



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**BIOPROSPECCIÓN DE MONO Y COCULTIVOS MICROBIANOS DE LA
PENÍNSULA DE YUCATÁN**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. CARLOS ANTONIO FAJARDO HERNÁNDEZ

DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2022



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: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

VOCAL: Dr. José Federico del Río Portilla

VOCAL: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

VOCAL: Dr. José Antonio Guerrero Analco

SECRETARIO: Dr. José Alberto Rivera Chávez

Lugar donde se desarrolló el proyecto de tesis:

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

Publicación: Fajardo-Hernández, C. A., Khan, F. S. T., Flores-Bocanegra, L., Prieto-Davó, A., Wan, B., Ma, R., Qader, M., Villanueva-Silva, R., Martínez-Cárdenas, A., López-Lobato, M. A., Hematian, S., Franzblau, S. G., Raja, H. A., García-Contreras, R. & Figueroa, M. Insights into the Chemical Diversity of Selected Fungi from the Tza Itzá Cenote of the Yucatan Peninsula. *ACS Omega* 2022 7, 14, 12171–12185; <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00544>

Presentación en congreso: Carlos A. Fajardo-Hernández, Alejandra Prieto-Davó, Firoz S. Khan, Shabnam Hematian y Mario Figueroa. Chemical Studies of Fungi from Cenotes of the Yucatan Peninsula. *Vanguards of Natural Product Research* 2021, ASP Virtual Meeting (cartel).

Sustentante:



M. en C. Carlos Antonio Fajardo Hernández
Tutor:



Mario Alberto Figueroa Saldívar
Profesor Titular C, TC
Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas (PCQ), UNAM, por mi desarrollo profesional a través de todos estos años, y por permitirme realizar la investigación que comprende este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado a través de la beca (No. CVU: 739587; No. de becario: 596831) para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN222220) de la UNAM y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9145) de la Facultad de Química (FQ), UNAM por los financiamientos otorgados para la realización de este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Mario Figueroa por todas las enseñanzas aprendidas a través de los años, por su confianza, apoyo y paciencia para poder realizar este proyecto, y por impulsarme a mejorar cada día.

A los Dres. Rachel Mata Essayag, Martha Macías Rubalcava y Rogelio Pereda Miranda por sus valiosas aportaciones y consejos mediante todas las evaluaciones tutorales, que indudablemente han enriquecido en gran manera este trabajo.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) por el registro de algunos espectros RMN; al QFB Alejandro Camacho Cruz del Cepario de la FQ, UNAM y al Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las cepas para las evaluaciones antimicrobianas; a la Dra. Alejandra Prieto Davó de la Unidad de Química en SISAL, (FQ, UNAM) Yucatán, por proporcionar los organismos fúngicos y bacterianos objeto de estudio; a los Dres. Nicholas H. Oberlies y Laura Flores Bocanegra de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro (UNCG), Carolina del Norte, EEUU, por el apoyo con el registro de algunos espectros de RMN y EM; y a los Dres. Huzefa A. Raja de la UNCG y Anahí Martínez Cárdenas de la FQ, UNAM, por el apoyo con los análisis taxonómicos de las cepas.

A la Dra.(c) Rubí Yeverino por sus consejos y ánimos, en la cercanía y en la distancia. A la M. en C. Marian López por su confianza y ayuda indispensable al inicio de este proyecto. A la M. en C. Alejandra Arista por su empatía durante esta etapa de mi vida. Al Dr. Rodrigo Villanueva por su compañerismo a lo largo de mis estudios de doctorado. A los antes mencionados por su valiosa amistad y apoyo durante estos tiempos inciertos. Y a todos mis compañeros del Laboratorio 125, del pasado y del presente.

A mi familia por ser mi cimiento y mi protección, especialmente a mi madre por su fortaleza, a mi hermana por siempre estar a mi lado y a mi tía por su generosidad. A Pepe y Jer por acompañarme en este camino y nunca soltarme.

*A la memoria de mi padre, por aspirar a ser tan valiente como él.
Siempre mi ejemplo a seguir.*

ÍNDICE

	Pág.
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Importancia de los productos naturales, caso particular de las fuentes microbianas.	
1.1.1 Cocultivos microbianos y otras estrategias para la obtención de productos naturales novedosos.	4
1.2 La biodiversidad de México con fines de bioprospección.	7
1.2.1 La península de Yucatán.	8
1.3 Productos naturales del género <i>Aspergillus</i> .	10
1.4 Productos naturales del género <i>Stachybotrys</i> .	11
1.5 La resistencia antimicrobiana como problema de salud emergente.	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	
4. PARTE EXPERIMENTAL	16
4.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos.	
4.1.1 Cepas bacterianas.	
4.1.2 Cepas fúngicas.	
4.1.3 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos de estudio.	17
4.2 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de especies fúngicas.	18
4.2.1 Primeros extractos orgánicos a partir de cepas fúngicas.	
4.2.1 Segundos extractos orgánicos a partir de cepas fúngicas.	19
4.3 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir del cocultivo de las especies fúngicas <i>Aspergillus</i> sp. NCA257, <i>Cladosporium</i> sp. NCA273 y <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	20
4.4 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir del cocultivo de las especies <i>Aspergillus</i> sp. NCA276 y bacteria NCA250.	21
4.5 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de especies bacterianas.	
4.6 Procedimientos cromatográficos generales.	22
4.7 Caracterización estructural.	23
4.8 Cristalografía de rayos X del compuesto 1 .	
4.9 Fraccionamientos primarios y obtención de los metabolitos 1–15 .	24
4.9.1 Fraccionamiento primario de los extractos de <i>Aspergillus</i> sp. NCA276 y purificación de los compuestos 1–5 .	
4.9.2 Fraccionamiento primario de los extractos de <i>Aspergillus</i> sp. NCA264 y obtención de los compuestos 6–8 .	27
4.9.3 Fraccionamiento primario del extracto NCA257a <i>Aspergillus</i> sp. y obtención del compuesto 9 .	29
4.9.4 Fraccionamiento primario del extracto NCA252a <i>Stachybotrys</i> sp. y purificación de los compuestos 10–15 .	30
4.10 Estudio químico de los cocultivos entre las especies <i>Aspergillus</i> sp. NCA257, <i>Cladosporium</i> sp. NCA273 y <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	34
4.10.1 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos.	
4.10.2 Obtención de los compuestos 16–18 a partir del extracto NCA257/NCA273 <i>Aspergillus</i> sp./ <i>Cladosporium</i> sp.	35
4.11 Estudio químico del cocultivo entre las especies <i>Aspergillus</i> sp. NCA276 y bacteria NCA250.	36
4.11.1 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos.	
4.11.2 Obtención del compuesto 19 a partir del extracto NCA276d <i>Aspergillus</i> sp.	37
4.11.3 Obtención del compuesto 20 a partir del extracto NCA250 bacteria.	38
4.12 Estudio químico de la cepa bacteriana NCA250.	
4.12.1 Fraccionamiento primario del extracto NCA250c y obtención de cantidades adicionales del producto 20 .	
4.13 Estudio químico de la cepa bacteriana NCA274.	39
4.13.1 Fraccionamiento primario del extracto NCA274 y obtención de los productos 21 y 22 .	
4.14 Evaluaciones biológicas.	41
4.14.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos frente a bacterias ESKAPE.	
4.14.2 Método de estría cruzada.	
4.14.3 Evaluación de la actividad anti- <i>Mycobacterium</i> y citotoxicidad de los compuestos puros.	42
4.15 Análisis por Redes Moleculares.	43
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1 Estudio químico de <i>Aspergillus</i> spp.	

5.1.1 Estudio químico de <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	56
5.1.2 Estudio químico de <i>Aspergillus</i> sp. NCA264.	59
5.1.3 Estudio químico de <i>Aspergillus</i> sp. NCA257	62
5.2 Estudio químico de <i>Stachybotrys</i> sp. NCA252	69
5.3 Estudios de metabolómica de los organismos sujetos a estudio.	70
5.3.1 <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	72
5.3.2 <i>Aspergillus</i> sp. NCA264.	73
5.3.3 <i>Aspergillus</i> sp. NCA257.	74
5.3.4 <i>Stachybotrys</i> sp. NCA252.	76
5.4 Ensayos de cocultivo en placa de Petri entre especies selectas de hongos y bacterias.	78
5.4.1 Ensayos de interacción hongo-hongo.	80
5.4.2 Ensayos de interacción entre bacterias NCA250, NCA274 y las especies fúngicas selectas.	81
5.5 Análisis cromatográfico de los extractos obtenidos de cocultivos entre especies selectas.	82
5.5.1 Cocultivo <i>Aspergillus</i> sp. NCA257/ <i>Cladosporium</i> sp. NCA273.	85
5.5.2 Cocultivo <i>Aspergillus</i> sp. NCA257/ <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	87
5.5.3 Cocultivo <i>Cladosporium</i> sp. NCA273/ <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	89
5.5.4 Cocultivo <i>Aspergillus</i> sp. NCA276/bacteria NCA250.	92
5.6 Caracterización estructural de los productos 16–18 .	94
5.7 Análisis por redes moleculares de los cocultivos entre las especies seleccionadas.	97
5.8 Caracterización de los productos 19 y 20 .	100
5.9 Ensayo de estría cruzada para evaluar el potencial antibacteriano de las bacterias seleccionadas.	101
5.10 Caracterización de los productos 21 y 22 .	102
5.11 Ensayos de actividad antimicrobiana de los compuestos puros.	108
5.11.1 Actividad antimicrobiana frente bacterias ESKAPE.	
5.11.12 Actividad antimicrobiana frente <i>Mycobacterium</i> spp.	
6. CONCLUSIONES	
7. PERSPECTIVAS	
REFERENCIAS	
ANEXOS	

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Línea del tiempo que muestra por década las nuevas clases de antibióticos que se han utilizado en clínica.	2
Figura 2. Ejemplos selectos de PN de origen microbiano.	3
Figura 3. Todas las moléculas pequeñas aprobadas (01 de enero de 1981 - 30 de septiembre de 2019).	4
Figura 4. Ejemplos selectos de metabolitos obtenidos a partir de cocultivos microbianos.	6
Figura 5. Distribución de pares de organismos empleados en cocultivo en la literatura.	7
Figura 6. Estructura del hexahidroacremoniol y el hongo <i>Acremonium massei</i> sobre APD.	10
Figura 7. Ejemplos selectos de metabolitos producidos por el género <i>Aspergillus</i> .	11
Figura 8. Ejemplos representativos de cada familia estructural producidos por <i>Stachybotrys</i> .	12
Figura 9. Ejemplos representativos de tipo triprenil fenol producidos por <i>Stachybotrys</i> .	12
Figura 10. Ubicación geográfica de los cenotes Noh Mozón y Tzá Itzá	16
Figura 11. Organismos fúngicos objeto de estudio y registro digital de los cultivos.	18
Figura 12. Registro digital de los cultivos.	20
Figura 13. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA276a (<i>Aspergillus</i> sp.).	24
Figura 14. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de F ₍₇₋₈₎ [NCA276a (<i>Aspergillus</i> sp.)].	25
Figura 15. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₍₇₋₈₎₋₆ de NCA276a (<i>Aspergillus</i> sp.)	25
Figura 16. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA276b (<i>Aspergillus</i> sp.).	26
Figura 17. Cromatogramas de las separaciones por HPLC preparativo de las fracciones F ₈ (arriba) y F ₆ (abajo) de NCA276b (<i>Aspergillus</i> sp.)	27
Figura 18. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA264a (<i>Aspergillus</i> sp.).	28

Figura 19. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₇ de NCA264a (<i>Aspergillus</i> sp.)	28
Figura 20. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA264b (<i>Aspergillus</i> sp.)	29
Figura 21. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA257a (<i>Aspergillus</i> sp.)	30
Figura 22. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.)	31
Figura 23. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₃ de NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.)	31
Figura 24. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de F ₆ [NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.)].	32
Figura 25. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₆₋₅ de NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.)	32
Figura 26. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de F ₈ [NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.)].	33
Figura 27. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₈₋₆ NCA252 (<i>Stachybotrys</i> sp.)	33
Figura 28. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario de los extractos NCA257/NCA273 (superior), NCA257/NCA276 (en medio), NCA273/NCA276 (inferior).	35
Figura 29. Cromatogramas de las separaciones por HPLC preparativo de las fracciones F ₅ y F ₆ de NCA257/NCA273 (<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Cladosporium</i> sp.)	36
Figura 30. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₉ de NCA257/NCA273 (<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Cladosporium</i> sp.)	36
Figura 31. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA276d (<i>Aspergillus</i> sp.)	37
Figura 32. Cromatogramas de las separaciones por HPLC preparativo de la fracción F ₁ de NCA276d (<i>Aspergillus</i> sp.)	37
Figura 33. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fase orgánica del extracto NCA250b (bacteria).	38
Figura 34. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA250c (bacteria).	39
Figura 35. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA274 (bacteria).	40
Figura 36. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F ₅ del extracto NCA274 (bacteria)	40
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (1).	45
Figura 38. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 1–5.	46
Figura 39. Espectro de HSQC (CDCl ₃) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (1).	47
Figura 40. Espectro de HMBC (CDCl ₃) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (1).	48
Figura 41. Espectro de COSY (CDCl ₃) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (1).	48
Figura 42. Espectro de NOESY (CDCl ₃) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (1).	49
Figura 43. (a) Cristal obtenido a partir del compuesto 1 (b) Gráfica de desplazamiento elipsoidal (50% de probabilidad) a 100(2) del compuesto 1.	49
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto aspergilina PZ (2).	51
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H y ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto aspoalasinina D (3).	53
Figura 46. Patrón de fragmentación por HRESIMS ² del producto asperfenamato (4).	54
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) del producto asperfenamato (4).	54
Figura 48. Espectro de RMN ¹ H y ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto 2-O-metilbutirolactona II (5).	55
Figura 49. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 6–8.	56
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H (MeOD- <i>d</i> ₄ , 700 MHz 6; CDCl ₃ , 400 MHz 7) de los productos ácido 11-dihidrosidónico (6) y ácido sidónico (7).	57
Figura 51. Espectro de RMN ¹³ C (MeOD- <i>d</i> ₄ , 175 MHz 6; MeOD- <i>d</i> ₄ , 100 MHz 7) de los productos ácido 11-dihidrosidónico (6) y ácido sidónico (7).	58
Figura 52. Correlaciones observadas para los carbonos C-2 y C-5 en el espectro de HMBC del compuesto 6.	58
Figura 53. Espectro de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto diorcinol (10).	59
Figura 54. Espectro de HRESIMS y perfil de UV del producto 9.	60
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del producto éter dimetilico del asterriquinol D (9).	61
Figura 56. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 10–15.	63
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H y ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto O-metilmeleína (10).	64

Figura 58. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del producto atranona A (11) y espectros de RMN ¹ H y ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto atranona B (12).	65
Figura 59. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) del producto acetato de stachybotrólida (13).	67
Figura 60. Análisis comparativo entre los espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de los productos acetato de stachybotrólida (13), acetato de stachybotrydial (14) y stachybotrólida (15).	68
Figura 61. RM del extracto NCA276 <i>Aspergillus</i> sp. con MolNetEnhancer.	71
Figura 62. RM del extracto NCA264 <i>Aspergillus</i> sp. con MolNetEnhancer.	73
Figura 63. RM del extracto NCA257 <i>Aspergillus</i> sp. con MolNetEnhancer.	74
Figura 64. RM del extracto NCA252 <i>Stachybotrys</i> sp. con MolNetEnhancer.	75
Figura 65. Cocultivo en caja de Petri de las especies <i>Aspergillus</i> sp. NCA257 y <i>Cladosporium</i> sp. NCA273.	77
Figura 66. Cocultivo en caja de Petri de las especies <i>Aspergillus</i> sp. NCA257 y <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	77
Figura 67. Cocultivo en caja de Petri de las especies <i>Cladosporium</i> sp. NCA273 y <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	78
Figura 68. Cocultivo en caja de Petri de la bacteria NCA250 frente especies <i>Cladosporium</i> sp. NCA273 y <i>Aspergillus</i> spp. NCA257 y NCA276.	79
Figura 69. Cocultivo en caja de Petri de la bacteria NCA274 frente especies <i>Cladosporium</i> sp. NCA273 y <i>Aspergillus</i> spp. NCA257 y NCA276.	80
Figura 70. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo <i>Aspergillus</i> sp./ <i>Cladosporium</i> sp. (NCA257/NCA273) y sus respectivos monocultivos.	80
Figura 71. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo <i>Aspergillus</i> sp./ <i>Aspergillus</i> sp. (NCA257/NCA276) y sus respectivos monocultivos.	81
Figura 72. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo <i>Cladosporium</i> sp./ <i>Aspergillus</i> sp. (NCA273/NCA276) y sus respectivos monocultivos.	81
Figura 73. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo bacteria NCA250/ <i>Aspergillus</i> sp. (NCA250/NCA276) y sus respectivos monocultivos.	82
Figura 74. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 16 y 17 .	83
Figura 75. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 y 100 MHz) de los productos ácido penicílico (16) y ácido 5,6-dihidropenicílico (17).	84
Figura 76. Espectros de HRESIMS y perfil de UV del producto 18 .	84
Figura 77. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del producto 3-isobutil-6-(1-hidroxi-2metilpropil)-2(1 <i>H</i>)-pirazinona (18).	85
Figura 78. RM de los extractos NCA257 (<i>Aspergillus</i> sp.) en amarillo, NCA273 (<i>Cladosporium</i> sp.) en rojo y su respectivo cocultivo en naranja; NCA276 (<i>Aspergillus</i> sp.) en cian y su cocultivo con NCA257 en verde.	86
Figura 79. Estructura obtenida de la difracción de rayos X del monocristal obtenido del producto 19 y espectros de HRESIMS y perfil de UV del producto 19 .	88
Figura 80. Espectros de HRESIMS y perfil de UV del producto 20 . Patrón de fragmentación observado para el producto 20 por HRESIMS.	89
Figura 81. Resultados del ensayo de actividad antimicrobiana (estría cruzada) de las bacterias NCA250, NCA258 y NCA271 contra: a) <i>E. coli</i> , b) <i>S. typhi</i> , c) <i>P. aeruginosa</i> , d) <i>S. aureus</i> , e) <i>B. subtilis</i> y f) <i>C. albicans</i> .	90
Figura 82. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) del producto actinomicina D (20).	91
Figura 83. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 21 y 22 .	92
Figura 84. Espectro de RMN ¹ H (MeOD- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) del producto 2,5-dihidroxicinamato de metilo (21).	93
Figura 85. Espectro de RMN ¹ H (MeOD- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) del producto ácido <i>N</i> -acetil antranílico (22).	93

Lista de Tablas

Tabla 1. Características del aislamiento de las cepas bacterianas.	Pág. 16
Tabla 2. Características del aislamiento de las cepas fúngicas.	17
Tabla 3. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (primer extracto).	19
Tabla 4. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (segundo extracto).	19
Tabla 5. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (mediana escala).	21
Tabla 6. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos de los organismos <i>Aspergillus</i> sp. (NCA276) y bacteria (NCA250).	21

Tabla 7. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (mediana escala).	22
Tabla 8. Fraccionamiento primario del extracto NCA276a (<i>Aspergillus</i> sp.).	24
Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción F ₍₇₋₈₎ del extracto NCA276a (<i>Aspergillus</i> sp.).	25
Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto NCA276b (<i>Aspergillus</i> sp.).	26
Tabla 11. Fraccionamiento primario del extracto NCA264 (<i>Aspergillus</i> sp.).	27
Tabla 12. Fraccionamiento primario del extracto NCA264b (<i>Aspergillus</i> sp.).	28
Tabla 13. Fraccionamiento primario del extracto NCA257a (<i>Aspergillus</i> sp.).	29
Tabla 14. Fraccionamiento primario del extracto NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.).	30
Tabla 15. Fraccionamiento secundario de la fracción F ₆ del extracto NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.).	31
Tabla 16. Fraccionamiento secundario de la fracción F ₈ del extracto NCA252a (<i>Stachybotrys</i> sp.).	33
Tabla 17. Fraccionamiento primario de los extractos NCA257/NCA273 (superior), NCA257/NCA276 (en medio), NCA273/NCA276 (inferior).	34
Tabla 18. Fraccionamiento primario del extracto NCA276d (<i>Aspergillus</i> sp.).	37
Tabla 19. Fraccionamiento primario del extracto NCA250c (bacteria).	39
Tabla 20. Fraccionamiento primario del extracto NCA274 (bacteria).	40
Tabla 21. Datos cristalográficos y colección de parámetros para el compuesto 17-desoxi-aspergilina PZ (1).	50
Tabla 22. Datos espectroscópicos de los compuestos 1–3 (CDCl ₃).	52
Tabla 23. Datos espectroscópicos de los compuestos 4 y 5 (CDCl ₃).	55
Tabla 24. Datos espectroscópicos de los compuestos 6–8.	59
Tabla 25. Datos espectroscópicos del compuesto 9 (CDCl ₃).	62
Tabla 26. Datos espectroscópicos de los compuestos 10–12 (CDCl ₃).	64
Tabla 27. Datos espectroscópicos de los compuestos 13–15 (CDCl ₃).	68
Tabla 28. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de <i>Aspergillus</i> sp. NCA276.	70
Tabla 29. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de <i>Aspergillus</i> sp. NCA264.	72
Tabla 30. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de <i>Stachybotrys</i> sp. NCA252.	76
Tabla 31. Datos espectroscópicos de los compuestos 16–18 (CDCl ₃).	85
Tabla 32. Anotaciones realizadas a partir de la RM de <i>Cladosporium</i> sp. NCA273 y <i>Aspergillus</i> spp. NCA257 y NCA276 y sus respectivos cocultivos.	87
Tabla 33. Actividad antimicrobiana en el ensayo de estría cruzada.	90
Tabla 34. Datos espectroscópicos del compuesto 20 (CDCl ₃).	91
Tabla 35. Datos espectroscópicos de los compuestos 21 y 22 (MeOD- <i>d</i> ₄)	94
Tabla 36. Resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos puros (% de inhibición del crecimiento).	96
Tabla 37. Resultados de la evaluación anti- <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv de los compuestos aislados.	97
Tabla 38. Resultados de la evaluación antimicobacteriana frente cepas no tuberculosas de los compuestos que mostraron >90% de inhibición a 50 µg/mL vs <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv en MABA.	98

Lista de Símbolos y Abreviaturas

°C	Grado Celsius	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
¹³ C	Carbono 13	HRESIMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución por Ionización Electrospray
¹ H	Hidrógeno	HSQC	Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple
A	Absorbancia	Hz	Hertz
Å	Armstrong	IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
a. C.	Antes de Cristo	IDH	Índice de deficiencia de hidrógeno
A1	Medio marino	ISP2	Medio del Proyecto Internacional de <i>Streptomyces</i> No. 2
AcOEt	Acetato de etilo	ITS	Espaciador transcrito interno
ADN	Ácido desoxirribonucleico	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
APD	Agar papa dextrosa	km ²	Kilómetros cuadrados
ASB	Albúmina sérica bovina	L	Litro
ATCC	American Type Culture Collection	λ	Longitud de onda
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	LORA	Ensayo de recuperación frente a condiciones anoxigénicas
Ca ²⁺	Ion calcio	m	Metro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	m	Señal múltiple
CF	Cromatografía flash	<i>m/z</i>	Relación masa carga
CHCl ₃	Cloroformo	Ma	Millones de años en tiempos geológicos
cm	Centímetro	MABA	Ensayo en Placa de Azul de Alamar
CMI	Concentración mínima inhibitoria	MeCN	Acetonitrilo
COSY	Espectroscopía de Correlación	MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
COVID-19	Enfermedad por coronavirus de 2019	MeOH	Metanol
CuKα	Radiación CuK-α	MeOH- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
cx	Cicloheximida	Mg ²⁺	Ion magnesio
δ	Desplazamiento químico	mg	Miligramo
d	Señal doble	MHz	Megahertz
Da	Dalton	min	Minuto
dd	Señal doble duplicada	mL	Mililitro
DMSO	Dimetil sulfóxido	mm	Milímetro
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético	mM	Milimolar
ERV	<i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina	MS/MS, MS ²	Espectrometría de masas en tándem
ESKAPE	Acrónimo para bacterias de interés clínico	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
F	Fracción	μg	Microgramo
FBS	Suero fetal bovino	μL	Microlitro
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos	μM	Micromolar
g	Gramo	μm	Micrómetro
GL	Grados de libertad	Na	Sodio
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking	NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Gram(-)	Gram negativo	ng	Nanogramo
Gram(+)	Gram positivo	nm	Nanómetro
h	Hora	nM	Nanomolar
H ₂ CO ₂	Ácido fórmico	NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser
H ₂ O	Agua	NRPS	Peptido sintasa no ribosomal
HBSS	Solución salina balanceada de Hank	OMS	Organización Mundial de la Salud
HCO ₃ ⁻	Ion bicarbonato	OSMAC	Una cepa, varios compuestos
HCOO ⁻	Ion formiato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
hept	Señal septuple	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
hex	Señal sextuple	pH	Potencial de hidrógeno
HMBC	Conectividad Heteronuclear a Enlaces Múltiples	PKS	Policétido sintasa
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A	PN	Producto natural

ppm	Partes por millón	sp ²	Hibridación sp ²
q	Señal cuádruple	SiO ₂	Gel de sílice
RAM	Resistencia antimicrobiana	sp ³	Hibridación sp ³
rf	Rifampicina	spp.	Especies
RM	Red molecular	t	Señal triple
RMN	Resonancia magnética nuclear	t _R	Tiempo de retención
rpm	Revoluciones por minuto	TZP	Piperacilina-tazobactam
s	Segundo	UFC	Unidades formadoras de colonia
s	Señal simple	uma	Unidad de masa atómica
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina	UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina	UNCG	Universidad de Carolina del Norte en Greensboro
SMTP	Triprenil fenoles de <i>Stachybotrys microspora</i>	UV	Ultravioleta
sp.	Especie	YEPD	Medio extracto de levadura peptona dextrosa

RESUMEN

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinario que tiene la finalidad de descubrir metabolitos bioactivos a partir de fuentes microbianas. En esta investigación se realizó el estudio químico de una serie de hongos y bacterias provenientes de cenotes de la península de Yucatán. Estos hábitats fueron seleccionados debido a sus características ambientales y químicas únicas en el mundo, lo que favorece la presencia de organismos inusuales y/o con capacidades metabólicas desconocidas.

Así, el estudio químico de una serie de hongos cultivables (*Aspergillus* spp. NCA257, NCA264 y NCA276, *Stachybotrys* sp. NCA252, y *Cladosporium* sp. NCA273) permitió el aislamiento de 19 metabolitos de diferentes clases químicas. La configuración absoluta del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**) producido por el hongo *Aspergillus* sp. NCA276 se estableció mediante análisis de difracción de rayos X. Además, se estableció el potencial antimicrobiano de estos productos contra una serie de patógenos del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 sensible a vancomicina, *E. faecalis* ATCC 51299 resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sensible a meticilina, *S. aureus* ATCC resistente a meticilina, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* aislado clínico no. 564 resistente a multifármacos, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, y *Enterobacter cloacae* ATCC 700323) y cepas de *Mycobacterium* (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. marinum* ATCC 927, *M. avium* ATCC 15769, y *M. kansasii* ATCC 12478).

Por otra parte, se realizaron experimentos de cocultivos entre hongos los cuales permitieron aumentar el rendimiento de algunos productos, así como apreciar las diferencias metabólicas entre los organismos cuando son cultivados de manera individual y en conjunto. Entre los productos detectados *de novo*, se lograron identificar al ácido 5,6-dihidropenicílico (**17**) y 3-isobutil-6-(1-hidroxi-2-metilpropil)-2(1*H*)-pirazinona (**18**) en los cocultivos de los *Aspergillus* sp. NCA257 y *Cladosporium* sp. NCA273.

En cuanto al estudio de bacterias de la región, se determinó su potencial antimicrobiano mediante el ensayo de estría cruzada. El estudio químico de algunas cepas seleccionadas a partir de los resultados del ensayo anterior permitió el aislamiento de tres metabolitos secundarios.

Finalmente, se realizaron los estudios de metabolómica de los organismos fúngicos mediante el análisis de sus espectros de MS-MS/MS y redes moleculares a través de la plataforma GNPS. Dichos análisis permitieron visualizar la diversidad química de los extractos mediante la anotación de compuestos adicionales, además de enriquecer las bases de datos del GNPS.

