



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

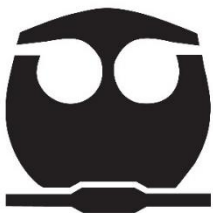
**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ESPECIES FÚNGICAS
SELECTAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JOSÉ EDUARDO NÚÑEZ SAUCEDO



MÉXICO, CDMX.

2022



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. Isabel del Carmen Rivero Cruz
VOCAL: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
SECRETARIO: Dr. Abraham Madariaga Mazón
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Zurisadai Padilla Gómez
SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Elizabeth Reyes López

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

SUSTENTANTE:



José Eduardo Núñez Saucedo

ASESOR:



Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

AGRADECIMIENTOS

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

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado de la FQ, UNAM, por los apoyos económicos PAPIIT IN 222220 y PAIP-FQ 5000-9145.

A mi tutor el Dr. Mario A. Figueroa Saldívar por creer en mí y por todo el apoyo brindado en el transcurso de este proyecto.

A la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), FQ, UNAM, por el registro de los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN).

A la Dra. María del Carmen González Villaseñor, Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar las cepas fúngicas objeto de estudio.

A mis compañeros del laboratorio 125, por todo su apoyo en mi estancia estudiantil y proyecto de tesis.

A todos esos amigos que hicieron que valiera la pena la carrera, por no dejarme rendir en los malos momentos.

A los M. en C. Carlos Antonio Fajardo Hernández y Rodrigo Villanueva Silva, por sus indicaciones, recomendaciones, consejos y ayuda en el análisis de los resultados obtenidos.

Y en particular a mis padres Rosa María Saucedo Valdez y José Honorio Núñez Bravo, a mis dos hermanos Hugo Alejandro Núñez Saucedo y Erick Núñez Saucedo. Por su dedicación, esfuerzo, consejos y apoyo en toda mi trayectoria escolar además por este gran y último paso hacia una vida profesional.

ÍNDICE

	Página
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VI
Lista de abreviaturas	VII
1. Antecedentes	1
1.1 Biodiversidad en México	1
1.1.1 Biodiversidad de especies fúngicas en México	2
1.2 Productos naturales fúngicos como agentes medicinales	3
1.3 Importancia de los metabolitos secundarios en el tratamiento de la resistencia a fármacos	7
2. Hipótesis	9
3. Objetivos	9
3.1 Objetivo general	9
3.2 Objetivos particulares	9
4. Desarrollo experimental	11
4.1 Aislamiento de los organismos fúngicos y cultivo en pequeña escala	11
4.2 Estudios de metabolómica	11
4.3 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala	12
4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos	12
4.5 Cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos	13
4.6 Fraccionamiento de los extractos en mediana escala	13
4.7 Separación y purificación de los metabolitos activos	14
4.8 Caracterización de los productos puros obtenidos	14
5. Resultados y discusión	16
5.1 Acondicionamiento y cultivo de los organismos fúngicos	16
5.2 Evaluación biológica	17
5.3 Cultivos en mediana escala y fraccionamiento primario	18
5.4 Investigación química de la especie ACA20	22
5.4.1 Caracterización de la asperlicina (1)	22
5.4.2 Caracterización del producto 2	25
6. Conclusiones	27
7. Perspectivas	27
8. Bibliografía	28

Lista de figuras

Figura		Página
1	Diversidad de especies de hongos, plantas y animales en el mundo y en México.	1
2	Gráfica de crecimiento del número total de especies de hongos reportadas por década desde 1750 en comparación con el número global de especies catalogadas.	2
3	(A) Ergot (<i>Claviceps purpurea</i>), (B) cabergolina, y (C) ergotamina.	3
4	Línea en el tiempo del descubrimiento de algunos fármacos antimicrobianos de origen fúngico utilizados en la terapéutica.	4
5	(A) <i>Ramularia collo-cygni</i> y (B) robillina D.	5
6	(A) <i>Penicillium radicum</i> y (B) viriditoxina.	5
7	(A) <i>Aspergillus ochraceus</i> e (B) insulicólida A.	6
8	Desarrollo y evolución de la resistencia a los fármacos antimicrobianos por las cepas <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (EDRM), <i>Enterococos</i> resistente a la vancomicina (ERV) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a las fluoroquinolonas (PRFQ).	8
9	Cultivos fúngicos en cajas de Petri con medio APD : (A) ACA4, (B) ACA20, (C) ZL01, (D) ZL012, (E) 6H14 y (F) 9G15.	17
10	Cultivos en pequeña escala en medio de arroz de la especie ACA20: vista inferior (A) y vista superior (B).	17
11	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash del extracto de ACA20. Detectores: ELSD (verde) y PDA (amarillo).	19
12	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash del extracto de ZL12. Detectores: ELSD (verde) y PDA (amarillo).	20
13	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash del extracto de ZL01. Detectores: ELSD (verde) y PDA (amarillo).	21
14	Cromatograma de corriente total de iones (TIC) y en el UV (295 nm) de la fracción 01003-072-6 (A). Espectros en el UV (B), ESI ⁺ (C) y ESI ⁻ (D) del compuesto 1.	23
15	Espectro de ¹ H RMN de la asperlicina (1).	24
16	Cromatograma de TIC y en el UV (295 nm) de la fracción 01003-072-7. (A). Espectros en el UV (B), ESI ⁺ (C) y ESI ⁻ (D) del compuesto 2.	26

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Especies fúngicas objeto de estudio.	11
2	Rendimiento de los extractos orgánicos preparados en pequeña escala.	12
3	Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en pequeña escala.	18
4	Condiciones de la separación por cromatografía en columna abierta tipo flash de los extractos fúngicos en mediana escala.	19
5	Resultados del fraccionamiento primario del extracto de ACA20 en mediana escala.	19
6	Resultados del fraccionamiento primario del extracto de ZL12 en mediana escala.	20
7	Resultados del fraccionamiento primario del extracto de ZL01 en mediana escala.	21
8	Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones secundarias de los hongos ACA20, ZL012 y ZL01.	21
9	Datos de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de la asperlicina (1).	24

Lista de abreviaturas

°C	Grado Celsius	MeCN	Acetonitrilo
µg	Microgramo	MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de etilo	kV	Kilovolt
µL	Microlitro	mg	Miligramo
APD	Agar papa dextrosa	MH	Medio Müeller Hinton
CDCl₃	Cloroformo deuterado	MHz	Mega Hertz
CHCl₃	Cloroformo	min	Minuto
δ_H	Desplazamiento químico de hidrógeno	mL	Mililitro
DMSO	Dimetilsulfóxido	mm	Milímetro
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MS	Espectrometría de masas	nm	Nanómetro
ESI	Ionización por electrospray	OMS	Organización Mundial de la Salud
g	Gramo	rpm	Revoluciones por minuto
Gram (+)	Gram negativo	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
Gram (-)	Gram positivo	ppm	Partes por millón
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	psi	Libras por pulgada cuadrada
Hz	Hertz	¹H RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
YESD	Medio de cultivo de extracto de levadura, peptona y dextrosa	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
uma	Unidad de masa atómica	UV	Espectroscopía en el ultravioleta
TIC	Cromatograma de iones totales		

1. ANTECEDENTES

1.1 Biodiversidad en México

La biodiversidad se define como la variedad de seres vivos que habitan en la Tierra, y comprende a los distintos ecosistemas y especies que forman parte de estos, así como las diferencias genéticas que hay entre los individuos que la constituyen. La gran variedad de ecosistemas, el elevado número de especies, la enorme riqueza de endemismos, así como la variabilidad genética de las especies silvestres y/o introducidas, permiten que México forme parte de un selecto grupo de países megadiversos que abarcan el 10% de la superficie del planeta albergando cerca del 70% de la biodiversidad mundial.

México, de acuerdo con algunos datos reportados por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2015), en 2015 contaba con un registro de 27,322 especies de plantas vasculares, 4,476 especies de hongos, 5,714 especies de vertebrados y 48,198 especies de invertebrados, diversidad que coloca al país entre los primeros lugares a nivel mundial considerando principalmente la privilegiada ubicación geográfica, la topografía en diversas altitudes y la variedad de climas (**Figura 1**).

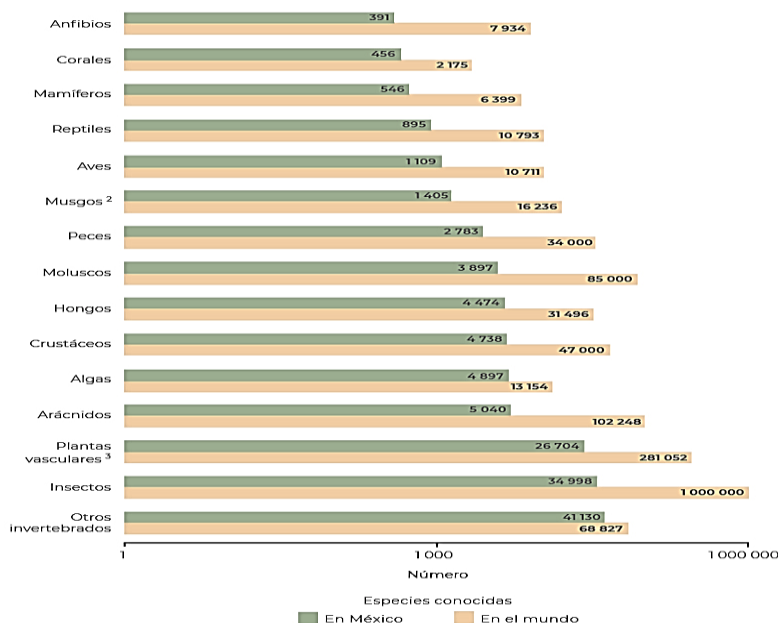


Figura 1. Diversidad de especies de hongos, plantas y animales en el mundo y en México (tomada de <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/tema/cap4.html> y consultada el 08-06-2021)

En este contexto, existen muchas áreas en el territorio nacional que no han sido objeto de estudios, hábitats inexplorados que comprenden zonas tropicales, o ecosistemas marinos, particularmente los de mar profundo, cuya flora y/o fauna es hasta hoy día completamente desconocida (Smith-Ramírez, *et al*, 2005).

