condiciones ambientales extremas y que favorezcan su adaptación a estos sistemas de estrés abiótico (Rodríguez-Valdez, 2017).

### **1.3 Importancia de los productos naturales para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.**

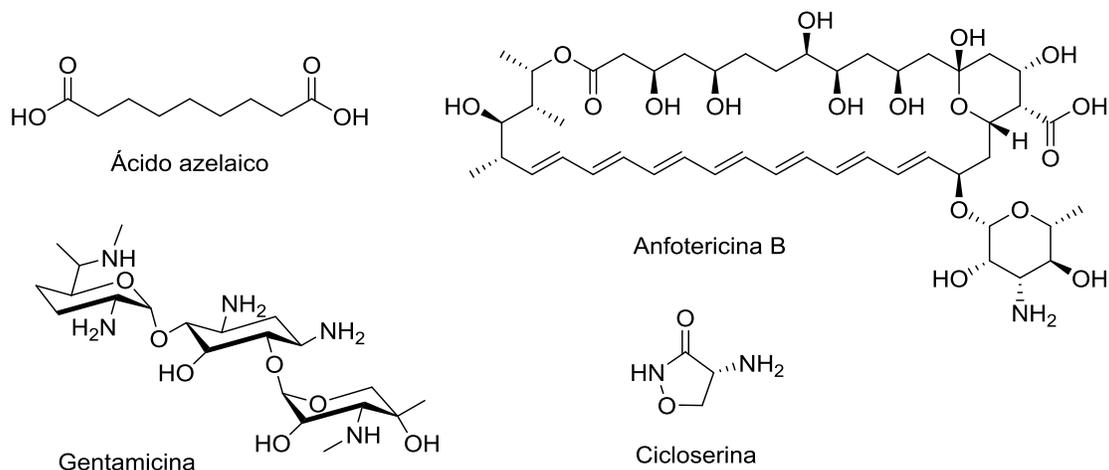
Los productos naturales (PN) obtenidos a partir de microorganismos han sido históricamente una de las fuentes más importantes para el descubrimiento de nuevos fármacos. Desde principios del siglo XX hasta la actualidad, los PN y sus derivados representan un ingreso económico importante para la industria farmacéutica, ya que muchos de estos son utilizados como tratamiento de primera línea en las terapias de enfermedades infecciosas, cáncer,

diabetes, etc. (Huang y Lin, 2017). De las nuevas entidades moleculares aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) en el 2013, los PN y sus derivados representan el 38% del total de las moléculas. Así mismo, el 69% de los antimicrobianos fueron PN, y de estos, el 97% se obtuvieron de microorganismos y el 3% de plantas (**Figura 1**) (Patridge *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Diversas fuentes de productos naturales antimicrobianos aprobados por la agencia FDA.

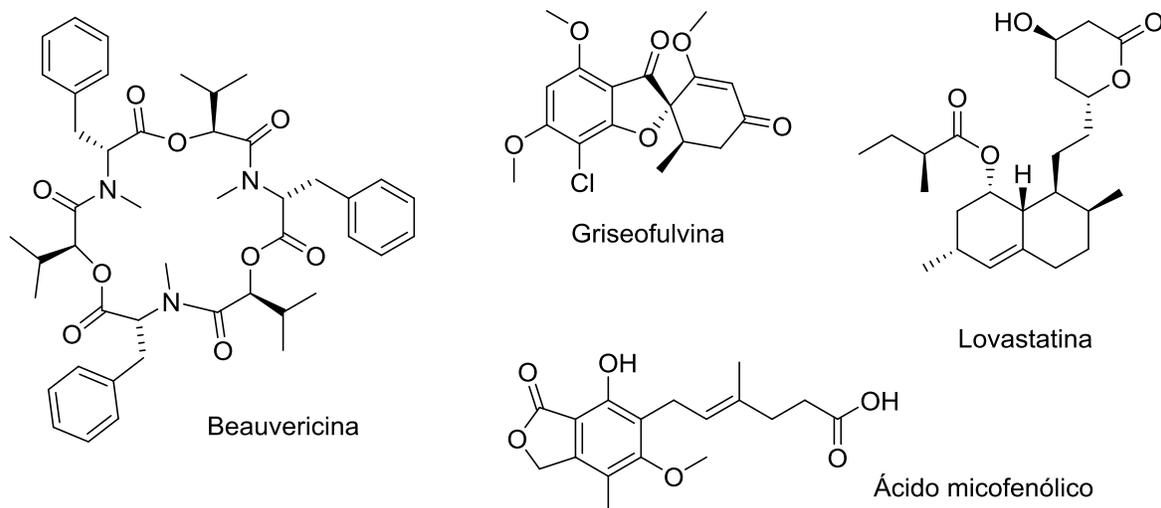
Algunos ejemplos de PN con actividad antimicrobiana son el ácido azelaico obtenido del trigo, el centeno y la cebada, y utilizado en el tratamiento del acné contra las bacterias *Staphylococcus epidermis* y *Propionibacterium acnes* (Webster, 2000); la anfotericina B, antimicótico producido por *Streptomyces nodosus* (NG *et al.*, 2005); la cicloserina producida por *Streptomyces garyphalus* e indicada contra *M. tuberculosis*; y la gentamicina aislada de *Micromonospora purpurea* utilizada contra infecciones por especies Gram negativo (Aliño-Santiago *et al.*, 2007); por mencionar algunos (**Figura 2**).



**Figura 2.** Ejemplo de productos naturales con actividad antimicrobiana.

#### 1.4 Papel de los hongos en la producción de antibióticos.

De acuerdo con Hawksworth y Lücking, existen entre 1.5 y 2.8 millones de especies fúngicas en la tierra, de las cuales solo el 10% han sido descritas taxonómicamente (Hawksworth y Lücking, 2017). Los hongos son reconocidos como importantes productores de una amplia gama de metabolitos secundarios biodinámicos, sin embargo, solo pocas de las especies conocidas han sido estudiadas con dichos fines. Estos compuestos son generalmente de bajo peso molecular, tienen una gran complejidad química-estructural y son importantes para la supervivencia del organismo productor en su entorno ecológico (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013). Entre las actividades biológicas más representativas de estos metabolitos se encuentran la antimicrobiana, la herbicida, la plaguicida, la inmunomoduladora, la antiviral, entre otras. Algunos compuestos de importancia para el hombre son la griseofulvina, un antifúngico aislado de *Penicillium griseofulvum* y utilizado para el tratamiento de la micosis de piel, uñas y cabello; el hipocolesterolemizante lovastatina aislada de *Aspergillus terreus*; la beauvericina, un depsipéptido obtenido a partir de *Beauveria bassiana* y empleado para el control de plagas; y el ácido micofenólico aislado de *Penicillium stoloniferum* utilizado para prevenir el rechazo de trasplantes (**Figura 3**) (Demain, 2014).



**Figura 3.** Ejemplo de productos naturales bioactivos obtenidos a partir de organismos fúngicos.

Como se mencionó anteriormente, de todos los antibióticos disponibles comercialmente, el 46% son de origen fúngico y estos varían en su estructura y mecanismo de acción (**Tabla 1**) (Kavanagh, 2005):

**Tabla 1.** Ejemplo de hongos productores de antibióticos y su mecanismo de acción.

Hongo productor	Antibiótico	Blanco terapéutico	Mecanismo de acción
<i>Penicillium notatum</i> , <i>P. chrysogenum</i>	Penicilina	Gram (+)	Inhibición de la síntesis de la pared celular
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cefalosporinas	Gram (+) y Gram (-)	Inhibición de la síntesis de la pared celular
<i>P. griseofulvum</i>	Griseofulvina	Dermatofitos	Inhibición de la formación de microtúbulos en la replicación
<i>Fusidium coccineum</i>	Ácido fusídico	Gram (+)	Inhibición de la síntesis de proteínas
<i>Glarea lozoyensis</i> , <i>Coleophama empedri</i>	Equinocandinas	<i>Candida</i> y algunas especies de <i>Aspergillus</i>	Inhibición de la síntesis de la pared celular
<i>Clitopilus passeckerianus</i>	Pleuromutilina	Gram (+)	Inhibición de la síntesis de proteínas

## 1.5 El Golfo de California.

De acuerdo con la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de Biodiversidad, en México se encuentra casi el 10% de la diversidad mundial, e incluye una gran riqueza fúngica de aproximadamente 6,000 especies descritas (CONABIO, 2019). Además, nuestro país es considerado “megadiverso” debido a las características geográficas, ya que posee una importante extensión oceánica (~65%), distribuida en la región del Océano Pacífico (Golfo de California y Tehuantepec) y en el Océano Atlántico (Golfo de México y el Mar Caribe), dando lugar a una amplia variedad de ecosistemas y de especies, así como de procesos ecológicos (SEMARNAT, 2018).

Específicamente, el Golfo de California es un largo y angosto mar de más de 1,200 km de longitud, una anchura entre 80 y 200 km y una superficie aproximada de 160,000 km<sup>2</sup> (**Figura 4**). Está rodeado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit, y se ha establecido que su formación sucedió hace 12 millones años cuando la Placa Pacífico empezó a moverse hacia el nornoroeste respecto a la Placa Norteamericana, y la parte continental correspondiente a la península de Baja California se incorporó a la Placa Pacífico (Calmus *et al.*, 2017). El desprendimiento de la península tuvo por consecuencia un estiramiento y un adelgazamiento progresivo de la litósfera continental preexistente que permitió, hace 3.6 millones de años, la formación de nueva corteza oceánica localizada en pequeñas cuencas en la parte sur del Golfo (cuencas de tipo “pull apart”) (Calmus, 2008). Dichas cuencas son más someras en la parte norte del Golfo de California mientras que en el centro y sur son más profundas y se les considera centros de dispersión naciente (Silvestre-Morales, 2010).



**Figura 4.** Mapa del Golfo de California, en el cual se observan las principales estructuras tectónicas: fallas transformantes y cuencas de tipo “pull apart”.

El nacimiento del Golfo de California llevó a la creación de ecosistemas marinos y terrestres únicos con abundantes recursos biológicos, alto endemismo y condiciones diferentes (hipersalino y térmico) al resto de los ecosistemas costeros. Estas condiciones permiten la exploración y explotación de microorganismos con un potencial productor de compuestos bioactivos (Rodríguez-Valdez, 2017). Los taxones objeto de estudio de este trabajo provienen principalmente de las Cuencas Alarcón y Pescadero, así como de la Falla Transformante localizada en la Cuenca Pescadero (**Figura 4**).

## **2. HIPÓTESIS**

El estudio químico de especies fúngicas provenientes de hábitats inexplorados en nuestro país, como los sedimentos del Golfo de California, permitirá la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, y que pueden servir de base para el desarrollo de nuevos agentes antifécciosos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar el estudio químico biodirigido preliminar de una serie de organismos fúngicos provenientes del Golfo de California para la obtención de compuestos biodinámicos con actividad antimicrobiana.

### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Acondicionar los taxones fúngicos aislados de muestras de sedimento del Golfo de California y establecer su viabilidad y pureza.
2. Preparar los cultivos en pequeña escala de cada cepa y obtener sus correspondientes extractos orgánicos mediante técnicas de maceración y reparto.
3. Establecer el potencial antimicrobiano de los extractos y seleccionar a los taxones para su estudio químico biodirigido.
4. Preparar los cultivos en mediana escala y obtener los extractos de los organismos seleccionados.
5. Fraccionar los extractos mediante técnicas cromatográficas convencionales y establecer el potencial antimicrobiano de las fracciones resultantes.
6. Aislar a los metabolitos mayoritarios de las fracciones activas y caracterizar su estructura química mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia.