ABSTRACT

This work belongs to a multidisciplinary research project aimed at discovering bioactive metabolites from microbial sources. This investigation involved the chemical study of a series of fungi and bacteria obtained from cenotes in the Yucatan Peninsula. These habitats were selected due to their unique environmental and chemical features, which allows the presence of rare organisms and/or with unknown biological and metabolic capabilities.

Thus, the chemical study of a series of culturable fungi (*Aspergillus* spp. NCA257, NCA264 and NCA276, *Stachybotrys* sp. NCA252, and *Cladosporium* sp. NCA273) led to the isolation of 19 metabolites of different chemical classes. The absolute configuration of the product 17-deoxyaspergillin PZ (**1**) isolated from *Aspergillus* sp. NCA276 was established via single-crystal X-ray crystallography. In addition, the antimicrobial potential of these products against several pathogens of the ESKAPE group was established (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 vancomycin-susceptible, *E. faecalis* ATCC 51299 vancomycin-resistant, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 methicillin-susceptible, *S. aureus* ATCC methicillin-resistant, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* aislado clínico no. 564 clinical isolate no. 564 multidrug resistant, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Enterobacter cloacae* ATCC 700323) and *Mycobacterium* strains (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. marinum* ATCC 927, *M. avium* ATCC 15769, y *M. kansasii* ATCC 12478).

On the foreground, coculture experiments were carried out among fungi, which improved the yield of some compounds and made it possible to appreciate the metabolic differences between the organisms when cultured individually and as a group. Among the products identified *de novo*, 5,6-dihydropenicilic acid (**17**) and 3-isobutyl-6-(1-hydroxy-2-methylpropyl)-2(1H)-pyrazinone (**18**) were identified in the coculture of *Aspergillus* sp. NCA257 and *Cladosporium* sp. NCA273.

As for the study of bacteria from the area, their antimicrobial potential was determined based on the cross-strain assay. The chemical study of some strains selected from the results of the previous assay allowed the isolation of 3 secondary metabolites.

Finally, metabolomic studies based on molecular networking analyses of MS-MS/MS data of each fungal extract were also performed through the GNPS platform. These analyses were used as a tool for the annotation of additional compounds as well as to enhance the GNPS database.

1. ANTECEDENTES

1.1 Importancia de los productos naturales, caso particular de las fuentes microbianas.

Los productos naturales (PN) han evolucionado a través de millones de años y adquirido una diversidad química única, la cual resulta como consecuencia de la heterogeneidad en sus actividades biológicas y farmacológicas.¹

Esta clase de recursos han estado presentes en la historia de la humanidad desde tiempos muy antiguos, como se puede constatar en los registros de escritura cuneiforme en tabletas de arcilla en Mesopotamia y que datan cerca del año 2600 a. C. Entre las sustancias que se encuentran descritas están los aceites de especies vegetales como *Cedrus* spp. (cedro), *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (regalíz), *Commiphora* spp. (mirra) y *Papaver somniferum* (jugo de amapola), los cuales se siguen utilizando en la actualidad para el tratamiento de distintos padecimientos (tos, fiebre, infecciones por parásitos, inflamación, etc.). Por otra parte, textos como la Materia Médica China han sido documentados extensivamente a través de los siglos, con registros desde el año 1100 a. C. (Wu Shi Er Bing Fang, contiene 52 prescripciones), seguido por trabajos tales como el Herbolario Shennong (~100 a. C.).^{2,3} En todos estos ejemplos, los PN han sido empleados como parte de la medicina tradicional, en particular como los componentes activos de remedios herbolarios.

Para inicios del año 1900, aproximadamente el 80% de todos los medicamentos eran obtenidos a partir de fuentes vegetales.⁵ El hito que marcó la diferencia en esta tendencia fue el descubrimiento de la penicilina producida por *Penicillium rubens*, por Alexander Fleming en 1928, y posteriormente su purificación por Norman Heatley, Howard Florey, Ernst Chain y colaboradores en Oxford, los cuales fueron fundamentales para su desarrollo farmacéutico.⁶⁻⁸ Con ello, el interés por el estudio de las fuentes microbianas se elevó y posteriormente con el inicio de la edad de oro de los antibióticos, cuya cúspide fue a mediados de la década de 1950 (**Figura 1**).⁹ De hecho, el descubrimiento rápido y relativamente fácil de múltiples clases de PN (y sus derivados) con actividad antimicrobiana durante un período relativamente corto condujo al uso excesivo de estos medicamentos.⁹ De manera paralela, el primer estudio sistemático sobre metabolitos fúngicos fue iniciado poco después de la Primera Guerra Mundial por Harold Restrick, y en el transcurso de las siguientes cuatro décadas realizó una contribución importante para el reconocimiento de los hongos como una fuente principal de PN.¹⁰

Por otro lado, las bacterias han demostrado ser un recurso particularmente prolífico donde un grupo pequeño de taxa ha acuñado una gran variedad de compuestos descubiertos. Por ejemplo, de las 53 divisiones (phyla) bacterianas, sólo 5 han sido descritas como productores de agentes anti-infecciosos.¹¹ Y dentro de éstas, la clase Actinobacteria, más específicamente los organismos

pertenecientes al orden Actinomycetales, han aportado aproximadamente 7 000 de los compuestos descritos en la base de datos Dictionary of Natural Products. De hecho, el género *Streptomyces* es productor del 80% de todos los PN provenientes de actinobacterias.¹² El primer antibiótico descubierto en Actinobacteria fue la actinomicina a partir de un cultivo de *S. antibioticus* en 1940,¹³ estreptotricina de *S. lavendulae* en 1942¹⁴ y estreptomycinina de *S. griseus* en 1944,¹⁵ todos ellos descubiertos por Waskman y colaboradores.¹⁶

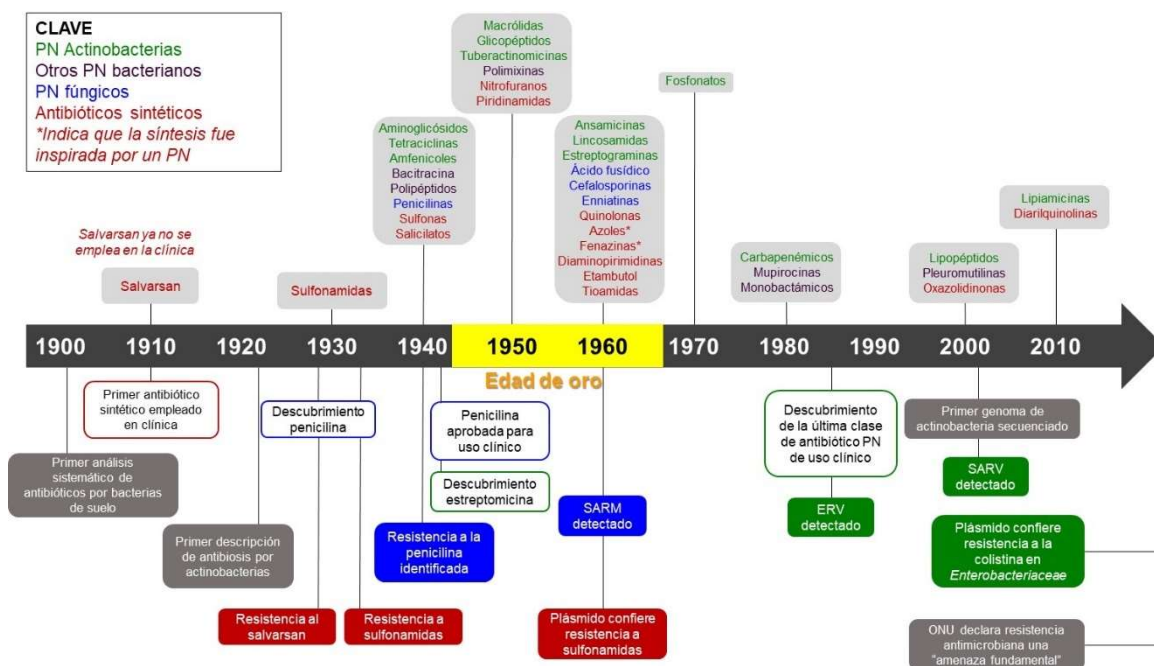


Figura 1. Línea del tiempo que muestra por década las nuevas clases de antibióticos que se han utilizado en clínica. Los antibióticos están coloreados por su fuente de obtención: verde - actinobacterias, morado - otras bacterias, azul - hongos y rojo - sintéticos. En la parte inferior se encuentran datos clave en el descubrimiento de antibióticos y la resistencia antimicrobiana, incluyendo el primer registro de cepas resistentes: *S. aureus* resistente a metilicina (SARM), *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV), *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) y la resistencia a la colistina conferida por plásmidos en Enterobacteriaceae. (Adaptado de Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. ⁹)

Hoy en día los PN de origen microbiano son fuente de obtención de la mayoría de los antibióticos que se encuentran en el mercado (por ejemplo, las penicilinas de *Penicillium* sp., las cefalosporinas de *Cephalosporium acremonium* y los aminoglucósidos tetraciclinas de Actinomycetales), y no únicamente en cuanto a esta clase de medicamentos sino también de agentes anticancerígenos (como el ácido torreyánico de *Pestalotopsis microspora* y la staurosporina de *Lentzea albida*), inmunosupresores (de tipo ciclosporinas y tacrolimus, de *Trichoderma* sp. y *Streptomyces tsukubaensis*, respectivamente), antivirales, antihelmínticos (el caso de las ivermectinas de *Streptomyces* sp.), inhibidores de enzimas (como la lovastatina de *Aspergillus* spp. y *Monascus* spp.), nutracéuticos, polímeros (el ácido itacónico de *A. terreus*), surfactantes, bioherbicidas (por ejemplo, el bialafos de *S. viridochromogenes*), entre otros (**Figura 2**).¹⁷⁻²¹

Por mencionar algunos ejemplos, cerca de la mitad de los antibióticos son producidos por actinobacterias, 10-15% por bacterias no filamentosas y 20% por hongos filamentosos. Sin embargo, las investigaciones en los últimos 20 años han disminuido significativamente como consecuencia de distintos factores, entre los cuales se encuentra la falta de interés de la industria farmacéutica y la fuerte competencia con las colecciones de compuestos de origen sintético como fuente de compuestos líder.¹⁷ En años recientes, distintos avances científicos y tecnológicos (incluyendo la optimización de técnicas analíticas, estrategias de ingeniería y minería genómica y los avances en técnicas de cultivo) están resolviendo muchos desafíos y abriendo el camino a nuevas oportunidades. Como consecuencia, el interés en los PN como fármacos potenciales está siendo revitalizado, particularmente para subsanar la resistencia antimicrobiana y cáncer.²²

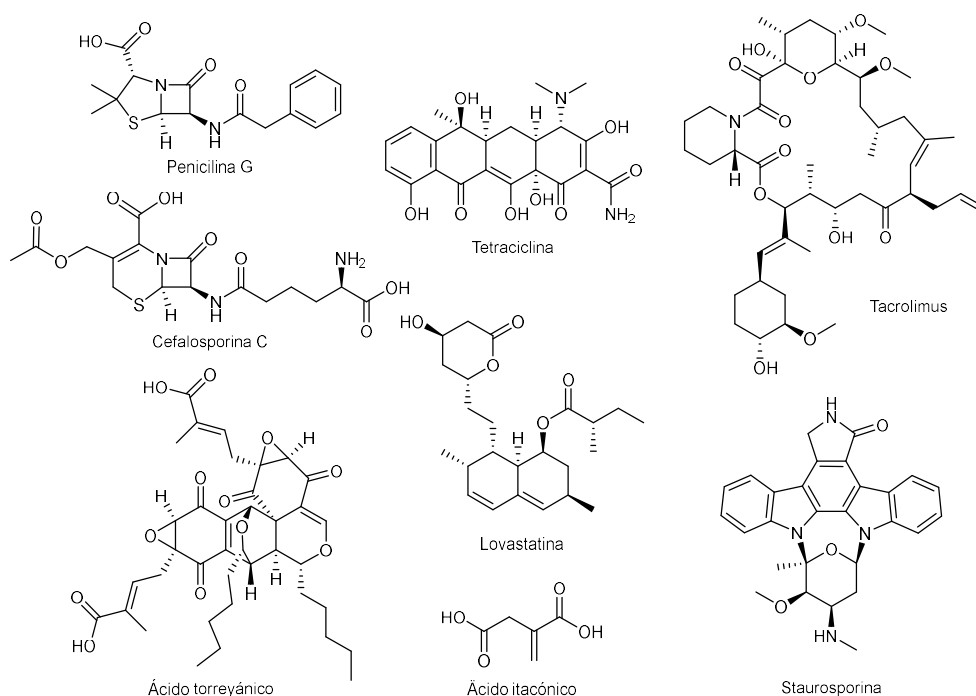


Figura 2. Ejemplos selectos de PN de origen microbiano de importancia.

Por las razones expuestas previamente, los PN representan una de las principales fuentes de inspiración para el desarrollo de fármacos. Newman y Cragg han realizado una serie de revisiones a través del tiempo sobre el papel que desempeñan los PN dentro de los fármacos aprobados por la FDA. En ellas se observa que, en un periodo de 38 años (01 de enero de 1981 a 30 de septiembre de 2019), los PN provenientes de todas las fuentes, las estructuras derivadas de ellos o las que poseen un farmacóforo proveniente de algún PN, han sido cruciales para el progreso de la medicina contemporánea, resultando en un número significativo de moléculas pequeñas aprobadas anualmente en todo el mundo, donde estas representan un 32% (S*, S*/NM, y S/NM; ver códigos en **Figura 3**). Por ejemplo, en el caso de los fármacos para el tratamiento de cáncer, durante el periodo de tiempo de 1946 a 1980, de las 75 moléculas pequeñas para este padecimiento, 40 (53.3%) fueron

desarrolladas basadas en PN y este porcentaje puede aumentar a 64.9% si se toman en cuenta a los derivados sintéticos inspirados en estas fuentes. Así también, en el periodo de 1981 a 2019, de las moléculas pequeñas aprobadas para esta indicación terapéutica (185 que equivalen al 100%), 75 (41%) de ellas fueron desarrolladas tomando a los PN como inspiración, en contraste con las 29 (15.7%) que fueron clasificadas por su origen sintético.²³

De manera adicional, la influencia de las estructuras propias de los PN no ha disminuido sustancialmente en los últimos cinco años en cuanto a los medicamentos aprobados que se basan originalmente en tales estructuras, en contraste con la reducción de programas de descubrimiento de fármacos basados en PN por parte de las grandes industrias farmacéuticas.²³

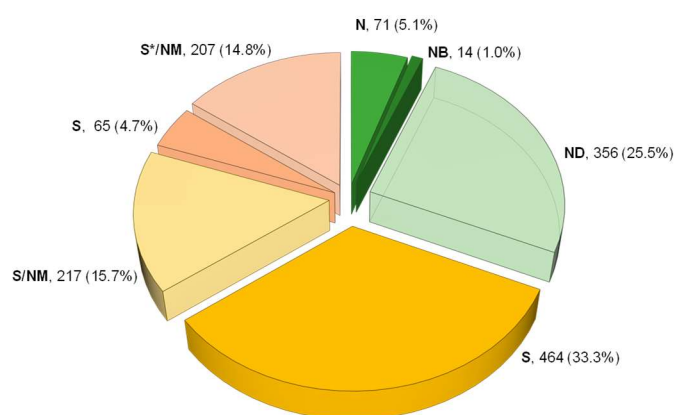


Figura 3. Todas las moléculas pequeñas aprobadas (01 de enero de 1981 - 30 de septiembre de 2019); $n = 1394$. Códigos: **N**: PN inalterado; **NB**: Droga botánica (composición definida); **ND**: Derivado de PN; **S**: Fármaco de origen sintético; **S***: Fármaco de origen sintético que posee un farmacóforo de PN; **/NM**: Mimetiza la acción de un PN. Adaptado de Newman y Cragg.²³

1.1.1 Cocultivos microbianos y otras estrategias para la obtención de productos naturales novedosos.

La necesidad de encontrar compuestos novedosos y útiles para subsanar varios aspectos de la condición humana es cada vez mayor. La resistencia a los agentes antimicrobianos, la aparición de nuevos virus, los problemas de salud recurrentes en personas con trasplantes de órganos, así como las enfermedades crónico-degenerativas y el gran incremento en la incidencia de infecciones fúngicas a nivel mundial solo ponen en evidencia la insuficiencia para hacer frente a estas problemáticas. Aunado a ello, la degradación ambiental, la pérdida de la biodiversidad y el deterioro de los recursos naturales añaden un gran factor de dificultad para solucionar las problemáticas que afectan la humanidad.²⁴ Debido a ello, es necesario desarrollar diferentes estrategias para el descubrimiento de nuevos PN.

En específico para los PN de origen microbiano, a medida que nos adentramos al siglo XXI y con la llegada de la secuenciación del genoma, se ha alcanzado el inicio de una segunda edad de oro para

el descubrimiento de fármacos. El análisis del creciente número de genomas fúngicos revela dos aspectos de interés: en primer lugar, el descubrimiento de un gran número de genes por análisis bioinformáticos basados en los genes altamente conservados (PKS y NRPS), involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios de manera putativa, y en segundo lugar, la mayoría de estos genes se localizan en clústeres, por lo que gracias a la identificación de clústeres de genes biosintéticos no conocidos, estos podrían ser extraídos de la gran cantidad de genomas publicados.²⁵⁻²⁶

Con esta información, se podría aseverar que un microorganismo puede producir hasta 50 metabolitos secundarios diferentes y se estima que, de los 23 000 compuestos activos de origen microbiano, 42% son producidos por hongos y 32% por actinobacterias.¹¹ Por ejemplo, a partir de los metabolitos de la familia Streptomycetaceae se han desarrollado cerca de 200 fármacos, los cuales se encuentran en ensayos clínicos o aprobados por la FDA.^{27,28}

El verdadero potencial biosintético de los microorganismos aún queda por ser determinado. Los principales desafíos que limitan el acceso a aquellos compuestos potencialmente novedosos básicamente son dos: la incapacidad de cultivar algunos de los productores más interesantes en el laboratorio²⁹ y la percepción de que la mayoría de los clústeres de genes biosintéticos se encuentran silenciados bajo condiciones estandarizadas.³⁰ Por otra parte, se ha observado una aportación considerable en el desarrollo de técnicas de cultivo para develar aquellas vías metabólicas en hongos, sin embargo, en cuanto a las bacterias permanece en su infancia.²⁸

Las metodologías exitosas para inducir la producción de metabolitos novedosos incluyen la ingeniería genética,³¹ mutagénesis, el enfoque OSMAC (el cultivo de la misma cepa en diferentes medios de cultivo),²⁵ o el tratamiento con modificadores epigenéticos.^{32,33} En contraste con estos métodos, los cocultivos entre microorganismos: bacteria-bacteria, hongo-hongo o bacteria-hongo representan un enfoque guiado por la naturaleza, mimetizando las condiciones fisiológicas de competencia biótica y comunicación existentes en sus hábitats de origen.³⁴

En la naturaleza, los microorganismos crecen en ambientes con distintas características, la mayoría de las veces hostiles y en constante competencia, así como se encuentran en tejidos vegetales, rizosfera, suelo, agua, fluidos humanos y tejidos. Las interacciones entre microorganismos conducen a la activación de mecanismos de regulación complejos, los cuales resultan en la biosíntesis de PN altamente diversos, tales como feromonas, moléculas de defensa y metabolitos involucrados en asociaciones simbióticas.³⁵⁻³⁷ Estos compuestos podrían poseer un papel de moléculas de señalización, comunicación y respuestas fenotípicas, sin embargo, existen pocos estudios que han resaltado la relación compleja que existe entre los microorganismos, al día de hoy se tiene poco entendimiento de estas relaciones.³⁸ Algunos de los primeros trabajos que describieron este tipo de metodologías fueron: un cocultivo de dos bacterias (*Rhodococcus fascians* y *Streptomyces padanus*)

que condujo a la obtención de las rhodostreptomocinas A y B realizado por el grupo de trabajo de Sinsky y colaboradores³⁹ y la obtención de las emericelamidas A y B, a partir un cocultivo de *Emericella* sp. con *Salinispora arenicola* (hongo-bacteria) por Fenical y colaboradores.⁴⁰ Finalmente, observando estos experimentos como modelo, el grupo de trabajo conformado por Samuel Bertrand y Jean-Luc Wolfender fue pionero en el cocultivo de dos organismos fúngicos,³⁵ obteniendo así el metabolito 4"-hidroxisulfoxi-2,2"-dimetilielavina P (un trímero sustituido del ácido 3,5-dimetilorselínico) como producto del cocultivo de *Trichophyton rubrum* y *Bionectria ochroleuca*, entre otros. Estos ejemplos se pueden visualizar en la **Figura 4**.

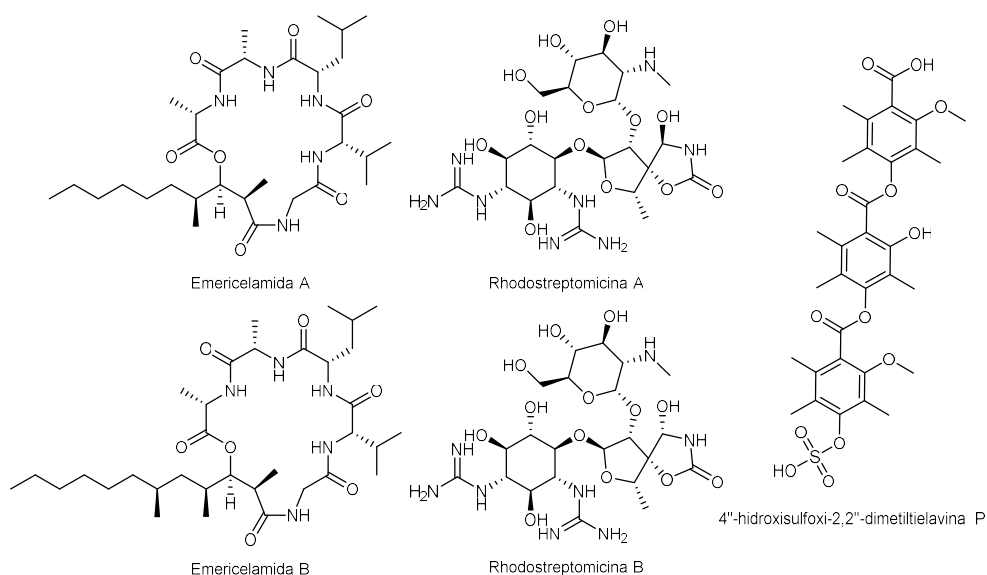


Figura 4. Ejemplos selectos de metabolitos obtenidos a partir de cocultivos microbianos.

Basado en este tipo de interacciones, se han obtenido PN de naturaleza diversa: policétidos, macrólidas, terpenoides, derivados de ácidos grasos, péptidos cíclicos, dicetopiperazinas, péptidos no ribosomales, alcaloides derivados de bencilamina, fenazina y triptamina y compuestos nitrogenados de naturaleza no alcaloidea por mencionar algunos.⁴¹ Haciendo énfasis en los trabajos previamente realizados, la mayoría tienen en común que la selección de organismos por competir fue hecha con base en su nicho ecológico (aunque algunas veces se considera que las interacciones irrelevantes a nivel ecológico pueden estresar a los organismos en mayor proporción). De 82 publicaciones, la tendencia predominante fue el cocultivo entre hongos (65), seguidos de bacterias (47) y muy pocos empleando microalgas. Aunado a ello, la mayoría de los trabajos demuestran una relación de competencia específica al reino de cada organismo (hongo-hongo o bacteria-bacteria) como se observa en el gráfico de la **Figura 5**.⁴¹

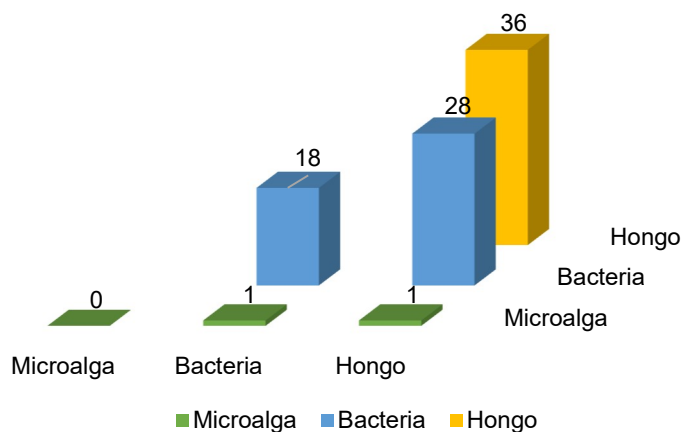


Figura 5. Distribución de pares de organismos empleados en cocultivo en la literatura, adaptado de Arora y colaboradores.⁴¹

1.2 La biodiversidad de México con fines de bioprospección.

México se considera un país megadiverso en cuanto a grupos de organismos, ocupando el quinto lugar en el mundo por su gran número de especies y endemismos, contribuyendo con el 10% de la diversidad terrestre del planeta. Su situación geográfica, así como su accidentada topografía con variedad de altitudes y climas han contribuido a formar un mosaico de condiciones ambientales y microambientes que promueven una gran variedad de hábitats y formas de vida, lo que confiere a México una elevada diversidad biológica.⁴² Para obtener un inventario aproximado de las especies fúngicas y bacterianas se ha optado por el análisis de datos emergentes de estudios en zonas tropicales, y la secuenciación de muestras ambientales a gran escala, las cuales tienen el potencial de enriquecer un modelo más robusto.⁴³ Por lo tanto, los datos en distribución biogeográfica, niveles de endemismo y especificidad de los organismos hospederos son tomados en cuenta cuando se desarrollan estimaciones acerca de la diversidad fúngica global.⁴⁴

Por consiguiente, se estima la existencia de 2.2 – 3.8 millones de especies de hongos, de las cuales actualmente se reconocen 135 000 especies aproximadamente, lo cual representa sólo el 8% del número estimado y en el peor de los escenarios solo el 3% se encuentran catalogadas.⁴⁵ En cuanto al inventario de las especies fúngicas en nuestro país y empleando distintos métodos de aproximación, Guzmán en 1998 estimó que existen alrededor de 200 000 especies de hongos. De estas se conocen únicamente el 3.5%, a pesar del trabajo exhaustivo que se ha realizado en las últimas décadas.⁴⁶

En el caso de las especies bacterianas, un estudio del año 2005 estableció que existen aproximadamente un millón de especies en 30 gramos de una rica capa de suelo forestal y por ende, existen al menos mil millones de especies en todo el mundo.⁴⁷ Existen pocos estudios en cuanto a la diversidad de bacterias en nuestro país, tan solo en un estudio realizado a partir de muestras de

sedimentos colectados en el Cinturón Plegado Perdido, al norte del Golfo de México y en la bahía sureste de Campeche, mediante la secuenciación de ADN genómico, fueron identificados 3 155 géneros diferentes agrupados en 917 familias.⁴⁸

Por esos motivos, los científicos de PN de origen microbiano son llevados a indagar las fuentes más inusuales para el estudio de especies con características únicas para el desarrollo y descubrimiento de compuestos bioactivos. Las investigaciones realizadas sobre el genoma de las especies identificadas sugieren que el 80% del metaboloma secundario permanece desconocido, resaltando la gran proporción de compuestos en espera de ser descubiertos.⁴⁹ A la fecha, más de 100 PN bioactivos a partir de 20 hongos provenientes de distintos ecosistemas de México han sido documentados en bases de datos especializadas, como Scopus y Scifinder.⁵⁰

1.2.1 La península de Yucatán.

La península de Yucatán en México comprende los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán, y es conocida como una provincia biótica.⁵¹ Esta región natural posee características únicas en cuanto a geología, geomorfología, paisajismo y biota.⁵² Debido a su extensa diversidad vegetal, la cual incluye alrededor de 2 300 especies de angiospermas, de las cuales 168 especies son nativas y/o endémicas,⁵³ y el contexto etnomédico heredado por la cultura Maya, ha sido objeto de estudio para la obtención de distintos metabolitos bioactivos a partir de sus fuentes vegetales.^{52,54} En cuanto a su diversidad microbiana, un análisis metagenómico del suelo de la península de Yucatán reveló la predominancia de actinobacterias y ascomicetos, para bacterias y hongos respectivamente⁵⁵ y por otra parte, el potencial biosintético de estas comunidades microbianas ha sido analizado mediante herramientas bioinformáticas acopladas con la amplificación directa del ADN ambiental.^{56,57}