1.1.1 Biodiversidad de especies fúngicas en México

El reino Fungi comprende a una gran variedad de organismos eucariontes, y es considerado como megadiverso desde el punto de vista morfológico, fisiológico y genético. En su mayoría, los hongos son descritos como microorganismos filamentosos de crecimiento apical, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y/o sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa (Abhijeet, 2014). A la fecha, se estima que existen entre 1.5 a 5 millones de especies de hongos en el planeta, y la biodiversidad de estas especies en los ambientes tropicales es mayor que en las regiones templadas. De tal manera que, en el caso particular de México, si consideramos este último criterio, el porcentaje de especies por describir en este tipo de ecosistemas aunado a la escasez de taxónomos expertos, requeriría de cientos de años para poder completar un registro aproximado del total de las especies que se desarrollan en estas regiones (**Figura 2**) (Aguirre-Acosta, *et al.*, 2014).

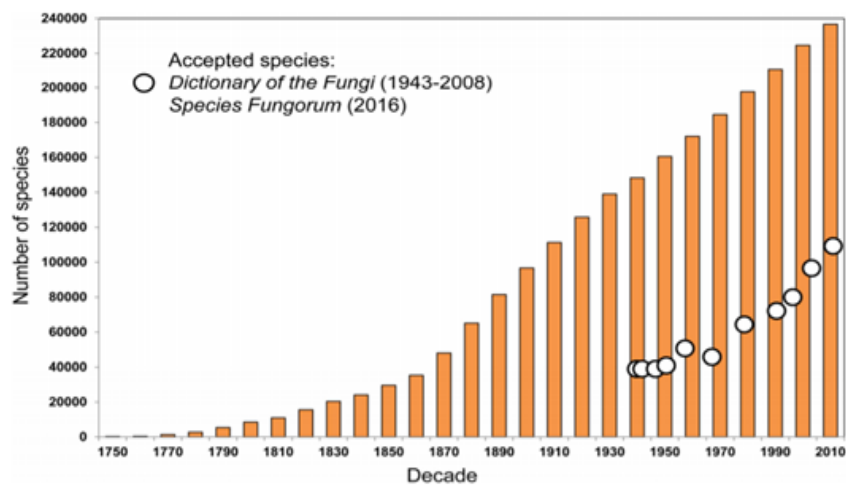


Figura 2. Gráfica de crecimiento del número total de especies de hongos reportadas por década desde 1750 en comparación con el número global de especies catalogadas (tomada de Hawksworth y Lücking, 2017).

1.2 Productos naturales fúngicos como agentes medicinales

Los productos naturales de origen fúngico representan a más de las dos terceras partes de los antibióticos más usados en la clínica, siendo los hongos endófitos y/o patógenos de vegetales, los productores de muchos metabolitos secundarios que desempeñan un papel importante en la virulencia y la competencia contra otros microorganismos (Buckley, 2008).

Un ejemplo de gran interés, lo representan los alcaloides del cornezuelo de centeno producidos por hongos filamentosos del género *Claviceps*, referenciados desde textos antiguos contra las enfermedades de los cereales y la primera epidemia de "ergotismo", "fuego sagrado" o "fuego de San Antonio" que minimizó las propiedades medicinales de este hongo (Laval, 2004). Siendo hasta el año de 1582 cuando por primera vez se evidenció su utilidad para "acelerar el parto", y en el año de 1938, con la síntesis del derivado de dietilamida del ácido lisérgico se ratificó su importancia medicinal. Actualmente, los derivados semisintéticos como la cabergolina y la ergotamina, se utilizan para el tratamiento de la migraña (Tfelt-Hansen, *et al.*, 2000), la enfermedad de Parkinson, la reducción del crecimiento tumoral y otras actividades antimicrobianas (Curran y Perry, 2004), evidenciando la utilidad farmacológica de este hongo (Figura 3).

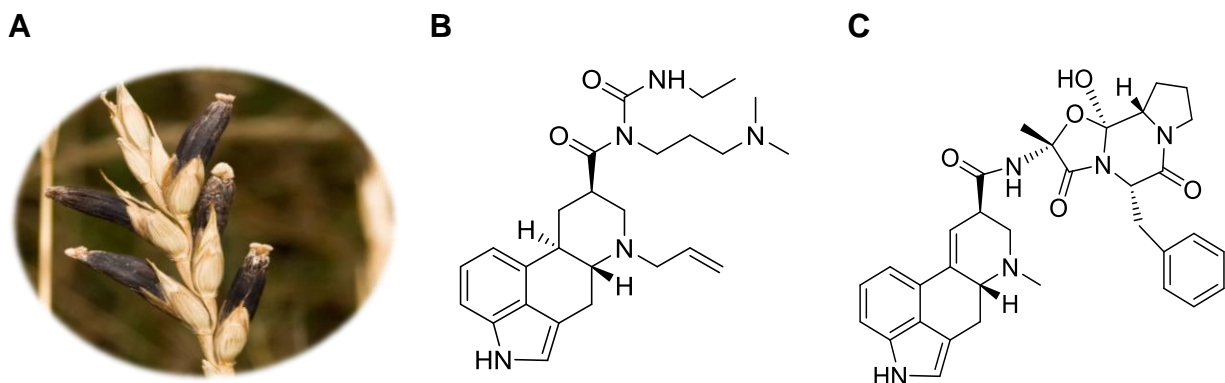


Figura 3. (A) Ergot (*Claviceps purpurea*), (B) cabergolina, y (C) ergotamina.

Otro ejemplo de la importancia histórica de los productos naturales fúngicos es el descubrimiento de la penicilina en el año de 1928 por Sir Alexander Fleming (Gayness, 2017). El aislamiento de este primer compuesto antibiótico de *Penicillium notatum* inició con una nueva era en el descubrimiento este tipo de fármacos (Figura 4). Así, desde el descubrimiento

de la penicilina, se inició la era dorada de los antibióticos, cambiando de manera indiscutible la calidad de vida de la humanidad. Con el desarrollo de la penicilina, la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas llevó al descubrimiento de numerosos compuestos antimicrobianos, aislados de otras especies del género *Streptomyces*, que incluyen antibióticos semisintéticos y/o sintéticos como la eritromicina (*S. erythreus*), vancomicina (*S. orientalis*), cloranfenicol (*S. venezuelae*) y neomicina (*S. fradiae*).

Año	Evento
1929	Descubrimiento de la penicilina
1932	Descubrimiento del prontosil. Identificación de las sulfonamidas
1939	Descubrimiento de la gramicidina
1942	Introducción de la penicilina
1943	Descubrimiento de la estreptomina (aminoglucósidos)
1943	Descubrimiento de la bacitracina
1945	Descubrimiento de las cefalosporinas
1947	Descubrimiento del cloranfenicol
1948	Descubrimiento de la clortetraciclina
1952	Descubrimiento de la eritromicina
1956	Descubrimiento de la vancomicina
1957	Descubrimiento de la rifampicina
1959	Introducción de los nitromimidazoles
1960	Síntesis e introducción de la meticilina
1961	Introducción de la ampicilina
1962	Introducción del ácido nalidixico
1963	Descubrimiento de la gentamicina
1964	Introducción de las cefalosporinas
1970	Introducción de la trimetoprima
1972	Introducción de la minociclina
1980	Introducción de la norfloxacina (fluoroquinolonas)
1993	Azitromicina y claritromicina
2000	Introducción del linezolid (oxazolidinonas)
2003	Introducción de la daptomicina (lipopéptidos)

Figura 4. Línea en el tiempo del descubrimiento de algunos fármacos antimicrobianos de origen fúngico utilizados en la terapéutica (tomada de Pinos, 2015).

Sin embargo, el amplio uso de esta clase de antibióticos ha dado lugar al desarrollo de un fenómeno de resistencia debido a la evolución selectiva impulsada por esta clase de fármacos, disminuyendo la eficacia de estos medicamentos en numerosas terapias efectivas contra bacterias potencialmente mortales.

Esto último ha derivado en un renovado interés en el descubrimiento de nuevas entidades químicas a partir de nuevas especies fúngicas, algunos ejemplos, lo constituyen las rubellinas, fitotoxinas aisladas del hongo fitopatógeno *Ramularia collo-cygni* (Havis, *et al.*, 2015) con una importante actividad contra bacterias Gram (+), incluyendo cepas multifármaco resistentes de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (SG 511), *S. aureus* (MRSA 134/94), *Enterococcus faecalis* (VRE 1528) o *Mycobacterium vaccae* (IMET 10670), además de presentar una actividad antiproliferativa importante (**Figura 5**).

La viriditoxina producida por *P. radicum* FKI-3765-2 (Noh, *et al.*, 2017) es activa contra *S. aureus* resistente a metilcilina (MRSA) o la lindgomicina, policétido antibiótico inusual, con un amplio espectro de actividades biológicas, contra una serie de bacterias Grampositivas así como la levadura *Candida albicans* y el hongo fitopatógeno *Z. tritici* (Singh, *et al.*, 2015) (**Figura 6**).

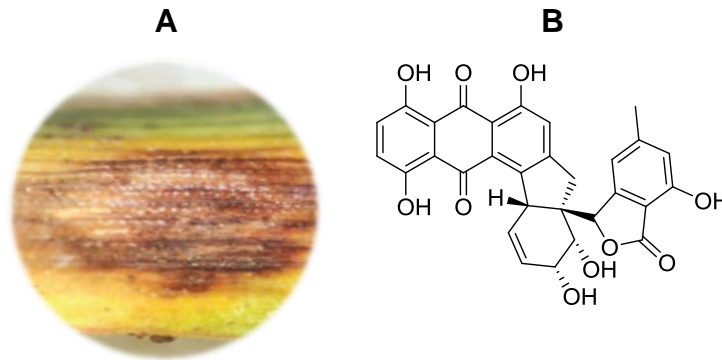


Figura 5. (A) *Ramularia collo-cygni* y **(B)** rubellina D.