## **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Acondicionamiento e identificación de los microorganismos.**

El acondicionamiento de los organismos fúngicos provenientes de muestras de sedimento de diferentes localidades del Golfo de California se realizó mediante resiembras sucesivas en cajas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (APD). De manera general, los cultivos se incubaron por 7 días a temperatura ambiente hasta observar un crecimiento homogéneo de las colonias. Una vez demostrada la viabilidad y pureza, se realizó la identificación taxonómica de las cepas mediante la comparación de las secuencias de la región del espaciador de transcripción interno (ITS) obtenidas con aquellas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information. Esta actividad fue realizada en colaboración con la Dra. Patricia Vélez Aguilar, investigadora del Laboratorio de Ecología Molecular de Micromicetos en Ecosistemas Amenazados, en el IB de la UNAM.

### **4.2 Preparación de los cultivos en pequeña escala y obtención de los extractos orgánicos.**

El cultivo en pequeña escala de los organismos fúngicos para los estudios químicos y biológicos se realizó en medio sólido de arroz húmedo (15 g de arroz y 30 mL de agua por duplicado). Para ello, se preparó un inóculo en 15 mL de medio líquido de enriquecimiento YESD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de soya y 2% de dextrosa) a partir de los cultivos axénicos en APD, y se mantuvo en agitación constante (100 rpm) durante 5 días a temperatura ambiente. Al cabo de este periodo, los inóculos fueron vertidos sobre el sustrato sólido en matraces Erlenmeyer de 125 mL, y se dejaron crecer por 21 días a temperatura ambiente con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas.

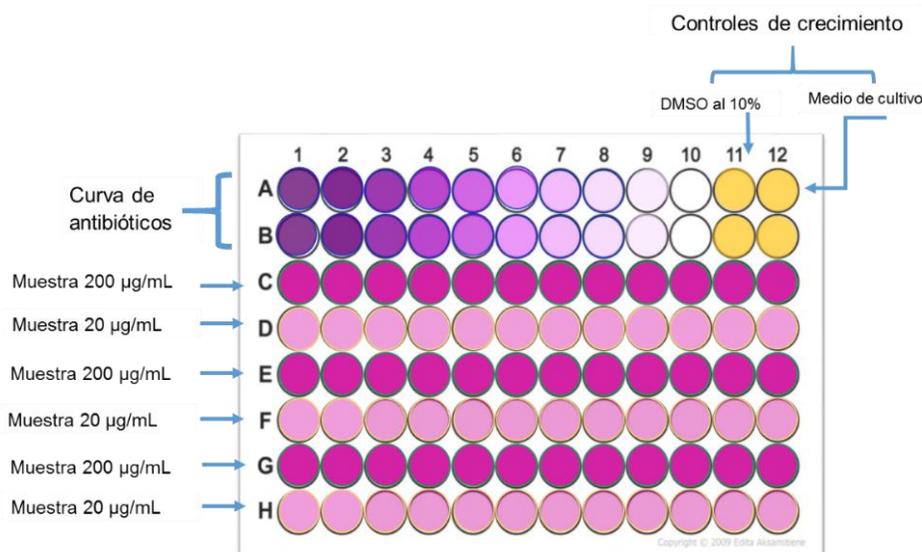
Una vez cumplido el tiempo de crecimiento, se realizó la preparación de los extractos orgánicos mediante un proceso de maceración y reparto. En primer lugar se adicionaron 60 mL de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1), luego se fragmentó el micelio en el medio de cultivo con la ayuda de una espátula y la suspensión se mantuvo en agitación constante (100 rpm) durante 8 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró el contenido de cada matraz y al filtrado se agregaron 60 mL de  $\text{CHCl}_3$  y

agua hasta un volumen final de 200 mL. La fase orgánica se separó de la fase acuosa, y a esta última se le realizó otro reparto utilizando 60 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Las fases orgánicas se reunieron y concentraron a sequedad a presión reducida. Finalmente, la fase orgánica se resuspendió con 60 mL de  $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$  (1:1) y se sometió a un proceso de desengrase con 60 mL de hexano.

#### 4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala, fracciones primarias y exudado se realizó empleando el ensayo de microdilución con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) contra una batería de microorganismos Gram (+) (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella typhi* ATCC 33459), y una levadura (*Candida albicans* ATCC 10231). Todos los microorganismos fueron proporcionados por el cepario de la FQ, UNAM. Los medios de cultivo empleados en el ensayo fueron caldo Müller-Hinton para las bacterias y caldo papa dextrosa para la levadura, y como controles positivos se emplearon a los antimicrobianos ampicilina, nistatina, gentamicina y vancomicina.

A manera de resumen, los ensayos se realizaron en placa de 96 pozos y todas las evaluaciones se realizaron por duplicado. Las muestras de prueba se evaluaron a dos concentraciones, 20 y 200  $\mu\text{g/mL}$ . Para ello, se colocaron en los pozos 50  $\mu\text{L}$  de la solución de cada muestra a las concentraciones de 1  $\text{mg/mL}$  y 0.1  $\text{mg/mL}$  (10% de DMSO en medio de cultivo), luego se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión del microorganismo en solución salina ajustada al 0.5 del estándar de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL); enseguida la placa se incubó durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Al término del periodo de incubación, se adicionaron a cada pozo 10  $\mu\text{L}$  del colorante MTT (5  $\text{mg/mL}$  en MeOH) y la placa se incubó nuevamente durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . La distribución final de las muestras, blancos y curva de antibióticos en la placa se ilustra en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Ensayo de actividad antimicrobiana por microdilución con el colorante MTT.

#### 4.4 Preparación de los cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos.

A partir de los resultados de la actividad antimicrobiana, se seleccionaron a los hongos con las claves O y W para su estudio químico biodirigido. Para ello, se realizó el escalamiento de los cultivos y la obtención de los extractos orgánicos utilizando la misma metodología descrita anteriormente (inciso 4.2) en una proporción 6× como a continuación se describe: el inóculo en medio YESD fue de 50 mL, los cultivos en medio sólido de 100 g de arroz y 200 mL de agua por duplicado, la extracción con 500 mL de MeOH-CHCl<sub>3</sub> (1:1) y 300 mL de CHCl<sub>3</sub> después de filtrar y se ajustó el volumen final a 1000 mL con agua destilada, el desengrase se realizó con 150 mL de MeCN-MeOH (1:1) y 150 mL de hexano.

Cabe mencionar que a partir del día 10 de crecimiento del hongo W se observó la presencia de un exudado incoloro sobre la superficie del medio sólido, el cual fue colectado (aproximadamente 4 mL del exudado). Luego se agregaron 4 mL de MeOH y la mezcla se filtró sobre una membrana de 0.45 µm y se secó sobre una corriente de aire.

#### 4.5 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala.

El fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala se realizó en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen (Teledyne Isco., NE, EE.UU.), equipado con una bomba binaria, detectores de UV/visible con arreglo de fotodiodos (PDA) y de dispersión de luz evaporativo (ELSD) y un colector de fracciones. La separación se realizó en columnas de diferentes tamaños empacadas con gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil se emplearon gradientes de polaridad creciente entre mezclas de hexano, cloroformo, acetato de etilo y MeOH. Las condiciones generales de análisis se resumen en la **Tabla 2**:

**Tabla 2.** Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.

Muestra	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Tiempo de corrida (min)	Volúmenes por columna
O	1.14	40	15	40	69.6	58.0
W	0.53	12	15	30	33.9	60.6

#### 4.6 Estudio químico de los hongos seleccionados.

El aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios de las fracciones activas se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) marca Waters (Waters Corp., MA, EE.UU.), equipado con una bomba cuaternaria, inyectores manual y automático, detectores de PDA ( $\lambda_{\text{máx}}$  190-500 nm) y ELSD (ganancia 100, presión de N<sub>2</sub> 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de 75±5°C) y colector de fracciones. El control del equipo y el procesamiento y manipulación de los datos se realizó con el programa Empower versión 3.0 (Waters). El establecimiento de los perfiles cromatográficos y las condiciones de separación de los compuestos se realizó en una columna Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 4.6 mm; Phenomenex Inc., California, EE.UU.) y como fase móvil se empleó ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B) y diferentes gradientes de elución. Finalmente las muestras se inyectaron (15 µL) a una concentración de 2.5 mg/mL. Una vez establecidas las condiciones de separación de los compuestos de interés, se realizó el escalamiento para la purificación a nivel preparativo en una columna Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 21.2 mm; Phenomenex), flujo de 21.24 mL/min y con un tiempo de recolección de cada fracción de 10-

12 s. Por cada inyección se utilizaron entre 20-30 mg de muestra y las todas las fracciones se llevaron a sequedad bajo una corriente de aire.

#### **4.6.1 Separación y purificación de la fracción activa O<sub>8</sub>.**

La purificación de la fracción activa O<sub>8</sub> (100.5 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo (inciso 4.6) con el siguiente sistema de elución:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B)
- Gradiente: 15% a 100% de B en 10 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (15% de B).
- Tiempo de corrida: 19 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 10 s.

#### **4.6.2 Separación y purificación de la fracción activa W<sub>8</sub>.**

La purificación de la fracción activa W<sub>8</sub> (70.4 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo (inciso 4.6) con el siguiente sistema de elución:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B)
- Gradiente: 50% a 100% de B en 15 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (50% de B).
- Tiempo de corrida: 23 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 12 s.

#### 4.7 Caracterización estructural de los metabolitos aislados.

La caracterización estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante el análisis detallado de sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y los obtenidos por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Los espectros de RMN se registraron en un equipo Varian VNMRS 400 (400 y 100 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente) o en un JEOL ECA 600 (150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  o  $\text{CDCl}_3$ . Todos los análisis se realizaron en la USAII, FQ, UNAM.

Por otra parte, los espectros de masas se obtuvieron en un sistema acoplado de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia Acquity (UPLC) marca Waters (Waters), equipado con un detector PDA, y acoplado con un espectrómetro de masas de alta resolución de ionización por electrospray (HRESIMS), Q Exactive marca ThermoFisher Scientific, (Massachusetts, EE.UU.), en los modos positivo ( $\text{ESI}^+$ ) y negativo ( $\text{ESI}^-$ ). Todos los análisis se registraron a una temperatura de  $40^\circ\text{C}$  empleando una columna Acquity BEH C18 ( $1.7\ \mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 10\ \text{mm}$ , Waters) y una mezcla binaria de ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y  $\text{CH}_3\text{CN}$  (B), utilizando un gradiente de 15% a 100% de B en 8 min, luego 100% de B por 1.5 min, y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. La detección en el UV se realizó de 200 a 500 nm. Las condiciones del HRESIMS fueron: temperatura del capilar:  $275^\circ\text{C}$  y 3.5-4.5 kV de voltaje para la fuente, 20-42 V para el voltaje del capilar y 95-110 V para la lente del tubo. Se empleó  $\text{N}_2$  como gas acarreador a 25 UA de flujo, y el control del instrumento y el análisis de datos se realizaron 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). Todos los análisis de HRESIMS se realizaron en la UNCG.

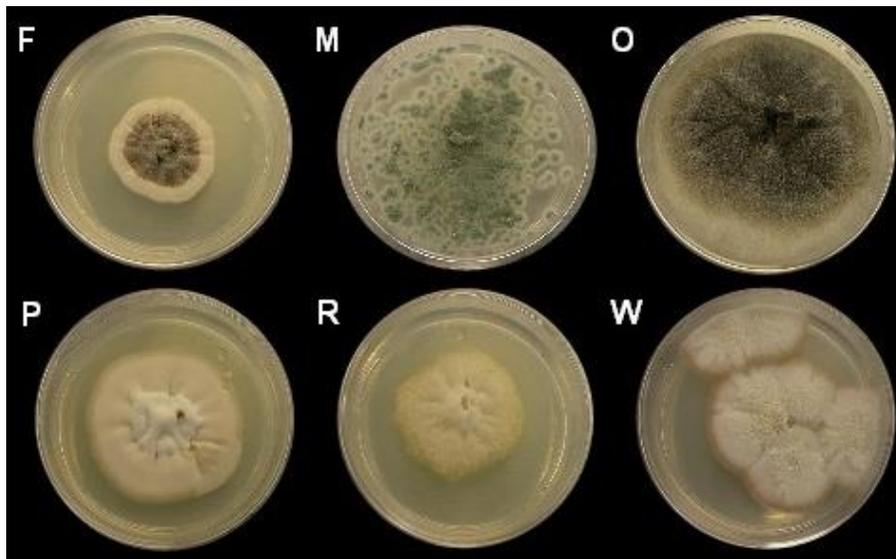
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo forma parte de un proyecto multidisciplinario de investigación que tiene como meta la obtención de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano a partir de fuentes inexploradas del país. Las cepas fúngicas estudiadas en este proyecto se obtuvieron de distintas muestras de sedimento colectadas en aguas profundas (> 3000 m de profundidad) del Golfo de California. Este tipo de ambientes, en donde las condiciones ambientales son considerablemente extremas (temperatura, presión, luz, salinidad, nutrientes, etc.) son de gran interés, ya que se ha demostrado que los microorganismos son capaces de producir metabolitos secundarios inusuales y/o bioactivos que les permitan garantizar su supervivencia.