Desde el punto de vista geológico, la península de Yucatán es una plataforma calcárea originada en el Cenozoico que se encuentra a 10 msnm, con una pequeña sierra en el centro de la península, donde se alcanza una altitud máxima de 150 m.⁵⁸ Dicha plataforma está conformada por un sustrato relativamente uniforme, compuesto por carbonato de calcio o magnesio en un 90%.⁵⁹

La península de Yucatán posee uno de los más extensos y espectaculares sistema de acuíferos kársticos del planeta. Este sistema de acuífero transfronterizo se extiende sobre un área de aproximadamente 165 000 km² entre México, Guatemala y Belice. La plataforma de caliza del Triásico al Holoceno de Yucatán está localizada en las vecindades del límite entre la placa Norteamericana/Caribeña y ha sido reformada por una serie de eventos tectónicos a través de su larga historia geológica.⁶⁰

La característica principal de este sistema hidrológico son los cenotes (de la palabra maya *ts'onot*, que significa caverna con depósito de agua), estos conforman un sistema semicircular de fallas geológicas desarrollado en rocas terciarias suprayacente a 65 Ma del impacto del asteroide

Chicxulub, donde la zona de fracturas y fallas alrededor del cráter ha favorecido los procesos de karstificación, y también la presencia de anomalías geofísicas de campos potenciales.^{58,61,62} Posteriormente, esta región recibió hasta 200 m de sedimentos y carbonatos marinos durante el Eoceno tardío y Oligoceno al mismo tiempo que la parte norte de la península estuvo expuesta a la erosión y la formación de karst.⁵⁸

El número estimado de cenotes en el estado de Yucatán va de los 7 000 a los 8 000. Existen diferentes clasificaciones, basada en su morfología en abiertos, semi abiertos, cerrados y cavernas o grutas y por sus características geológicas, en jóvenes y maduros.⁶³ Dentro de ellos habitan diferentes especies de flora y fauna relativamente pobres en cuanto a número de especies, sin embargo, se ha observado la prevalencia y el desarrollo de especies endémicas.⁶⁴

En cuanto a sus características fisicoquímicas, existen diferentes procesos dentro de ellos, por ejemplo, colapsos ocasionados por la disolución lenta de la roca caliza por el agua, con ayuda del ácido sulfhídrico, la reactividad ocasionada por la mezcla entre agua dulce y marina sobre la caliza y la actividad microbiológica asociada.⁶⁴ El agua de los cenotes presenta una naturaleza atmosférico-litotrófica con un dominio de interacción de agua-roca, siendo la disolución de minerales (calcita, aragonita, dolomita, halita y caolinita) los que aportan los principales constituyentes químicos al acuífero (Ca^{2+} - Mg^{2+} - HCO_3^-) y otorgando un carácter ligeramente alcalino (pH de 7.0 a 9.1)^{65,66} el cual fluctúa por la neutralización de ácidos orgánicos y taninos en los cenotes colindantes a manglares.⁶⁷ También existe un alto incremento de calcio asociado a sulfatos, y se observa una estratificación vertical del agua durante las épocas más cálidas y lluviosas del año (Mayo-Octubre).⁶⁷

Existen dos procesos que contribuyen a la salinidad en los cenotes, el primero observado en localidades con un alto enriquecimiento de sodio, en comparación del calcio, influenciado por el agua marina. El segundo ocurre en lugares localizados en el sureste de la península, cercano a depósitos ricos en sulfatos, donde el calcio toma el lugar predominante. Así también, la presencia de materia orgánica define el equilibrio geoquímico dependiendo del carácter del cenote (lótico o léntico). En sistemas lénticos, existe más actividad del estado trófico, favoreciendo la formación de grandes cantidades de materia orgánica, y por ende una mayor cantidad de nutrientes.⁶⁷

Los estudios químicos de microorganismos provenientes de cenotes son escasos, y han estado enfocados en evaluar la actividad biológica de sus extractos orgánicos, exhibiendo un alto porcentaje bioactivo (~81%), dentro de las actividades de prueba, se encuentran la actividad antimicrobiana, insecticida y nematotóxica.⁶⁸⁻⁷⁰ A la fecha, el único estudio químico que ha concluido con una entidad química novedosa, se realizó a partir del hongo *Acremonium massei*, colectado de materia orgánica sumergida de un cenote en Mérida, resultando así el hexahidroacremonintriol (**Figura 6**), un compuesto que presenta actividad insecticida moderada contra los fitófagos *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.⁷¹

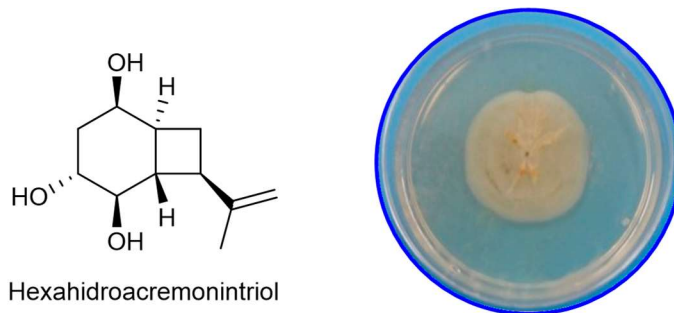


Figura 6. Estructura del hexahidroacremonintriol y el hongo *Acremonium massei* sobre APD.⁷¹

1.3 Productos naturales del género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, 1768 comprende más de 344 especies,⁷² las cuales se desarrollan como endófitos, saprofitos, parásitos y también como patógenos humanos, ya que pueden provocar condiciones localizadas y sistémicas, denominadas aspergilosis (por *Aspergillus flavus* y *A. fumigatus*, principalmente) y, por otra parte, son responsables de enfermedades en animales domésticos y cultivos.⁷³ Algunos de los sinónimos taxonómicos para este género son: *Emericella* Berk., 1857; *Polypaecilum* G. Sm., 1961; *Chaetosartorya* Subram., 1972; *Petromyces* Malloch & Cain, 1972 y *Phialosimplex* Sigler, Deanna A. Sutton, Gibas, Summerb. & Iwen, 2010.⁷⁴

Las especies de *Aspergillus* producen una basta colección de metabolitos secundarios, muchos de ellos son considerados de interés para la comunidad científica. Los hongos pertenecientes a este género producen metabolitos de importancia en la industria como la producción de ácidos orgánicos (cítrico, glucónico, itacónico y kójico) por *Aspergillus niger* y *A. oryzae*,⁷⁵ y fármacos como la lovastatina, un inhibidor de la enzima HMG-CoA por *A. terreus*.⁷⁶

A la fecha existen más de 3 200 metabolitos producidos por este género,⁷⁷ Frisvad y Larsen han realizado un extenso trabajo empleando la quimiotaxonomía para la clasificación taxonómica de los organismos de este género, partiendo de los seis subgéneros de mayor importancia en *Aspergillus*: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Polypaecilum/Phialosimplex* (no nombrado oficialmente), *Cremeri* y *Aspergillus*.⁷⁸ Desde el punto de vista biogénético, este género es capaz de producir diferentes clases de moléculas, como son policétidos, derivados del ácido siquímico⁷⁸ y terpenoides,⁷⁹ así como metabolitos provenientes de biogénesis mixta, algunos ejemplos de ellos se encuentran en la **Figura 7**.

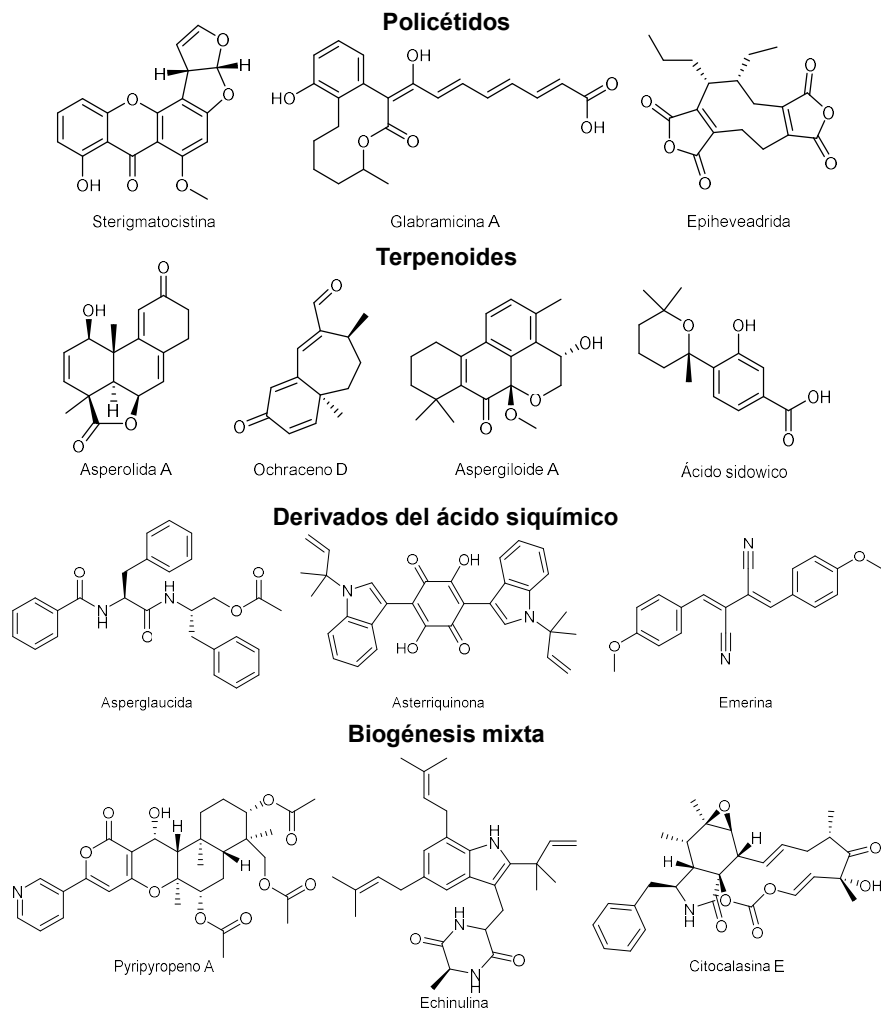


Figura 7. Ejemplos selectos de metabolitos producidos por el género *Aspergillus*.

1.4 Productos naturales del género *Stachybotrys*.

El género *Stachybotrys* Corda, 1837 posee una amplia distribución y consiste por más de 50 especies dentro del orden Hypocreales.⁸⁰ La mayoría de las especies de *Stachybotrys* son saprotróficas y generalmente han sido encontradas en suelo y sustratos ricos en celulosa como heno, paja, granos, restos de plantas, raíces muertas, pulpa de madera, algodón, telas, papel, fibras vegetales, etc.

La especie más estudiada es *S. chartarum* (sinónimos taxonómicos *S. atra* Corda y *S. alternans*), conocido como "moho negro" el cual ha recibido atención especial debido a estar implicado en el desarrollo de estaquibotriotoxicosis,⁸¹ una enfermedad que afecta principalmente a animales de granja que consumen alimentos contaminados por el hongo. Posteriormente, debido al aislamiento de satratoxinas a partir de paja contaminada que servía de alimento a bovinos y ovinos con este padecimiento, se atribuyó a los tricotecenos una posible participación en el desarrollo de la enfermedad,⁸² Sin embargo, sólo cerca del 40% de las cepas de *S. chartarum* producen tricotecenos

macrocíclicos, además que las cepas productoras de esta clase de compuestos son más citotóxicas que los aislamientos que no los producen.⁸³

A la fecha, más de 200 PN han sido descritos como metabolitos de este género.^{77,81} Por su naturaleza química pueden clasificarse en sesquiterpenoides como los tricotecenos,⁸⁴ diterpenoides como las atranonas,⁸⁵ citocalasanos (alcalasinas),⁸⁶ isocromenos,⁸⁷ policétidos,⁸⁸ cochlioquinonas⁸⁹ (**Figura 8**) y meroterpenoides (triprenil fenoles), siendo los metabolitos más representativos y abundantes del género,⁹⁰ los cuales a su vez pueden dividirse en fenilspirodrimanos,⁹¹ stachybotrinas,⁹² SMTPs (triprenil fenoles de *S. microspora*),⁹³ kampanoles,⁹⁴ stachyflinas⁹⁵ y bisaboescuales,⁹⁶ entre otros. (**Figura 9**).

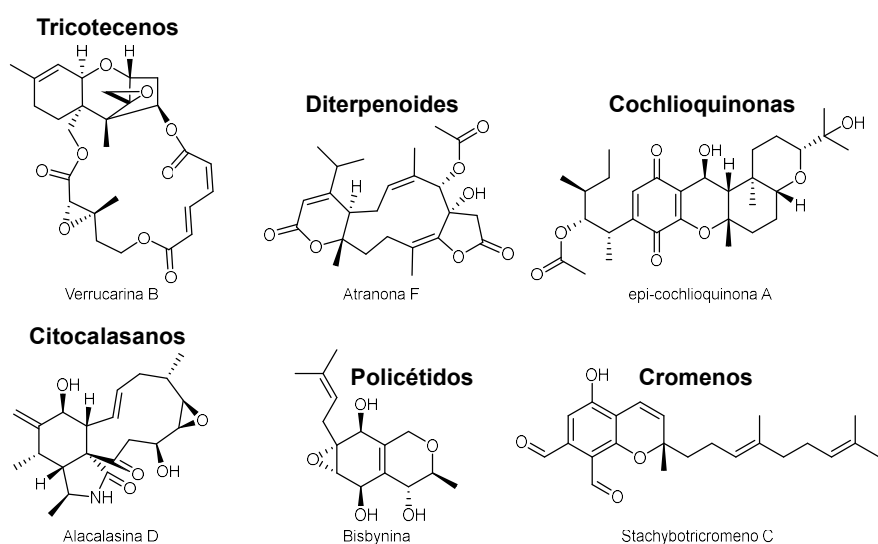


Figura 8. Ejemplos representativos de cada familia estructural producidos por *Stachybotrys*.

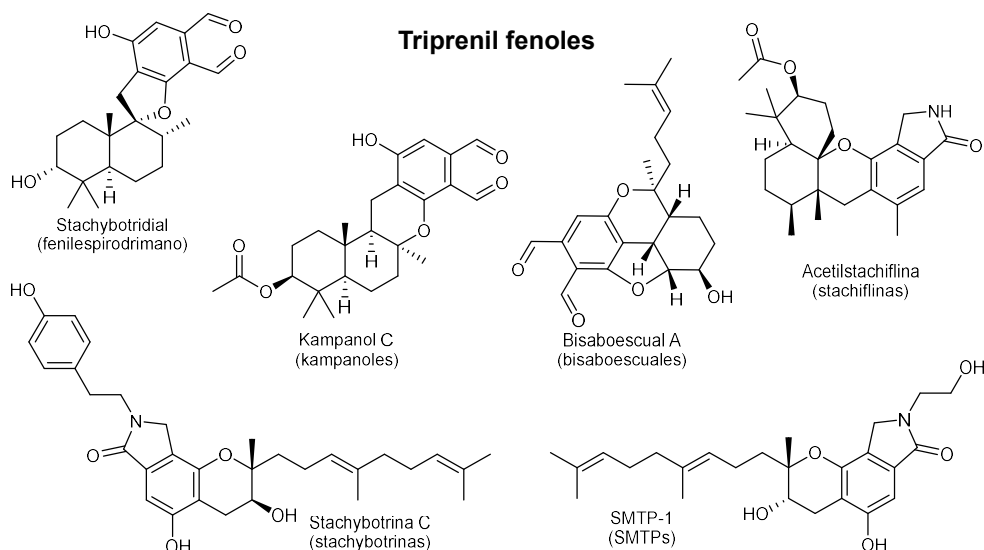


Figura 9. Ejemplos representativos de tipo triphenil fenol producidos por *Stachybotrys*.

1.5 La resistencia antimicrobiana como problema de salud emergente.

La resistencia antimicrobiana (RAM) ocurre cuando microorganismos (bacterias, virus, hongos y parásitos) se vuelven capaces de adaptar y crecer en presencia de fármacos que antes poseían actividad contra ellos. La RAM ocurre mediante una serie de mecanismos de resistencia, tales como la modificación del blanco de acción, hidrólisis enzimática, degradación, eflujo e impermeabilidad.⁹⁷ Debido a ello, se ha vuelto una de las mayores amenazas a los sistemas de salud pública, causando problemas serios para la prevención y el tratamiento de las enfermedades persistentes.⁹⁸

Si bien no es un problema moderno, ya que D'Costa y colaboradores demostraron, por análisis metagenómicos de sedimentos de permafrost que datan de 30 000 años, la existencia de una colección altamente diversa de genes de resistencia (hacia antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y glicopéptidos),⁹⁹ actualmente, se estima que la RAM ha sido la causa de 4.95 millones de muertes en 2019 a nivel mundial, incluyendo 84 800 por tuberculosis multirresistente (*Mycobacterium tuberculosis*). De manera independiente a la pandemia de COVID-19, la RAM puede llevar a 24 millones de personas a pobreza extrema para el 2030, y las infecciones resistentes a tratamiento podrían causar 10 millones de muertes cada año hacia el 2050, como fue descrito en el reporte de las Naciones Unidas sobre acciones urgentes para evitar la crisis de RAM.^{100,101}

El acrónimo ESKAPE incluye 6 patógenos nosocomiales que exhiben multirresistencia a fármacos y virulencia: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.,¹⁰² estos organismos están asociados con un alto riesgo de mortalidad, por consiguiente, en un aumento en los costos de los sistemas sanitarios. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha seleccionado 20 especies bacterianas con 25 patrones de resistencia adquirida y diez criterios para evaluar su prioridad: mortalidad, carga en el sistema de salud, carga en la comunidad, prevalencia de la resistencia, tendencia a 10 años de la resistencia, transmisibilidad, prevención en el entorno comunitario, prevención en los sistemas de salud, tratabilidad y canalización. Estos resultados fueron estratificados en tres categorías (crítica, alta y prioridad media). Dentro de las bacterias de prioridad crítica se incluyen *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos y a cefalosporinas de tercera generación. Las bacterias que se encuentran en prioridad alta son *E. faecium* resistente a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina. De las bacterias responsables de infecciones adquiridas en el entorno comunitario, *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina, *Campylobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae* y *Salmonella typhi* resistentes a fluoroquinolonas.¹⁰³

En el año 2019, los seis patógenos que fueron asociados a 929 000 muertes aproximadamente fueron, en orden de importancia, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Streptococcus pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, y *Pseudomonas aeruginosa*. En cuanto a la especificidad de sus mecanismos, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue el responsable de más de 100 000 muertes asociadas a RAM, mientras seis patógenos más ocasionaron 50 000-100 000 muertes: cepas multiresistentes, excluyendo ampliamente las cepas multiresistentes de *M. tuberculosis*, *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación, *A. baumannii* resistente a carbapenemas, *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, *K. pneumoniae* resistente a carbapenemas y *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación.¹⁰⁰

En el caso de nuestro país, un estudio de 2018 reveló que de un total de 22 943 aislados clínicos, la resistencia a carbapenémicos fue hallada en $\leq 3\%$ de las cepas de *Escherichia coli*, 12.5 en *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp., y hasta en un 40% para *P. aeruginosa*, la cual también presentó resistencia a piperacilina-tazobactam (TZP) en un 19.1%. En *Acinetobacter* sp. se encontró una resistencia mayor al 50% para cefepima, ciprofloxacino, meropenem y TZP. Con respecto a los organismos Gram(+), la resistencia a la meticilina por *S. aureus* fue encontrada en 21.4% de los aislados, y la resistencia a vancomicina alcanzó un 21% en *E. faecium*. *Acinetobacter* sp. presentó la mayor resistencia a múltiples fármacos (53%), seguido de *Klebsiella* sp. (22.6%) y *E. coli* (19.4%).¹⁰⁴

Durante la presente emergencia sanitaria ocasionada por el COVID-19, los trabajadores del área de la salud están enfrentando una enorme presión, incluyendo un alto riesgo de infección. En esta pandemia, es crucial salvar la vida de los pacientes incluso si es necesario el uso de agentes antimicrobianos para tratar o prevenir complicaciones e infecciones secundarias. Sin embargo, varios de estos antibióticos empleados en la terapéutica son clasificados en muchos casos como el único recurso existente y todavía es muy pronto para saber en qué magnitud se vio afectada esta problemática.¹⁰⁵

2. HIPÓTESIS

Las especies de hongos y bacterias provenientes de cenotes de la península de Yucatán, debido a las características físicas y químicas de su entorno, son candidatas para la obtención de moléculas con potencial antimicrobiano, dadas las interacciones propias de su ambiente.

Por otra parte, el crecimiento de estas cepas en condiciones estándar de laboratorio debería permitir la obtención de compuestos bioactivos.

Los ensayos de interacción entre organismos y las técnicas de metabolómica son herramientas fundamentales que permitirán la selección de organismos candidatos, y obtención de productos naturales con actividad biológica.

3. OBJETIVOS

Descubrir productos naturales biodinámicos a partir del estudio químico individual de cepas fúngicas y bacterianas, y también mediante el empleo de cocultivos microbianos, entre especies originarias de cenotes de la península de Yucatán.

Con la finalidad de cumplir el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos.

- Seleccionar las especies fúngicas y bacterianas para su estudio químico, de acuerdo con su morfología y tasas de crecimiento, para realizar ensayos de competencia en cajas de Petri.
- Realizar ensayos de interacción entre especies en cajas de Petri para observar los cambios morfológicos o sobreproducción de pigmentos en los organismos fúngicos y bacterianos.
- Cultivar las especies seleccionadas, en mono y cocultivos y obtener así sus correspondientes extractos orgánicos, mediante técnicas convencionales de maceración y reparto, con el fin de evaluar si por sí solas son capaces de producir moléculas bioactivas.
- Realizar los estudios químicos clásicos (fraccionamiento, separación y purificación de los metabolitos secundarios) mediante técnicas cromatográficas, así como el empleo de herramientas de metabolómica, para poder ampliar el conocimiento existente en bases de datos de libre acceso, como GNPS.
- Caracterizar los metabolitos aislados, empleando técnicas espectroscópicas y realizar las pruebas biológicas sobre los compuestos puros para determinar su actividad antimicrobiana frente patógenos del grupo ESKAPE, *Mycobacterium tuberculosis* y cepas de *Mycobacterium* no tuberculosas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos.

4.1.1 Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas empleadas en esta investigación fueron proporcionadas por la Dra. Alejandra Prieto Davó de la Unidad de Química en Sisal, Facultad de Química, UNAM, provenientes de dos cenotes: Noh Mozón (20°37'25.40" N, 89°23'02.44" W) y Tzá Itza (20°43'50.27" N, 89°27'56.82" W) en 2018 (**Figura 10**), dichos aislamientos se describen en la **Tabla 1**. Para su aislamiento se empleó medio marino A1 al 10%, el cual se compone por almidón (0.4 g/L), peptona de soya (0.2 g/L), extracto de levadura (0.4 g/L) y sales marinas artificiales (32 g/L) adicionado con rifampicina (5 µg/mL) y cicloheximida (0.1 mg/mL). Para el acondicionamiento y mantenimiento de los organismos, se emplearon placas con agar marino (A1) adicionado con sales marinas artificiales (32 g/L).

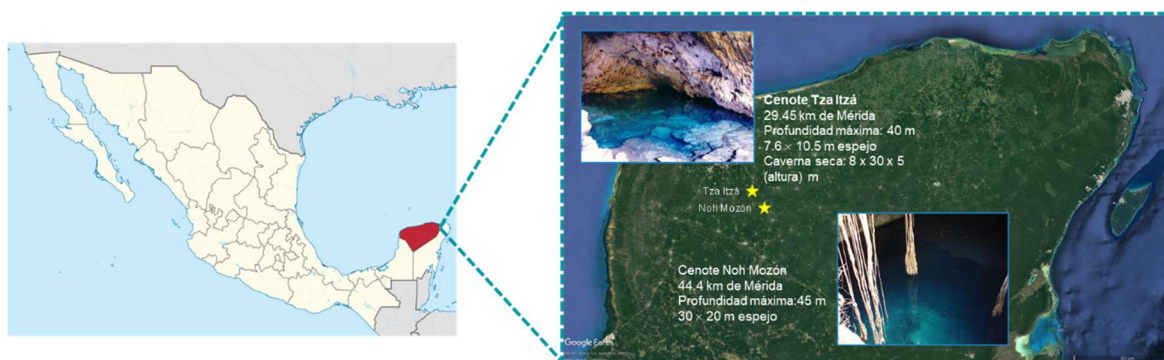


Figura 10. Ubicación geográfica de los cenotes Noh Mozón y Tzá Itzá.

Tabla 1. Características del aislamiento de las cepas bacterianas.

Código Interno	Zona	Cenote	Medio/Antibiótico/Muestra
NCA250	Cueva 36 m	Noh-Mozón	A1/rf+cx/1-I
NCA251	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/10-V
NCA253	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/10-I
NCA255	Caverna, 15 m	Tza Itzá	A1/rf+cx/16-IA
NCA258	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/12-IA
NCA259	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/12-IB
NCA260	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/9-II
NCA266	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/10-II
NCA269	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf+cx/9-IIB
NCA271	Espejo, 2.2 m	Tza Itzá	A1/rf+cx/13-III
NCA274	Espejo, 8 m	Noh-Mozón	A1/rf/18A-A

4.1.2 Cepas fúngicas.

Los hongos saprófitos objeto de estudio del presente proyecto de investigación fueron aislados por la Dra. Alejandra Prieto Davó de la Unidad de Química en Sisal, Facultad de Química, UNAM, provenientes de dos cenotes: Noh Mozón (20°37'25.40" N, 89°23'02.44" W) y Tzá Itza (20°43'50.27" N, 89°27'56.82" W) en 2018 (**Figura 10**). Para el acondicionamiento de estas cepas,

se emplearon placas con agar papa dextrosa (APD) adicionado con sales marinas artificiales (32 g/L). Los cultivos axénicos se identificaron con los códigos internos NCA252, NCA254, NCA256, NCA257, NCA264, NCA270, NCA273, NCA276 y NCA277 (Tabla 2).

Tabla 2. Características del aislamiento de las cepas fúngicas.

Código Interno	Zona	Cenote	Medio/Antibiótico/Muestra
NCA252	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/12B
NCA254	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/10-IV
NCA256	Caverna, 15 m	Tza Itzá	A1/rf+cx/17-II
NCA257	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf+cx/8-I
NCA264	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/12-A
NCA270	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf+cx/9-IIA
NCA273	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/10-2
NCA276	Cueva, 19 m	Tza Itzá	A1/rf/9-II
NCA277	Cueva 36 m	Noh-Mozón	A1/rf+cx/1-I

4.1.3 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos de estudio.

La caracterización taxonómica de los organismos se realizó mediante el análisis de las características moleculares del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal (ITS). La extracción de ADN a partir de los cultivos axénicos, 100 – 150 mg de micelio libre de pigmentos se cultivaron en un medio líquido compuesto por peptona (2%), extracto de levadura (1%) y dextrosa (2%) (YEPD), a temperatura ambiente con fotoperíodos de luz/oscuridad. Después de 3 días de crecimiento, el micelio se filtró y el ADN se extrajo empleando un ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, Orange, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y pureza del ADN obtenido en cada extracción se cuantificó midiendo las absorbancias a 230, 260 y 280 nm (BioDrop µLITE+, Biochrom, Holliston, MA, EEUU) y calculando el ratio A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Las muestras de ADN se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de llevar a cabo las amplificaciones. Para los hongos seleccionados para el estudio químico (6 morfotipos), los fragmentos que contienen la región ITS se amplificaron utilizando la combinación de los primers ITS1F y ITS4.^{106,107} La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL: PureTaq™ Ready-To-Go™ (General Electric, Fairfield, CT, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante, 2 µM de los primers forward y reverse y al menos 2 ng/µL de ADN genómico. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) de acuerdo al siguiente programa: 95 °C por 5 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos (94 °C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 60 s), 72 °C por 8 min para el paso final de elongación. Los amplicones se secuenciaron en ambas direcciones (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Los electroferogramas obtenidos se leyeron y corrigieron empleando el software FinchTV (versión 1.4.0). Las secuencias obtenidas en cada caso se emplearon para realizar un análisis comparativo de la homología empleando el algoritmo BLAST, proporcionado por la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), con aquellas descritas en la base de datos GenBank. Los resultados del BLAST se ordenaron según la identidad máxima de cada secuencia. Las identidades

basadas en las secuencias se establecieron con un valor de corte de 94.3% para asignar a nivel de género, el cual se empleó en la mayoría de los casos, así como para discriminar entre especies, el valor de corte se predijo como 99.6% (**Tabla 3**).¹⁰⁸ Esta actividad se realizó bajo la supervisión de la investigadora posdoctoral Dra. Anahí Martínez Cárdenas y el Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro (UNCG).