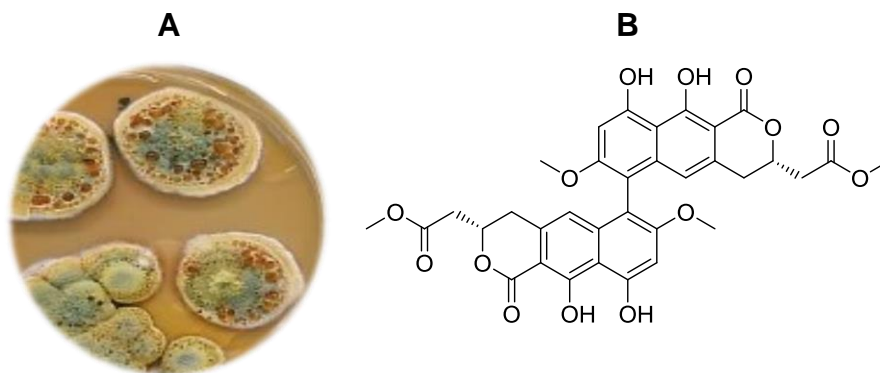
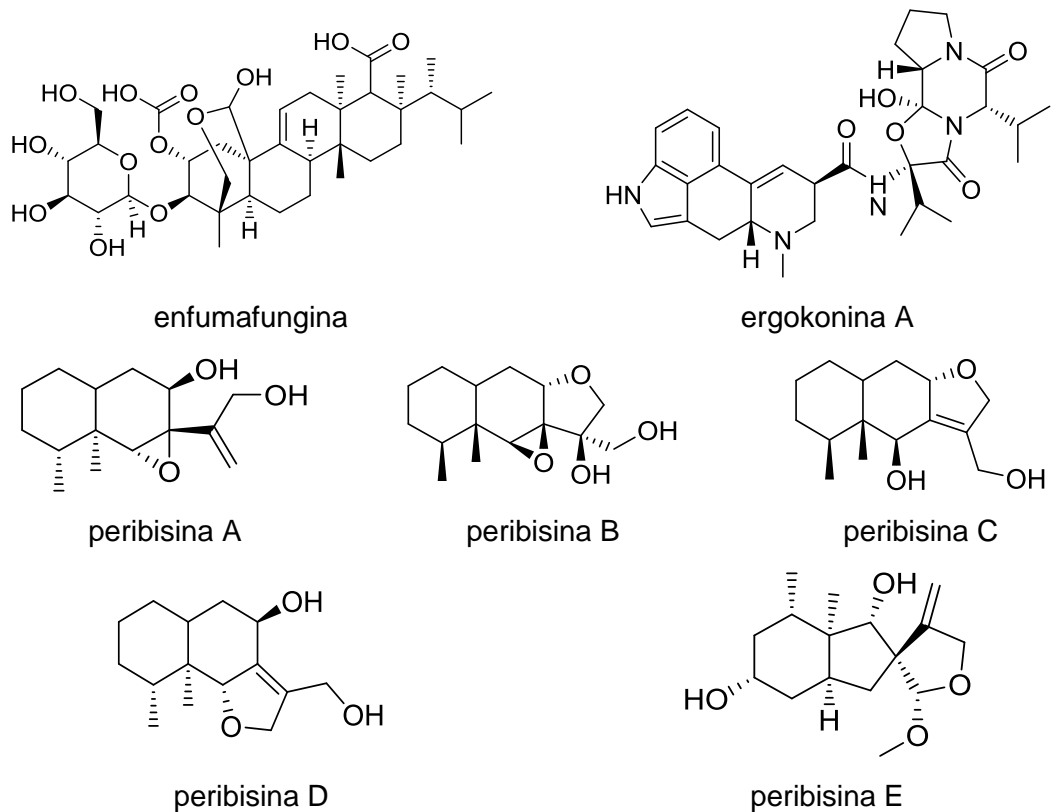


Figura 6. (A) *Penicillium radicum* y **(B)** viriditoxina.

La enfumafungina y la ergokonina A son terpenoides aislados de especies de *Hormonema* y *Trichoderma*, con actividad antibiótica relevante contra varias especies de bacterias, levaduras y hongos (López-Bucio, *et al.*, 2015). Las peribisinas (A-E), sesquiterpenos aislados de *Periconia byssoides*, son capaces de inhibir el desarrollo de células cancerosas de leucemia en bajas concentraciones, lo que hace a estos compuestos candidatos para el desarrollo de nuevos anticancerígenos (Liu, *et al.*, 2009).



La insulicólida A aislada de *Aspergillus ochraceus*, es un producto natural prometedor por su actividad antiviral (Deshmukh, *et al.*, 2017) (**Figura 7**).

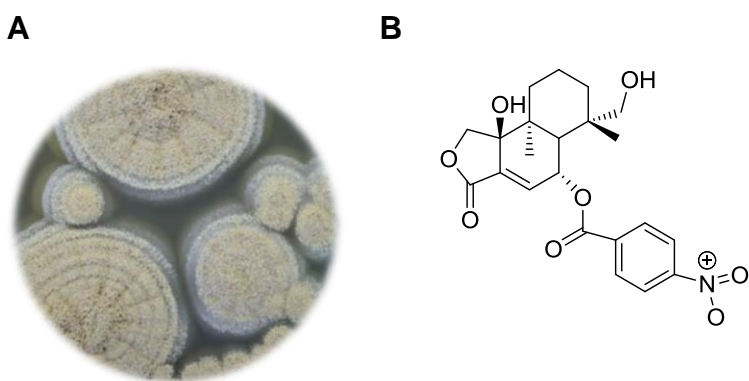


Figura 7. (A) *Aspergillus ochraceus* e **(B)** insulicólida A.

En este escenario, es indiscutible que los hongos representan la mejor fuente para la obtención de compuestos bioactivos para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

1.3 Importancia de los metabolitos secundarios en el tratamiento de resistencia a fármacos

A partir de la década de los 80 comenzó a incrementarse la incidencia de diversos padecimientos infecciosos intrahospitalarios causados por microorganismos resistentes a los agentes terapéuticos utilizados de manera convencional. Las principales causas de este incremento son la automedicación, la falta de apego al tratamiento y los fenómenos de resistencia adquirida por la regulación en la expresión de genes por los organismos patógenos; la expresión de proteínas en membrana expulsoras de fármacos y/o la formación de películas microbianas. Por otra parte, la industria farmacéutica, ante la falta de incentivos, la escasez de recursos financieros y los retos científicos que implica el descubrimiento de nuevos fármacos, ha limitado la realización de la investigación en esta área, restringiendo el desarrollo de nuevas entidades químicas (Aslam, *et al.*, 2018).

La resistencia a fármacos se presenta principalmente en el transcurso de las infecciones mal tratadas, en procedimientos de rutina como las cesáreas o los implantes de prótesis de cadera, o tratamientos de quimioterapia. Según la OMS, cada año mueren 700 mil personas de infecciones por bacterias resistentes en el mundo. Asimismo, los cálculos, en 2017, eran que de 2014 a 2050 los gérmenes resistentes pueden causar la muerte en 10 millones de personas con un costo de 100 mil millones de dólares. Algunas estimaciones indican que solo en Estados Unidos y en Europa, más de 50,000 personas mueren al año por estas causas. En países de ingresos bajos a medios de América Latina, la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de *Escherichia coli* están aumentando, alrededor del 60% en hospitales mexicanos. Mientras que las fluoroquinolonas, alrededor del 60% en hospitales en Colombia, México y Perú. Recientemente, distintos centros de salud nacional en conjunto con el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana de la UNAM, buscan contribuir a la vigilancia epidemiológica y molecular de la resistencia bacteriana en México, con el fin de apoyar la prescripción y las políticas sobre antibióticos. Trabajan en más de 20 de hospitales en la República y alrededor de 8 laboratorios extranjeros (Ponce de León, *et al.* 2018). Lo antes mencionado ha obligado a las autoridades de salud global a buscar soluciones (**Figura 8**). En este sentido, los productos naturales de origen fúngico representan una fuente potencial en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos debido a su gran diversidad estructural,

convirtiéndose en una buena alternativa para abordar el desafío clínico de los fenómenos de resistencia.