En esta sección se discutirán, en primer lugar, los resultados obtenidos del acondicionamiento, el cultivo y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos en pequeña escala de los hongos objeto de estudio. Posteriormente, se describirán los resultados del estudio químico realizado con dos cepas seleccionadas por su potencial biológico, así como el aislamiento y caracterización de algunos de los metabolitos presentes.

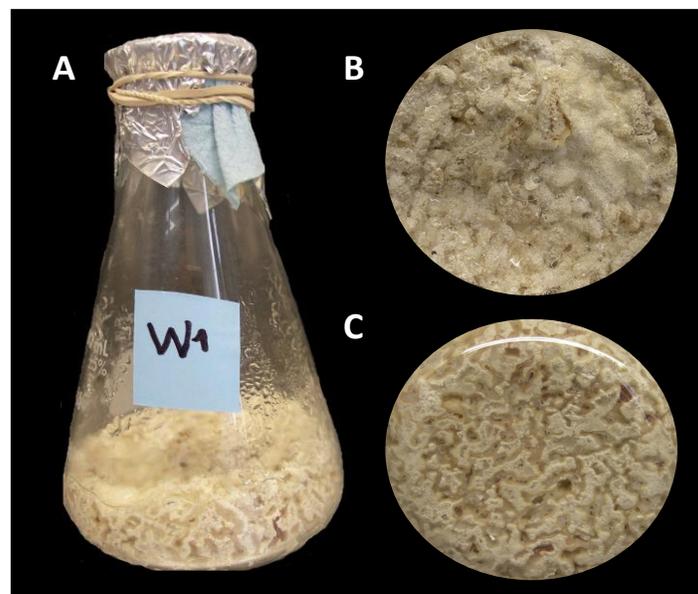
### **5.1 Acondicionamiento de los organismos fúngicos y obtención de los extractos orgánicos en pequeña escala.**

Se realizó el acondicionamiento de 19 cepas fúngicas aisladas de muestras de sedimento marino de las cuencas de Alarcón y Pescadero y la falla transformante Pescadero, en el Golfo de California, México, siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.1. Todas las cepas fueron proporcionadas por la Dra. Patricia Vélez del IB, UNAM, y en la **Figura 6** se ilustra la morfología de algunas de éstas en cajas de Petri con APD después de 5 días de crecimiento a temperatura ambiente.



**Figura 6.** Ejemplos de los organismos fúngicos selectos acondicionados en medio APD.

Una vez confirmada la viabilidad y pureza de todos los organismos, se prepararon los correspondientes cultivos en pequeña escala en medio sólido (**Figura 7**) siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.2, y al término del periodo de crecimiento establecido, se obtuvieron sus extractos orgánicos mediante técnicas de maceración y reparto. Los rendimientos obtenidos de estos extractos se resumen en la segunda columna de la **Tabla 3**.



**Figura 7.** Ejemplo del cultivo en pequeña escala del hongo W: anverso (**A** y **B**) y reverso (**C**).

## 5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en pequeña escala.

El potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña escala fue establecido utilizando una batería de microorganismos Gram (+), Gram (-) y la levadura *C. albicans*, empleando el método de microdilución con MTT en una placa de 96 pozos (inciso 4.3). Los resultados de la evaluación de resumen en la **Tabla 3**. De estos, se seleccionaron para su estudio químico biodirigido a los hongos O y W debido al efecto inhibitorio contra *S. aureus* y *C. albicans* y *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente.

**Tabla 3.** Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos 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						
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						
T	72.4						
W	255.3						
308-G	65.4						
308-P	308.3						
Bco. arroz	72.1						
CMI (µg/mL)		6.3	7.8	0.1	3.1	0.8	20.3

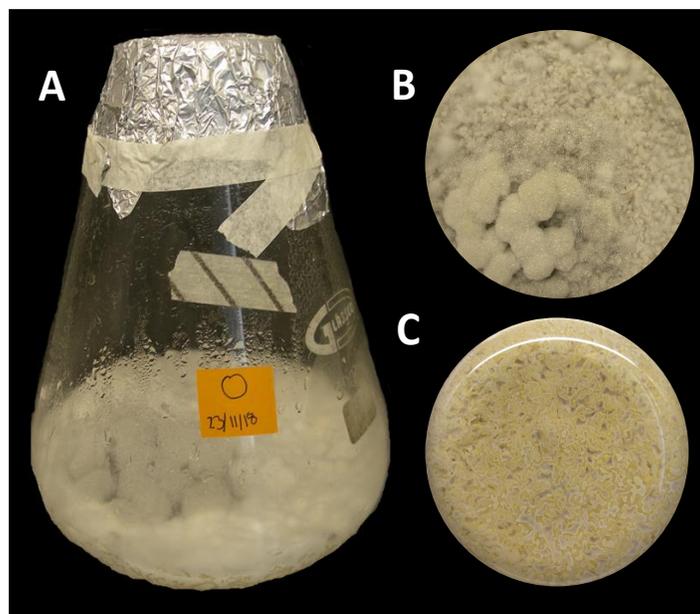
### Criterios de inhibición:

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

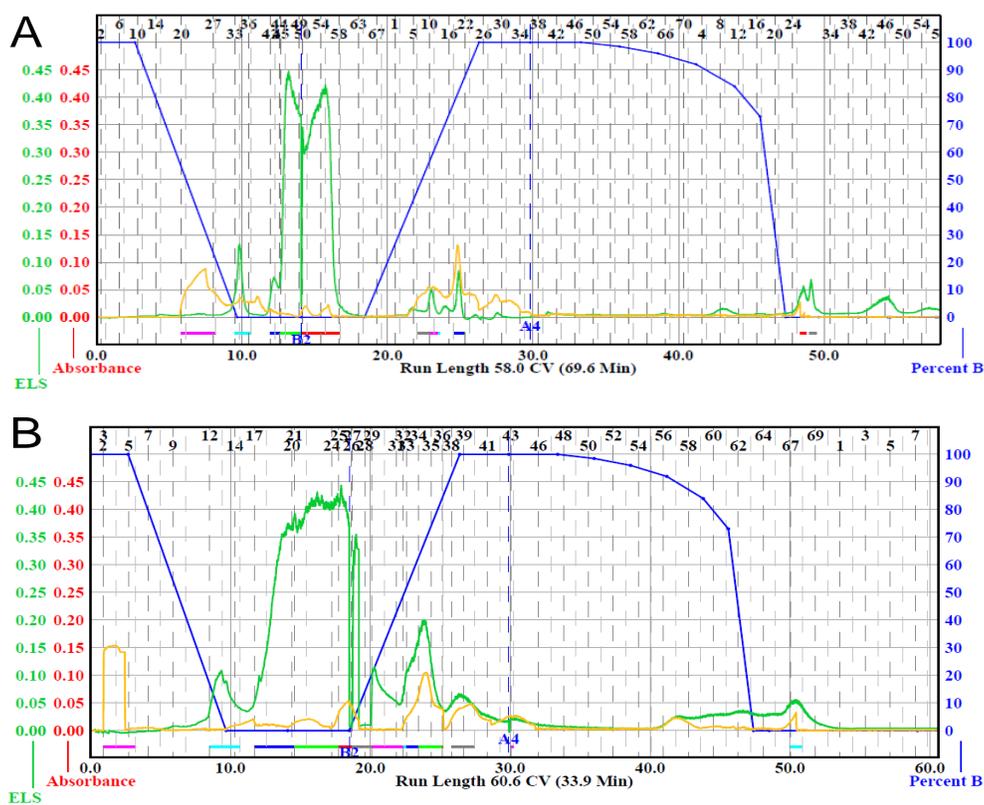
La identificación taxonómica de estas especies se realizó mediante el análisis de sus secuencias ITS del ADN ribosomal (Raja *et al.*, 2017). Los resultados de este análisis permitieron establecer que ambas especies pertenecen al género *Aspergillus*. Este género se compone por alrededor de 330 especies distribuidas en todo el mundo y en casi cualquier ambiente (Soltani, 2016), además de que muchas de las especies de este género son productoras importantes de una amplia gama de metabolitos secundarios de aplicación industrial y terapéutica, como el ácido cítrico producido por *A. niger* que es empleado en la industria de alimentos, química, cosmética, farmacéutica, etc. (Velásquez *et al.*, 2010), el antifúngico caspofungina de *A. nidulans* o el hipocolesteromante lovastatina de *A. terreus*, por mencionar algunos ejemplos. Por otra parte, en los últimos años, diversas especies de *Aspergillus* aisladas de los océanos han sido fuentes de compuestos bioactivos novedosos, probablemente debido a las adaptaciones epigenéticas de las especies a su entorno, como la tolerancia a la sal o la resistencia a la compresión, entre otras. Algunos ejemplos son: la plinabulina, un derivado sintético de la halimida que inhibe la polimerización de la tubulina (Rangel, y Falkenberg, 2015), o la terretonina G, un sesquiterpenoide activo contra *B. subtilis*, *S. aureus*, y *Micrococcus luteus* (Fukuda *et al.*, 2014), representan dos ejemplos de moléculas base de utilidad para el desarrollo de nuevos medicamentos.

### 5.3 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario de los extractos orgánicos.

Los cultivos en mediana escala de los hongos O y W se prepararon siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.4 (**Figura 8**). Una vez obtenidos los extractos orgánicos (1.139 g y 530 mg de O y W, respectivamente) se realizó su fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna tipo Flash. Los conjuntos de fracciones se reunieron con base en los perfiles en el UV y ELSD (**Figura 9**), obteniéndose 17 conjuntos de fracciones para el extracto del hongo O y 14 conjuntos de fracciones para el W (**Tabla 4**).



**Figura 8.** Ejemplo del cultivo en mediana escala del hongo O: anverso (A y B) y reverso (C).



**Figura 9.** Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de los extractos de los hongos O (A) y W (B). Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELS y PDA, y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH).