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

4.2.1 Primeros extractos orgánicos a partir de cepas fúngicas.

Las cepas fúngicas NCA252, NCA256, NCA257, NCA264, NCA273 y NCA276 se inocularon en cajas de Petri con medio APD y se dejaron crecer por 7 días a temperatura ambiente. Al término de este periodo, se transfirieron trozos de agar (5 × 5 mm) del cultivo axénico en 100 mL de medio YEPD adicionado con sal marina artificial (32 g/L) y se mantuvieron en agitación por 5 días a 100 rpm, temperatura ambiente y fotoperiodos normales de luz/oscuridad. Posteriormente, cada uno de los inóculos mencionados anteriormente se transfirió a un medio sólido de arroz estéril (100 g de arroz y 200 mL de H₂O) para el caso de los organismos NCA257, NCA273 y NCA276; 2× (100 g de arroz y 200 mL de H₂O) para NCA264 y NCA256 y 3× (100 g de arroz y 200 mL de H₂O) para NCA252, empleando matraces Fernbach de 2800 mL. El tiempo de fermentación se fijó en 21 días, a temperatura ambiente y con fotoperiodos normales de luz/oscuridad.

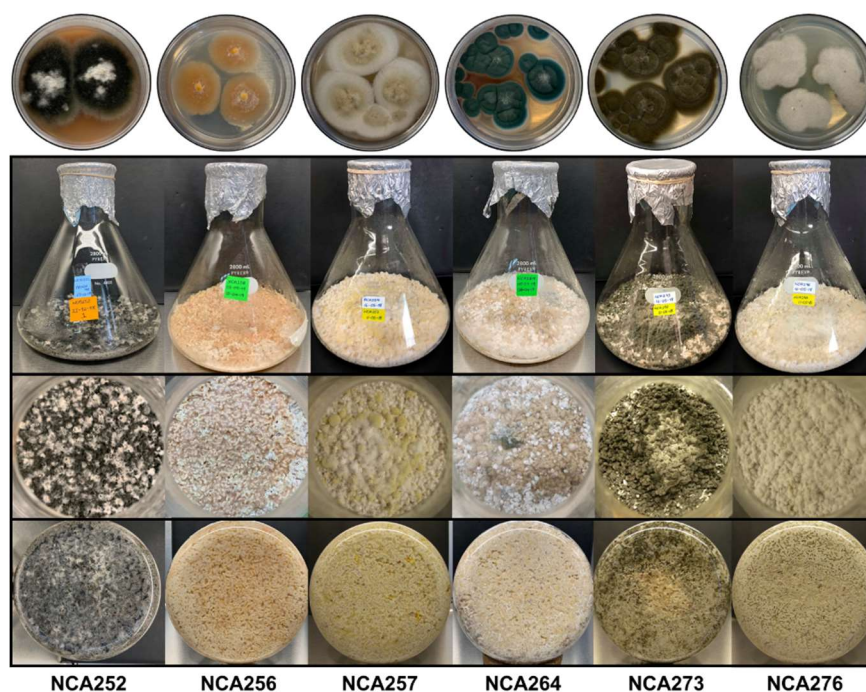


Figura 11. Organismos fúngicos objeto de estudio y registro digital de los cultivos.

Al término del periodo de crecimiento, se realizó el registro digital de los cultivos (**Figura 11**) y se procedió a la obtención de los extractos orgánicos correspondientes. En primer lugar, se adicionaron

20 mL de MeOH a cada matraz (con la finalidad de detener la actividad metabólica del cultivo) y se dejaron reposar por 15 min. El cultivo se fragmentó mecánicamente con la ayuda de una espátula y se adicionaron 400 mL de una mezcla MeOH-CHCl₃ (1:1), macerando en agitación constante a 100 rpm por 24 h para proceder a su filtración *in vacuo*. Se adicionó al volumen filtrado 200 mL de CHCl₃ y se ajustó a un volumen total de 1000 mL con H₂O, manteniendo esta solución en agitación por 30 min. Se realizó la separación de la fase orgánica por reparto entre disolventes y el extracto obtenido fue secado a presión reducida y sometido a un desgrase con una mezcla de *n*-hexano-MeCN-MeOH (2:1:1), recuperando y concentrando la fase de MeCN-MeOH. Los rendimientos obtenidos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (primer extracto).

Proporción	Cepa	Clave	Peso (mg)	No. Acceso GenBank
3 ×	<i>Stachybotrys</i> sp.	NCA252a	1916.9	OL544703
2 ×	<i>Arachniotus verruculosus</i>	NCA256a	722.7	OL544704
1 ×	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA257a	556.3	OM275810
2 ×	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA264a	721.7	OL544705
1 ×	<i>Cladosporium</i> sp.	NCA273a	368.2	OL544706
1 ×	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA276a	749.8	OL544707
1 × equivale a 100 g de arroz / 200 mL de H ₂ O.				

4.2.2 Segundos extractos orgánicos a partir de cepas fúngicas.

Con el propósito de obtener cantidades adicionales de algunos compuestos, se realizó un segundo extracto orgánico de las cepas fúngicas NCA252, NCA256, NCA257, NCA264, NCA273 y NCA276, las cuales se inocularon en cajas de Petri con medio APD y se dejaron crecer por 7 días a temperatura ambiente. Al término de este periodo, se inocularon 12 mL de medio YEPD con trozos de agar (5 × 5 mm) del cultivo axénico y se mantuvieron en agitación por 5 días a 100 rpm, temperatura ambiente y fotoperiodos de luz/oscuridad. Posteriormente, cada uno de los inóculos se transfirió a un medio sólido de arroz estéril, empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL: 10 × (12 g de arroz y 24 mL de H₂O). El tiempo de fermentación se fijó en 21 días, a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz/oscuridad. El peso de los extractos se registró, tal como se muestra en la

Tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (segundo extracto).

Proporción	Cepa	Clave	Peso (mg)
10 ×	<i>Stachybotrys</i> sp.	NCA252b	3258.7
10 ×	<i>Arachniotus verruculosus</i>	NCA256b	1227.1
10 ×	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA257b	687.1
10 ×	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA264b	626.8
9 ×	<i>Cladosporium</i> sp.	NCA273b	366.0
10 ×	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA276b	2118.6
1 × equivale a 12 g de arroz / 24 mL de H ₂ O.			

4.3 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir del cocultivo de las especies fúngicas *Aspergillus* sp. NCA257, *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276.

Se seleccionaron las cepas fúngicas *Aspergillus* sp. NCA257, *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276 para realizar experimentos de interacción. Estos se llevaron a cabo inoculando en sentidos opuestos de la placa cada uno de los organismos y observando los cambios morfológicos dentro de un periodo de 24 h a 7 días. Con el fin de analizar estas interacciones de manera comparativa, se realizaron los extractos orgánicos del cocultivo en cuestión. Cada organismo se inoculó en cajas de Petri con medio APD y se dejaron crecer por 7 días a temperatura ambiente. Al terminar este periodo, se inocularon por duplicado en 50 mL de medio YEPD adicionado con sal marina artificial (32 g/L) con trozos de agar (5×5 mm) del cultivo axénico y se mantuvieron en agitación por 5 días a 100 rpm, temperatura ambiente y fotoperiodos de luz/oscuridad. Las combinaciones posibles de microorganismos (NCA257/NCA273; NCA257/NCA276; NCA273/NCA276) se inocularon en un medio sólido de arroz estéril (100 g de arroz y 200 mL de H₂O). El tiempo de fermentación se fijó en 21 días, a temperatura ambiente y con fotoperiodos normales de luz/oscuridad. Al término del periodo de crecimiento, se realizó el registro digital de los cultivos (**Figura 12**) y se procedió a la obtención de los extractos orgánicos correspondientes, de la misma forma que en el inciso anterior. Los rendimientos obtenidos se resumen en la **Tabla 5**.



Figura 12. Registro digital de los cultivos.

Tabla 5. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (mediana escala).

Proporción	Cepa	Clave	Peso (mg)
1 ×	<i>Aspergillus</i> sp. / <i>Cladosporium</i> sp.	NCA257/NCA273	1206.1
1 ×	<i>Aspergillus</i> sp. / <i>Aspergillus</i> sp.	NCA257/NCA276	1197.4
1 ×	<i>Cladosporium</i> sp. / <i>Aspergillus</i> sp.	NCA273/NCA276	968.4

4.4 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir del cocultivo de las especies *Aspergillus* sp. NCA276 y bacteria NCA250.

Se seleccionaron los organismos NCA250 y *Aspergillus* sp. NCA276 debido a los cambios morfológicos observados por el experimento de interacción entre ambas cepas. Se inoculó en extremos opuestos de una placa de Petri cada organismo: la bacteria (NCA250) se inoculó por estría simple y el hongo (NCA276) por picadura. Los cambios morfológicos presentes en el medio agar A1 se monitorearon durante un periodo de 24 h a 7 días. Con el fin de analizar los cambios en el metaboloma de cada organismo, se obtuvieron los extractos orgánicos a partir de medios líquidos del monocultivo y cocultivo de estas especies, adaptando la metodología previamente descrita.¹⁰⁹ Para ello, se prepararon cultivos semilla en medio A1, inoculados con cada organismo, y se dejaron crecer por 48 h y se inocularon 10 mL del cultivo semilla del organismo NCA250 (bacteria) y 2 mL de cultivo del organismo NCA276 (*Aspergillus* sp.). Cada extracto se preparó a partir de 500 mL del cultivo en medio A1 adicionado con sales marinas (32 g/L) realizando los monocultivos por duplicado (con el fin de realizar la extracción a los 7 y 21 días) y el cocultivo por triplicado (con el fin de realizar la extracción a los 7, 14 y 21 días). Al término de cada periodo, se obtuvo el extracto orgánico por reparto con AcOEt (2×500 mL). Se realizó el registro de los rendimientos, los cuales se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos de los organismos *Aspergillus* sp. NCA276 y bacteria NCA250.

Tiempo	Cepa	Clave	Peso (mg)
7 días	bacteria	NCA250a	32.8
	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA276c	106.3
	bacteria/ <i>Aspergillus</i> sp.	NCA250/NCA276a	35.0
14 días	bacteria/ <i>Aspergillus</i> sp.	NCA250/NCA276b	37.7
21 días	bacteria	NCA250b	109.2
	<i>Aspergillus</i> sp.	NCA276d	109.6
	bacteria/ <i>Aspergillus</i> sp.	NCA250/NCA276c	50.7

4.5 Cultivo y preparación de los extractos orgánicos a partir de especies bacterianas.

Las cepas bacterianas en cuestión se seleccionaron con base en los resultados de la actividad biológica observada en el ensayo de estría cruzada (**inciso 5.11**). Para obtener los extractos orgánicos de las cepas NCA250, NCA259, NCA260 y NCA269, se adaptó la metodología empleada por Wang y colaboradores.¹¹⁰ Se elaboraron cultivos semilla a partir de medio ISP2 (15 mL), el cual contiene extracto de levadura (4 g/L), extracto de malta (10 g/L) y dextrosa (4 g/L), inoculando con dos cuadros de agar (5×5 mm). Estos se incubaron durante 5 días y posteriormente

se vertieron en un sustrato estéril 2×[15 g de arroz húmedo y 30 mL de H₂O adicionado con sales marinas artificiales (32 g/L)]. Para realizar la extracción, el cultivo se maceró con 150 mL de AcOEt durante 24 h. Posteriormente, se filtró y se concentró *in vacuo*. El extracto obtenido se resuspendió en 100 mL de MeOH 90% acuoso y se realizó un segundo reparto con 100 mL de hexano. Ambos extractos se recuperaron para su posterior utilidad (**Tabla 7**). Para obtener los extractos orgánicos de las cepas NCA258, NCA271 y NCA274, se emplearon cultivos semilla (100 mL de medio ISP2) inoculados de la misma forma que se describió anteriormente e incubando por 7 días. Finalmente, los inóculos se vertieron sobre un sustrato estéril [100 g de arroz húmedo y 200 mL de H₂O adicionado con sales marinas artificiales (32 g/L)]. Para realizar la extracción, los cultivos se maceraron con 800 mL de AcOEt durante 24 h. Posteriormente, se filtró y se concentró *in vacuo*. El extracto seco se resuspendió en 400 mL de MeOH 90% acuoso y se realizó un segundo reparto con 400 mL de hexano. Ambos extractos se recuperaron para su posterior utilidad (**Tabla 7**).

Tabla 7. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos fúngicos (mediana escala).

Pequeña escala			
Proporción	Cepa	Peso Extracto MeOH 90% (mg)	Peso Extracto <i>n</i>-hexano (mg)
2 ×	NCA250	904.3	102.8
2 ×	NCA259	54.2	36.2
2 ×	NCA260	49.0	70.9
2 ×	NCA269	1243.0	86.7
1 × equivale a 15 g de arroz húmedo / 30 mL de H ₂ O; el extracto proveniente del cultivo de la bacteria NCA250 será llamado con la clave NCA250c.			
Mediana escala			
Proporción	Cepa	Peso Extracto MeOH 90% (mg)	Peso Extracto <i>n</i>-hexano (mg)
1 ×	NCA258	104.2	741.6
1 ×	NCA271	148.1	728.4
1 ×	NCA274	113.0	1086.2
1 × equivale a 100 g de arroz húmedo / 200 mL de H ₂ O			

4.6 Procedimientos cromatográficos generales.

El estudio químico de los extractos orgánicos fúngicos y bacterianos se realizó empleando técnicas cromatográficas convencionales, principalmente de tipo Flash (CF) para el fraccionamiento primario y de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la separación de productos a partir de cada fracción. Para la CF se utilizaron como fases estacionarias columnas de RediSep Rf Gold Si-gel (fase normal) y como fase móvil se emplearon mezclas ternarias (*n*-hexano, CHCl₃ y MeOH) o cuaternarias (*n*-hexano, CHCl₃, AcOEt y MeOH) de polaridad creciente, en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen system (Teledyne Technologies) equipado con los detectores de arreglo de fotodiodos (PDA; barrido entre 190-500 nm) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Para la HPLC de tipo analítica, semipreparativa y preparativa se utilizaron como fases estacionarias columnas Gemini C₁₈ (5µm, 110 Å, 250 × 4.6 mm; 5 µm, 110 Å 250 × 10 mm; 5 µm, 110 Å, 250 × 21.2 mm, Phenomenex) y Kinetex C₁₈ (5 µm, 100 Å, 250 × 4.6 mm y 5 µm, 100 Å, 250 × 21.2 mm,

Phenomenex), mientras que la fase móvil consistió en mezclas binarias de MeCN, MeOH y agua con H₂CO₂ al 0.1% empleando diferentes sistemas de tipo gradiente o isocrático. Las velocidades de flujo de la fase móvil utilizadas fueron de 1 mL/min (analítico), 4.72 mL/min (semipreparativo) y 21.24 mL/min (preparativo), en un cromatógrafo Waters conformado por una bomba cuaternaria modelo 2535, un inyector automático modelo 2707, y los detectores PDA modelo 2998 y ELSD modelo 2424. La adquisición y manejo de datos se realizó con el software Empower 3 (Waters).

4.7 Caracterización estructural.

La caracterización estructural de los productos obtenidos se realizó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) mono- y bidimensionales (1D y 2D) se registraron en los equipos de 400 MHz (JEOL ECS-400, Varian VNMRs-400 o Bruker Avance III) y 500 MHz (JEOL ECA-500). Los datos de espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS-MS/MS) se obtuvieron en el equipo Q Exactive Plus (modos positivo y negativo) mientras que los de baja resolución se obtuvieron en un equipo Waters SQD2 (modos positivo y negativo), todos equipados con una fuente de ionización por Electro spray (ESI) y acoplados a un sistema de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia Acquity UPLC system (Waters). En todos los sistemas cromatográficos se utilizó una columna BEH C₁₈ (1.7 µm, 130 Å, 50 × 2.1 mm), empleando una mezcla binaria constituida por MeCN (A) y agua con H₂CO₂ (0.1%; B), en un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% A hasta 100% A en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min, utilizando un flujo de 0.3 mL/min.

4.8 Cristalografía de rayos X del compuesto 1.

El compuesto **1** fue recristalizado a partir de una mezcla de CHCl₃-MeOH-H₂O (1:20:1), obteniendo así cristales óptimos para su difracción por rayos X. Todas las intensidades de reflexión fueron medidas a 100(2) K empleando un difractómetro Gemini R (equipado con un detector Atlas) y radiación CuKα ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) bajo el programa CrysAlisPro (versión CrysAlisPro 1.171.38.43f; Rigaku OD, 2015). El refinamiento de las dimensiones de la celda y reducción de datos fueron llevados a cabo empleando la versión más reciente del programa (viz. CrysAlisPro 1.171.40.53, Rigaku OD, 2019). La estructura fue resuelta con el programa SHELXT-2018/2 y fue refinada en F² empleando el método de mínimos cuadrados de matriz completa mediante el programa SHELXL-2018/3.¹¹⁸ Se aplicó una corrección a la absorción empírica empleando CrysAlisPro 1.171.40.53.¹¹⁹ Los átomos de no hidrógeno fueron refinados anisotrópicamente. En el refinamiento, los hidrógenos fueron unidos a átomos de carbono y fueron tratados como átomos de carga empleando los parámetros predeterminados de SHELXL, mientras aquellos átomos unidos a nitrógeno fueron localizados por mapas de diferencia de electrones.

4.9 Fraccionamientos primarios y obtención de los metabolitos 1–15.

4.9.1 Fraccionamiento primario de los extractos de *Aspergillus* sp. NCA276 y purificación de los compuestos 1–5.

El extracto orgánico resultante del cultivo de *Aspergillus* sp. (clave NCA276a, 749.8 mg) se sometió a un fraccionamiento primario empleando CF, como fase estacionaria se utilizó una columna de 12 g de gel de sílice (SiO₂), como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-MeOH, colectando eluatos de 15 mL y generando 9 fracciones (**Figura 13**), reunidas por la señal cromatográfica observada (**Tabla 8**).

Tabla 8. Fraccionamiento primario del extracto NCA276a (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 4	F ₁	0.6
5 – 7	F ₂	18.0
8 – 12	F ₃	25.4
13 – 20	F ₄	3.5
21 – 27	F ₅	123.1
28 – 52	F ₆	55.1
53 – 57	F₇	159.2
58 – 62	F₈	103.5
63 – 70	F ₉	122.2
Peso inicial (mg)		703.6
Total recuperado (mg)		610.6
% Recuperación		86.78

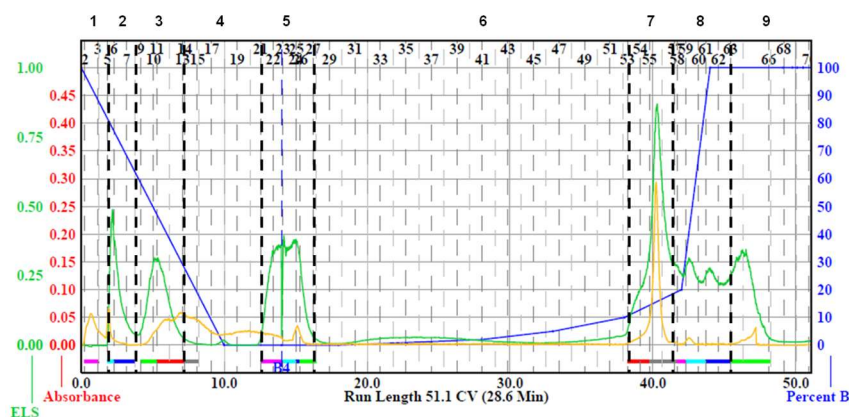


Figura 13. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA276a (*Aspergillus* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

Las fracciones F₇ y F₈ (159.2 y 103.5 mg, respectivamente) se reunieron de acuerdo con su similitud cromatográfica, para más adelante realizar un fraccionamiento secundario, empleando una columna de 4 g de SiO₂ como fase estacionaria y como fase móvil un gradiente compuesto por *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, en orden creciente de polaridad y colectando por tubo 4 mL, reuniendo 9 fracciones secundarias (**Tabla 9** y **Figura 14**).

Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción F₍₇₋₈₎ del extracto NCA276a (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 9	F ₍₇₋₈₎ -1	1.1
10 – 20	F ₍₇₋₈₎ -2	1.0
21 – 27	F ₍₇₋₈₎ -3	0.6
28 – 34	F ₍₇₋₈₎ -4	0.5
35 – 38	F ₍₇₋₈₎ -5	2.2
39 – 49	F₍₇₋₈₎-6	28.9
50 – 55	F ₍₇₋₈₎ -7	63.8
56 – 69	F ₍₇₋₈₎ -8	55.7
70 – 86	F ₍₇₋₈₎ -9	62.8
Peso inicial (mg)		238.6
Total recuperado (mg)		216.6
% Recuperación		90.78

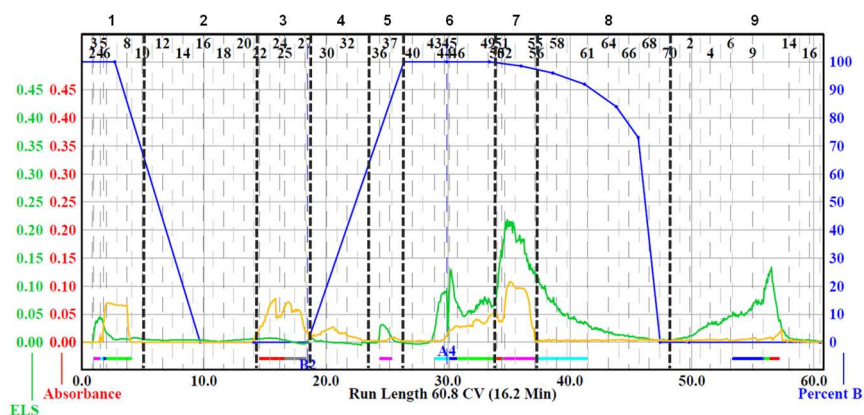


Figura 14. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de F₍₇₋₈₎ [NCA276a (*Aspergillus* sp.)]. En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

La fracción secundaria F₍₇₋₈₎-6 (28.9 mg) se seleccionó para la separación de sus componentes por HPLC preparativo, empleando un sistema en gradiente de 40:60 a 100:0 de MeCN–agua con H₂CO₂ (0.1%) en 20 min (**Figura 15**), de esta manera se obtuvo el producto **1** (4.2 mg, $t_R=14.6$ min).

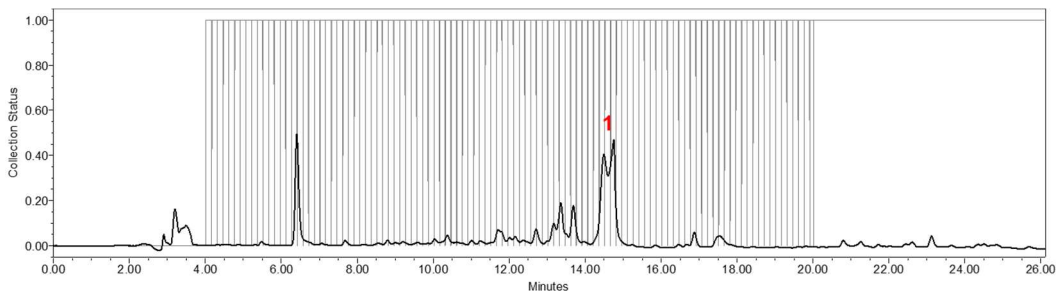


Figura 15. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₍₇₋₈₎-6 de NCA276a (*Aspergillus* sp.); PDA λ 200 nm.

El segundo extracto (clave NCA276b, 2.2 g) se fraccionó utilizando una columna de 40 g de SiO₂ como fase estacionaria y un gradiente conformado por *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, como fase móvil, colectando un volumen de 15 mL por eluato. Esta operación generó 11 fracciones primarias (F₁-F₁₁; **Tabla 10** y **Figura 16**). El análisis cromatográfico de las fracciones mostró que F₃ y F₉ (97.1

y 700.1 mg) se componían por productos mayoritarios, a partir de las cuales se obtuvieron **3** (F₉) y **4** (F₃).

Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto NCA276b (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 28	F ₁	5.4
29 – 53	F ₂	7.4
54 – 61	F ₃	97.1
62 – 72	F ₄	10.3
73 – 78	F ₅	32.2
79 – 83	F ₆	67.0
84 – 88	F ₇	77.6
89 – 92	F ₈	100.6
93 – 97	F ₉	700.1
98 – 108	F ₁₀	537.1
109 – 180	F ₁₁	199.9
Peso inicial (mg)		2098.8
Total recuperado (mg)		1834.7
% Recuperación		87.41

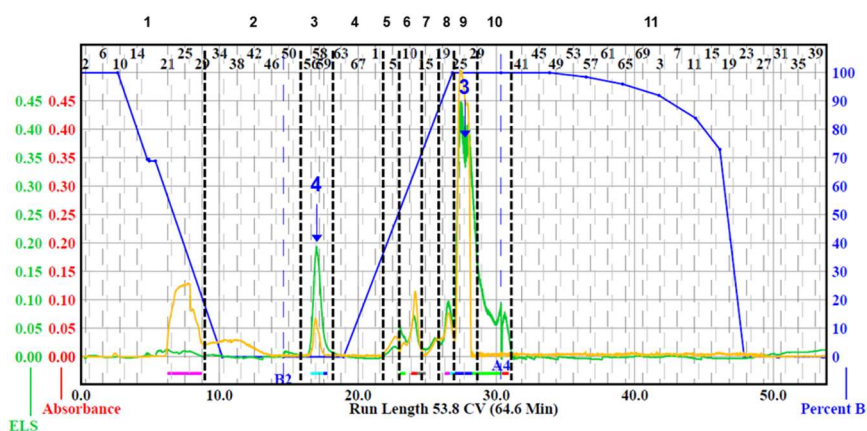


Figura 16. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA276b (*Aspergillus* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

Algunas fracciones se seleccionaron para su purificación por HPLC, adecuando las condiciones de análisis para su separación óptima. La fracción F₆ (65.0 mg) y la fracción F₈ (100.6 mg) se separaron empleando un sistema en gradiente de 40:60 a 100:0 de MeCN–agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min y 20 min, respectivamente (**Figura 17**). Esto permitió el aislamiento de los productos **2** (30.8 mg, $t_R=8.5$ min) de la fracción F₈ y **5** (12.0 mg, $t_R=5.7$ min) a partir de la fracción F₆. De esta última fracción también se aisló un producto adicional (7.2 mg, $t_R=9.6$ min), sin embargo, no fue posible su caracterización debido a que, tras la separación, el análisis cromatográfico de esta fracción reveló que se encontraba conformada por dos compuestos.

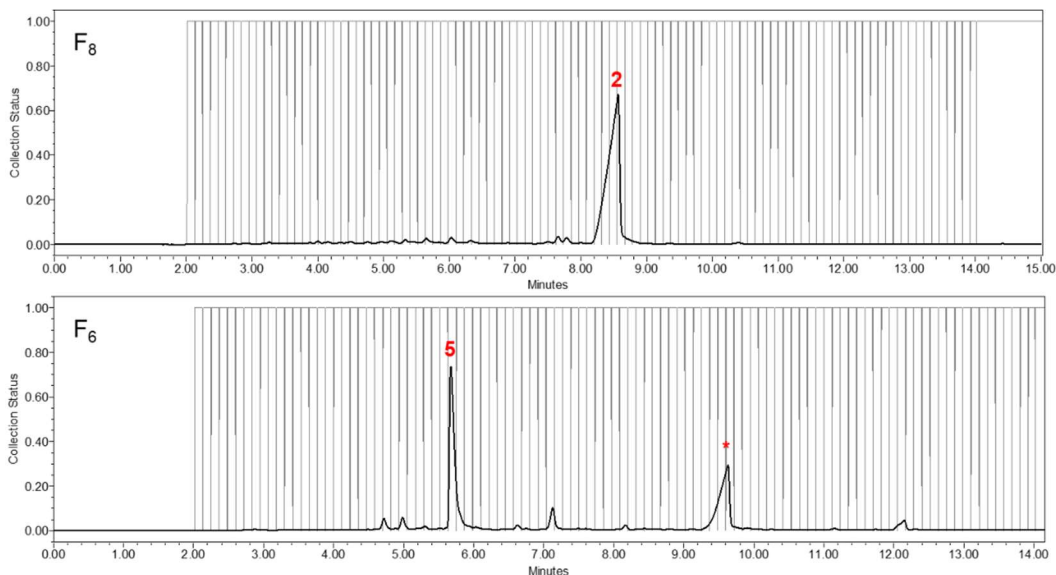


Figura 17. Cromatogramas de las separaciones por HPLC preparativo de las fracciones F₈ (arriba) y F₆ (abajo) de NCA276b (*Aspergillus* sp.); PDA λ 254 nm.