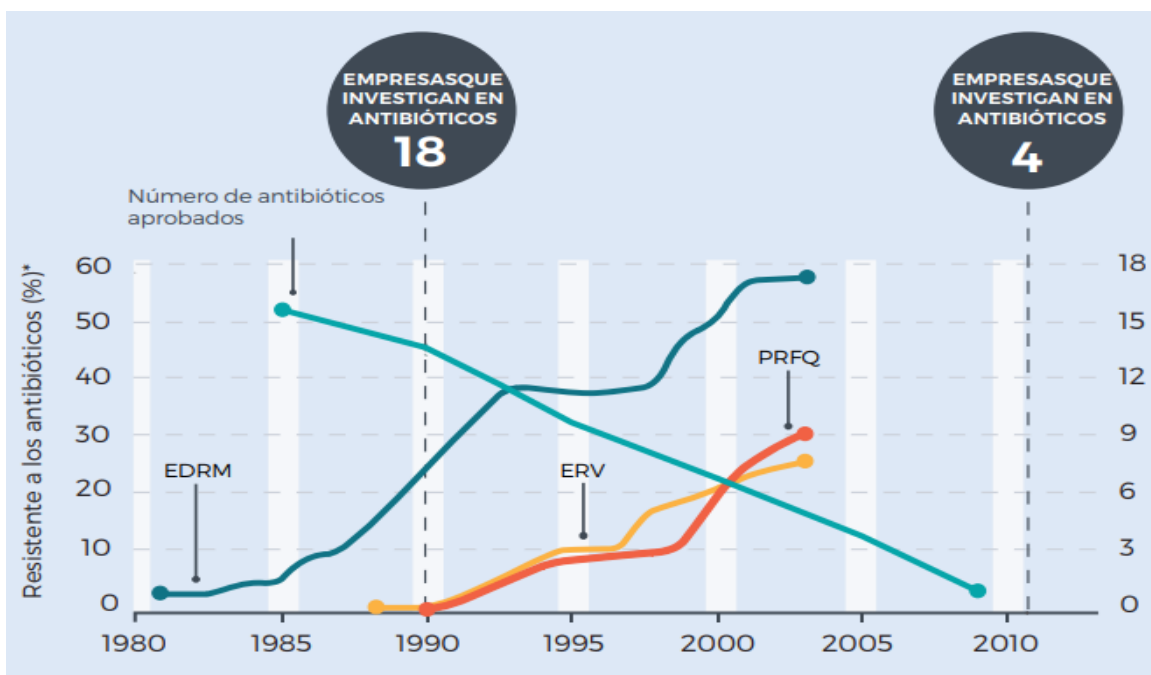


Figura 8. Desarrollo y evolución de la resistencia a los fármacos antimicrobianos por las cepas *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (**EDRM**), *Enterococos* resistente a la vancomicina (**ERV**) y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a las fluoroquinolonas (**PRFQ**) (tomada de <https://unsgaccessmeds.org> y consultada el 08-06-2021).

2. HIPÓTESIS

El estudio químico biodirigido de especies fúngicas selectas aisladas a partir de muestras de arena y/o de insectos pertenecientes a hábitats poco explorados, garantizará la obtención de nuevos compuestos activos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de investigación es realizar el estudio químico biodirigido de especies fúngicas selectas aisladas a partir de diferentes muestras de arena y/o de insectos, con la finalidad de obtener compuestos con potencial activos.

3.2 Objetivos particulares

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

1. Realizar el acondicionamiento de una serie de hongos obtenidos de las fuentes naturales seleccionadas.
2. Preparar los cultivos en pequeña escala y obtener los extractos orgánicos correspondientes mediante las técnicas de maceración y reparto.
3. Realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos contra una batería de microorganismos Gram (+), Gram (-) y la levadura *Candida albicans* utilizando el ensayo del colorante MTT.
4. Preparar los cultivos en mediana escala de todas las especies seleccionadas con base en los resultados obtenidos en la evaluación biológica realizada.
5. Realizar el fraccionamiento de los extractos cultivados en mediana escala, mediante técnicas cromatográficas convencionales.
6. Realizar la evaluación del potencial antimicrobiano de las fracciones obtenidas en el objetivo anterior utilizando el mismo ensayo biológico que permitió establecer la actividad de los extractos en pequeña escala.

7. Realizar el aislamiento y la purificación de los compuestos activos presentes en las fracciones activas seleccionadas mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).
8. Realizar la caracterización química de los metabolitos puros aislados utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Aislamiento de los organismos fúngicos y cultivo en pequeña escala

Los organismos fúngicos seleccionados para el estudio fueron aislados a partir de diferentes muestras de arena y/o de insectos provenientes de diversos hábitats (**Tabla 1**). Todos los organismos fueron proporcionados por la Dra. María del Carmen González Villaseñor, Instituto de Biología, UNAM.

Código	Lugar de colecta	Fuente natural
9G15	Chiapas	Grillo
6H14	Chiapas	Hormiga
ACA4	Acapulco, Guerrero	Arena
ACA20	Acapulco, Guerrero	Arena
ZL01	Manzanillo, Colima	Arena
ZL012	Manzanillo, Colima	Arena

Enseguida, se realizó el acondicionamiento de los organismos mediante la transferencia de las cepas tipo a cajas de Petri con medio de agar papa dextrosa (APD); estas cajas fueron cultivadas a temperatura ambiente (por triplicado) hasta observar un crecimiento uniforme. Una vez verificada la pureza y viabilidad, todos los cultivos fueron transferidos a medio líquido de extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%) (YESD) (15 mL), por 5 días a temperatura ambiente y en agitación (100 rpm). Posteriormente, cada inóculo fue transferido a medio de arroz (15 g de arroz y 30 mL de agua), y se dejaron crecer por 21 días a temperatura ambiente con fotoperiodos de luz oscuridad 12/12 horas.

4.2 Estudios de metabolómica

Los estudios de metabolómica se realizaron utilizando la metodología implementada en nuestro grupo de trabajo, empleándose un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución marca Waters (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, Waters Co., MA, EE.UU.). Todos los análisis se realizaron en una columna Acquity BEH C₁₈ (Waters Co., MA, EE.UU.; 1.7 µm, 2.1×10 mm) con una mezcla de elución binaria de CH₃CN (A)-ácido fórmico 0.1% acuoso (B) (EI-Elimat, *et al.*, 2013).

4.3 Preparación de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala

A partir de los cultivos obtenidos mediante el procedimiento descrito en el inciso 4.1, se prepararon los extractos orgánicos correspondientes, empleando la técnica de maceración utilizando 60 mL de la mezcla de CHCl₃-MeOH (1:1) y agitación constante (100 rpm) durante 8 horas. Transcurrido este tiempo de extracción, los cultivos se filtraron al vacío y la biomasa resultante se lavó con 50 mL de la mezcla de CHCl₃-MeOH (1:1). Enseguida, al extracto obtenido se le adicionaron 60 mL de CHCl₃ y agua destilada hasta completar un volumen final de 200 mL. Esta mezcla se mantuvo en agitación por 30 min y se fraccionó mediante un proceso de reparto con CHCl₃ (3×200 mL). Las fases orgánicas resultantes fueron reunidas y concentradas a sequedad a presión reducida. Finalmente, esta fracción orgánica fue resuspendida en 60 mL de la mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se desengrasó mediante un reparto con *n*-hexano (3×60 mL). Los datos de los extractos preparados, así como las cantidades de muestra obtenidas resumen en la **Tabla 2**.

Muestra	Clave	Peso (mg)
9G15	01003-052-1	79.0
ACA4	01003-052-2	20.8
6H14	01003-052-3	247.5
ZL01	01003-052-4	50.1
ACA20	01003-052-5	39.7
ZL012	01003-052-6	15.5

4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos, fracciones y compuestos puros, se realizó mediante 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* (ATCC 259233) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Salmonella typhi* (ATCC 9992), y la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231). Todos los microorganismos fueron proporcionados por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Como medios de cultivo se emplearon los caldos Müeller-Hinton (MH) para las bacterias y papa dextrosa (PD) para la

levadura. Los controles positivos empleados fueron ampicilina para las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhi*, vancomicina para *B. subtilis*, gentamicina para *P. aeruginosa*, y nistatina para la levadura *C. albicans*.

Brevemente, todos los ensayos correspondientes se efectuaron en placas Elisa de 96 pozos. Cada pozo contenía 50 μL del medio de cultivo MH y 100 μL de una suspensión del microorganismo de prueba en solución salina, ajustada al 0.5% (1×10^8 células/mL) del estándar turbidimétrico de McFarland. Los pozos de las filas A-J contenían además 50 μL de las muestras a evaluar a las concentraciones de 20 y 200 $\mu\text{g/mL}$ disueltas en DMSO (10%). Las últimas filas de pozos (K-L) fueron utilizados como controles de esterilidad y/o de crecimiento. Las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, a cada pozo se le adicionaron 10 μL de la solución reveladora de MTT (5 mg/mL en MeOH) y la placa se incubó durante 30 min a 37°C. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada como la menor concentración en la que no se observó crecimiento del microorganismo ensayado.

4.5 Cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos

Con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad antimicrobiana (**inciso 4.4**), se seleccionaron las especies fúngicas con las claves ACA20, ZL012 y ZL01 para su estudio químico, realizando en primer lugar, la preparación de los cultivos en mediana escala para la obtención de los extractos orgánicos correspondientes. La preparación de los cultivos y obtención de los extractos en mediana escala se realizó empleando la misma metodología descrita en los incisos **4.1** y **4.3** pero en una proporción 10 \times .

4.6 Fraccionamiento de los extractos en mediana escala

El fraccionamiento de los extractos orgánicos se realizó mediante una 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.

4.7 Separación y purificación de los metabolitos activos

La separación y purificación de los compuestos presentes en las fracciones activas se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítico y preparativo. Estos 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, este último con las siguientes condiciones instrumentales: ganancia 100, presión de N₂ 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de $75 \pm 5^\circ\text{C}$. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizaron empleando el programa Empower versión 3.0 (Waters). Las condiciones analíticas de separación de los constituyentes presentes en las muestras se establecieron utilizando una columna Gemini C₁₈ (5 μm , 4.6 \times 250 mm, Phenomenex, California, EE.UU.) y diferentes gradientes de elución entre ácido fórmico (0.1%) y MeCN. Una vez establecidas las condiciones óptimas de separación obteniendo la resolución adecuada que permitiera la purificación de los compuestos mayoritarios, se escaló el método de análisis a nivel preparativo empleando para ello una columna Gemini C₁₈ (5 μm , 21.2 \times 250 mm, Phenomenex, California, EE.UU.).

4.8 Caracterización de los productos puros obtenidos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C se registraron en un equipo VARIAN VNRMS 400 (Varian Inc., California, EE.UU.). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm empleando CDCl₃ 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 por electrospray (HRESIMS-MS/MS; Q Exactive marca ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) en los modos de ionización 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 \times 100 mm, Waters) y una mezcla binaria de MeCN (A)-ácido fórmico 0.1% acuoso (B), utilizando un gradiente de elución lineal de MeCN-ácido fórmico (15:85) incrementando la composición

hasta 100% (A) durante 8 min, y manteniendo estas condiciones en modo isocrático por 1.5 min, finalmente, se regresa a las condiciones iniciales de análisis en 0.5 min. La detección se realizó mediante un barrido en el UV desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm. Las condiciones del detector 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. El N₂ se empleó 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). Las muestras para estos análisis se prepararon a una concentración de 0.5 mg/mL en 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, Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU., respectivamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado al estudio de especies fúngicas selectas aisladas a partir de hábitats poco explorados en México con la finalidad de realizar un estudio sistemático de estas nuevas especies de microorganismos como fuentes potenciales en la obtención de principios activos de utilidad en el desarrollo de nuevas terapias médicas, en particular para el tratamiento de infecciones de diversa etiología.