**Tabla 4.** Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de los hongos O y W.

Hongo O				Hongo W			
Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
1 (1-30)	6.7	10 (91-94)	25.0	1 (1-5)	1.9	8 (31-35)	70.4
2 (31-36)	15.3	11 (95-106)	42.6	2 (6-9)	0.7	9 (36-41)	71.3
3 (37-40)	4.5	12 (107-140)	40.3	3 (10-15)	7.9	10 (42-52)	55.4
4 (41-43)	13.0	13 (141-156)	53.6	4 (16-23)	156.7	11 (53-58)	36.6
5 (44-49)	200.0	14 (157-167)	72.7	5 (24-25)	49.6	12 (59-64)	74.6
6 (50-72)	243.4	15 (168-178)	55.9	6 (26-27)	7.2	13 (64-fin)	72.7
7 (73-81)	42.1	16 (179-190)	75.7	7 (28-30)	11.6	-	-
8 (82-86)	100.5	17 (191-fin)	29.5	<b>Recuperado (mg)</b>			616.6
9 (87-90)	27.7	<b>Recuperado (mg)</b>	1048.6	<b>Recobro (%)</b>			116.3
<b>Recobro (%)</b>			92.1				

#### 5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones en mediana escala.

La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos en mediana escala y de las fracciones primarias se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.3. Cabe mencionar que el exudado obtenido a partir del hongo W también fue evaluado y los resultados globales de actividad se resumen en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos y fracciones primarias.\*

Extracto o fracción	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
O-ME				
O-1				
O-2				
O-3				
O-4				
O-5				
O-6				
O-7				
O-8				
O-9				
O-10				
O-11				
O-12				
O-13				

O-14				
O-15				
O-16				
O-17				
W-ME				
W-3				
W-4				
W-5				
W-6				
W-7				
W-8				
W-9				
W-10				
W-11				
W-12				
W-13				
W-14				
Exudado W				
CMI (µg/mL)	7.8	0.1	3.1	20.3

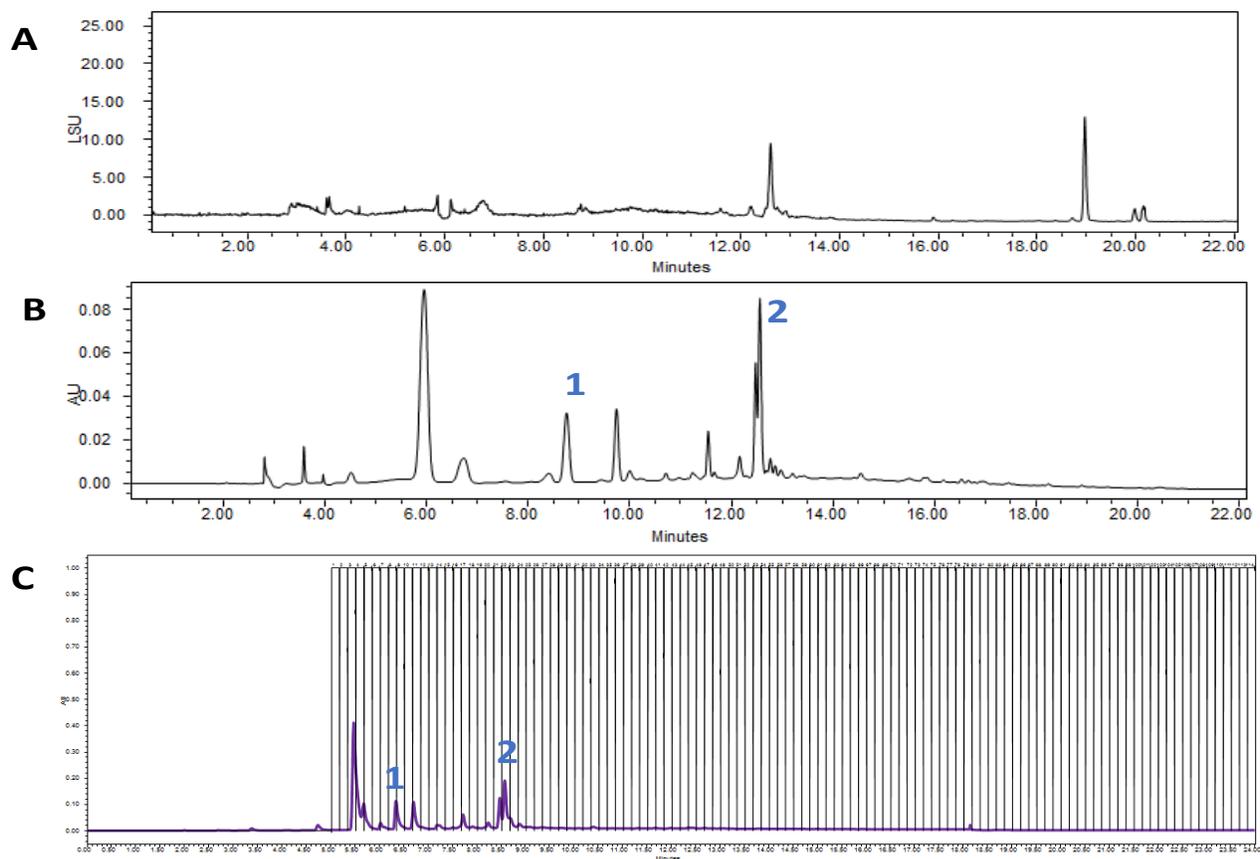
\*Se emplearon los mismos criterios de actividad indicados en la nota final de la **Tabla 3**. Ninguna muestra presentó actividad contra *P. aeruginosa* y *S. typhi*.

### 5.5 Estudio químico de las fracciones activas seleccionadas.

Con base en los resultados de actividad antimicrobiana, se seleccionaron a las fracciones O<sub>8</sub> (inhibición total a 200 y 20 µg/mL contra *C. albicans*) y W<sub>8</sub> (inhibición total a 200 y 20 µg/mL contra *B. subtilis* y *S. aureus*) para la separación de los componentes mayoritarios mediante HPLC. Cabe mencionar que a pesar de no presentar actividad antimicrobiana, también se analizó el contenido metabólico preliminar del exudado del hongo W, debido a que se ha descrito que este tipo de excreciones cumplen con diversas funciones para los organismos que los producen, ya sea como reservorio de agua durante los períodos de crecimiento activo, como un sistema de excreción de productos de desecho, subproductos metabólicos, sustancias inorgánicas, metabolitos secundarios y/o enzimas, o como medio para degradar los tejidos de las plantas en el caso de los hongos endófitos (Figuroa *et al.*, 2014).

### 5.5.1 Aislamiento y caracterización de los compuestos 1 y 2 a partir de la fracción O<sub>8</sub>.

El aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción activa O<sub>8</sub> se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.6.1. Este procedimiento permitió la obtención de 2.8 mg del compuesto **1** (t<sub>R</sub> 6.28 min) y 3.0 mg de **2** (t<sub>R</sub> 8.53 min) (**Figura 10C**).

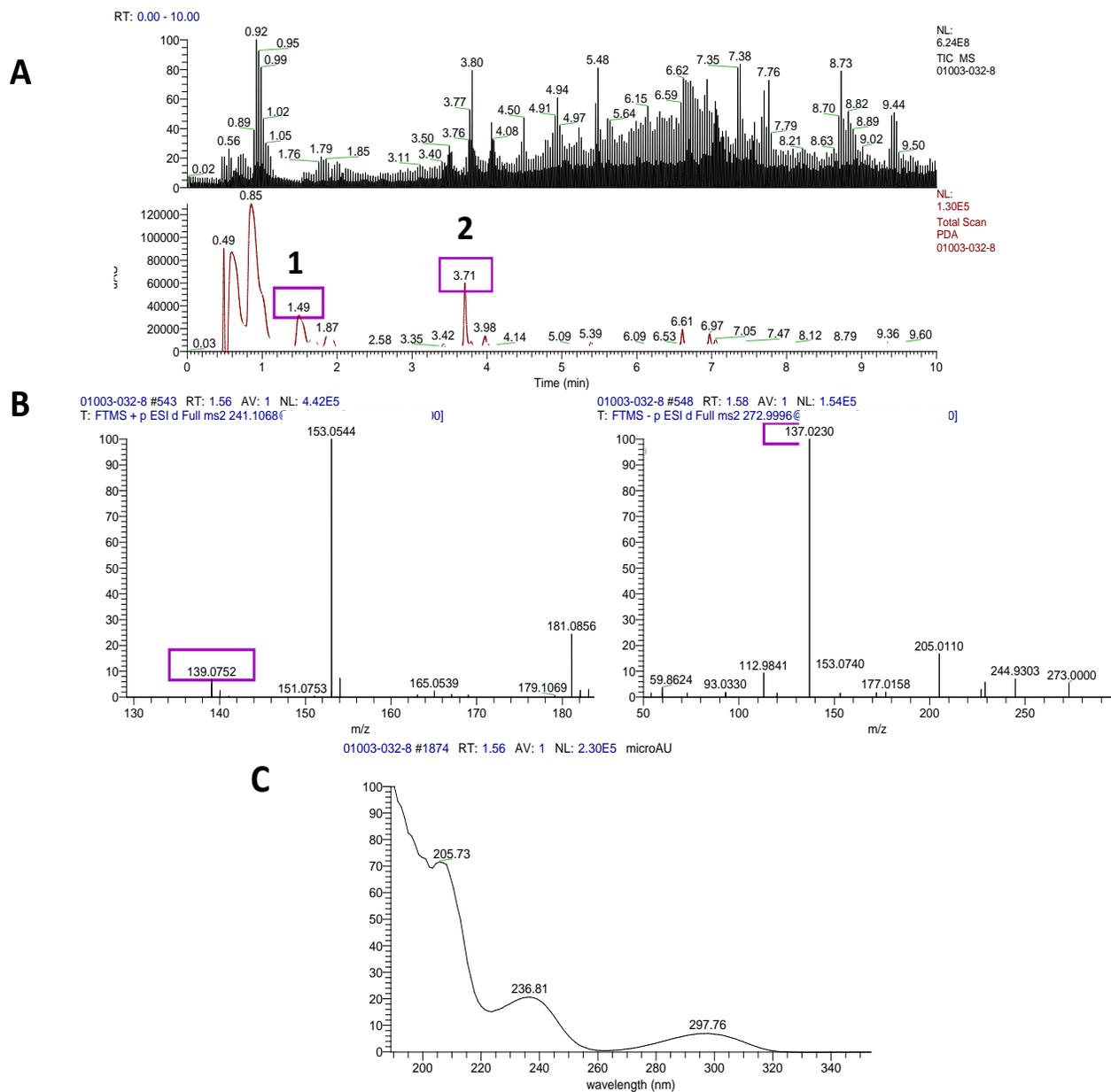


**Figura 10.** Cromatogramas por HPLC de la fracción activa O<sub>8</sub>: (A) ELSD y (B) PDA 254 nm. (C) Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

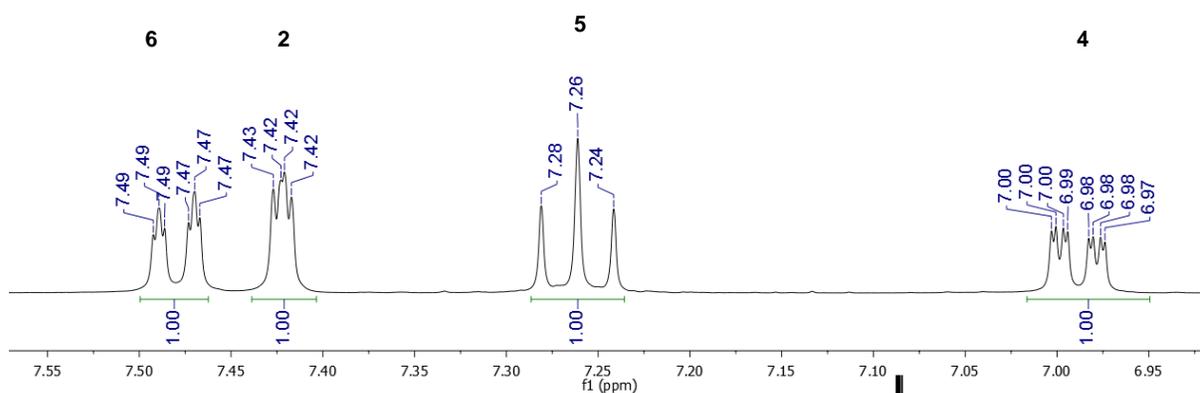
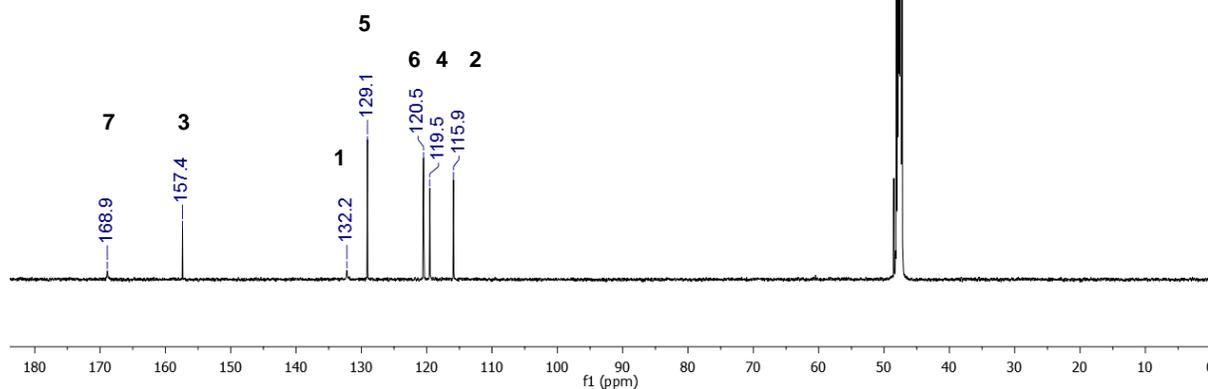
El compuesto **1** se aisló como un sólido blanco y su fórmula molecular se estableció como C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (*m/z* 139.0752 [M+H]<sup>+</sup> y 137.0230 [M-H]<sup>-</sup>), la cual permite 5 grados de insaturación (**Figura 11**). El análisis detallado de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Figura 12** y **Tabla 6**) permitió identificar los siguientes grupos de señales:

- En  $\delta_H$  7.48 (dt,  $J = 7.6, 1.2$  Hz), 7.42 (dd,  $J = 2.3, 1.6$  Hz), 7.26 (t,  $J = 7.9$  Hz) y 6.99 (dd,  $J = 8.1, 2.6, 1.0$  Hz) se observan las señales correspondientes a cuatro hidrógenos aromáticos de un sistema de spin ABMX.

- En  $\delta$  168.9 se observa una señal de un carbono de un grupo carbonilo de ácido; en  $\delta$  132.2 y 157.4 dos carbonos con hibridación  $sp^2$ , el último unido a un átomo de oxígeno; y en  $\delta$  129.1, 120.5, 119.5 y 115.9 cuatro carbonos de tipo metino. Todas estas señales son congruentes con un sistema aromático disustituído.



**Figura 11.** Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción O<sub>8</sub> (A). Espectros en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (B) y en el UV (PDA) (C) del compuesto 1.

**A****B**

**Figura 12.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) (A) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) (B) del compuesto **1** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

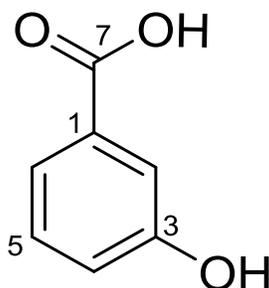
**Tabla 6.** Datos de RMN del compuesto **1**.

Posición	<b>1<sup>a</sup></b>		<b>ácido 3-hidroxibenzoico<sup>b</sup></b>	
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	132.2   C		133.2   C	
2	115.9   CH	7.42, dd (2.3, 1.6)	117.2   CH	7.41, t (2.1)
3	157.4   C		158.7   C	
4	119.5   CH	6.99, dd (8.1, 2.6, 1.0)	121.0   CH	6.99, dd (7.9, 2.1)
5	129.1   CH	7.26, t (7.9)	130.4   CH	7.26, t (7.9)
6	120.5   CH	7.48, dt (7.6, 1.2)	121.8   CH	7.47, dd (7.9, 2.1)
7	168.9   C		170.0   C	

<sup>a</sup> $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 y 150 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; <sup>b</sup> $\text{CD}_3\text{OD}$ , Hui-Min *et al.*, 2016.

La búsqueda de la fórmula molecular en las bases de datos especializadas (Diccionario de Productos Naturales y SciFinder), aunado con el análisis detallado de los datos espectroscópicos y espectrométricos antes descritos, permitieron caracterizar a este producto como el ácido 3-hidroxibenzoico (**1**) (**Figura 13**) (Scott, 1964). Este metabolito secundario ha sido aislado de distintas especies fúngicas como *P. griseofulvum* y *Schizophyllum commune*,

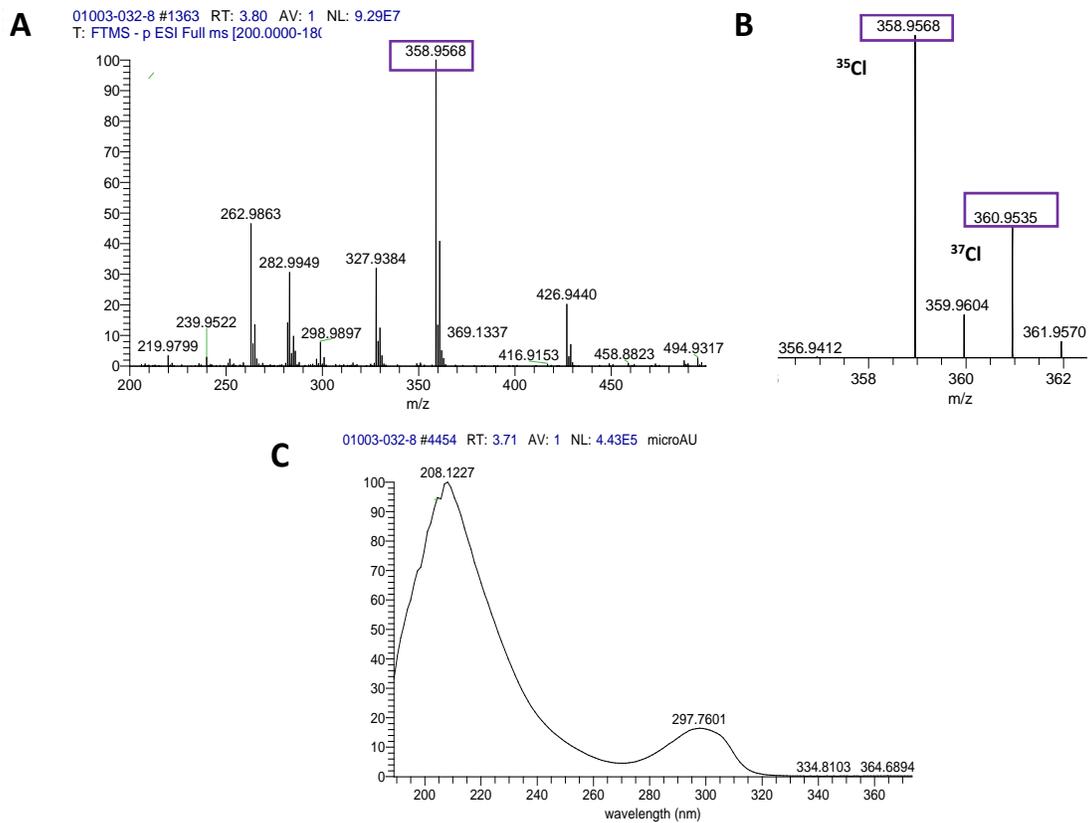
y presenta una importante actividad antioxidante y analgésica (Hui-Min *et al.*, 2016) e inhibe la lipólisis en los adipocitos mediante su efecto agonista con los receptores HCA<sub>1</sub> y HCA<sub>2</sub> (receptores de ácido hidroxicarboxílico) (Juurlink *et al.*, 2014).



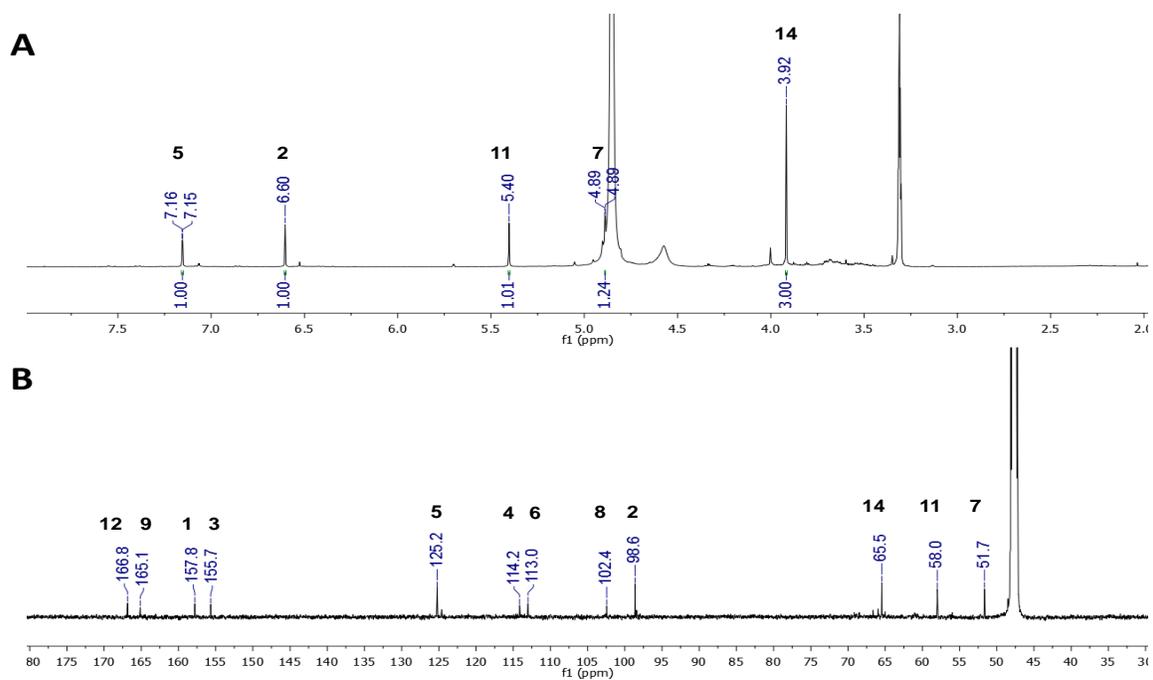
**Figura 13.** Estructura química del ácido 3-hidroxibenzoico (1).

El compuesto **2** se aisló como un sólido amarillo y su fórmula molecular se estableció como C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>ClS<sub>2</sub> mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  358.9568 [M-H]<sup>-</sup>), la cual permite 9 grados de insaturación (**Figura 14**). En éstos también se observa el fragmento correspondiente a la pérdida característica de un átomo de azufre ( $m/z$  327.9384) (**Figura 14A**) y la señal del conjunto isotópico del <sup>37</sup>Cl en  $m/z$  360.9535, que es de aproximadamente un tercio de la intensidad del pico base (**Figura 14B**) (Chankhamjon *et al.*, 2014). El análisis detallado de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Figura 15** y **Tabla 7**) permitió identificar los siguientes grupos de señales:

- En  $\delta_H$  3.92 (s) se observa una señal simple correspondiente a un grupo metilo sobre un heteroátomo.
- En  $\delta_H$  7.15 (d,  $J = 1.2$  Hz) y 6.60 (s) se observan las señales correspondientes a dos hidrógenos aromáticos.
- En  $\delta_H$  5.40 (s) y 4.89 (d,  $J = 1.1$  Hz), se observan dos señales de metinos sobre un heteroátomo (azufre), uno de ellos desplazado a campos más bajos.
- En  $\delta_C$  165.1 y 166.8 se observan dos señales de grupos carbonilo de amida; en  $\delta_C$  157.8 y 113.0, dos carbonos de tipo sp<sup>2</sup>; en  $\delta_C$  125.2, 98.6, 155.7 y 114.2, dos metinos aromáticos y dos unidos a un átomo de oxígeno y otro de cloro, respectivamente; en  $\delta_C$  58.0 y 51.7, dos carbonos protonados sobre átomos de azufre; en  $\delta_C$  102.4, un carbono sp<sup>3</sup> unido a nitrógeno y oxígeno; y en  $\delta_C$  65.5, una señal de metilo de un grupo metoxilo.