4.9.2 Fraccionamiento primario de los extractos de *Aspergillus* sp. NCA264 y obtención de los compuestos 6-8.

El extracto orgánico procedente del cultivo axénico de *Aspergillus* sp. (clave NCA264a, 721.7 g) se fraccionó por medio de CF, empleando como fase estacionaria una columna de 12 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 10 mL y obteniendo un conjunto de 9 fracciones primarias (F₁-F₉; **Tabla 11** y **Figura 18**), agrupadas según el cromatograma obtenido.

Tabla 11. Fraccionamiento primario del extracto NCA264 (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 4	F ₁	0.5
5 – 6	F ₂	3.4
7 – 15	F ₃	3.2
16 – 25	F ₄	338.9
22 – 44	F ₅	77.5
45 – 60	F ₆	27.8
61 – 99	F₇	42.0
100–138	F ₈	57.3
139–154	F ₉	70.6
Peso inicial (mg)		697.0
Total recuperado (mg)		621.2
% Recuperación		89.12

Se seleccionó la fracción F₇ (33.8 mg) para la separación de sus componentes por HPLC preparativa, empleando un gradiente de 20:80 a 85:15 de MeCN-agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min, originando el producto **6** (0.8 mg, t_R =12.6 min) y **7** (4.6 mg, t_R = 13.8 min).

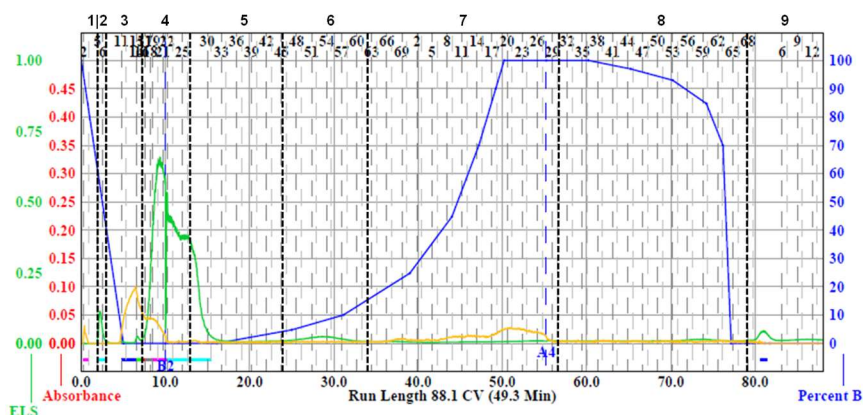


Figura 18. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA264a (*Aspergillus* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

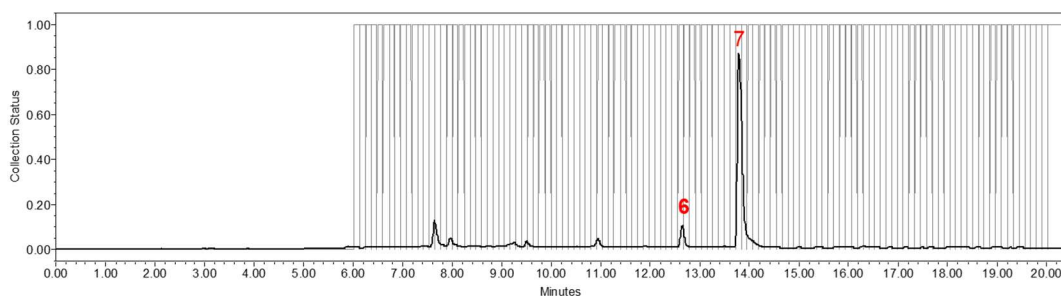


Figura 19. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₇ de NCA264a (*Aspergillus* sp.); PDA λ 254 nm.

Por otra parte, el segundo extracto orgánico obtenido a partir del cultivo de *Aspergillus* sp. (clave NCA264b, 626.8 mg) se fraccionó empleando como fase estacionaria una columna de 40 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 15 mL y obteniendo un conjunto de 10 fracciones (F₁-F₁₀) (**Tabla 12** y **Figura 20**). El análisis cromatográfico de todas las fracciones reveló que la fracción F₅ (110.0 mg) está conformada por un producto mayoritario (**8**).

Tabla 12. Fraccionamiento primario del extracto NCA264b (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 49	F ₁	20.7
50 – 59	F ₂	193.0
60 – 71	F ₃	10.3
72 – 75	F ₄	32.8
76 – 78	F₅	110.0
79 – 90	F ₆	26.0
91 – 101	F ₇	21.2
102 – 128	F ₈	57.7
129 – 140	F ₉	14.4
141 – 175	F ₁₀	57.7
Peso inicial (mg)		626.8
Total recuperado (mg)		624.6
% Recuperación		99.64

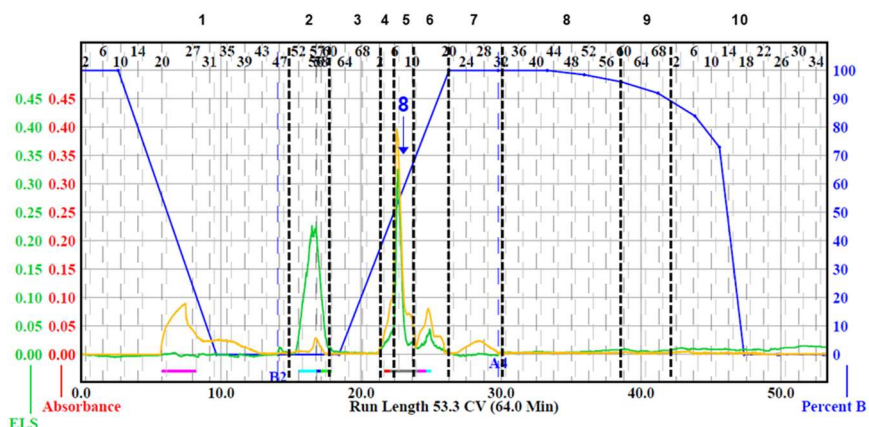


Figura 20. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA264b (*Aspergillus* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

4.9.3 Fraccionamiento primario del extracto NCA257a (*Aspergillus* sp.) y obtención del compuesto 9.

El extracto orgánico obtenido a partir del cultivo de *Aspergillus* sp. (clave NCA257a, 527.3 mg) se fraccionó por CF, utilizando como fase estacionaria una columna de 12 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-MeOH, colectando eluatos de 15 mL y obteniendo un conjunto de 10 fracciones (F₁-F₁₀) reunidas por la señal observada en el cromatograma (**Tabla 13** y **Figura 21**). El análisis cromatográfico de la fracción F₄ (19.5 mg) reveló que está conformada por un compuesto mayoritario (**9**).

Tabla 13. Fraccionamiento primario del extracto NCA257a (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 16	F ₁	2.6
17 – 21	F ₂	144.3
22 – 24	F ₃	3.2
25 – 40	F₄	19.5
41 – 45	F ₅	49.8
46 – 47	F ₆	24.1
48 – 50	F ₇	30.4
51 – 54	F ₈	51.4
55 – 61	F ₉	132.9
62 – 70	F ₁₀	35.9
Peso inicial (mg)		527.3
Total recuperado (mg)		494.1
% Recuperación		93.70

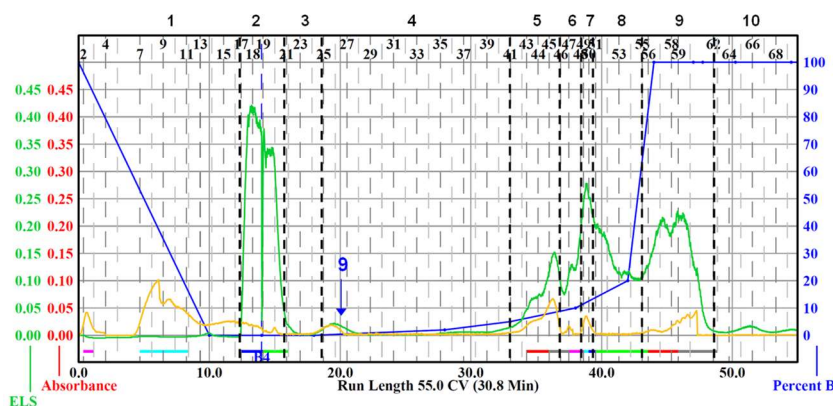


Figura 21. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA257a (*Aspergillus* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

4.9.4 Fraccionamiento primario del extracto NCA252a *Stachybotrys* sp. y purificación de los compuestos 10-15.

El extracto orgánico procedente del cultivo axénico de *Stachybotrys* sp. (clave NCA252a, 1.92 g) se fraccionó por medio de CF, empleando como fase estacionaria una columna de 40 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 15 mL, obteniendo un conjunto de 16 fracciones primarias, agrupadas por la señal observada en el cromatograma (**Figura 22**). El resumen de las fracciones obtenidas se observa en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Fraccionamiento primario del extracto NCA252a (*Stachybotrys* sp.).

Fraciones	Clave	Peso (mg)	Fraciones	Clave	Peso (mg)
1 – 46	F ₁	28.5	86 – 89	F ₉	188.3
47 – 54	F ₂	216.3	90 – 94	F ₁₀	177.0
55 – 57	F₃	40.9	95 – 101	F ₁₁	65.1
58 – 72	F ₄	8.1	102–140	F ₁₂	79.1
73 – 75	F ₅	23.6	141–154	F ₁₃	67.2
76 – 79	F₆	354.2	155–160	F ₁₄	49.3
80 – 81	F ₇	74.8	161–166	F ₁₅	52.5
82 – 85	F₈	329.0	167–185	F ₁₆	27.8
Peso inicial (mg)					1916.9
Total recuperado (mg)					1782.3
% Recuperación					95.68

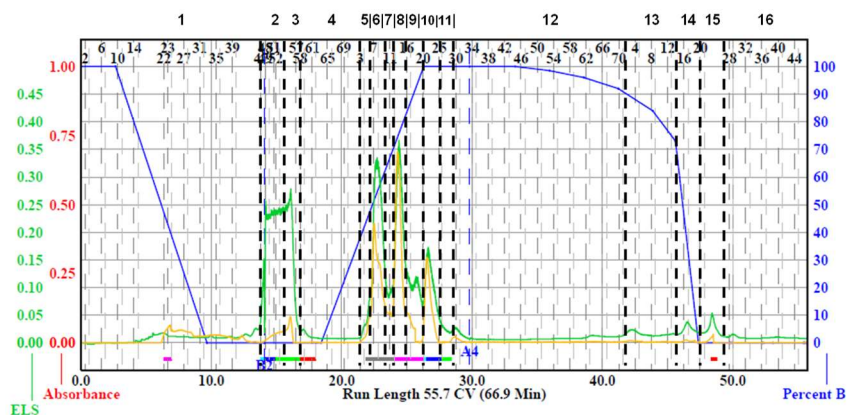


Figura 22. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA252a (*Stachybotrys* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

El análisis cromatográfico del conjunto de fracciones permitió la selección de la fracción F₃ (40.9 mg) para su separación mediante HPLC (**Figura 23**), empleando un gradiente de 30:70 a 100:0 de MeCN-agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min, obteniendo el compuesto **10** (3.4 mg, $t_R = 7.0$ min). El producto mayoritario de la fracción (5.7 mg, $t_R = 12.4$ min) presentó degradación durante el proceso de elucidación.

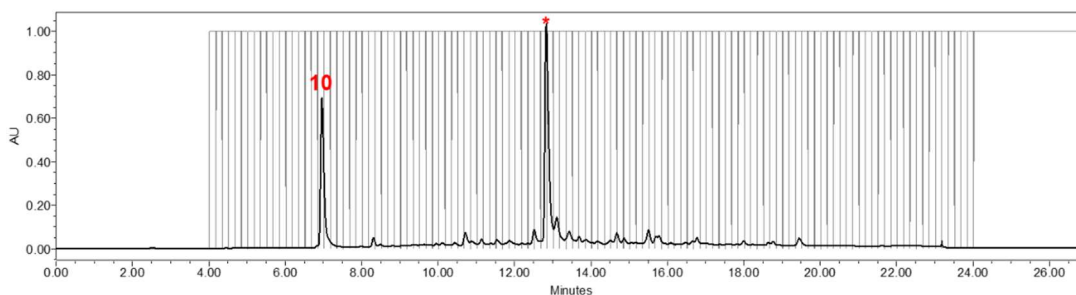


Figura 23. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₃ de NCA252a (*Stachybotrys* sp.); PDA λ 254 nm.

Por otra parte, se realizó el fraccionamiento secundario de dos fracciones primarias. Para la fracción F₆ (309.6 mg), se empleó como fase estacionaria una columna de 12 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 10 mL. Obteniendo 9 fracciones secundarias (F₆₋₁-F₆₋₉; **Tabla 15** y **Figura 24**).

Tabla 15. Fraccionamiento secundario de la fracción F₆ del extracto NCA252a (*Stachybotrys* sp.).

Fraciones	Clave	Peso (mg)
1 – 8	F ₆₋₁	0.8
9 – 21	F ₆₋₂	1.2
22 – 29	F ₆₋₃	2.6
30 – 42	F ₆₋₄	42.7
43 – 62	F₆₋₅	128.2
63 – 72	F ₆₋₆	32.6
73 – 83	F ₆₋₇	40.0
94 – 99	F ₆₋₈	12.6
100 – 148	F ₆₋₉	8.4
Peso inicial (mg)		309.6
Total recuperado (mg)		269.1
% Recuperación		86.91

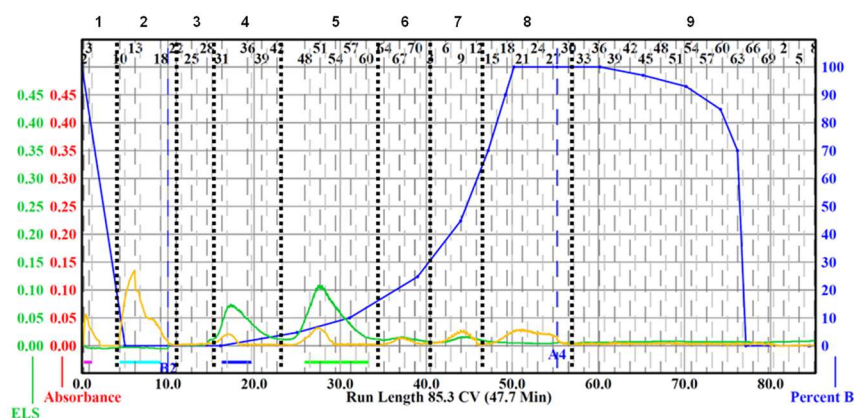


Figura 24. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de F₆ [NCA252a (*Stachybotrys* sp.)]. En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

La fracción F₆₋₅ (120.4 mg) se seleccionó para su separación por HPLC a nivel preparativo (**Figura 25**), utilizando un gradiente de 50:50 a 80:20 de MeCN- agua con H₂CO₂ (0.1%) por 15 min, lo que permitió el aislamiento de los compuestos **11** (4.9 mg, $t_R = 9.7$ min), **12** (21.2 mg, $t_R = 11.5$ min), **13** (16.8 mg, $t_R = 16.8$ min) y **14** (7.5 mg, $t_R = 17.5$ min).

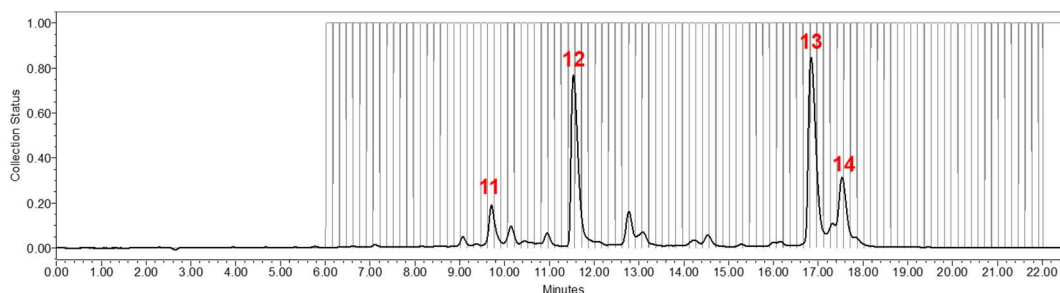


Figura 25. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₆₋₅ de NCA252a (*Stachybotrys* sp.); PDA λ 230 nm.

La fracción F₈ (288.7 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario por CF, empleando como fase estacionaria una columna de 12 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 10 mL, generando 11 fracciones secundarias (F₈₋₁-F₈₋₁₁; **Tabla 16** y **Figura 26**).

Tabla 16. Fraccionamiento secundario de la fracción F₈ del extracto NCA252a (*Stachybotrys* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 9	F ₈₋₁	0.7
10 – 20	F ₈₋₂	1.1
21 – 24	F ₈₋₃	0.4
25 – 27	F ₈₋₄	1.1
28 – 62	F ₈₋₅	31.6
63 – 74	F₈₋₆	110.7
75 – 80	F ₈₋₇	35.7
81 – 87	F ₈₋₈	32.8
88 – 95	F ₈₋₉	34.9
96 – 99	F ₈₋₁₀	4.0
100 – 148	F ₈₋₁₁	14.6
Peso inicial (mg)		288.7
Total recuperado (mg)		267.6
% Recuperación		92.69

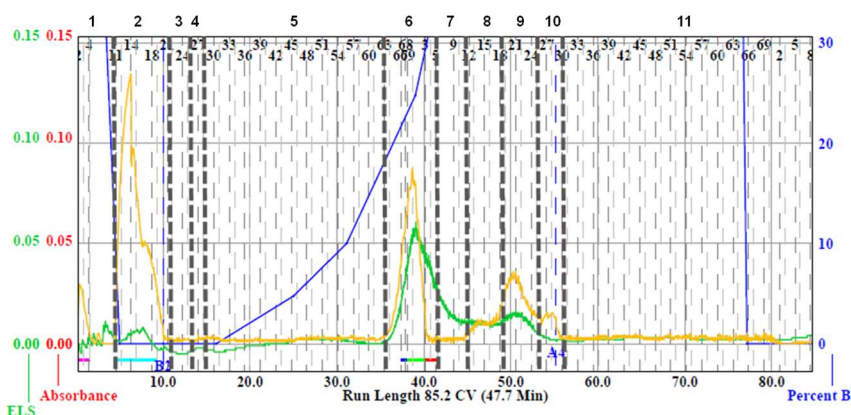


Figura 26. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de F₈ [NCA252a (*Stachybotrys* sp.)]. En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

La fracción F₈₋₆ (110.7 mg) se resolvió y consecuentemente se separó (**Figura 27**), empleando un sistema de elución de 60:40 a 100:0 de MeCN– agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min, obteniendo así el compuesto **15** (8.6 mg, *t_R* = 10.4 min). De esta fracción se obtuvo otro producto (14.2 mg, *t_R* = 11.9 min), el cual sufrió degradación, lo que imposibilitó la caracterización química de la molécula.

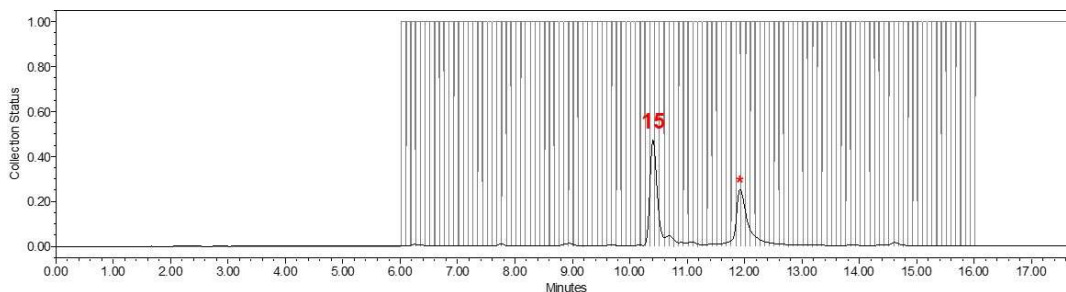


Figura 27. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₈₋₆ NCA252 (*Stachybotrys* sp.); PDA λ 254 nm.

4.10 Estudio químico de los cocultivos entre las especies *Aspergillus* sp. NCA257, *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276.

4.10.1 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos.

Los extractos orgánicos obtenidos del cocultivo de las especies *Aspergillus* spp. (NCA257, NCA276) y *Cladosporium* sp. (NCA273) (claves NCA257/NCA273, 1206.1 mg; NCA257/NCA276, 1197.4 mg; NCA273/NCA276, 968.4 mg) (**Figura 28**) se sometieron a un fraccionamiento primario empleando columnas con 12 g de SiO₂ como fase estacionaria, una mezcla de *n*-hexano-CHCl₃-MeOH en orden creciente de polaridad como fase móvil, y colectando eluatos de 15 mL. El compendio de las fracciones obtenidas se resume en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Fraccionamiento primario de los extractos NCA257/NCA273 (superior), NCA257/NCA276 (en medio), NCA273/NCA276 (inferior).

NCA257/NCA273			NCA257/NCA276			NCA273/NCA276		
Fraciones	Clave	Peso (mg)	Fraciones	Clave	Peso (mg)	Fraciones	Clave	Peso (mg)
1 – 17	F ₁	17.3	1 – 14	F ₁	1.1	1 – 16	F ₁	115.3
18 – 22	F ₂	314.0	15 – 17	F ₂	2.9	17 – 20	F ₂	78.1
23 – 31	F ₃	10.7	18 – 20	F ₃	120.4	21 – 40	F ₃	50.3
32 – 36	F ₄	25.9	21 – 22	F ₄	59.5	41 – 45	F ₄	21.0
37 – 40	F₅	74.9	23 – 26	F ₅	8.7	46 – 47	F ₅	54.9
41 – 45	F₆	107.4	27 – 38	F ₆	35.3	48 – 50	F ₆	114.9
46 – 47	F ₇	45.1	39 – 44	F ₇	45.8	51 – 54	F ₇	109.2
48 – 49	F₈	55.1	45 – 47	F ₈	24.5	55 – 57	F ₈	25.8
50 – 52	F ₉	60.4	48 – 50	F ₉	63.6	58 – 61	F ₉	49.5
53 – 56	F ₁₀	59.5	51 – 52	F ₁₀	62.0	62 – 65	F ₁₀	89.0
57 – 58	F ₁₁	29.1	53 – 54	F ₁₁	71.6	66 – 71	F ₁₁	15.2
59 – 63	F ₁₂	95.4	55 – 61	F ₁₂	139.8	Peso inicial (mg)		827.8
64 – 70	F ₁₃	10.1	62 – 65	F ₁₃	53.3	Total recuperado (mg)		723.2
Peso inicial (mg)		929.7	66 – 67	F ₁₄	64.2	% Recuperación		87.36
Total recuperado (mg)		904.9	68 – 71	F ₁₅	49.8			
% Recuperación		97.33	72 – 77	F ₁₆	16.2			
			Peso inicial (mg)		862.5			
			Total recuperado (mg)		818.7			
			% Recuperación		95.35			

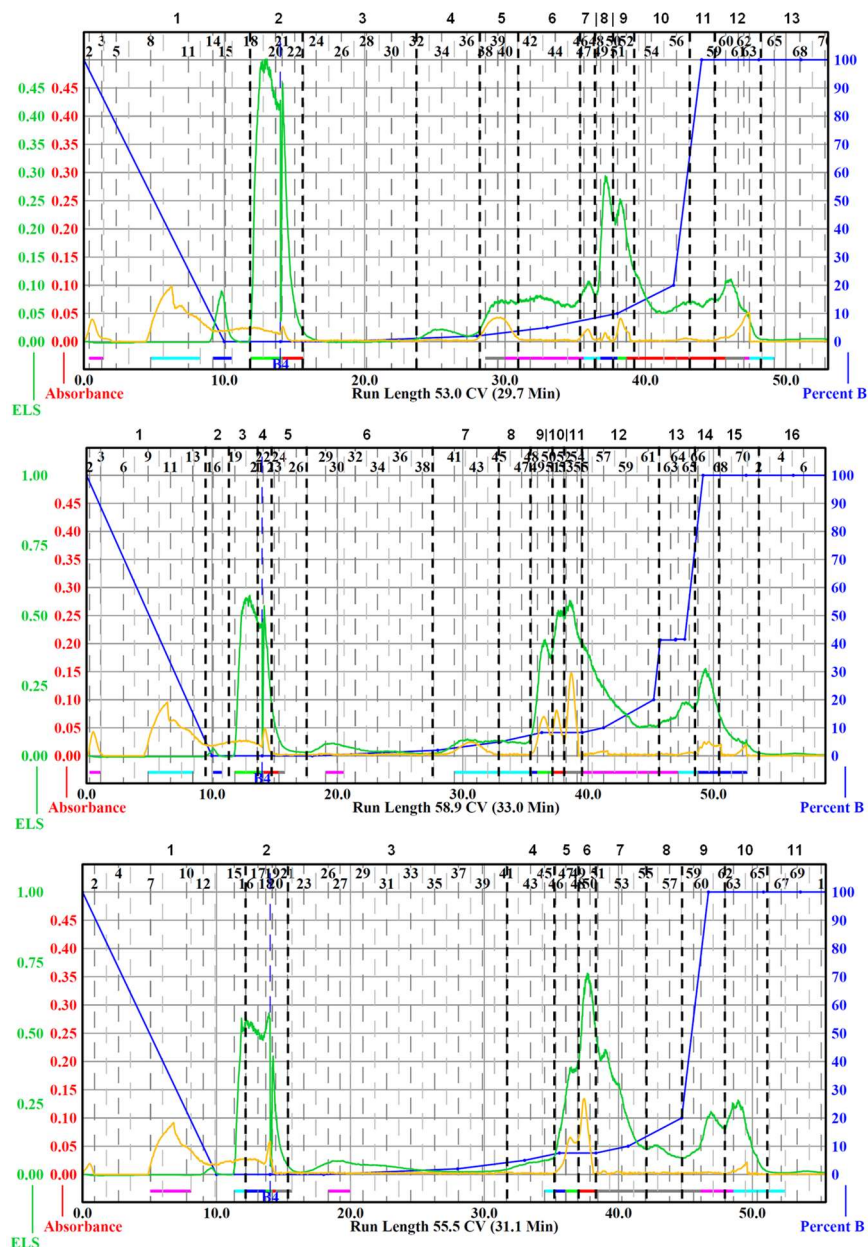


Figura 28. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario de los extractos NCA257/NCA273 (superior), NCA257/NCA276 (en medio), NCA273/NCA276 (inferior). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

4.10.2 Obtención de los compuestos 16-18 a partir del extracto NCA257/NCA273 *Aspergillus* sp./*Cladosporium* sp.

Las fracciones F₅ (65.9 mg) y F₆ (97.8 mg) se seleccionaron para su separación mediante HPLC preparativa. Para ello, se optimizaron las condiciones de análisis, empleando un gradiente de 10:90 a 70:30 de MeCN-agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min (**Figura 29**). Este procedimiento permitió el aislamiento de los compuestos **16** [51.4 mg, $t_R=9.6$ min (F₅); 35.8 mg, $t_R=5.7$ min (F₆)] y **17** [16.4 mg, $t_R=10.8$ min (F₅); 5.6 mg, $t_R=9.9$ min (F₆)].