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de este trabajo se resume a continuación: en primer lugar, se realizó el acondicionamiento de seis cepas de especies fúngicas seleccionadas, aisladas de diversos sustratos (arena y/o insectos). Una vez demostrada la viabilidad de las cepas se realizó la preparación de los cultivos en pequeña escala de las especies identificadas con las claves internas ACA4, ACA20, ZL01, ZL012, 6H14 y 9G15 (**Figura 9**), con la finalidad de realizar las evaluaciones biológicas de la actividad antimicrobiana. A continuación, se realizó el estudio químico de las especies seleccionadas con base en los resultados de la actividad biológica señalada, aplicando distintas técnicas cromatográficas, que permitieron la identificación de los metabolitos secundarios activos.

Los resultados generados a través de la estrategia metodológica antes descrita se discutirán en dos partes: la primera abarca la evaluación biológica de los extractos y fracciones analizados. En la segunda parte, se describen todos los aspectos relacionados con la investigación química de la especie ACA20.

5.1 Acondicionamiento y cultivo de los organismos fúngicos

Los organismos fúngicos seleccionados para su resiembra en condiciones axénicas fueron proporcionados por la Dra. María del Carmen González Villaseñor, Instituto de Biología de la UNAM. Estos organismos fueron obtenidos a partir de tres diferentes muestras: una de arena, otra de grillo y la última de hormiga. La identificación de estas especies se encuentra en proceso. Posteriormente, cada aislamiento se cultivó en medio sólido (**inciso 4.1 y Figura 10**) y se prepararon los correspondientes extractos orgánicos.

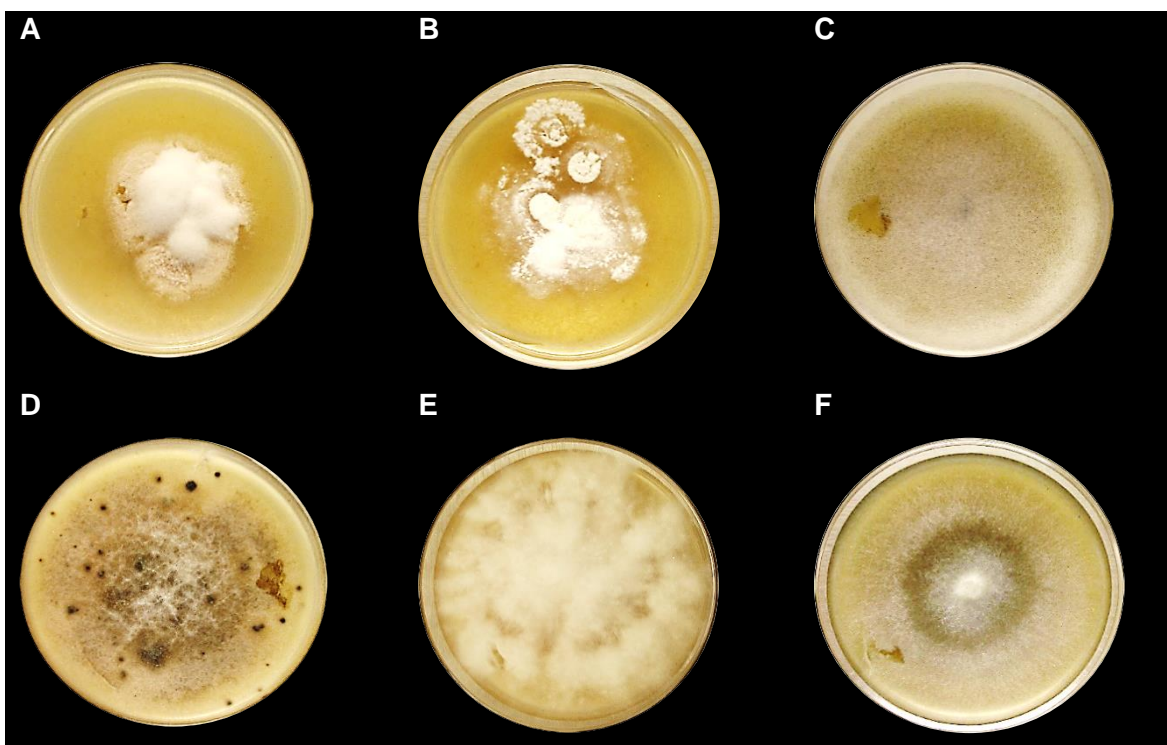


Figura 9. Cultivos fúngicos en cajas de Petri con medio APD : **(A)** ACA4, **(B)** ACA20, **(C)** ZL01, **(D)** ZL012, **(E)** 6H14 y **(F)** 9G15.

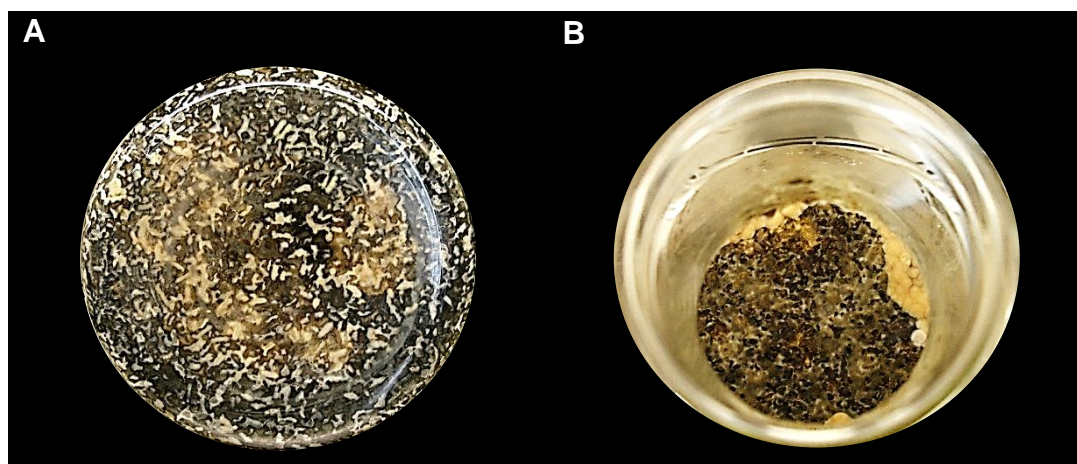


Figura 10. Cultivos en pequeña escala en medio de arroz de la especie ACA20: vista inferior **(A)** y vista superior **(B)**.

5.2 Evaluación biológica

El potencial antibacteriano de todos los extractos preparados en pequeña escala (**Tabla 3**) se evaluó utilizando una batería de microorganismos Gram (+), Gram (-) y la levadura *C. albicans* mediante la técnica de microdilución con el colorante MTT (Appendino, *et al.*, 2008). Este ensayo permitió evidenciar que solo tres de las muestras evaluadas inhiben parcialmente el

crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *B. subtilis* y *S. typhi* a la concentración de 200 µg/mL. En el caso de la especie indicada con el código interno 01003-52-4, el extracto presentó actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *B. subtilis* a las dos concentraciones ensayadas. Ninguno de los extractos presentó actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa*, *E. coli* y *C. albicans*. Con base en estos resultados se puede establecer que las especies fúngicas ZL01, ACA20 y ZL012, contienen principios antimicrobianos al inhibir el crecimiento de al menos un microorganismo.

Tabla 3. Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en pequeña escala. *				
Muestra	Peso (mg)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>
01003-52-1	79.0			
01003-52-2	20.8			
01003-52-3	247.5			
01003-52-4	50.1			
01003-52-5	39.7			
01003-52-6	15.5			
Control positivo CMI (µg/mL)		2.5^a	0.1^b	0.3^b
Controles positivos: ^a vancomicina y ^b ampicilina.				
<i>Criterios de inhibición</i>				
Inhibición total a 200 e inhibición parcial a 20 µg/mL				
Inhibición parcial a 200 µg/mL				
No inhibición				

* Ningún extracto mostró actividad vs Gram (-) ni *C. albicans*.

5.3 Cultivos en mediana escala y fraccionamiento primario

Con base en los resultados biológicos discutidos en el inciso anterior 5.2 de esta sección, se seleccionaron las tres especies más activas para su estudio químico. Para ello, se inició con la preparación de los cultivos en mediana escala, con la finalidad de obtener a los productos activos presentes. Una vez obtenidos los extractos orgánicos se sometieron a un fraccionamiento primario por reparto, tal como se indicó en la sección experimental. Así, las fracciones desgrasadas de cada extracto se sometieron a una separación por cromatografía en columna tipo Flash, utilizando como eluyentes mezclas de disolventes (*n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH) con incrementos de polaridad. Las condiciones cromatográficas de análisis de cada muestra se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Condiciones de la separación por cromatografía en columna abierta tipo flash de los extractos fúngicos en mediana escala.

Muestra	Extracto (mg)	Gel de sílice (g)	Volumen de equilibrio (mL)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)
ACA20	132.7	4.0	2.0	4.0	18.0
ZL012	2334.3	24.0	2.0	10.0	35.0
ZL01	945.5	4.0	2.0	15.0	40.0

El fraccionamiento secundario de los extractos generó un conjunto de fracciones, siete para ACA20, siete para ZL012 y nueve para ZL01 (**Figuras 11-13 y Tablas 5-7**).