**Figura 14.** Espectros en el modo ESI<sup>-</sup> (**A** y **B**) y en el UV (PDA) (**C**) del compuesto **2**.



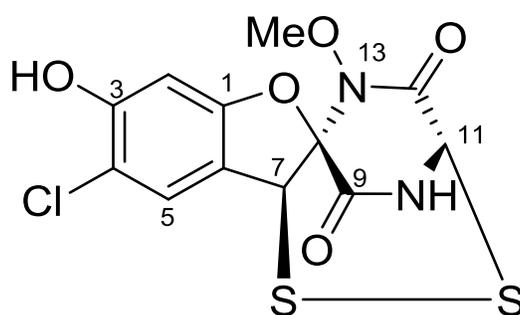
**Figura 15.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) (**A**) y <sup>13</sup>C (150 MHz) (**B**) del compuesto **2** en CD<sub>3</sub>OD.

**Tabla 7.** Datos de RMN del compuesto **2**.

Posición	<b>2<sup>a</sup></b>		<b>aspiroclorina<sup>b</sup></b>		
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	
1	157.8	C	157.3	C	
2	98.6	CH	98.6	CH	6.65, s
3	155.7	C	155.4	C	
4	114.2	C	113.0	C	
5	125.2	CH	125.6	CH	7.17, d (1.1)
6	113.0	C	112.7	C	
7	51.7	CH	51.1	CH	4.88, d (1.1)
8	102.4	C	101.7	C	
9	165.1	C	163.8	C	
10		NH		NH	10.2, d (4.6)
11	58.0	CH	57.7	CH	5.71, d (4.7)
12	166.8	C	165.9	C	
14	65.5	CH <sub>3</sub>	65.8	CH <sub>3</sub>	3.82, s
OH-3					10.76, s

<sup>a</sup>CD<sub>3</sub>OD, 400 y 150 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C; <sup>b</sup>DMSO-d<sub>6</sub>, Chankhamjon *et al.*, 2014.

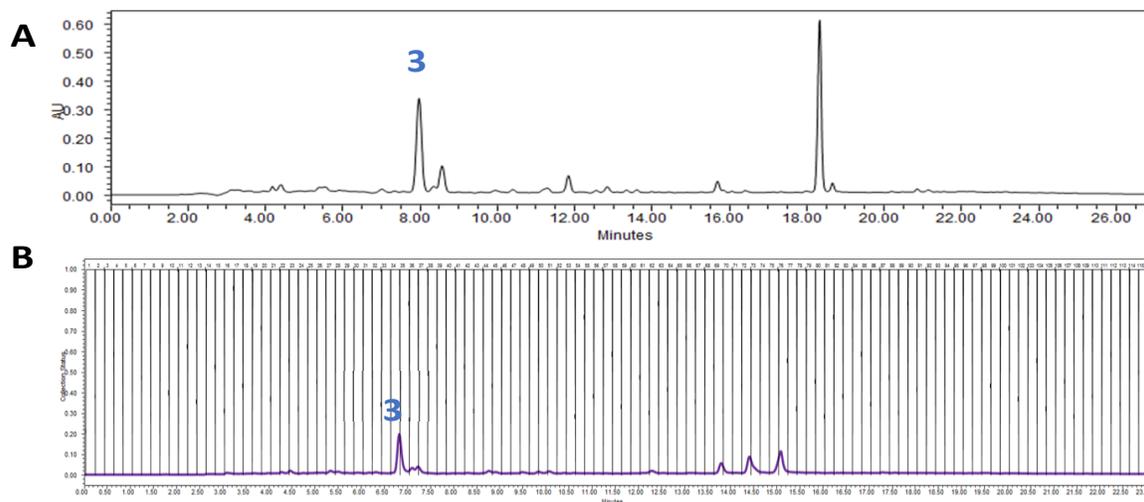
Como en el caso del compuesto **1**, en análisis combinado de los datos experimentales y lo descrito en la literatura especializada permitió caracterizar a este producto como aspiroclorina (**2**) (Chankhamjon *et al.*, 2014). Esta epoditiodicetopiperazina halogenada, aislada de distintas especies de *Aspergillus*, ha demostrado tener una importante actividad antifúngica contra cepas de *C. albicans* resistentes a los azoles inhibiendo la síntesis de proteínas. También se ha descrito su actividad antibacteriana contra cepas de *S. aureus*, antiviral contra algunos paramyxovirus causantes de la enfermedad de Newcastle, y antitumoral en el carcinoma de ascitis de Ehrlich-Lettre (Monti *et al.*, 1999).



**Figura 16.** Estructura química de la aspiroclorina (**2**).

### 5.5.2 Aislamiento y caracterización del compuesto 3 a partir de la fracción W<sub>8</sub>.

El análisis mediante HPLC de la fracción activa W<sub>8</sub> reveló la presencia de dos componentes mayoritarios con t<sub>R</sub> de 7.9 y 18.3 min (**Figura 17A**). La purificación por HPLC a nivel preparativo de esta fracción permitió la obtención de 1.8 mg de un sólido blanco con un t<sub>R</sub> de 6.71 min identificado como el compuesto (**3**) (**Figura 17B**).

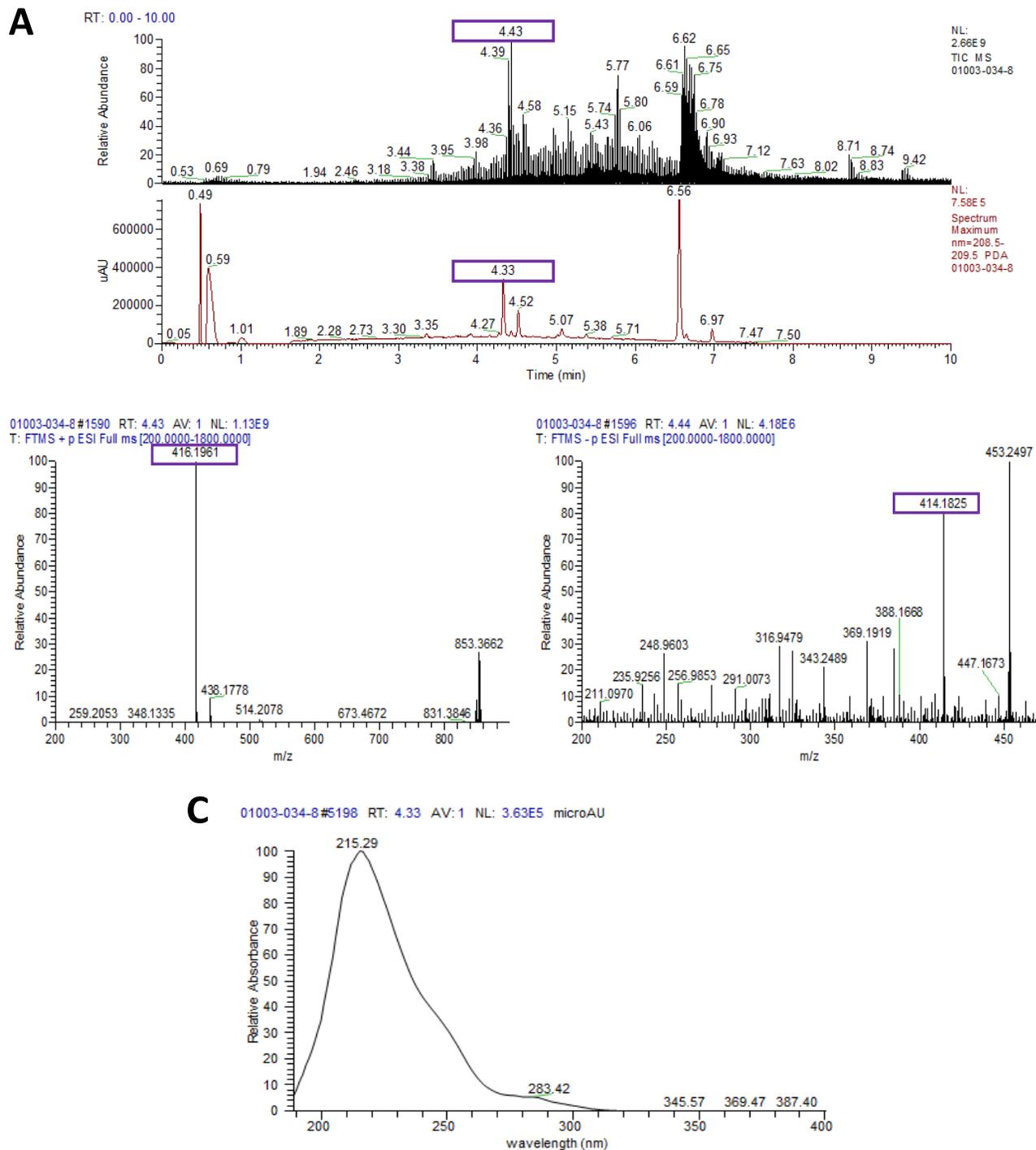


**Figura 17.** Cromatogramas por HPLC de la fracción activa W<sub>8</sub>: **(A)** PDA 254 nm y **(B)** separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

El análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (**Figura 18B**) de este producto permitió establecer su fórmula molecular como C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (*m/z* 416.1961 [M+H]<sup>+</sup> y 414.1825 [M-H]<sup>-</sup>), la cual permite 15 grados de insaturación, además de observarse tres máximos de absorción en el UV en 215, 245 y 284 nm (**Figura 18C**). El análisis detallado del espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 19** y **Tabla 8**) evidenció los siguientes grupos de señales:

- Entre δ<sub>H</sub> 7.02-7.87 se observan un conjunto de señales correspondientes a ocho hidrógenos aromáticos arreglados en dos sistemas de espín de tipo ABMX.
- En δ<sub>H</sub> 1.02, 1.22 y 2.56 se observan tres señales simples asignables a tres grupos metilo, uno de ellos de un grupo acetato sobre N.
- En δ<sub>H</sub> 2.51 (dd, *J* = 13.7, 8.6 Hz) y 3.39 (dd, *J* = 13.9, 8.4 Hz) se observa dos señales atribuibles a un metileno diasterotópico y que se encuentra unido a un metino en δ<sub>H</sub> 3.88 (t, *J* = 8.4 Hz).

- En  $\delta_H$  5.09 (dd,  $J = 10.9$  Hz) y 5.14 (d,  $J = 17.6$  Hz), y 5.89 (dd,  $J = 17.4, 10.8$  Hz) se observan tres hidrógenos vinílicos (un metileno y un metino) característicos de un sistema ABX.
- En  $\delta_H$  6.09 se observa la señal de un metino unido a un heteroátomo (N).



**Figura 18.** Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) de la fracción  $W_8$  (A). Espectros en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (B) y en el UV (PDA) (C) del compuesto 3.