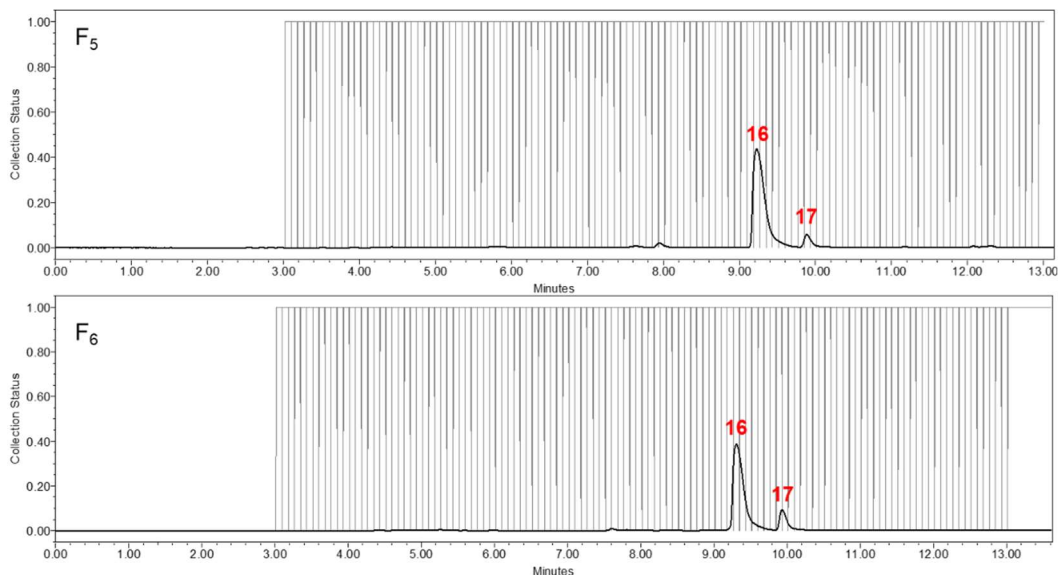


Figura 29. Cromatogramas de las separaciones por HPLC preparativo de las fracciones F₅ y F₆ de NCA257/NCA273 (*Aspergillus* sp./*Cladosporium* sp.); PDA λ 254 nm.

Por otra parte, la F₉ (58.1 mg) se separó utilizando un gradiente de 15:85 a 100:0 de MeCN- agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min (**Figura 30**), dando origen al producto **18** (2.6 mg, t_R = 7.5 min).

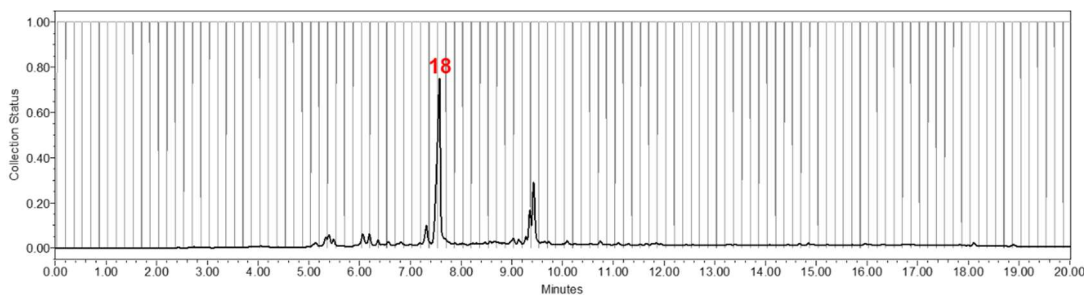


Figura 30. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₉ de NCA257/NCA273 (*Aspergillus* sp./*Cladosporium* sp.); PDA λ 280 nm.

4.11 Estudio químico del cocultivo entre las especies *Aspergillus* sp. NCA276 y bacteria NCA250.

4.11.1 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos.

Se fraccionó el extracto orgánico producido por el hongo *Aspergillus* sp. cultivado en medio líquido A1 por 21 días (clave NCA276d, 109.6 mg) empleando CF. Se utilizó como fase estacionaria una columna de 4 g de SiO₂ y como fase móvil, un gradiente en orden creciente de polaridad compuesto por *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH (**Figura 31**). Esta operación originó 4 fracciones primarias (**Tabla 18**).

Tabla 18. Fraccionamiento primario del extracto NCA276d (*Aspergillus* sp.).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 47	F ₁	20.7
48 – 55	F ₂	9.1
56 – 71	F ₄	12.0
72 - 82	F ₅	52.5
Peso inicial (mg)		94.3
Total recuperado (mg)		107.0
% Recuperación		88.13

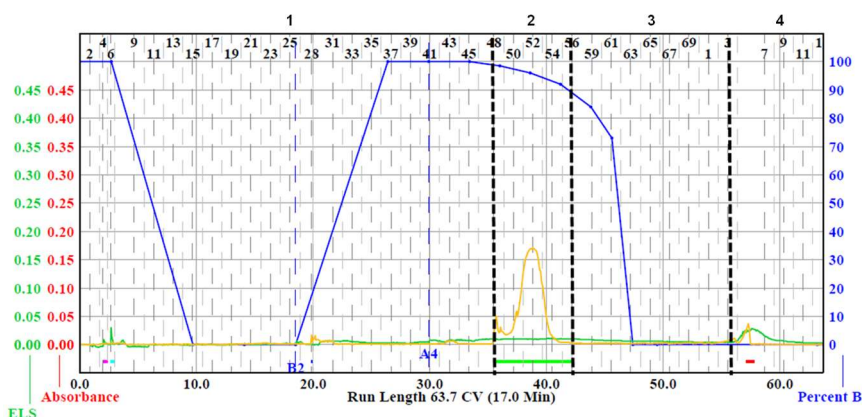


Figura 31. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA276d (*Aspergillus* sp.). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

4.11.2 Obtención del compuesto 19 a partir del extracto NCA276d *Aspergillus* sp.

Se seleccionó la fracción F₁ para su separación por HPLC semipreparativa, debido a que mostraba las señales principales observadas en el extracto. Las condiciones se optimizaron, adquiriendo un perfil adecuado bajo las siguientes condiciones de análisis: gradiente de 30:70 a 100:0 de MeCN-agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min (**Figura 32**), lo que permitió la obtención de dos productos: **19** (4.5 mg, $t_R=9.6$ min) y nuevamente **4** (0.5 mg, $t_R=16.4$ min).

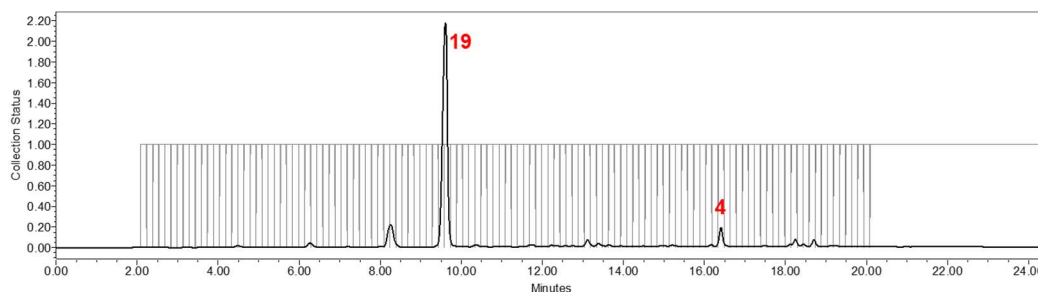


Figura 32. Cromatogramas de las separaciones por HPLC preparativo de la fracción F₁ de NCA276d (*Aspergillus* sp.); PDA λ 254 nm.

4.11.3 Obtención del compuesto 20 a partir del extracto NCA250 (bacteria)

El extracto orgánico NCA250b (109.2 mg) se sometió a un proceso de partición, resuspendiendo el extracto en H₂O (20 mL) y realizando un reparto con CHCl₃-MeOH (1:1; 2×20 mL). Ambas fases se colectaron y posteriormente, concentraron *in vacuo*, recuperando así 18.0 mg de la fase orgánica y 81.9 mg de la fase acuosa. Tras su análisis por HPLC analítica, se apreció que las señales de interés se concentraron en la fase orgánica (18.0 mg) por lo que se separó por HPLC semipreparativa, empleando como fase móvil un gradiente de 50:50 a 100:0 de MeCN-agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min (**Figura 33**), permitiendo el aislamiento del producto **20** (0.5 mg, *t_R* = 13.7 min).

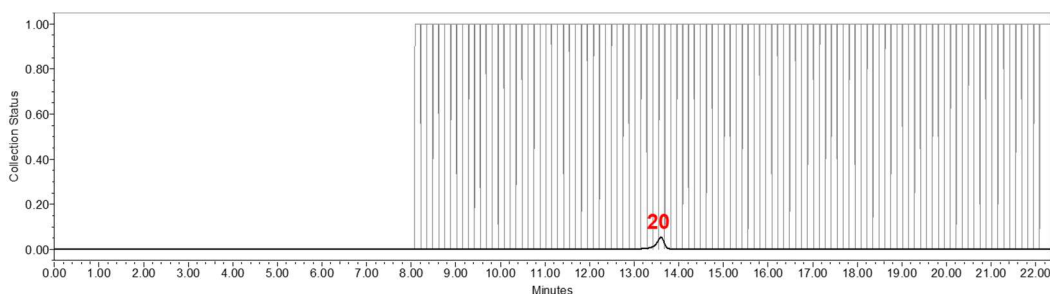


Figura 33. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fase orgánica del extracto NCA250b (bacteria); PDA λ 440 nm.

4.12 Estudio químico de la cepa bacteriana NCA250.

4.12.1 Fraccionamiento primario del extracto NCA250c y obtención de cantidades adicionales del producto 20.

El extracto orgánico procedente del cultivo axénico de la bacteria NCA250 en arroz húmedo (clave NCA250c, 904.3 mg) se fraccionó empleando CF, la fase estacionaria seleccionada fue una columna de 24 g de SiO₂ y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando eluatos de 10 mL (**Figura 34**), lo que generó un conjunto de 10 fracciones primarias, agrupadas por la señal observada en el cromatograma. El resumen de las fracciones obtenidas se observa en la **Tabla 19**.

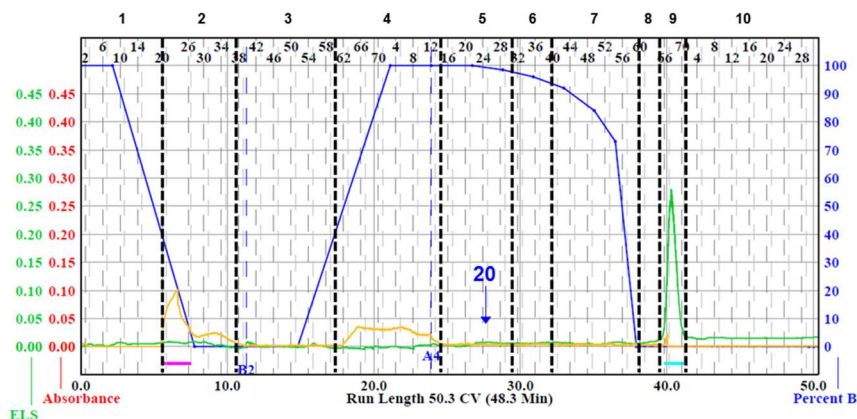


Figura 34. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA250c. En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

Tabla 19. Fraccionamiento primario del extracto NCA250c (bacteria).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 19	F ₁	1.5
20 – 38	F ₂	1.5
39 – 60	F ₃	11.5
61 – 84	F ₄	6.0
85 – 100	F ₅	16.3
101 – 110	F ₆	9.4
111 – 130	F ₇	9.4
131 – 134	F ₈	23.7
135 – 140	F ₉	576.3
141 – 170	F ₁₀	23.8
Peso inicial (mg)		865.8
Total recuperado (mg)		742.8
% Recuperación		85.79

El análisis cromatográfico de todas las fracciones reveló que la fracción F₅ (16.3 mg) se compone de un compuesto mayoritario, que resultó ser el mismo previamente aislado (**20**) a partir del extracto NCA250b.

4.13 Estudio químico de la cepa bacteriana NCA274.

4.13.1 Fraccionamiento primario del extracto NCA274 y obtención de los productos **21** y **22**.

El extracto orgánico originado por el cultivo axénico de la bacteria NCA274 en arroz húmedo (113.0 mg) fue fraccionado empleando CF. La fase estacionaria seleccionada fue una columna de 12 g de SiO₂ y como fase móvil se empleó un gradiente de polaridad creciente entre *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH, colectando por tubo 10 mL (**Figura 35**). Como resultado de este, se obtuvieron un conjunto de 9 fracciones primarias. Las fracciones obtenidas y sus rendimientos se resumen en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Fraccionamiento primario del extracto NCA274 (bacteria).

Fracciones	Clave	Peso (mg)
1 – 9	F ₁	1.3
10 – 17	F ₂	1.3
18 – 27	F ₃	28.2
28 – 46	F ₄	9.2
47 – 57	F ₅	18.7
58 – 67	F ₆	7.7
68 – 82	F ₇	11.6
83 – 91	F ₈	25.8
92 – 120	F ₉	6.9
Peso inicial (mg)		113.0
Total recuperado (mg)		110.7
% Recuperación		97.96

Se seleccionó la fracción F₅ (18.7 mg) para la separación de sus componentes mayoritarios mediante HPLC semipreparativa (**Figura 36**), empleando un gradiente de 60:40 a 100:0 de MeOH-agua con H₂CO₂ (0.1%) en 15 min y con una velocidad de flujo del 80% con respecto al indicado en la metodología general para evitar la presurización de la columna (16.99 mL/min). De esta manera se obtuvieron los compuestos **21** (0.5 mg, $t_R = 10.3$ min) y **22** (0.4 mg, $t_R = 13.2$ min).

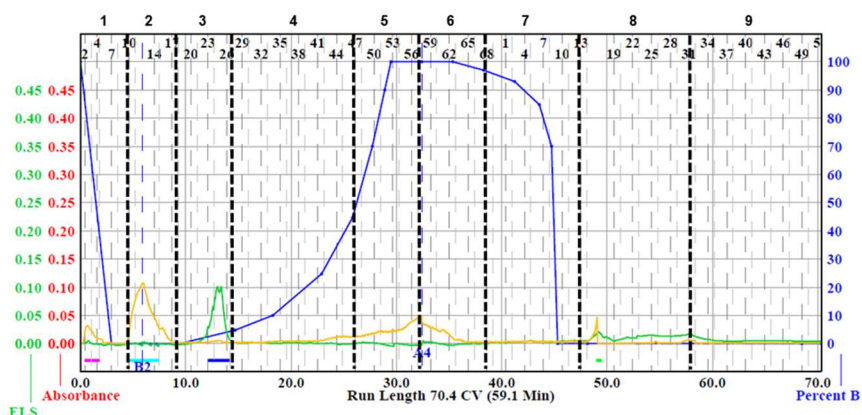


Figura 35. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto NCA274 (bacteria). En amarillo la señal del detector PDA y en verde la señal del detector ELSD.

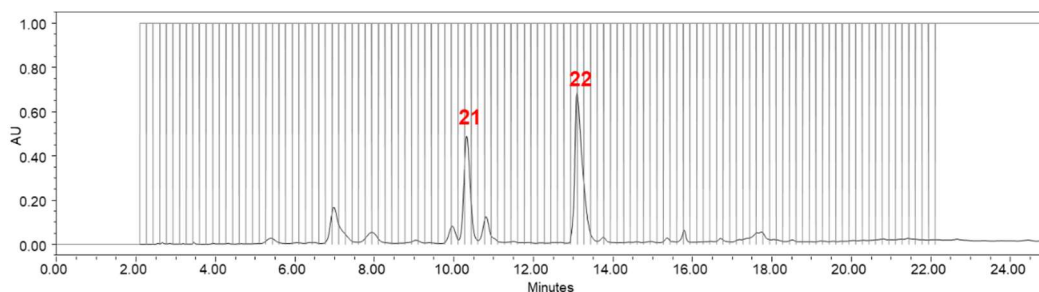


Figura 36. Cromatograma de la separación por HPLC preparativo de la fracción F₅ del extracto NCA274 (bacteria); PDA λ 440 nm.

4.14 Evaluaciones biológicas.

4.14.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos frente a bacterias ESKAPE.

Los compuestos obtenidos se evaluaron *in vitro* empleando el método de microdilución en placas de 96 pozos¹¹¹ frente una batería de bacterias Gram(+) y Gram(-): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina; ERV), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a metilina, SARM), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* cepa 564 (resistente a antibióticos). Para ello, las bacterias de prueba se cultivaron en medio Müller Hinton a 37 °C por 24 h para cada evaluación y se inocularon en tubos con agua destilada estéril, ajustando la turbidez a 0.5 de la escala de Mc Farland. Para el cálculo de la CMI de los controles positivos [vancomicina para ambas cepas de *E. faecalis* y SARM, ampicilina para *S. aureus* ATCC 6538 y ATCC 25923 y gentamicina para las bacterias Gram(-)], se realizó una curva mediante diluciones seriadas, partiendo de una solución stock de 1 mg/mL de cada control positivo, o bien, la concentración inicial de la solución stock se ajustó de tal forma que la CMI se encontrara en la mitad de la curva (**inciso 5.11.1, Tabla 36**). Cada pozo de la curva contenía 50 µL de medio (después de realizar la dilución seriada), 100 µL de medio de cultivo y 100 µL de la solución de microorganismo a probar. Para la evaluación de los compuestos puros, se prepararon soluciones stock a 0.5 y 0.05 mg/mL (para evaluar a 100 y 10 µg/mL, respectivamente) en DMSO en agua al 10%. Cada pozo de prueba contenía 50 µL de la solución stock, 100 µL de medio de cultivo y 100 µL de la suspensión de microorganismo. Ambas concentraciones fueron evaluadas por triplicado para cada compuesto. También se realizaron controles de crecimiento y esterilidad, así como de DMSO al 10%. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h y posteriormente, se empleó MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) como agente revelador, colocando en cada pozo 10 µL de una solución del reactivo en MeOH (5 mg/mL) e incubando la placa a 37 °C por 30 min. Las absorbancias se obtuvieron empleando un espectrofotómetro BioRad® modelo iMark (Hercules, CA, EEUU) a una longitud de 490 nm) utilizando el software Microplate Manager® 6 (versión 6.3, BioRad®, Hercules, CA, EEUU). El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó empleando la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = 100 - \left[\left(\frac{\lambda_{490}muestra - \lambda_{490}medio\ de\ cultivo}{\lambda_{490}control\ de\ crecimiento - \lambda_{490}medio\ de\ cultivo} \right) \times 100 \right]$$

4.14.2 Método de estría cruzada.

Con la finalidad de evaluar el potencial antimicrobiano de las cepas bacterianas, se realizó el ensayo de estría cruzada contra los patógenos *Escherichia coli* ATCC10536, *Salmonella typhi* ATCC 9992, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 10231.¹¹² Para ello, cada bacteria se inoculó en cajas

de Petri de 5 cm de diámetro con agar Luria-Bertani mediante estría a lo largo de la placa y se mantuvieron a temperatura ambiente por 7 días (solo los organismos NCA258 y NCA259 se colocaron a 37°C). Al término de este periodo, se realizó el inóculo en sentido perpendicular al crecimiento de las bacterias, de los organismos de prueba y se dejaron en incubación por 48 h a 37°C.

4.14.3 Evaluación de la actividad anti-*Mycobacterium* y citotoxicidad de los compuestos puros.

Esta parte del proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Scott Franzblau de la UIC.^{113,114}

MABA (Ensayo en placa de azul de Alamar): Los compuestos puros se disolvieron en DMSO antes de ser añadidos a la placa de ensayo, la cual contenía el medio 7H12 (4.7 g de caldo, 1 g de casitona (Bacto), 5 g de albúmina sérica bovina (ASB), 4 mg de catalasa y 5.6 mg de ácido palmítico por cada litro de medio). Se realizaron diluciones seriadas por duplicado. El stock de *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 se inoculó en el medio líquido, para alcanzar una concentración final de 3 a 5 × 10⁵ células/mL y posteriormente se añadió a las placas de ensayo, las cuales se incubaron por 7 días a 37 °C. Los pozos que contenían únicamente los compuestos de prueba se emplearon para detectar su auto-fluorescencia, así como también se utilizaron controles que contenían únicamente a la bacteria y el medio de cultivo. Para revelar la placa se empleó el colorante redox azul de Alamar (20 µL de 0.6 mM de resazurina y 12 µL de Tween 80 al 20%) y las placas se incubaron por un periodo adicional de 18-24 h a 37°C. La fluorescencia final se midió después de 24 h a 530 nm ($\lambda_{excitación}$) y 590 nm ($\lambda_{emisión}$) empleando un lector de placa CLARIOstar (BMG, LABTECH, Ortenberg, Alemania). La CMI se definió como la concentración mínima del compuesto requerida para alcanzar una reducción de la fluorescencia del 90%, con respecto a los controles bacterianos sin tratamiento.

LORA (Ensayo de recuperación frente a concentraciones bajas de oxígeno): Para este ensayo se empleó una cepa de *M. tuberculosis* H₃₇Rv adaptada a condiciones bajas de oxígeno y transformada con el plásmido auto-luminiscente LuxABCDE, la cual es expuesta a los compuestos de prueba bajo hipoxia y un periodo de recuperación normóxica; el crecimiento se cuantificó mediante luminiscencia. La cepa en cuestión se descongeló y diluyó en caldo Middlebrook 7H12 (caldo Middlebrook 7H9 adicionado con 1 mg/mL casitona, 5.6 µg/mL ácido palmítico 5 mg/mL de ASB y 4 µg/mL de catalasa). El inóculo se ajustó a una concentración final entre 5×10⁵ y 2×10⁶ UFC/mL. Se realizaron diluciones seriadas de los compuestos de prueba por duplicado. La microplaca se sometió a anaerobiosis (concentración de O₂ menor a 0.16%) empleando un Anoxomat modelo WS-8080 (MART Microbiology) y tres ciclos de evacuación y llenado con una mezcla de 10% H₂, 5% CO₂ y 85% N₂. La placa se incubó a 37 °C por 10 días y posteriormente se transfirió a una incubadora (37 °C, 5% CO₂ y 95% humedad) para 28h de recuperación normóxica. En el día 11 (después del periodo de recuperación) se añadieron 100 µL de una solución 1% de n-decanal a cada pozo y la luminiscencia se detectó a 490 nm en un lector de placa CLARIOstar (BMG

LABTECH, Ortenberg, Alemania). La CMI se definió como la concentración mínima del compuesto requerida para alcanzar una reducción en la luminiscencia del 90% con relación a los controles bacterianos sin tratamiento.

Citotoxicidad en células de mamífero: La línea celular Vero ATCC CCL-81 se cultivó en el medio esencial mínimo de Eagle (MEM) con 10% de suero fetal bovino (FBS) adicionado con penicilina y estreptomycin. Las células Vero se prepararon y lavaron con una solución 0.25% de tripsina-EDTA 1× en solución salina balanceada de Hank (HBSS; pH 7.4). Después de verificar la morfología por microscopía y ajustar la densidad en 3 a 5×10^5 células/mL en MEM, 100 μ L de la suspensión celular se incubaron con los compuestos de prueba a 37 °C por 72 h. La placa se reveló con 20 μ L de 0.6 mM de resazurina e incubada por 4h. La fluorescencia se midió a 530/590 nm. En este caso se calculó la IC₅₀ para cada compuesto, definida como la concentración efectiva para reducir la fluorescencia en un 50% con respecto al control bacteriano.

4.15 Análisis por Redes Moleculares.

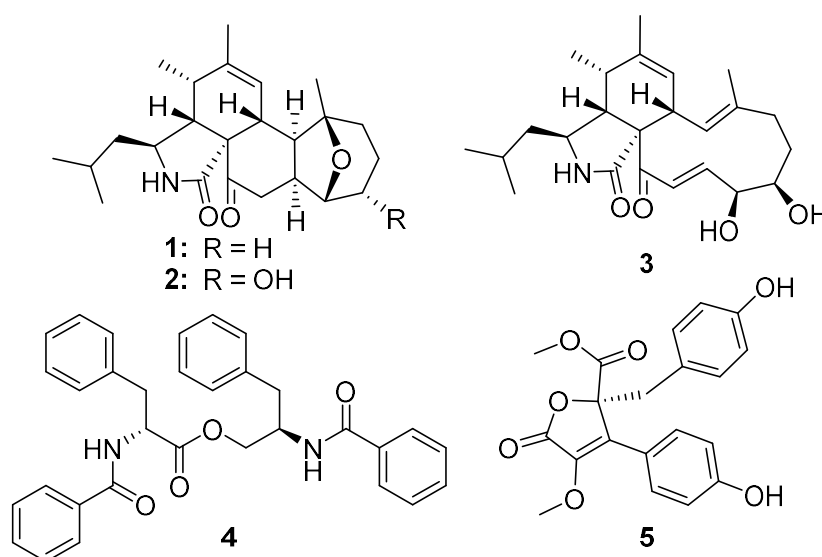
Los archivos correspondientes a los espectros de masas de alta resolución (HRESIMS-MS/MS) de cada extracto analizado se convirtieron al formato mzML empleando el software de ProteoWizard MsConvert (versión 3.0.20239). Todos los archivos convertidos se cargaron en el servidor web Global Natural Products Social (GNPS; gnps.ucsd.edu) empleando el programa FTP Server versión 5.17.16 (Microsoft Windows) y analizados empleando el flujo de trabajo publicado por Aron y colaboradores.¹¹⁵ Los datos se filtraron removiendo todos los iones fragmentados MS/MS entre ± 17 Da del precursor m/z . La tolerancia de masa de los iones precursores y la tolerancia de los iones fragmentados MS/MS se ajustaron a 0.01 y 0.02 Da, respectivamente. La red se creó de tal manera que los edges poseen un puntaje de coseno superior a 0.7 y más de 5 picos alineados. Posteriormente, los edges entre dos nodos se conservaron en la red si cada uno de ellos concordaba entre los 10 nodos más similares entre sí. Los espectros que conforman la red fueron comparados frente la colección de espectros del GNPS. Esta colección fue filtrada de la misma forma que los datos de entrada. De igual forma se emplearon las funciones MolNetEnhancer¹¹⁶ y Derreplicator+¹¹⁷ para el análisis de los datos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio químico de *Aspergillus* spp.

5.1.1 Estudio químico de *Aspergillus* sp. NCA276.

A partir del primer extracto del hongo *Aspergillus* sp. se obtuvo el producto **1**, el cual pertenece a la familia estructural de las aspocalasinas. Posteriormente, del segundo extracto se obtuvieron los productos **2–5**, donde **2** y **3** pertenecen a la misma familia estructural que **1**, mientras que **4** es un compuesto derivado de fenilalanina y **5** resultó ser una butirolactona. Todas las estructuras se elucidaron gracias a los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y HRESIMS principalmente, y la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos observados con los presentes en trabajos previos a esta investigación.



La fórmula molecular del compuesto **1** se dedujo como $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_3$ (IDH=8, calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{NO}_3$, $\Delta=-2.0$ ppm) con base en los iones m/z 386.2682 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 384.2543 $[\text{M}-\text{H}]^-$ obtenidos por HRESIMS (**Figura 38**). El espectro de RMN de ^1H (**Figura 37**) exhibió las siguientes señales: tres señales simples ensanchadas δ_{H} 5.99 (s), 5.44 (s) y 3.79 (s) correspondientes a un H de amida, un protón olefínico y un metino base de oxígeno, respectivamente; siete metinos δ_{H} 3.10 (dt, $J=10.5$, 3.4 Hz), 3.02 (q, $J=8.9$ Hz), 2.94 (dd, $J=12.0$, 8.8 Hz), 2.63 (dd, $J=5.0$, 4.0 Hz), 2.42 (d, $J=11.9$ Hz), 2.36 (m) y 1.57 (m); un metileno desapantallado δ_{H} 2.53 (d, $J=9.0$ Hz), cuatro metilenos diasterotópicos (los cuales fueron asignados mediante el experimento HSQC; **Figura 39**) δ_{H} 1.91 (m, H-17a), 1.72 (m, H-16b), 1.72 (m, H-10b), 1.65 (m, H-17b), 1.65 (m, H-15a), 1.52 (m, H-15b), 1.49 (m, H-16a), 1.28 (m, H-10a) y 5 metilos 1.76 (d, $J=1.8$ Hz), 1.18 (s), 1.15 (d, $J=7.2$ Hz), 0.95 (d, $J=6.5$ Hz) y 0.92 (d, $J=6.5$ Hz). Los datos obtenidos por RMN de ^{13}C demostraron la presencia de un grupo funcional cetona δ_{C} 211.4, una amida δ_{C} 174.1, dos carbonos con hibridación sp^2 δ_{C} 139.6 y 127.6, dos carbonos base de heteroátomo δ_{C} 82.4, 80.6, un carbono cuaternario δ_{C} 64.2, siete metinos δ_{C}

52.2, 52.0, 44.6, 41.3, 36.7, 35.2 y 25.2; 5 metilenos δ 47.6, 43.2, 39.5, 29.5, 17.3 y 5 metilos δ 24.0, 23.8, 21.4, 20.4 y 13.8. El resumen de las constantes espectroscópicas de los productos **1-3** se muestran en la **Tabla 21**.