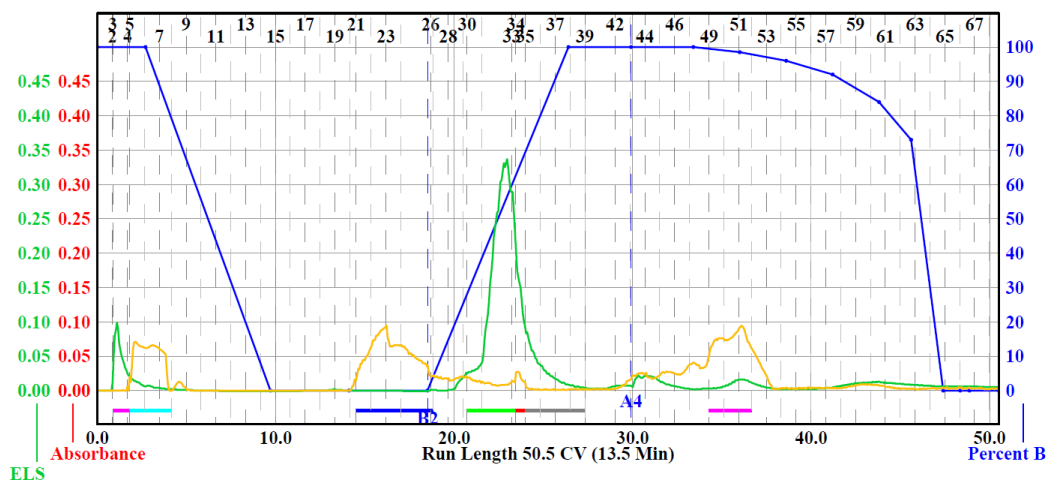


Figura 11. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash del extracto de ACA20. Detectores: ELSD (verde) y PDA (amarillo).

Tabla 5. Resultados del fraccionamiento primario del extracto de ACA20 en mediana escala.

Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1-10	01003-072-1	0.9
11-19	01003-072-2	0.6
20-27	01003-072-3	0.4
28-30	01003-072-4	13.7
31-47	01003-072-5	10.1
48-55	01003-072-6	6.1
56	01003-072-7	31.4
Cantidad recuperada		63.2
% de recuperación		47.6%

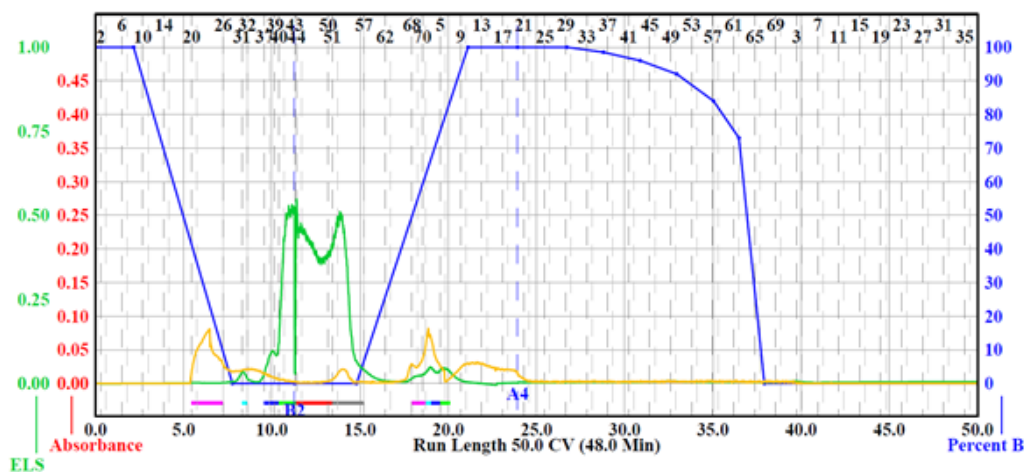


Figura 12. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash del extracto de ZL12. Detectores: ELSD (verde) y PDA (amarillo).

Tabla 6. Resultados del fraccionamiento primario del extracto de ZL12 en mediana escala.

Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1-25	01003-073-1	1.1
25-34	01003-073-2	3.0
35-48	01003-073-3	453.0
49-63	01003-073-4	195.8
64-75	01003-073-5	50
76-92	01003-073-6	21.5
93	01003-073-7	56.8
Cantidad recuperada		781.2
% de recuperación		33.5%

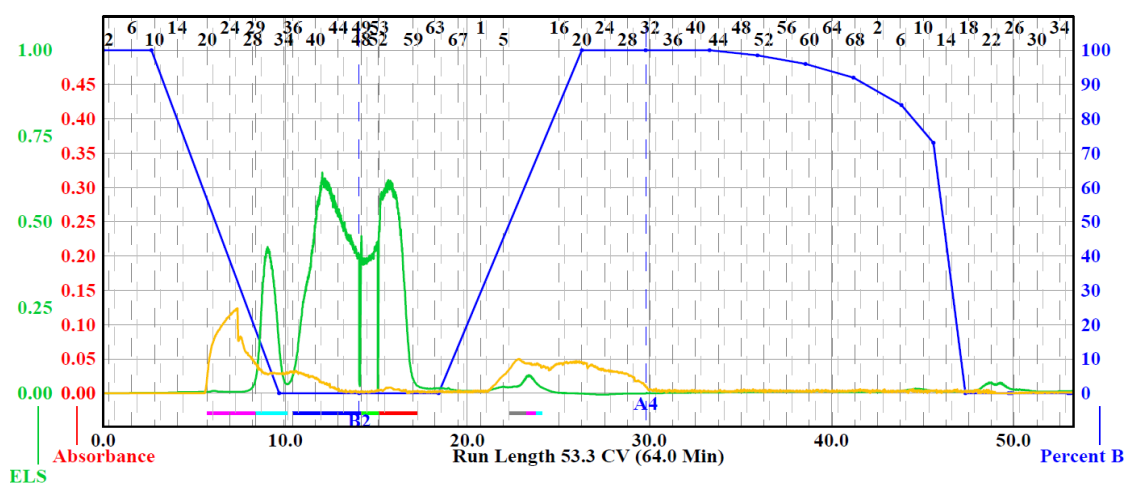


Figura 13. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash del extracto de ZL01. Detectores: ELSD (verde) y PDA (amarillo).

Tabla 7. Resultados del fraccionamiento primario del extracto de ZL01 en mediana escala.

Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1-25	01003-074-1	3.2
26-34	01003-074-2	3.8
35-49	01003-074-3	288.2
50-62	01003-074-4	241.4
63-71	01003-074-5	10.9
72-96	01003-074-6	120.9
97-103	01003-074-7	8.5
104-145	01003-074-8	56.7
146	01003-074-9	210.9
Cantidad recuperada		944.5
% de recuperación		99.8%

Posteriormente, se determinó el potencial antimicrobiano de las fracciones secundarias obtenidas en los procesos cromatográficos descritos anteriormente. Los resultados de las fracciones que mostraron actividad se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resultados de actividad antimicrobiana de las fracciones activas de los hongos ACA20 y ZL01.

Muestra	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>
ACA20			
01003-72-6			
01003-72-7			
ZL01			
01003-74-3			
01003-74-8			
Control positivo CMI ($\mu\text{g/mL}$)	2.5^b	0.3^a	0.3^a
Controles positivos: ^a ampicilina y ^b vancomicina.			
Criterios de inhibición			
Inhibición parcial a 200 $\mu\text{g/mL}$			
No Inhibición			

Se observa que las fracciones secundarias 01003-72-6 y 01003-72-7 de la especie ACA20 concentran la actividad biológica, e inhiben parcialmente el crecimiento de las bacterias *B. subtilis* y *S. typhi* a la concentración más alta ensayada (200 $\mu\text{g/mL}$). Con respecto a las fracciones evaluadas provenientes del extracto ZL01, solo las muestras identificadas con las claves 01003-74-3 y 01003-74-8 presentaron actividad biológica a la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ contra los organismos, *B. subtilis* y *S. aureus*. Por otra parte, las fracciones de la especie

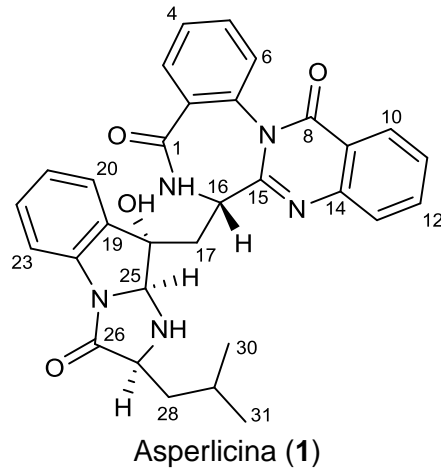
ZL012 no mostraron inhibición del crecimiento bacteriano sobre ninguna de las bacterias ensayadas.