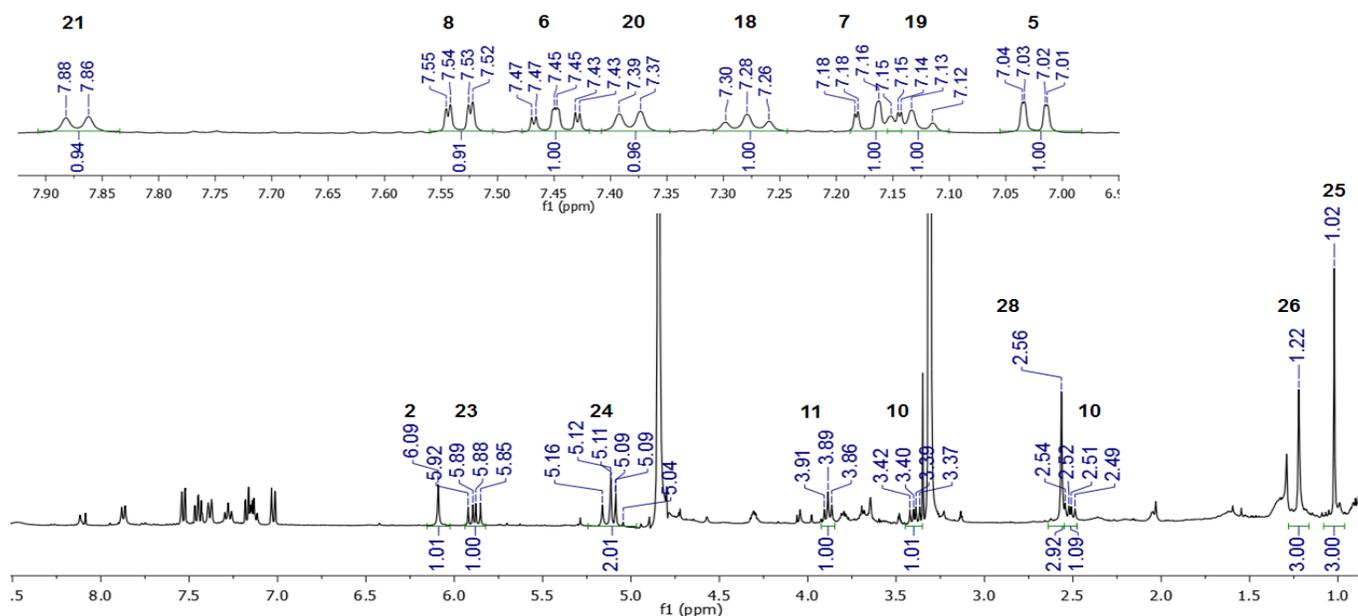


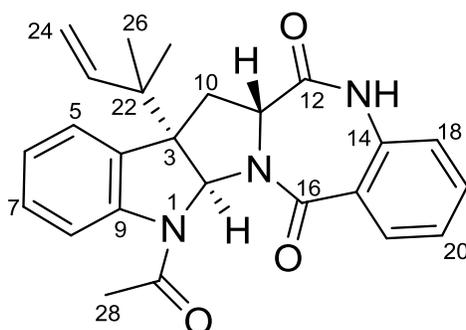
Figura 19. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3 (400 MHz) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Tabla 8. Datos de RMN del compuesto 3.

Posición	<b>3<sup>a</sup></b>	<b>1-acetil aszonalenina<sup>b</sup></b>
	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)
2	6.09, s	5.93, s
5	7.02, dd (8.2, 1.0)	6.87, d (8.4)
6	7.45, td (7.6, 1.6)	7.40, td (7.9, 1.3)
7	7.17, td (7.8, 1.2)	7.18, t (7.4)
8	7.54, dd (8.2, 1.6)	7.71, dd (7.9, 1.3)
10	2.51, dd (13.7, 8.6)	2.44, d (13.8, 8.5)
	3.39, dd (13.9, 8.4)	3.37, dd (13.8, 8.2)
11	3.88, t (8.4)	3.90, t (8.4)
13	-	7.75, s
18	7.28, t (7.6)	7.23, d (7.3)
19	7.13, t (7.1)	7.07, t (7.6, 0.8)
20	7.38, d (7.8)	7.28, td (7.3, 1.3)
21	7.87, d (7.8)	8.00, d (7.9)
23	5.89, dd (17.4, 10.8)	5.89, dd (17.4, 10.4)
24	5.14, d (17.6)	5.13, d (17.4)
	5.09, d (10.9)	5.14, d (10.4)
25	1.02, s	0.99, s
26	1.22, s	1.19, s
28	2.56, s	2.59, s

<sup>a</sup> $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz y 100 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; <sup>b</sup> $\text{CDCl}_3$ , Yin *et al.*, 2009.

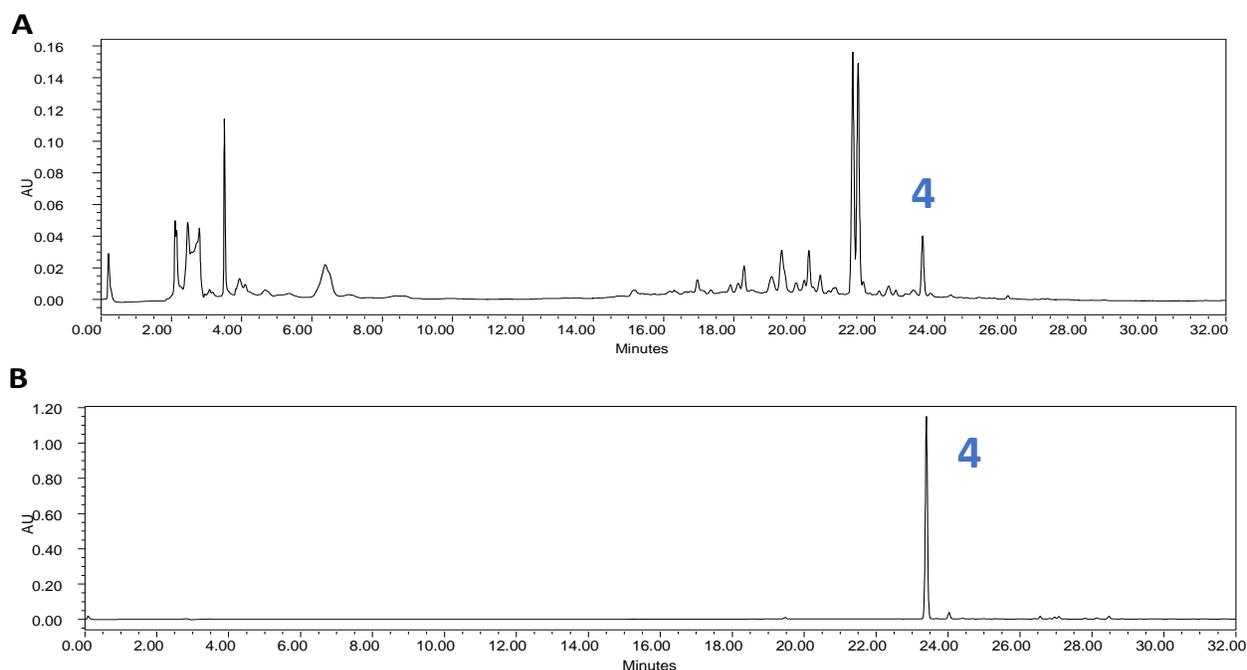
Debido a la limitada cantidad obtenida no fue posible registrar el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . A pesar de esto, los desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  y los valores de masa exacta antes descritos, además de los resultados obtenidos en las bases de datos especializadas, permitieron identificar al compuesto **3** como la 1-acetil aszonalenina (Yin *et al.*, 2009). Este alcaloide, conocido también como LL-5490 $\beta$ , fue aislado por primera vez en 1973 por Ellestad y colaboradores de una cepa de *Aspergillus*, y forma parte de una serie inusual de benzodiacepinonas, como las euginilinas, las brevianamidas y la austamida, con la cadena de isoprenilo en C-3 (Ellestad *et al.* 1973). También se ha identificado en el hongo *Neosartorya fischeri* y otras especies de *Aspergillus* (*A. zonatus*, *A. carneus* y *A. terreus*), y aunque no presenta actividad antibacteriana o antifúngica significativa, es un inhibidor del receptor humano para la sustancia P, la neuroquinina-1, involucrada en trastornos gastrointestinales y psiquiátricos (Huang *et al.*, 2018).



**Figura 20.** Estructura química del 1-acetil aszonalenina (**3**).

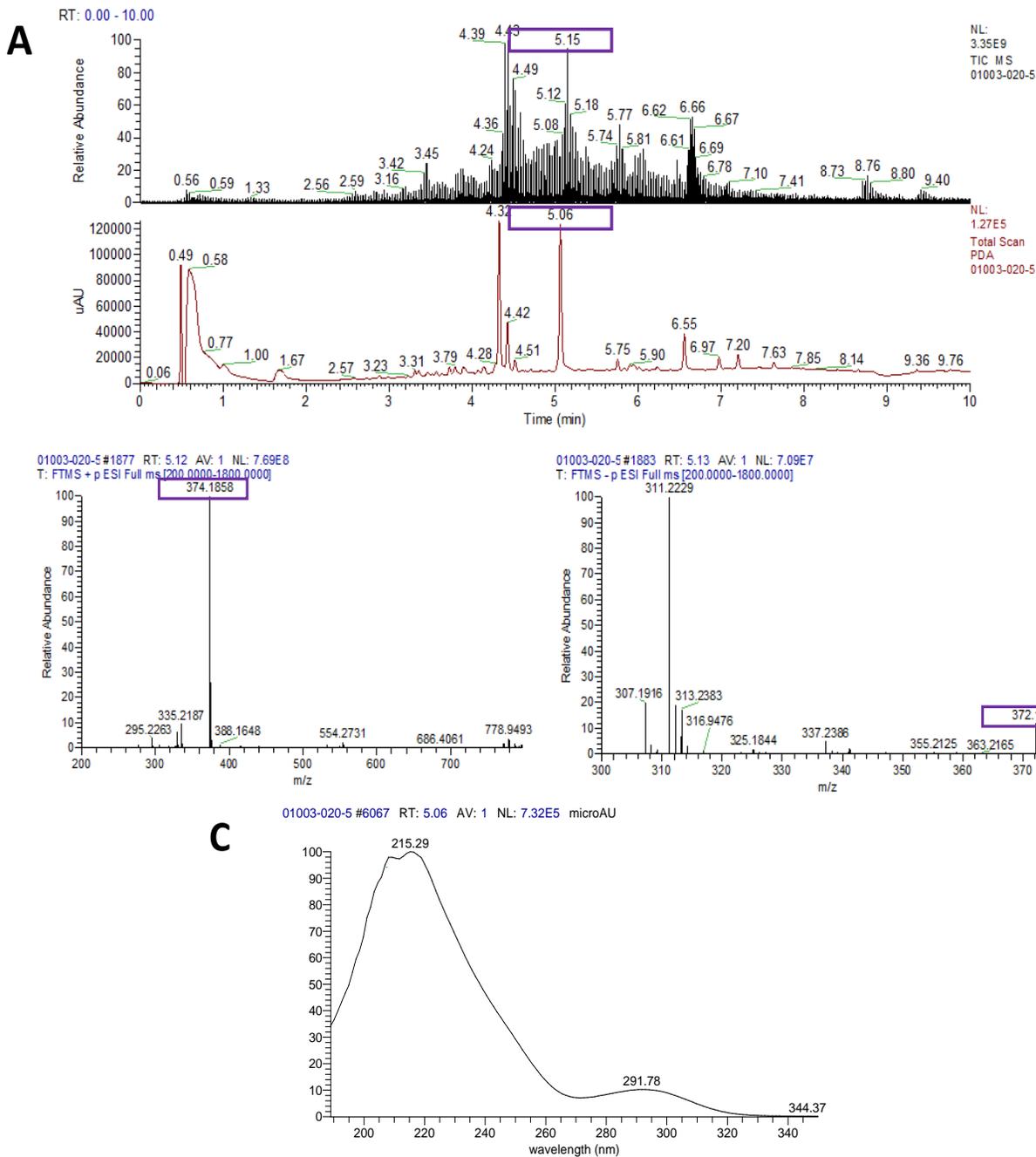
### 5.5.3 Caracterización del compuesto 4 a partir de la fracción W<sub>6</sub>.

El análisis por HPLC de la fracción W<sub>6</sub> reveló que esta contenía un compuesto mayoritario (**4**; 4.4 mg, t<sub>R</sub> 23.4 min) que corresponde con uno de los componentes presentes en el exudado incoloro separado del cultivo en mediana escala previo a la extracción (inciso 4.4) (**Figura 21**).



**Figura 21.** Comparación de los cromatogramas por HPLC (PDA 254nm) del exudado del hongo W (**A**) y la fracción W<sub>6</sub> (**B**).