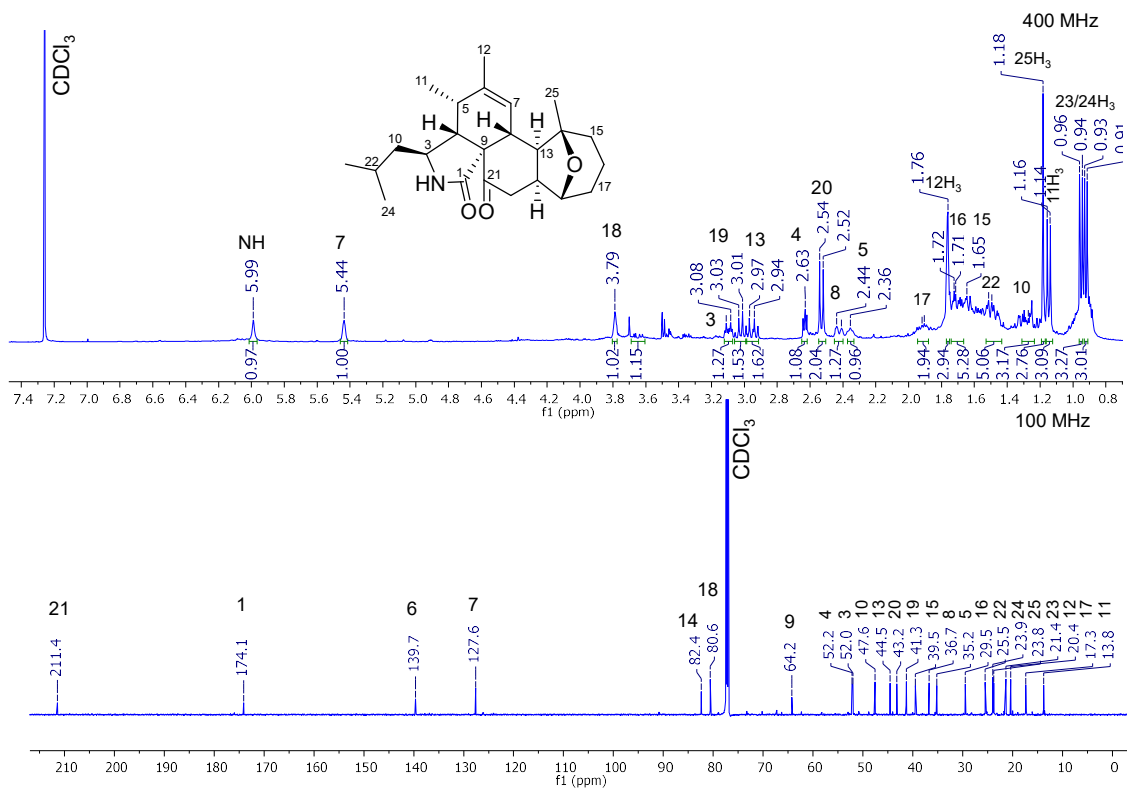


Figura 37. Espectro de RMN ¹H y RMN ¹³C (CDCl₃, 400 y 100 MHz) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**).

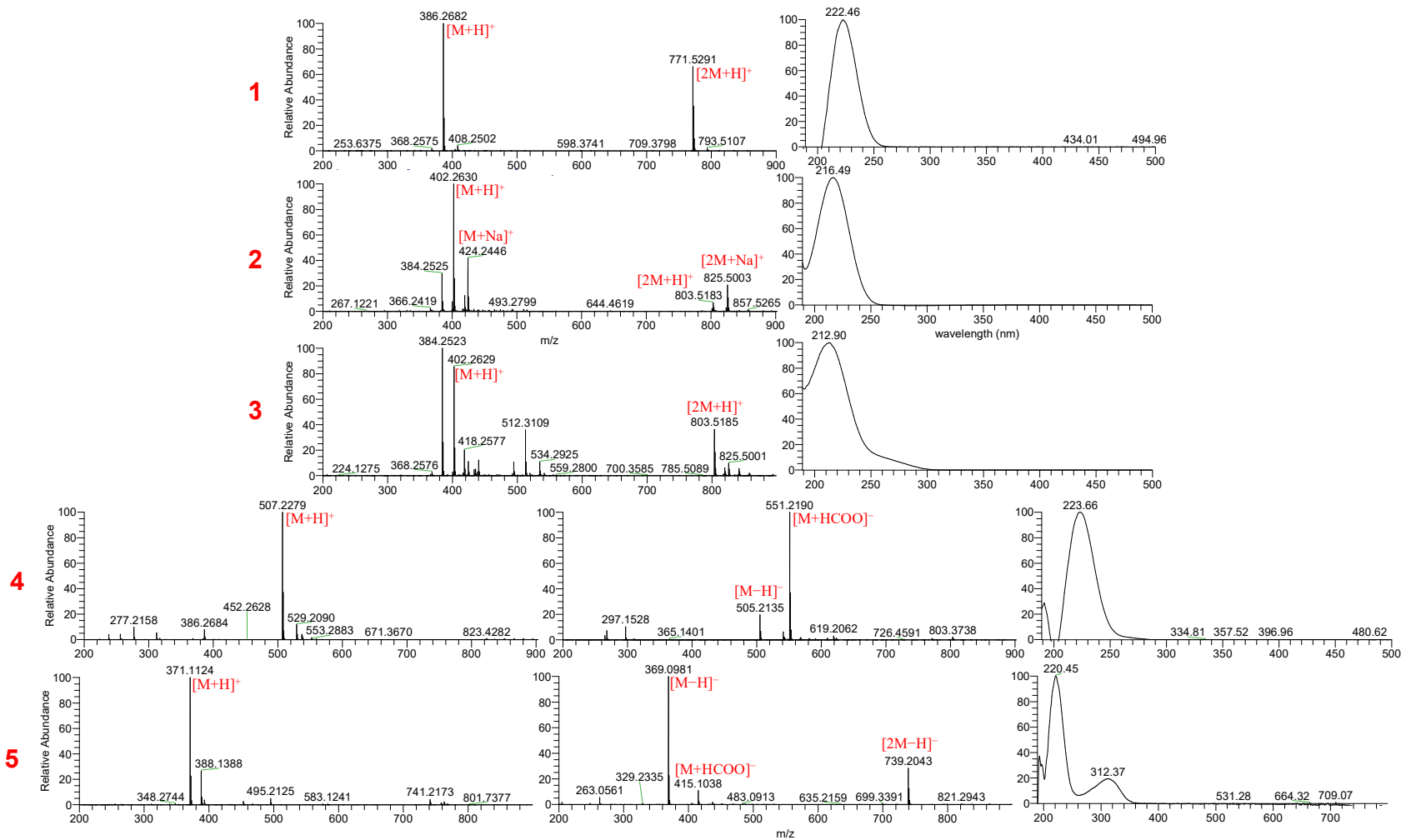


Figura 38. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 1-5.

El espectro HMBC (**Figura 40**) mostró la correlación de un núcleo de isoindolona (H4/C1; NH/C3; NH/C9) con un grupo isopropilo en la posición 3, y un macrociclo entre 8 y 9 (H4/C21; H12/C8 y NH/C9). Estos arreglos estructurales se observan en el prototipo estructural de las aspocalasinas. Las correlaciones entre H20/C18 y H20/C13 sugirieron un enlace entre C13 y C19, formando un sistema de cuatro anillos, el cual es poco común en este tipo de compuestos. Adicionalmente, la fórmula calculada posee 3 oxígenos únicamente, por lo que se sugirió un epóxido entre las posiciones 14 y 18. El análisis detallado de estos espectros, aunado a los experimentos bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY, **Figuras 39-42**), permitieron identificar a este producto como un derivado reducido en la posición 17 de la aspergilina PZ, el cual únicamente se había aislado por Ding y colaboradores,¹²⁰ obtenido a partir de un medio de fermentación de una especie que probablemente pertenezca al género *Aspergillus*, previamente había recibido el nombre de F14945-D1, por lo que en este trabajo se nombrará como 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**). La obtención de los experimentos de RMN bidimensionales, así como la determinación de su configuración absoluta son hallazgos inéditos pertenecientes a este trabajo.

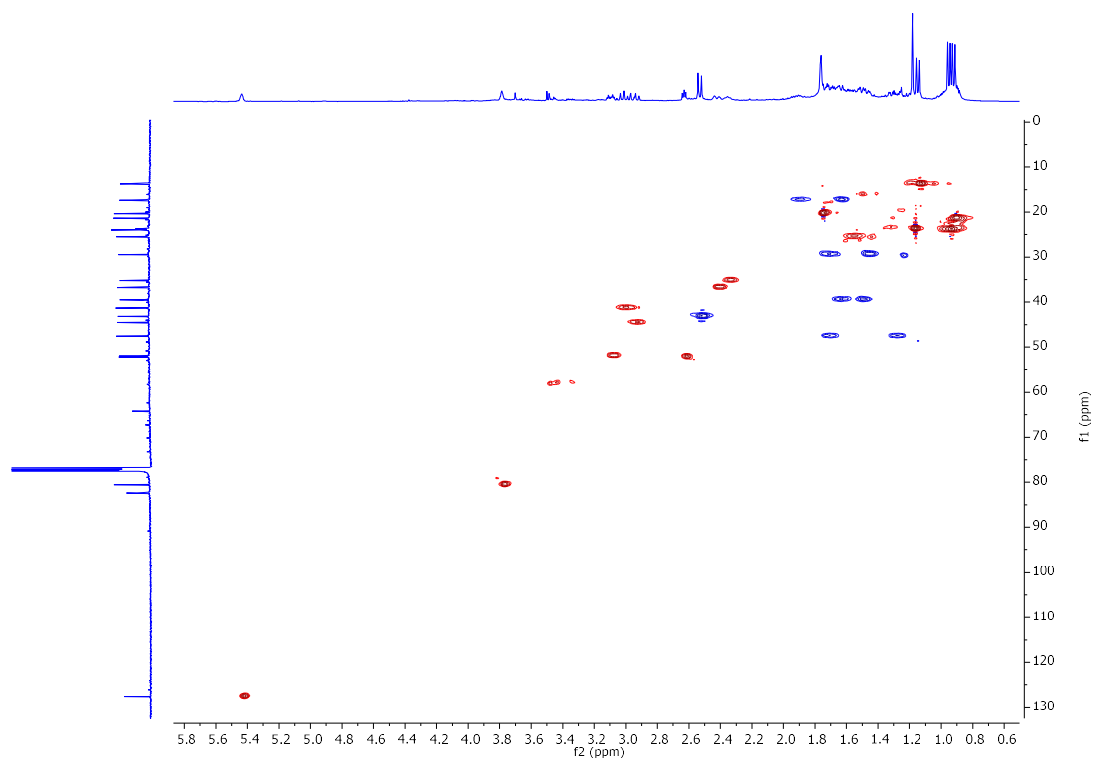


Figura 39. Espectro de HSQC (CDCl₃) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**).

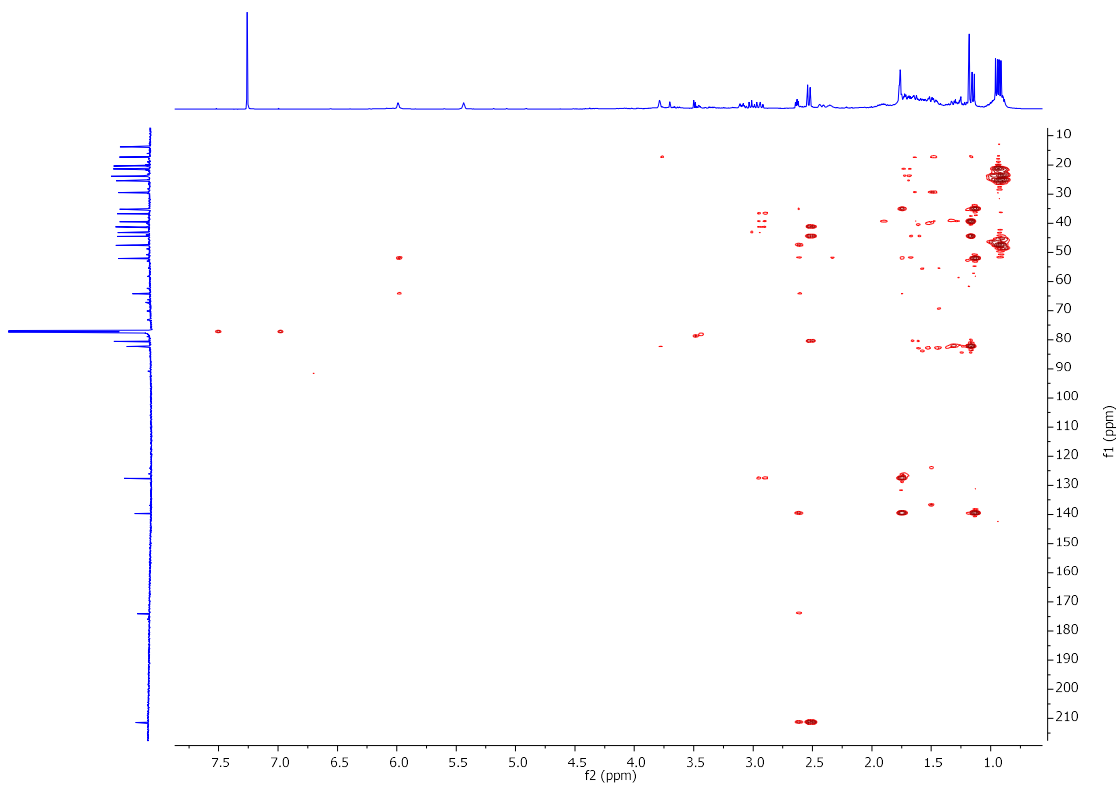


Figura 40. Espectro de HMBC (CDCl₃) del producto 17-desoxi-aspergiline PZ (1).

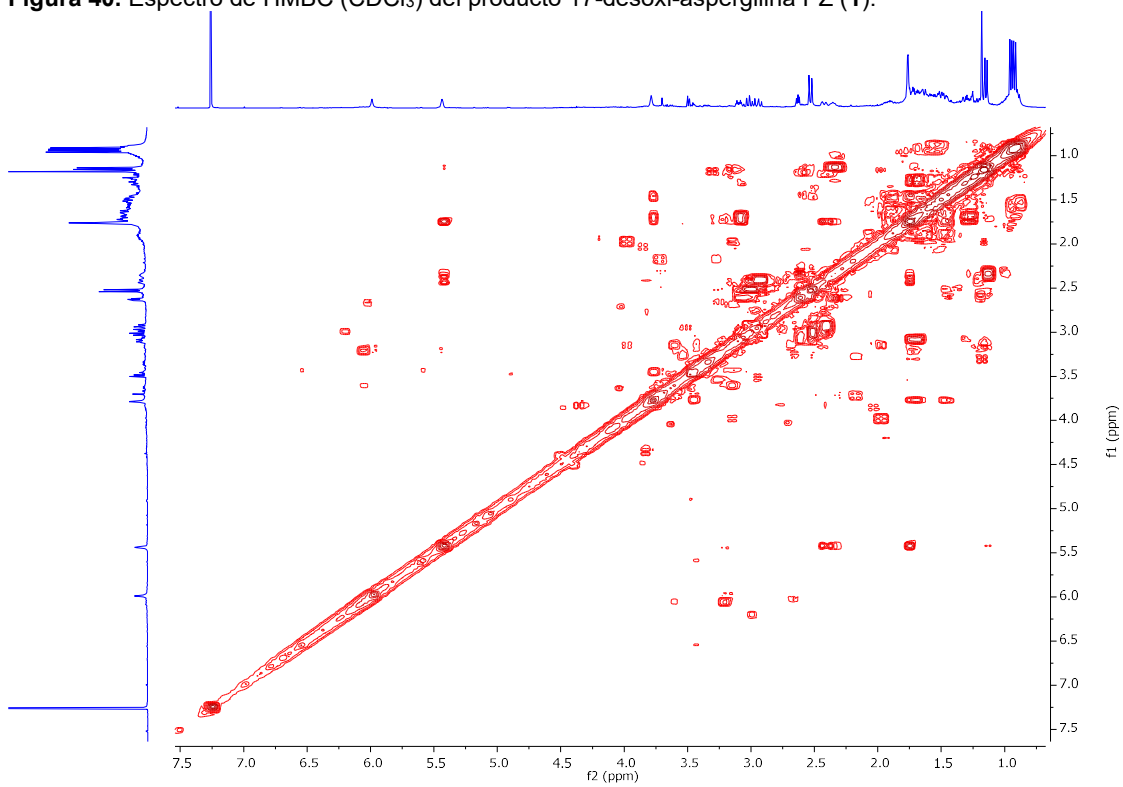


Figura 41. Espectro de COSY (CDCl₃) del producto 17-desoxi-aspergiline PZ (1).

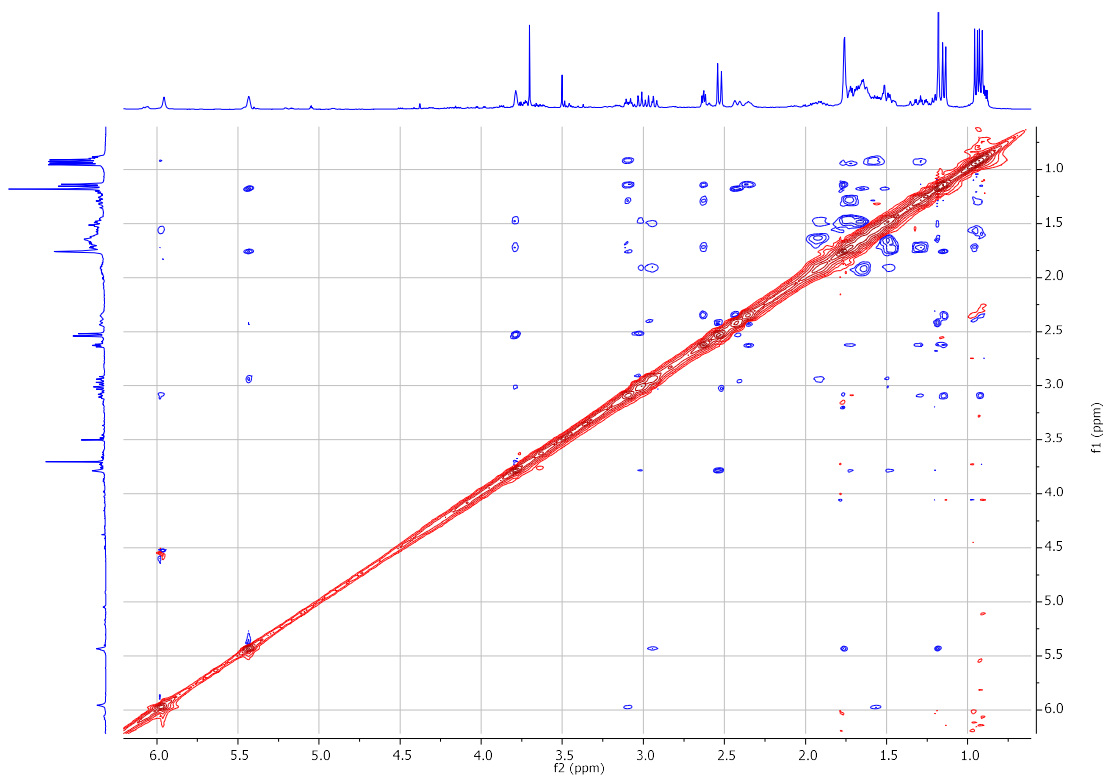


Figura 42. Espectro de NOESY (CDCl_3) del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**).

Se procedió a determinar la configuración absoluta de la 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**) mediante el análisis cristalográfico por difracción de rayos X, obteniendo un parámetro de Flack de 0.08(10). Como resultado, la configuración absoluta observada para este compuesto (3S,3aR,4S,6aS,8aS,9R,13S,13aR,13bR) es similar que la observada en prototipos estructurales previamente descritos (**Figura 43, Tabla 21**).¹²¹

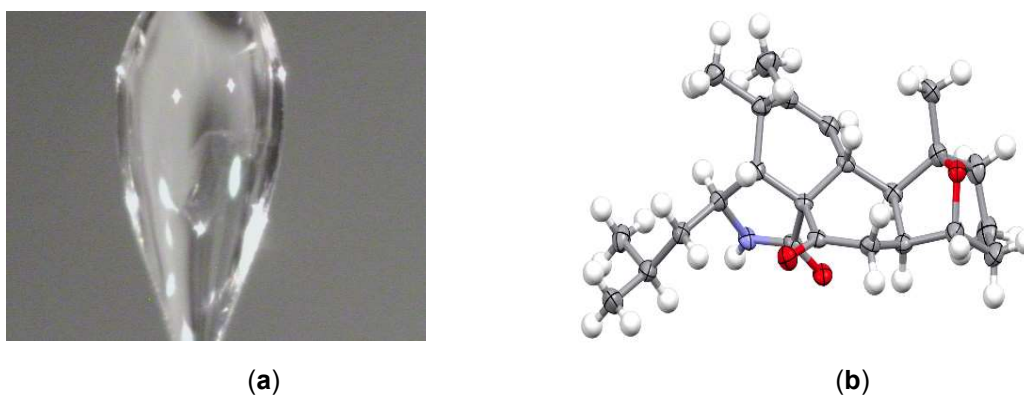


Figura 43. (a) Cristal obtenido a partir del compuesto **1** (b) Gráfica de desplazamiento elipsoidal (50% de probabilidad) a 100(2) K del compuesto **1**.

Tabla 21. Datos cristalográficos y colección de parámetros para el compuesto 17-desoxi-aspergillina PZ (**1**).

Fórmula	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃
T (K)	100(2)
Peso molecular	385.53
Sistema cristalino	ortorrómbico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> , Å	10.57334(18)
<i>b</i> , Å	11.1937(2)
<i>c</i> , Å	18.0740(3)
α , deg	90
β , deg	90
γ , deg	90
<i>V</i> , Å ³	2139.14(6)
<i>Z</i>	4
Radiación (λ , Å)	CuK α (1.54178)
<i>d</i> calcd, g·cm ⁻³	1.197
<i>F</i> (000)	840
Tamaño del cristal (mm ³)	0.24 × 0.17 × 0.08
rango theta de colección de datos	4.646 a 67.234°
μ , mm ⁻¹	0.611
No. de datos únicos	3838
Completitud a theta	100%
No. de restricciones	0
No. de parámetros refinados	258
GL en <i>F</i> ²	1.028
<i>R</i> 1 ^a [<i>i</i> > 2 σ (<i>i</i>)]	0.0333
<i>R</i> 1 ^a (todos los datos)	0.0375
<i>wR</i> 2 ^b (todos los datos)	0.0848
Mayor diferencia pico y agujero	0.169 y -0.154 e.Å ⁻³
${}^a R1 = \frac{\sum F_o - F_c }{\sum F_o }, {}^b wR2 = \sqrt{\frac{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{\sum [w(F_o^2)^2]}}$	

A continuación, el producto **2** presentó los iones moleculares de 402.2630 [M+H]⁺ y 400.2501 [M-H]⁻ en el análisis por UPLC-HRESIMS, la cual difiere en +16 uma con respecto al producto **1** (**Figura 37**), y calculando para este caso una fórmula de C₂₄H₃₅NO₄ (IDH=8, calculado para C₂₄H₃₆NO₄, Δ =-2.2 ppm). El espectro de RMN ¹H mostró similitud con el del producto **1** (**Figura 44**), las únicas diferencias observadas fueron la aparición de un metino base de oxígeno δ_H 3.64 (d, *J*=3.3 Hz) en lugar del metileno en la posición 17, así como el desplazamiento de H-19 hacia campos bajos δ_H 3.25 (q, *J*=9.1 Hz). Por lo que, considerando la diferencia de masa con **1**, se propone la estructura de la aspergillina PZ (**2**).^{121,122}

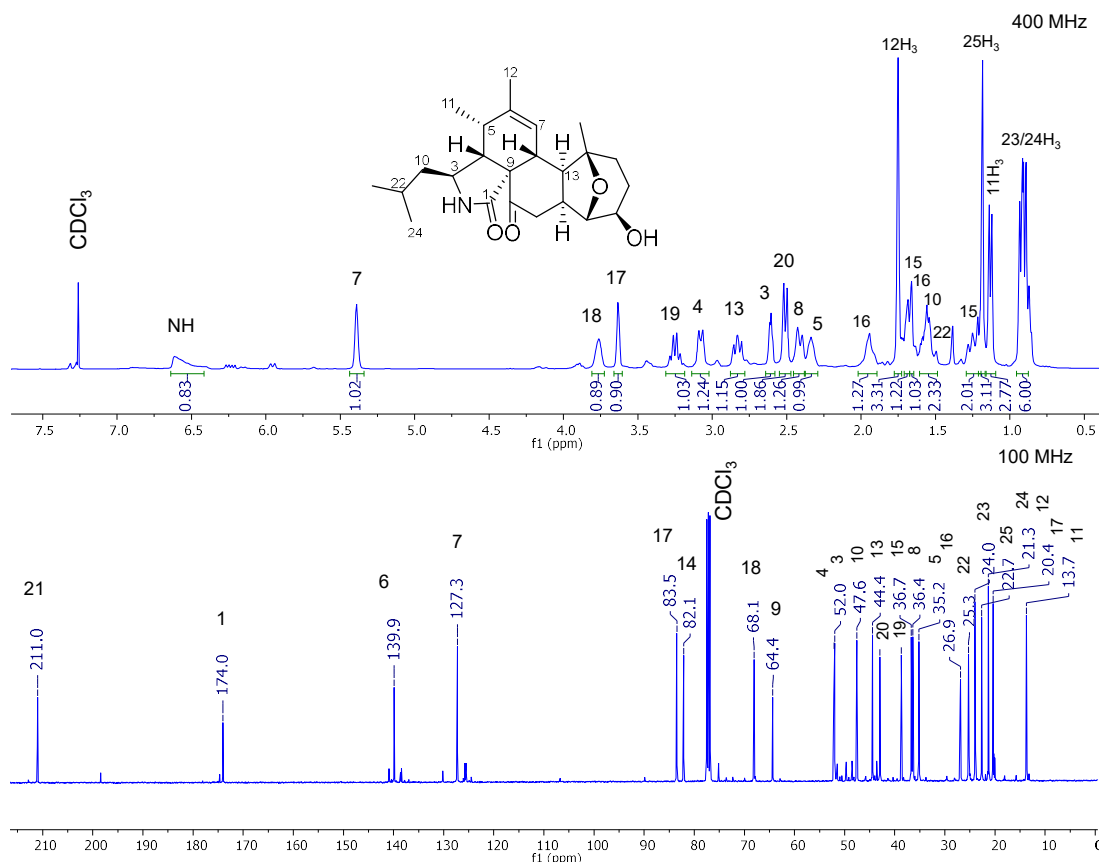


Figura 44. Espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 y 100 MHz) del producto aspergillina PZ (**2**).