Así, con base en lo anterior, se seleccionaron las muestras con las claves 01003-72-6, 01003-72-7, 01003-74-3 y 01003-74-8 para el aislamiento y la purificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

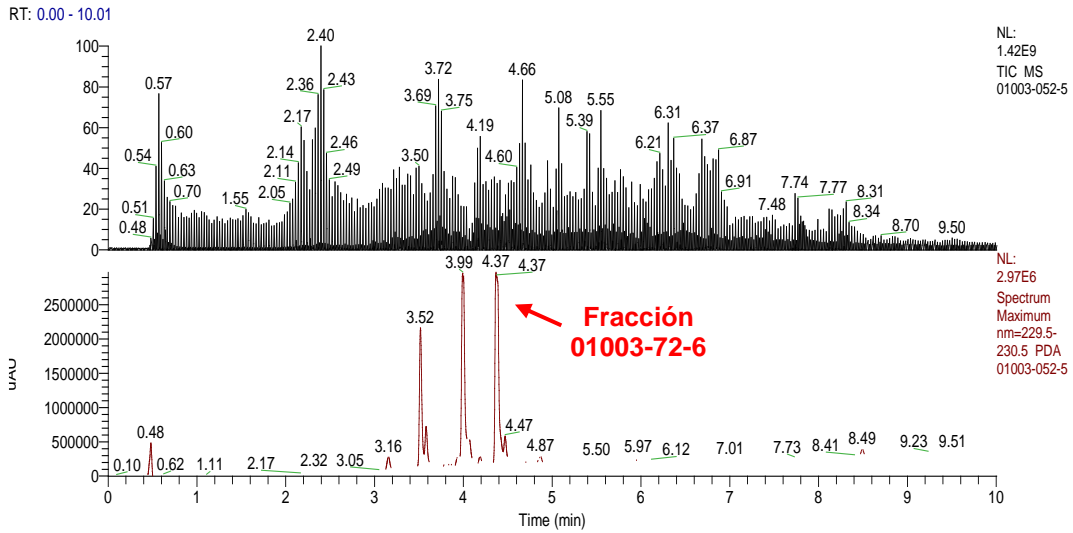
5.4 Investigación química de la especie ACA20

5.4.1 Caracterización de la aspercilina (1)

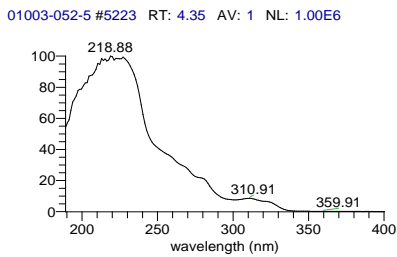
El estudio químico mediante sucesivos pasos cromatográficos de la fracción 01003-72-6 permitieron el aislamiento del compuesto **1** como un sólido amarillo. Los espectros de masas obtenidos mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (**Figura 14**) mostraron los iones moleculares en una relación masa-carga (m/z) de 536.2292 y 534.2148 una para $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$, respectivamente, permitiendo establecer la fórmula molecular como $C_{31}H_{29}N_5O_4$, la cual permite 20 grados de insaturación. El análisis detallado de los espectros de RMN (**Tabla 9** y **Figura 15**) del producto, permitieron comprobar la presencia de tres aminoácidos, dos derivados del ácido antranílico y uno más del triptófano, como tres sistemas A_2B_2 diagnósticos para tres anillos aromáticos *di*-sustituídos en δ_H 7.0-8.4 (H-3-H-6, H-10-H-13 y H-20-H-23). Además, se observan señales para 29 protones, tres de los cuales se intercambian al adicionar el disolvente deuterado; dos metilos de un residuo de isopropilo en δ_H 0.87 (H-31) y 0.95 (H-30); dos señales dobles de doble centradas en δ_H 4.25 (H-27) y 4.57 (H-16) que corresponden a dos metinos unidos a un grupo amina (NH); y dos multipletes centrados en δ_H 1.60 (H-28) y 2.66 (H-17) asignables a dos grupos metileno alifáticos. En resumen, el análisis detallado de este conjunto de señales, junto con el análisis comparativo de los espectros obtenidos con aquellos descritos en la literatura, permitieron caracterizar a **1** como la aspercilina aislada por primera vez de la especie *Aspergillus alliaceus* (Chang, *et al.*, 1985; Sun, *et al.*, 1994).



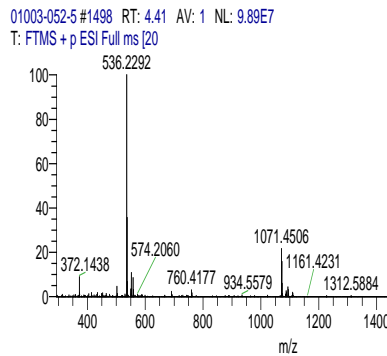
A



B



C



D

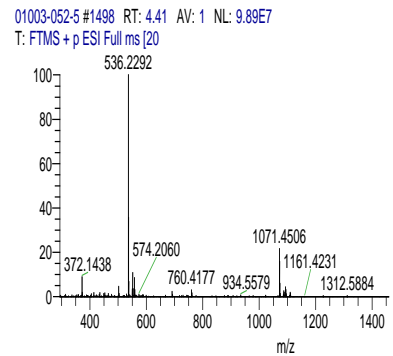


Figura 14. Cromatograma de corriente total de iones (TIC) y en el UV (295 nm) de la fracción 01003-072-6 (A). Espectros en el UV (B), ESI⁺ (C) y ESI⁻ (D) del compuesto 1.

Tabla 9. Datos de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de la asperlicina (1).		
Posición	δ_{H} , mult (J en Hz)	δ_{H} , mult (J en Hz) ^a
3	7.88, dd (1.2, 7.6)	7.98, dd (1.5, 7.5)
4	7.10, brt (7.5)	7.10, brt (7.5)
5	7.78, dt (1.2, 7.6)	7.83, dt (1.0, 7.5)
6	7.21, brd (7.1)	7.24, brd (8.0)
10	8.28, dd (1.1, 9.0)	8.28, dd (1.0, 8.0)
11	7.56, ddd (1.0, 2.7, 8.5)	7.56, brt (8.0)
12	7.75, ddd (1.4, 7.4, 9.7)	7.67, t (8.0)
13	7.64, brd (7.7)	7.64, d (7.5)
16	4.57, dd (5.0, 10.2)	4.37, dd (4.5, 9.5)
17	2.55, dd (5.6, 9.8)	2.53, dd (4.5, 15.5)
	2.78, dd (6.8, 10.0)	2.72, dd (9.5, 15.5)
20	7.50, brdd (6.9)	7.49, brd (8.0)
21	7.30, dd (7.8)	7.28, brt (7.5)
22	7.70, t (8.0)	7.69, t (8.0)
23	7.60, brd (7.4)	7.60, d (7.5)
25	5.48, s	5.50, s
27	4.25, dd (3.2, 12.2)	4.25, dd (3.0, 10.5)
28	1.47, ddd (3.5, 9.0, 13.7)	1.52, ddd (4.0, 10.5, 12.5)
	1.74, ddd (3.5, 9.3, 12.6)	1.77, ddd (3.0, 9.5, 12.5)
29	1.83, m	1.84, m
30	0.95, d (6.4)	0.94, d (6.2)
31	0.87, d (6.4)	0.88, d (6.2)

^a $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$ (1:4)

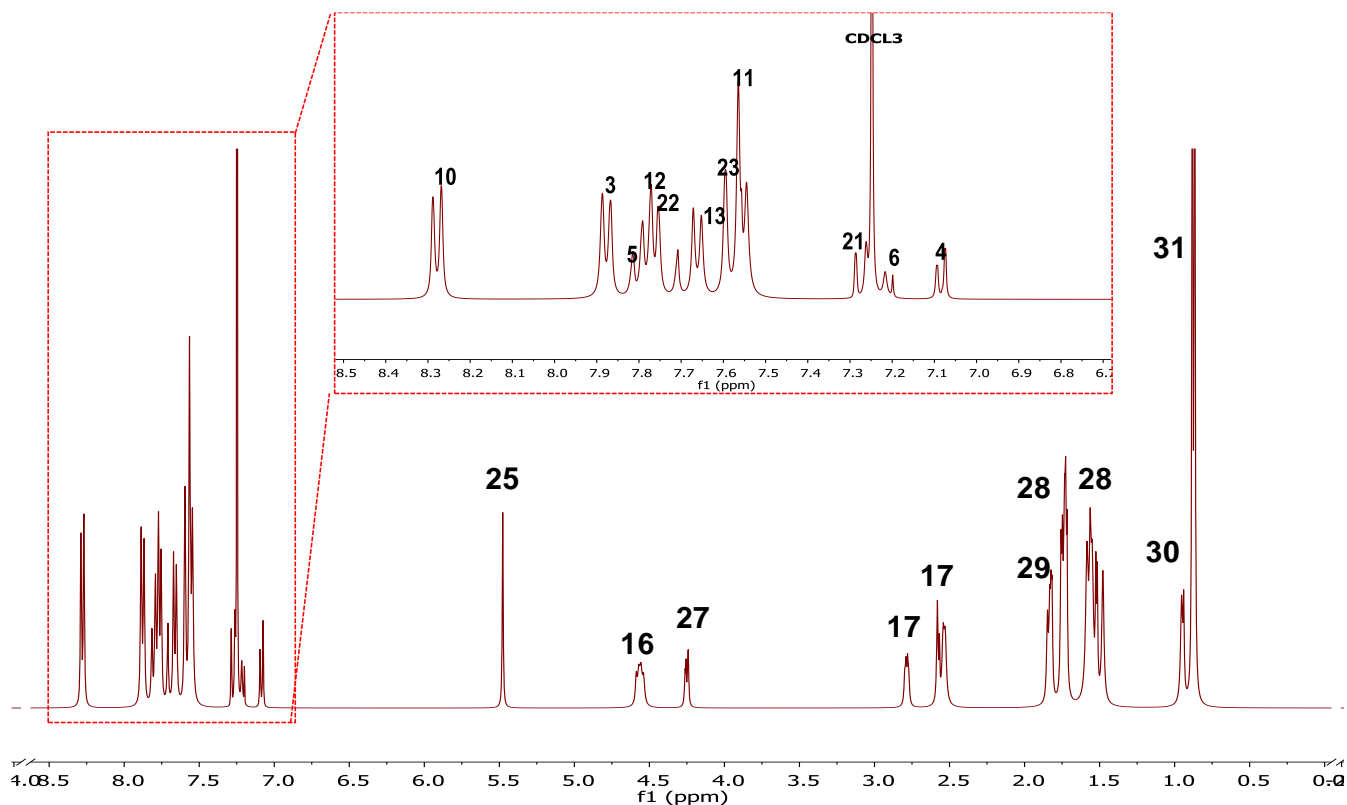


Figura 15. Espectro de ^1H RMN de la asperlicina (1).