La fórmula molecular de **4** (C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) fue determinada mediante el análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS en una *m/z* de 374.1858 [M+H]<sup>+</sup> y 372.1717 [M-H]<sup>-</sup>, la cual permite 14 grados de insaturación (**Figura 22**).



**Figura 22.** Cromatograma de iones totales (TIC) y en el UV (PDA) del exudado del hongo W (A). Espectros en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (B) y en el UV (PDA) (C) del compuesto 4.

Por otra parte, el análisis detallado de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Figura 23** y **Tabla 9**) reveló que este producto corresponde al derivado desacetilado del compuesto **3**, la aszonalenina (**4**). La ausencia del metilo del grupo acetato en  $\delta_{\text{H}}$  2.56 presente en el compuesto **3** y la diferencia de 42 uma correspondiente a la pérdida de un grupo acetato, además de la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con aquellas descritas en la literatura (Yin *et al.*, 2009), permitieron confirmar la estructura del compuesto **4**. (**Figura 24**).

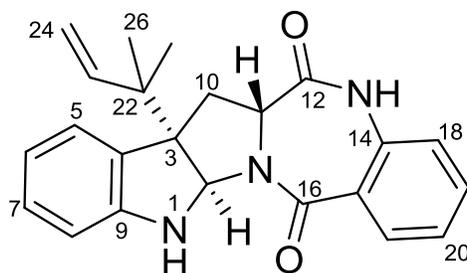
La aszonalenina (**4**) fue aislada por primera vez junto con su derivado acetilado **3** en 1983 a partir del hongo *A. zonatus* (Kimura *et al.*, 1983). Además de presentar el mismo espectro de actividades biológicas que **3**, el compuesto **4** ha sido evaluado como inhibidor de las  $\alpha$ -glucosidasas. (Shan *et al.*, 2015).



**Tabla 9.** Datos de RMN del compuesto **4**.

Posición	<b>4<sup>a</sup></b>			<b>aszonalenina<sup>b</sup></b>		
	$\delta_C$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)		$\delta_C$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	
2	81.7	CH	5.58, s	81.7	CH	5.58, s
3	60.7	C		60.7	C	
4	131.2	C		131.2	C	
5	125.3	CH	7.16, d (7.5)	125.3	CH	7.15, d (7.6)
6	118.4	CH	6.73, td (7.4, 1.1)	118.4	CH	6.72, t (7.4)
7	128.6	CH	7.09, td (7.7, 1.1)	128.6	CH	7.08, t (7.6)
8	109.2	CH	6.63, d (7.8)	109.2	CH	6.62, d (7.9)
9	134.0	C		133.9	C	
10	33.4	CH <sub>2</sub>	2.42, dd (14.0, 9.1) 3.47, dd (14.1, 7.7)	33.4	CH <sub>2</sub>	2.42, dd (14.0, 9.0) 3.46, dd (14.2, 7.6)
11	57.0	CH	4.0, dd (9.0, 7.7)	57.0	CH	3.99, t (8.1)
12	170.2	C		169.8	C	
14	149.0	C		149.0	C	
15	126.8	C		126.8	C	
16	166.8	C		166.8	C	
18	120.6	CH	6.91, d (8.1)	120.4	CH	6.90, d (8.2)
19	132.6	CH	7.45, td (7.7, 1.5)	132.6	CH	7.44, td (7.9, 1.0)
20	124.9	CH	7.23, td (7.7, 1.1)	124.9	CH	7.22, t (7.6)
21	131.2	CH	7.84, dd (7.9, 1.5)	131.2	CH	7.83, d (7.9)
22	41.4	C		41.4	C	
23	143.7	CH	6.12, dd (17.3, 10.9)	143.7	CH	6.11, dd (17.3, 10.7)
24	114.3	CH <sub>2</sub>	5.14, m	114.3	CH <sub>2</sub>	5.11, d (17.3) 5.14 d (10.7)
25	22.7	CH <sub>3</sub>	1.06, s	22.7	CH <sub>3</sub>	1.06, s
26	22.4	CH <sub>3</sub>	1.14, s	22.5	CH <sub>3</sub>	1.14, s

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz y 100 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C; <sup>b</sup>CDCl<sub>3</sub>, Yin *et al.*, 2009.



**Figura 24.** Estructura química de la aszonalenina (**4**).

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de este trabajo se describen a continuación:

1. Se realizó el acondicionamiento adecuado de 19 taxones fúngicos provenientes del Golfo de California, y a partir de los cultivos en medio sólido en pequeña escala, se prepararon los correspondientes extractos orgánicos mediante técnicas de maceración y reparto.
2. La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña escala permitió seleccionar a los organismos fúngicos O y W para su estudio químico biodirigido. Cabe destacar que ambas especies fueron identificadas taxonómicamente como pertenecientes al género *Aspergillus*.
3. A partir de las fracciones activas estudiadas, se aislaron cuatro compuestos mayoritarios: el ácido 3-hidroxibenzoico (**1**) y la aspiroclorina (**2**) del hongo O, y la 1-acetil aszonalenina (**3**) y su derivado desacetilado aszonalenina (**4**) del hongo W. La caracterización química de los compuestos se realizó mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas, con aquellas descritas en la literatura especializada.
4. Finalmente, con base en lo descrito en la literatura, los productos **1-4** contribuyen significativamente a la actividad antimicrobiana observada en los extractos fúngicos obtenidos a partir de hongos provenientes del Golfo de California, lo cual corrobora la hipótesis planteada.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Dye, C., **2014**. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645).
- World Health Organization, **2018**. The top 10 causes of death. Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- World Health Organization, **2017**. Diarrhoeal disease. Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- World Health Organization, **2018**. Tuberculosis. Sitio web <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, **2018**. Características de las defunciones registradas en México durante 2017, Comunicado de prensa Núm. 525/18. Sitio web: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>.
- Li, B., & Webster, T. J., **2018**. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(1), 22-32.
- World Health Organization, **2018**. High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. Sitio web: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>.
- Chellat, M. F., Raguž, L., & Riedl, R., **2016**. Targeting antibiotic resistance. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(23), 6600-6626.
- World Health Organization, **2018**. Antibiotic resistance. Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- O'Neill, J., **2016**. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, Review on Antimicrobial Resistance.
- Pérez-Cano, H. y Robles-Contreras, A., **2013**. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4(3), 186-191.
- Rodríguez-Valdez, G., **2017**. Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el uso, manejo y preservación de los recursos

naturales con orientación en biotecnología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

- Huang, T. y Lin, S., **2017**. Microbial Natural Products: A Promising Source for Drug Discovery. *Journal of Applied Microbiology and Biochemistry*, 1(2), 5.
- Patridge, E., Gareiss P., Kinch M., y Hoyer D., **2016**. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204-207.
- Webster, G., **2000**. Combination azelaic acid therapy for acne vulgaris, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(2), S47-S50.
- NG, A. W. K., Wasan, K. M., y Lopez-Berestein, G., **2005**. Liposomal Polyene Antibiotics. *Methods in Enzymology*, 391, p. 304-313.
- Aliño-Santiago, M., López- Esquirol, J., Navarro-Fernández, R. y Duperval- Maletá P., **2007**. Aminoglucósidos: mirada actual desde su historia. *Revista Cubana de Pediatría*; 79(2).
- Hawksworth, D., y Lücking, R., **2017**. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectrum*, 5(4).
- Cortés-Sánchez, A. y Mosqueda-Olivares, T., **2013**. Una mirada a los organismos fúngicos: Fabricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12(2), 64-90.
- Demain, A., **2014**. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(2), 185–201.
- Kavanagh, K., **2005**. Fungi: biology and applications. *John Wiley & Sons Ltd*, Capítulo 5: Antibiotics, Enzymes and Chemical Commoties from Fungi, p. 113-143.
- CONABIO, **2019**, ¿Qué es un país megadiverso? Sitio web: <https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html>.
- SEMARNAT, **2018**, Mares Mexicanos, Sitio web: <https://www.gob.mx/semarnat/es/articulos/mares-mexicanos?idiom=es>.
- Calmus, T., Búrquez, A., y Martínez-Yrizar, A., **2017**. El golfo de California: un océano joven, región megadiversa, vínculo entre tectónica y ecología. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León*, 20(85).
- Calmus, T., **2008**. El mar de Cortés: un océano incipiente. *Revista Universidad de Sonora*, 20, 4-6

- Silvestre-Morales, **2010**. Estructura cortical de la cuenca de Alarcón al Sur del Golfo de California. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J, y Oberlies, N.H., **2017**. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756-770.
- Soltani, J., **2016**. Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. p. 275-292.
- Velásquez, J. A., Beltrán, D., Padilla, L. y Giraldo, G. **2010**. Obtención de ácido cítrico por fermentación con *Aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (*Musa ABB simmonds*) maduro. *Revista Tumbaga*, 1(5), 135-147.
- Rangel, M. y Falkenberg M., **2015**. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(6), 421-428.
- Fukuda, T., Kurihara Y., Kanamoto, A., y Tomoda, H., **2014**. Terretonin G, a new sesterterpenoid antibiotic from marine-derived *Aspergillus* sp. OPMF00272. *The Journal of Antibiotics*, 67(8), 593–595.
- Figueroa, M., Jarmusch, A. K., Raja, H.A., El-Elimat, T., Kavanaugh, J. S. Horswill, A.R., Cooks, R. G., Cech, N. B. y Oberlies, N.H., **2014**. Polyhydroxyanthraquinones as Quorum Sensing Inhibitors from the guttates of *Penicillium restrictum* and their analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Natural Products*, 77(6), 1351-1358.
- Scott, A. I., 1964, Interpretation of the Ultraviolet spectra of natural products. *International Series of Monographs on Organic Chemistry*, p. 115-116.
- Hui-Min, Y., Gan, W., Ya-Ping, L., Ming-Qiang, R., Chuan-Bin, S., Xiu-Wen, Y., Xiao-Dong, L., y Ren, L., **2016**. Phenolic acids isolated from the fungus *Schizophyllum commune* exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(9), 0661–0670.
- Juurlink, B., HJ, Azouz, H. J., Aldalati, A. MZ, AlTinawi, B., MH y Ganguly, P., **2014**. Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutrition Journal*, 13(1), 63.

- Chankhamjon, P., Boettger-Schmidt, D., Scherlach, K., Urbansky, B., Lackner, G., Kalb, D., Dahse, H.M., Hoffmeister, D., y Hertweck C., **2014**. Biosynthesis of the Halogenated Mycotoxin Aspirochlorine in Koji Mold Involves a Cryptic Amino Acid Conversion. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(49), 13409 –13413.
- Monti, F., Ripamonti F., Hawser P. S., y Islam, K., **1999**. Aspirochlorine: A Highly Selective and Potent Inhibitor of Fungal Protein Synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 52(3), 311-318
- Yin, W.B., Grundmann, A., Cheng, J., y Li, S.M., **2009**. Acetylaszonalenin Biosynthesis in *Neosartorya fischeri*. Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 100–109.
- Ellestad, G., Mirando, P., y Kunstmann, M., **1973**. Structure of the Metabolite LL-S490 $\beta$  from an Unidentified *Aspergillus* Species. *The Journal of Organic Chemistry*, 38(24), 4204-5.
- Huang, P., Yao, Z., Hsung, R., **2018**. Selected Procedure-Economical Enantioselective Total Syntheses of Natural Products, *Efficiency in Natural Product Total Synthesis*, p. 67-158
- Kimura, Y., Hamasaki T., y Nakajima H., **1982**. Structure of aszonalenin, a new metabolite of *Aspergillus zonatus*. *Tetrahedron Letters*, 23(2), 225-228.
- Shan, W., Wang, S., Zhan, Z., Ying Y., Ma, L., Chen, Y., Wu, R. y Tang, L., **2015**. Application of compuns aszonalenin and acetylaszonalenin to preparing anti-diabetic medicine. Sitio web: <https://patents.google.com/patent/CN105982902A/en>.