La aspercilina (**1**) ha sido descrita como un potente antagonista no peptídico competitivo de la colecistoquinina (CCK), hormona que se produce en el intestino delgado, concretamente en el duodeno además del yeyuno provocando la contracción de la vesícula biliar y la secreción pancreática. Esta hormona también es considerada como un neurotransmisor que se libera en el sistema nervioso, especialmente en el hipotálamo. Este producto natural presenta una gran afinidad por el receptor CCK pancreático, ileal y de la vesícula biliar, pero no por el receptor CCK del sistema nervioso central.

5.4.2 Caracterización del producto 2.

A partir de la fracción activa 01003-72-7 se aislaron 31.4 mg de un sólido blanco-amarillo. Los espectros obtenidos mediante la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (**Figura 16**), mostraron los iones moleculares $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$, en m/z de 743.3080 y 741.2939 una, respectivamente. Desafortunadamente y derivado de la pandemia, no se logró finalizar la caracterización de este compuesto. Sin embargo, la revisión del peso molecular de **2** en el *Diccionario de Productos Naturales* no arrojó coincidencias, por lo que podría tratarse de un compuesto novedoso. Cabe destacar que derivado de el paro de actividades por la pandemia, los registros de los espectros de RMN para finalizar la caracterización no pudieron concluirse.

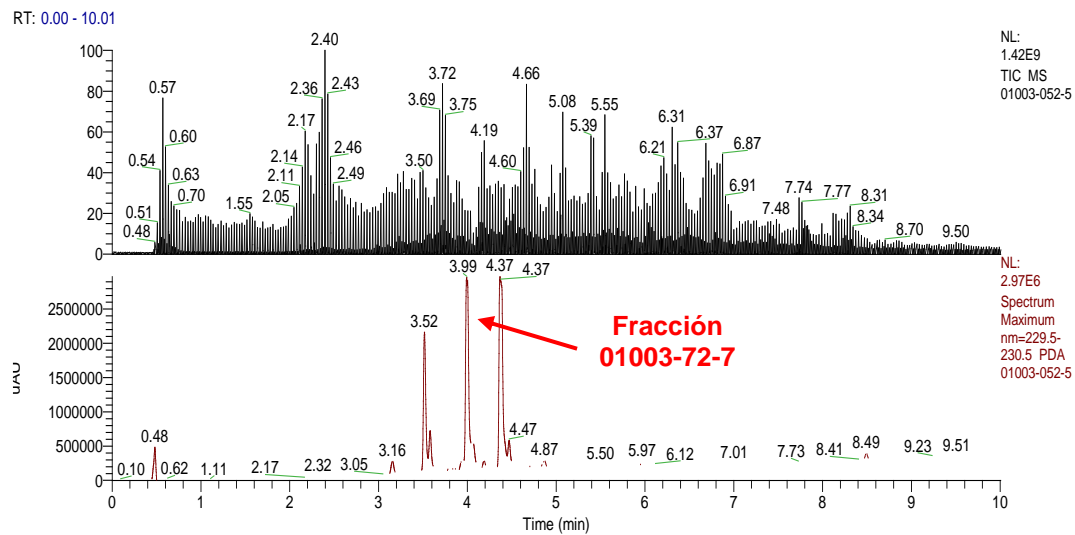
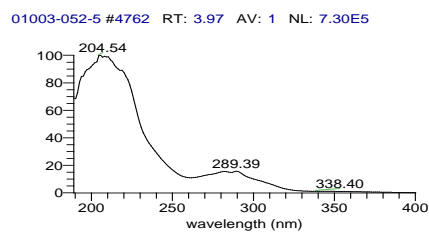
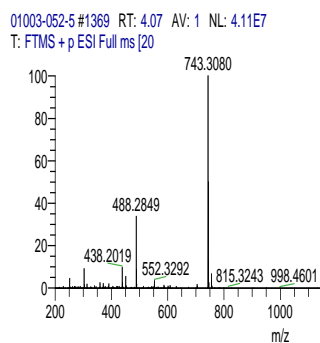
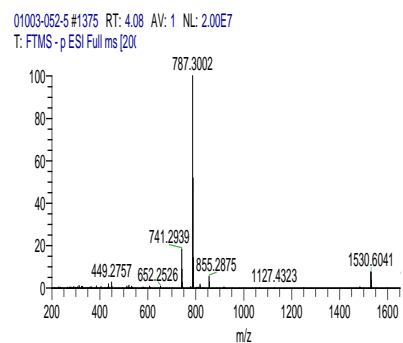
A**B****C****D**

Figura 16. Cromatograma de TIC y en el UV (295 nm) de la fracción 01003-072-7. **(A)**. Espectros en el UV **(B)**, ESI⁺ **(C)** y ESI⁻ **(D)** del compuesto **2**.

6. CONCLUSIONES

- El presente proyecto de investigación es una contribución al conocimiento de los productos de origen natural aislados a partir de especies fúngicas de hábitats poco explorados de México, como fuentes potenciales para la obtención de moléculas con actividad antimicrobiana.
- Con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de micro dilución en placa con el colorante MTT, se seleccionaron tres especies fúngicas como candidatos para la obtención de compuestos antimicrobianos.
- El estudio químico de la especie fúngica ACA20 permitió el aislamiento de la aspercilina (1) y de un segundo producto, el cual se encuentra en proceso de caracterización.

7. PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización química del producto 2 aislado de la especie ACA20.
- Realizar el estudio químico de las fracciones activas de la especie ZL01, con la finalidad de aislar a los productos responsables de la actividad biológica evaluada.
- Identificar taxonómicamente a las especies fúngicas estudiadas mediante métodos moleculares.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abhijeet S.Y.M. Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A review. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2014**, s8.
- Aguirre-Acosta, E.; Ulloa, M.; Aguilar, S.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R. Biodiversidad de Hongos en México. *Rev. Mex. Biodivers.* **2014**, *85*, 76–81.
- Appendino, G.; Gibbons, S.; Giana, A.; Pagani, A.; Grassi, G.; Stavri, M.; Smith, E.; Rahman, M. M. Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis Sativa*: A Structure-Activity Study. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1427–1430.
- Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U. Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 1645–1658.
- Buckley, M. The Fungal Kingdom: Diverse and Essential Roles in Earth's Ecosystem: This Report Is Based on a Colloquium, American Society for Microbiology: Washington (DC), **2008**.
- Conabio, Coordinación de información y Servicios Externos, **2015**.
<https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/tema/cap4.html> (consultado el 08-06-2021).
- Curran M.P. y Perry C.M. Cabergoline : A review of Its Use in The Treatment of Parkinson's Disease. *Drugs* **2004**, *64*, 2125-2141.
- Chang, R.S.; Lotti, V. J.; Monaghan, R.L.; Birnbaum, J.; Stapley, E O.; Goetz, M.A.; Albers-Schönberg, G.; Patchett, A.A.; Liesch, J.M.; Hensens, O.D. A Potent Nonpeptide Cholecystokinin Antagonist Selective for Peripheral Tissues Isolated from *Aspergillus alliaceus*. *Science* **1985**, *230*, 177–179.
- Declarationb by the Pharmaceutical, Biotechnology and Diagnostics Industries on Combating Antimicrobial Resistance, **2016**. <https://unsgaccessmeds.org> (consultado el 08-06-2021).
- Deshmukh, S.K.; Prakash, V. Ranjan, N. Marine Fungi: A Source of Potential Anticancer Compounds. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2536.
- El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B.M.; Cech, N.B.; Pearce, C.J. Oberlies, N.H. High-Resolution MS, MS/MS, and UV Database of Fungal Secondary Metabolites as a Dereplication Protocol for Bioactive Natural Products. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1709–1716.

- Gaynes, R. The Discovery of Penicillin: New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infect. Dis.* **2017**, *23*, 849-853.
- Graue, E.; Lee, W.; Martuscelli, J.; Saninger, J.; Ponce de León, S. Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia Antimicrobiana y Consumo de Antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, agosto **2018**.
- Hawksworth D.L. y Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*.
- Havis, N.D.; Brown, J.K.M.; Clemente, G.; Frei, P.; Jedryczka, M.; Kaczmarek, J.; Kaczmarek, M.; Matusinsky, P.; McGrann, G.R.D.; Pereyra, S. *Ramularia collo-cygni*, An Emerging Pathogen of Barley Crops. *Phytopathology* **2015**, *105*, 895–904.
- Liu, L.; Liu, S.; Chen, X.; Guo, L.; Che, Y. Pestalofones A-E, Bioactive Cyclohexanone Derivatives from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 606–613.
- López-Bucio, J.; Pelagio-Flores, R.; Herrera-Estrella, A. Trichoderma as Biostimulant: Exploiting the Multilevel Properties of a Plant Beneficial Fungus. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 109–123.
- Laval R.E. Sobre las epidemias del fuego de San Antonio. *Rev. Chil. Infectol.* **2004**, *21*.
- Noh, T.H.; Sen, L.; Hong, J.; Lee, J.-H.; Moon, H.R.; Jung, J.H. Antibacterial Activities of Viriditoxin Congeners and Synthetic Analogues Against Fish Pathogens. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4970–4974.
- Pinos P. Aspectos Farmacológicos y Quimicofarmacéuticos, Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia, **2015**.
- Smith -Ramírez C. Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile. Editorial Universitaria, Santiago. **2005**.
- Singh, V.; Praveen, V.; Tripathi, D.; Haque, S.; Somvanshi, P.; Katti, S.B.; Tripathi, C.K.M. Isolation, Characterization and Antifungal Docking Studies of Wortmannin Isolated from *Penicillium radicum*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11948.
- Sun, H H.; Byard, S.J.; Cooper, R.; Revised NMR Assignments for the Cholecystokinin Antagonist Asperlicin. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 599–601.
- Tfelt-Hansen, P.; Saxena, P. R.; Dahlöf, C.; Pascual, J.; Láinez, M.; Henry, P.; Diener, H.; Schoenen, J.; Ferrari, M. D.; Goadsby, P. J. Ergotamine in the Acute Treatment of Migraine: A Review and European Consensus. *Brain* **2000**, *123* (Pt 1), 9–18.