Para la determinación estructural del compuesto **3**, el análisis por UPLC-HRESIMS (**Figura 37**) reveló los iones m/z 402.2629 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 400.2496 $[\text{M}-\text{H}]^-$, que permiten la fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_4$ (IDH=8, calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{NO}_3$, $\Delta=-2.4$ ppm) siendo un isómero del compuesto **2**. Sin embargo, el análisis por RMN ^1H de este producto (**Figura 45**) mostró señales de cuatro hidrógenos vinílicos en δ_{H} 7.11 (d, $J=16.5$ Hz), 6.38 (dd, $J=16.6, 4.9$ Hz), 5.92 (d, $J=10.7$ Hz) y 5.41 (s); uno de amida en δ_{H} 6.43 (s); dos metinos base de oxígeno en δ_{H} 4.57 (s) y 3.76 (s); cinco metinos δ_{H} 3.15 (m), 3.00 (dd, $J=5.4, 2.6$), 2.90 (d, $J=10.2$ Hz), 2.48 (m) y 1.53 (m); dos metilenos en δ_{H} 2.14 (2H, m) y 1.16 (2H, m); un metileno diasterotópico en δ_{H} 2.05 (m) y 1.45 (m); y cinco metilos en δ_{H} 1.75 (s), 1.29 (s), 1.22 (d, $J=7.2$ Hz), 0.89 (d, $J=6.4$ Hz) y 0.88 (d, $J=6.5$ Hz). Mientras tanto en el espectro de RMN ^{13}C se observaron dos carbonilos: uno de cetona δ_{C} 197.7 y uno de amida δ_{C} 175.4; seis carbonos con hibridación sp^2 que representan tres dobles ligaduras δ_{C} 142.0, 140.5, 137.5, 129.7, 125.8 y 124.2; dos carbonos base de oxígeno δ_{C} 79.4, 75.7 y un carbono cuaternario δ_{C} 68.4; cinco metinos δ_{C} 51.4, 49.6, 43.7, 35.2 y 25.1, tres metilenos δ_{C} 48.4, 39.6, 29.3 y cinco metilos δ_{C} 23.7, 21.6, 20.1, 15.7 y 13.6. Estos datos son consistentes con los descritos en la literatura para el producto aspoalasinina D (**3**).^{123, 124} El resumen de las constantes espectroscópicas de estos tres productos se encuentran en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Datos espectroscópicos de los compuestos **1-3** (CDCl₃).

Posición	1		2		3	
	δ_C 100 MHz	δ_H 400 MHz J(Hz)	δ_C 100 MHz	δ_H 400 MHz J(Hz)	δ_C 100 MHz	δ_H 400 MHz J(Hz)
1	174.1	-	174.0	-	175.4	-
2-NH	-	5.99, s	-	6.61, s	-	6.43, s
3	52.0	3.10, dt (10.5, 3.4)	52.1	2.61, t (4.3)	51.4	3.15, m
4	52.2	2.63, dd (5.0, 4.0)	52.0	3.08, dd (10.4, 3.2)	49.6	3.00, dd (5.4, 2.6)
5	35.2	2.36, m	35.2	2.34, m	35.2	2.48, m
6	139.6	-	139.9	-	140.4	-
7	127.6	5.44, s	127.3	5.40, s	125.8	5.41, s
8	36.7	2.42, d (11.9)	36.7	2.42, d (11.8)	43.7	2.90, d (10.2)
9	64.2	-	64.3	-	68.4	-
10	47.6	1.28, m 1.72, m	38.7	1.67, m 1.56, m	48.4	1.16, m, 2H
11	13.8	1.15, d (7.2), 3H	13.7	1.14, d (7.2), 3H	13.6	1.22, d (7.2), 3H
12	20.4	1.76, d (1.8), 3H	20.4	1.76, s, 3H	20.1	1.75, s, 3H
13	44.6	2.94, dd (12.0, 8.8)	44.4	2.84, dd (12.0, 9.2)	124.2	5.92, d (10.7)
14	82.4	-	82.1	-	137.5	-
15	39.5	1.65, m 1.52, m	47.6	1.27, dd (10.5, 2.9) 1.70, m	39.6	2.14, m, 2H
16	29.5	1.49, m 1.72, m	26.9	1.67, m 1.96, m	29.3	1.45, m 2.05, m
17	17.3	1.91, m 1.65, m	83.5	3.64, s	79.4	3.76, s
18	80.6	3.79, s	68.1	3.77, s	75.7	4.57, s
19	41.3	3.02, q (9.0)	36.4	3.25, q (9.2)	141.9	6.38, dd (16.5, 4.9)
20	43.2	2.53, d (9.0)	42.9	2.52, d (9.2)	129.7	7.11, d (16.5)
21	211.4	-	211.0	-	197.7	-
22	25.5	1.57, m	25.3	1.55, m	25.1	1.53, m
23	24.0	0.92, d (6.5)	24.0	0.93, d (6.6), 3H	21.6	0.89, d (6.5), 3H
24	21.4	0.95, d (6.5)	21.3	0.90, d (6.6), 3H	23.7	0.88, d (6.5), 3H
25	23.8	1.18, s, 3H	22.7	1.19, s, 3H	15.7	1.29, s, 3H

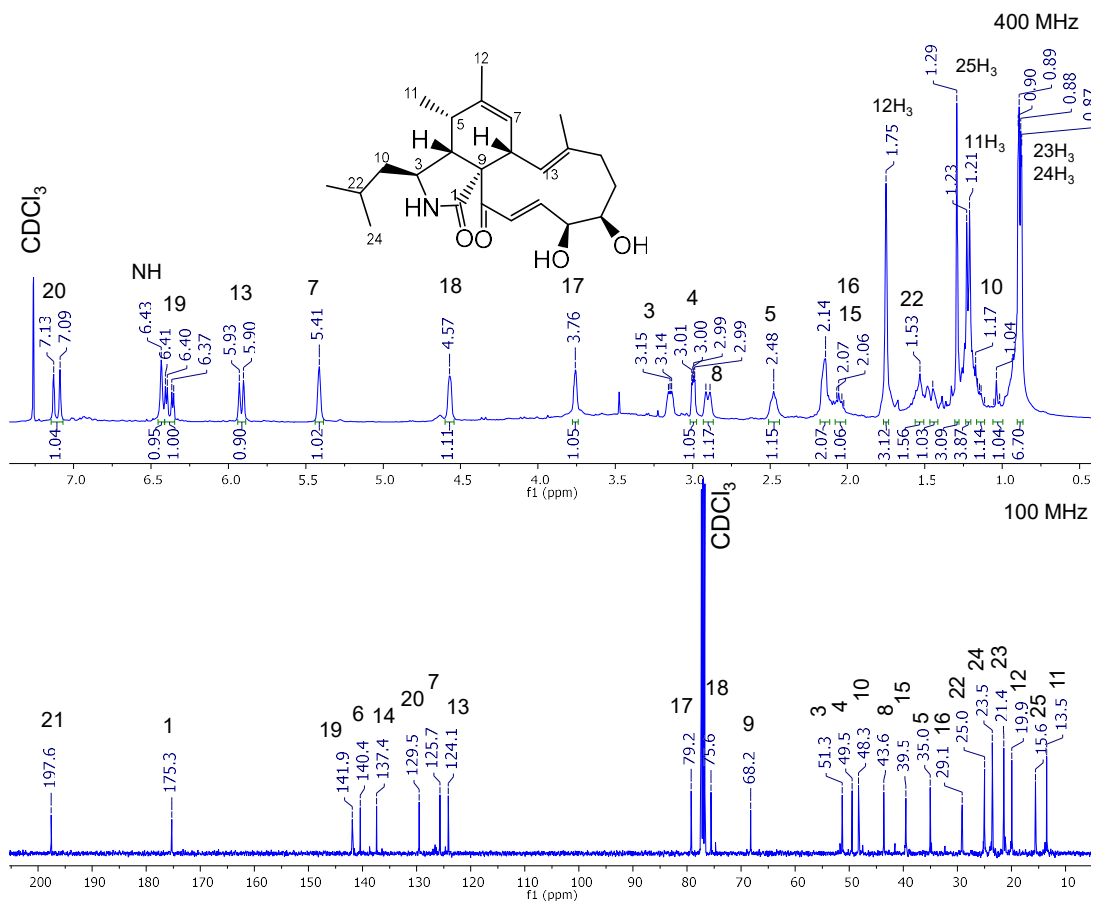


Figura 45. Espectro de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3 , 400 y 100 MHz) del producto asपालसिना D (**3**).

Por otra parte, para la caracterización estructural del producto **4** se observaron los iones moleculares de m/z 507.2279 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 505.2136 $[\text{M}-\text{H}]^-$ obtenidos por HRESIMS (**Figura 37**), calculando una fórmula molecular de $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ (IDH=19, calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$, $\Delta=+0.1$ ppm). La clave principal para la identificación de este compuesto fue el patrón de fragmentación de la especie m/z 507.2279, obtenido por HRESIMS², en él se apreció un pico base de m/z 238.1225, así como los iones 256.1331, 224.1069 y 105.0335 (**Figura 46**). Estos iones coincidieron con los descritos previamente por Garg y colaboradores para el asperfenamato (**4**).¹²⁵ De manera adicional, la confirmación de la identidad química se realizó por el espectro de RMN ^1H (**Figura 47**), en el cual se apreciaron señales que integran para 20 protones aromáticos δ_{H} 7.20-7.70 ppm, así como dos hidrógenos de amida δ_{H} 6.66 (d, $J=8.2$ Hz) y 6.56 (d, $J=8.2$ Hz), dos metinos base de nitrógeno δ_{H} 4.92 (qd, $J=6.8, 1.7$ Hz), 4.62 (dddd, $J=11.8, 8.3, 5.9, 2.2$ Hz) y tres metilenos diasterotópicos δ_{H} 4.55 (ddd, $J=11.3, 3.5, 1.7$ Hz) y 4.03 (ddd, $J=11.4, 4.1, 1.5$ Hz); 3.29 (dd, $J=13.9, 6.4$ Hz) y 3.21 (dd, $J=13.9, 7.1$ Hz); 3.00 (dd, $J=13.9, 6.6$ Hz) y 2.89 (dd, $J=13.9, 8.3$ Hz).

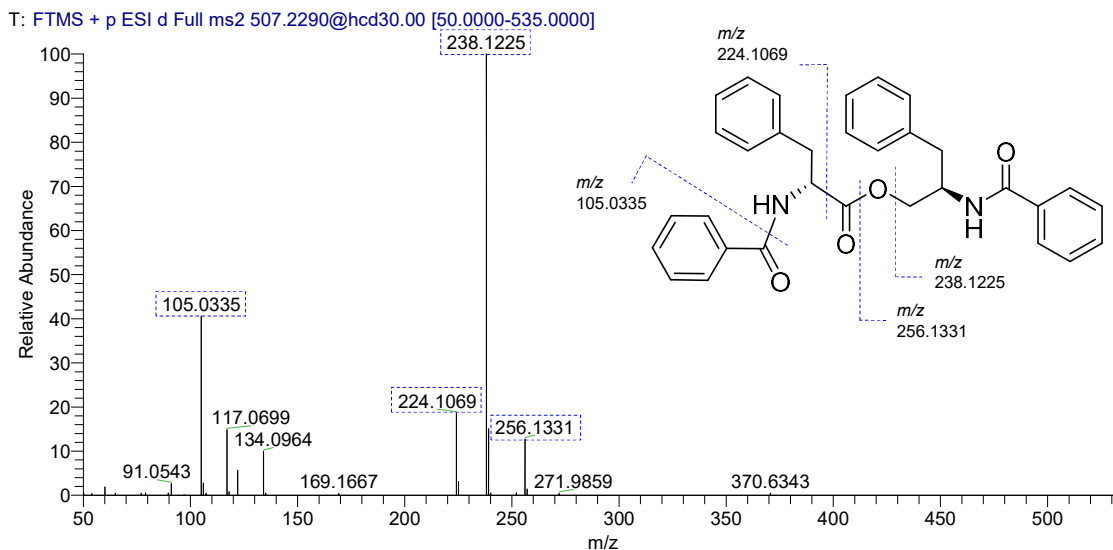


Figura 46. Patrón de fragmentación por HRESIMS² del producto asperfenamato (**4**).

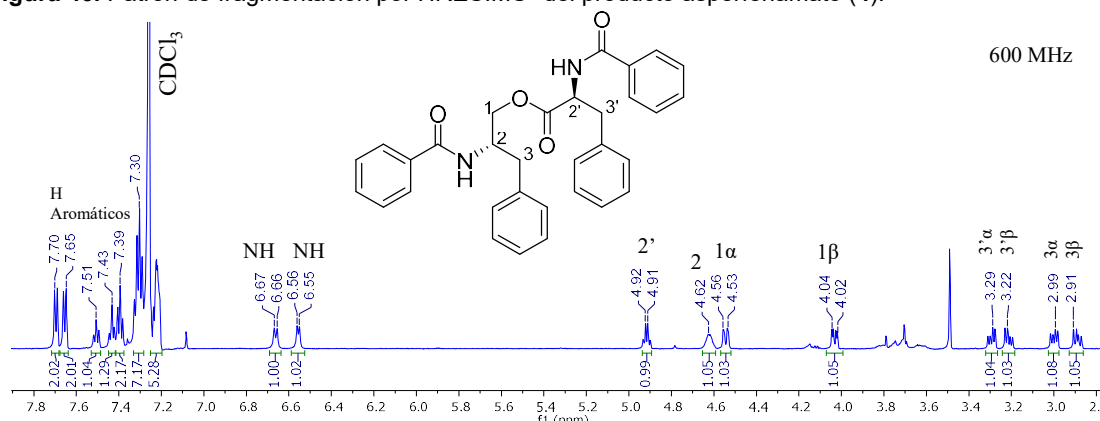


Figura 47. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) del producto asperfenamato (**4**).

Finalmente, el análisis del producto **5** por UPLC-HRESIMS reveló la presencia de los iones m/z 371.1124 [M+H]⁺ y 369.0681 [M-H]⁻ (**Figura 37**), calculando una fórmula molecular de C₂₀H₁₈O₇ (IDH=12, calculado para C₂₀H₁₉O₇, Δ =-0.3 ppm). En el espectro de RMN ¹H (**Figura 48**) se observaron cuatro señales que integran para ocho hidrógenos aromáticos en δ_H 7.54 (2H, d, J =8.8 Hz), 6.90 (2H, d, J =8.8 Hz), 6.71 (2H, d, J =8.5 Hz), y 6.60 (2H, d, J =8.8 Hz); un metileno diastereotópico en δ_H 3.54 (d, J =14.7 Hz) y 3.42 (d, J =14.7 Hz) y dos metoxilos en δ_H 3.80 (6H, s). El espectro de RMN ¹³C mostró señales atribuibles a dos carbonilos de tipo éster δ_C 169.8 y 167.7; doce carbonos aromáticos, de los cuales dos poseen funciones oxigenadas δ_C 157.4 y 155.1; δ_C 141.1, 136.2, 131.8, 129.9, 124.7, 121.9, 116.1 y 115.0; un carbono base de oxígeno δ_C 85.1; dos metoxilos δ_C 58.7 y 53.8 y un metileno δ_C 38.8. Cabe mencionar que la sustitución de los metoxilos fue asignada vecina a las posiciones 2 y 6 de la butirolactona mediante el experimento HMBC. Estas evidencias proporcionaron la información suficiente para identificar este producto como la 2-O-metilbutirolactona II (**5**).¹²⁶ El resumen de las constantes espectroscópicas observadas para los compuestos **4** y **5** se muestran en la **Tabla 23**.

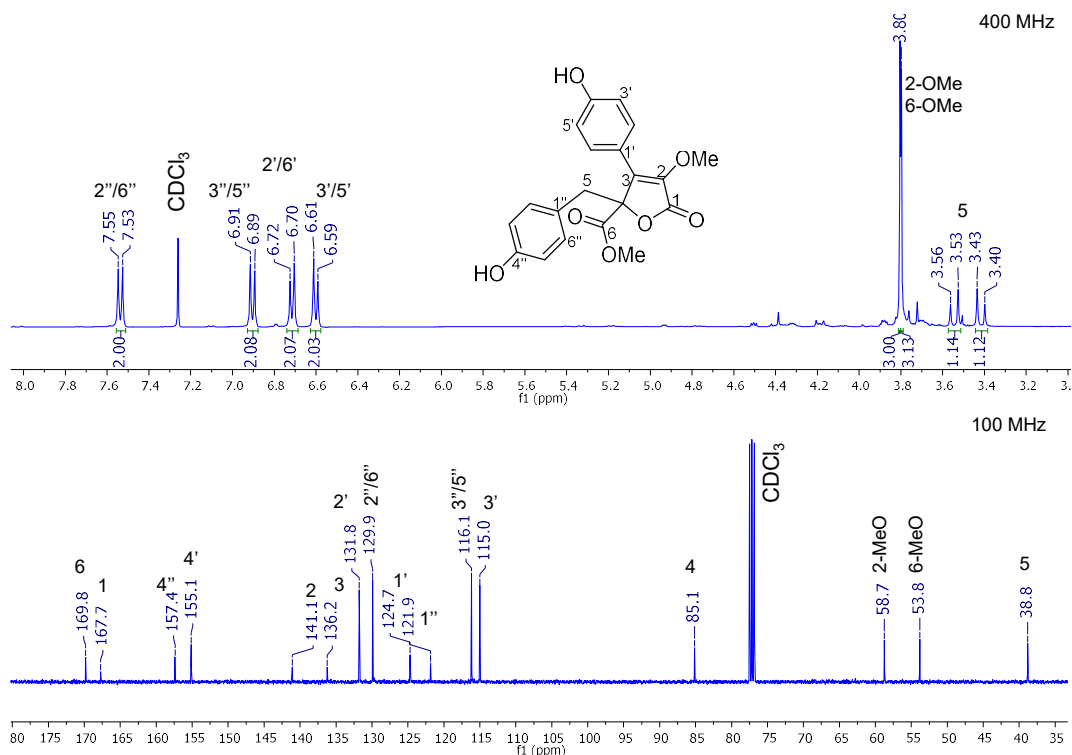


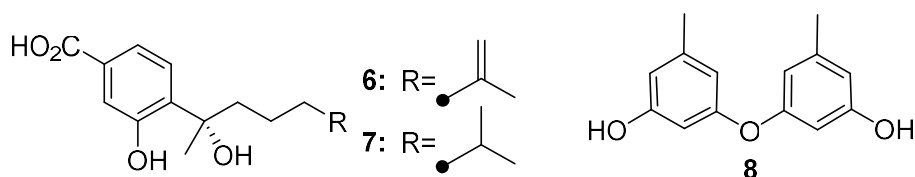
Figura 48. Espectro de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3 , 400 y 100 MHz) del producto 2-O-metilbutirolactona II (5).

Tabla 23. Datos espectroscópicos de los compuestos 4 y 5 (CDCl_3).

Posición	4		Posición	5	
	δ_{H} 600 MHz J(Hz)			δ_{C} 100 MHz	δ_{H} 400 MHz J(Hz)
NH	6.66, d (8.2)		1	167.7	-
NH	6.56, d (6.3)		2	141.1	-
1a	4.55, ddd (11.4, 4.1, 1.5)		3	136.2	-
1b	4.03, ddd (11.4, 4.1, 1.5)		4	85.1	-
2	4.62, dddd (11.8, 8.3, 5.9, 2.2)		5	38.8	3.54, d (14.6)
2'	4.92 qd (6.8, 1.7)				3.42, d (14.6)
3a	3.00 dd (13.6, 6.6)		6	169.8	-
3b	2.89, dd (13.9, 8.3)		1''	124.7	-
3a'	3.29, dd (13.9, 6.4)		2'	131.8	6.71, d (8.5)
3b'	3.21, dd (13.9, 6.4)		3'	115.0	6.60, d (8.5)
4	7.51, td (7.6, 1.9)		4'	155.1	-
5, 9	7.40, td (7.4, 2.0), 2H		5'	115.0	6.60, d (8.5)
5', 6', 7', 8', 9'	7.22, m, 5H		6'	131.8	6.71, d (8.5)
6, 7, 8, 13, 15, 13', 15'	7.31, m, 7H		1''	121.9	-
12, 16	7.70, d (7.8), 2H		2''/6''	129.9	7.54, d (8.8), 2H
12', 16'	7.65, d (7.8), 2H		3''/5''	116.1	6.90, d (6.9), 2H
14'	7.43, td (7.9, 2.2)		4''	157.4	-
			2-MeO	58.7	
			6-MeO	53.8	3.80 (s), 6H

5.1.2 Estudio químico de *Aspergillus* sp. NCA264.

A partir del organismo *Aspergillus* sp. NCA264 fue posible el aislamiento de tres productos de naturaleza aromática, los productos **6** y **7** son sesquiterpenoides de tipo bisabolano, mientras que **8** es un oxidibenzenoide.



Para la elucidación estructural de los compuestos **6** y **7**, el espectro de HRESIMS (**Figura 49**) se observaron los iones correspondientes a la molécula desprotonada en m/z 263.1286 $[M-H]^-$ y m/z 265.1442 $[M-H]^-$, respectivamente, los cuales son consistentes con la fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$ (IDH=6, calculado para $C_{15}H_{19}O_4$, $\Delta=-1.1$ ppm) para el compuesto **6** y $C_{15}H_{22}O_4$ (IDH=5, calculado para $C_{15}H_{21}O_4$, $\Delta=-0.3$ ppm) para el compuesto **7**. Estos dos compuestos se encuentran relacionados y pertenecen a la misma familia estructural debido a que ambas moléculas poseen tres máximos de absorción en el UV (214, 240 y 300 nm).

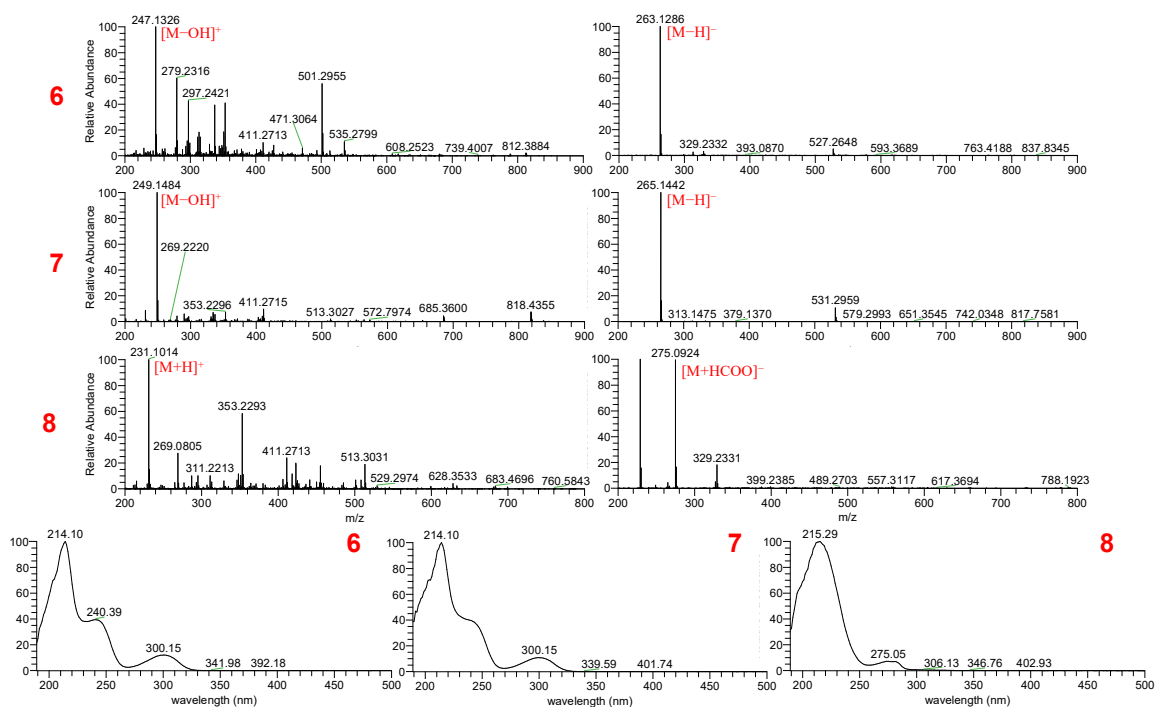


Figura 49. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 6–8.

El espectro de RMN de 1H del compuesto **6** (**Figura 50**) reveló señales de un anillo aromático trisustituido en δ_H 7.47 (dd, $J=8.1, 1.4$), 7.37 (d, $J=1.3$ Hz) y 7.24 (d, $J=8.1$ Hz), un vinilo terminal δ_H 4.61 (s) y 4.65 (s), tres metilenos, dos de ellos diasterotópicos en δ_H 1.95 (dd, $J=13.0, 3.7$ Hz) y 1.77 (dt, $J=13.7, 4.6$ Hz); 1.47 (m) y 1.32 (m); 1.96 (m) y dos metilos desapantallados en δ_H 1.62 (s) y 1.60

(s). En contraste, el compuesto **7** presentó como principales diferencias la desaparición de las señales del vinilo terminal y el metilo en δ_H 1.62, la señal de metileno se vio desplazada hacia campos altos en δ_H 1.15 (m, 2H) y también, la aparición de dos señales: un metino en δ_H 1.49 (sept, $J=6.6$ Hz) y una señal doble en δ_H 0.82 (d, $J=6.6$ Hz, 6H).

En el experimento de RMN de ^{13}C del producto **6** (**Figura 51**) se identificaron 13 señales correspondientes a un carbono de ácido carboxílico en δ_C 175.8, cuatro señales de naturaleza aromática en δ_C 156.8, 127.6, 121.5 y 118.6; dos carbonos de tipo sp^2 en δ_C 146.7 y 110.6; un carbono cuaternario base de oxígeno en δ_C 77.8; tres señales asignables a metilenos en δ_C 42.9, 39.0 y 23.0 y dos a metilos en δ_C 28.8 y 22.3. Los carbonos restantes para satisfacer la fórmula molecular ($C_{15}H_{20}O_4$) fueron asignados mediante las correlaciones observadas en el espectro de HMBC y sus desplazamientos químicos fueron asignados en δ_C 137.2 y 133.5 (**Figura 52**). En comparación, el espectro de RMN ^{13}C del producto **7** presentó como principales diferencias, la aparición de señales de metino en δ_C 28.8 y de metilo en δ_C 22.9, sustituyendo las de carbonos sp^2 previamente descritas.

Todas las señales antes mencionadas fueron consistentes con las descritas para los ácidos 11-dihidrosidónico (**6**) y sidónico (**7**), metabolitos aislados previamente de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.^{127,128}

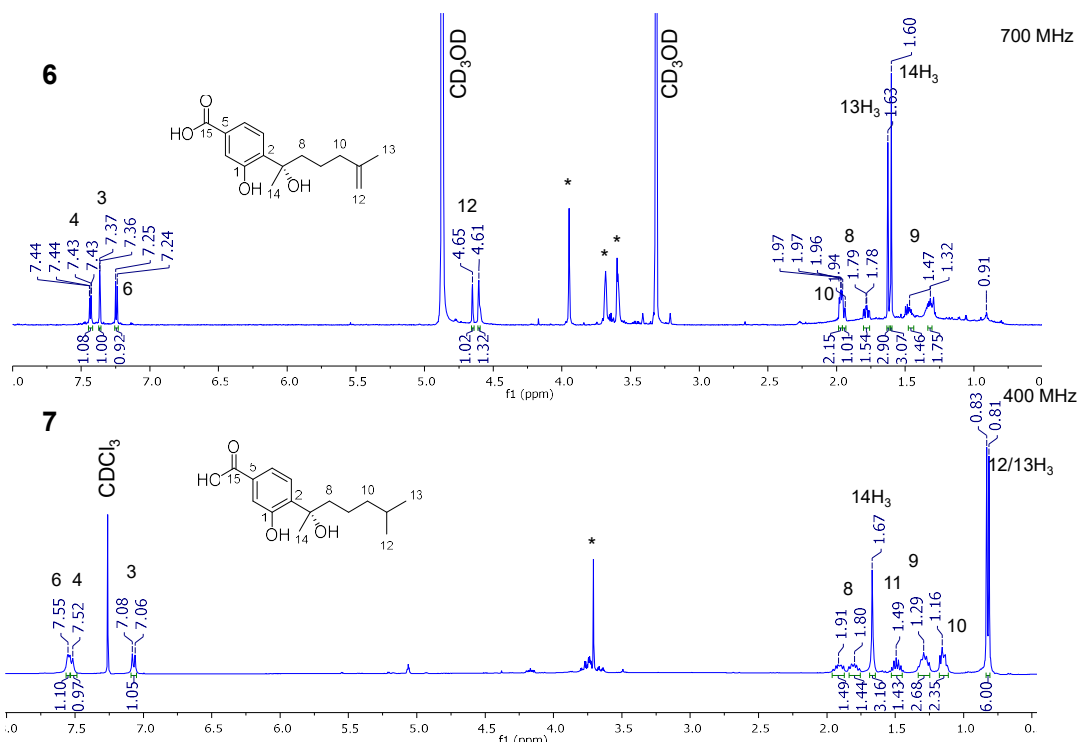


Figura 50. Espectro de RMN 1H (MeOD- d_4 , 700 MHz **6**; $CDCl_3$, 400 MHz **7**) de los productos ácido 11-dihidrosidónico (**6**) y ácido sidónico (**7**). *Impurezas

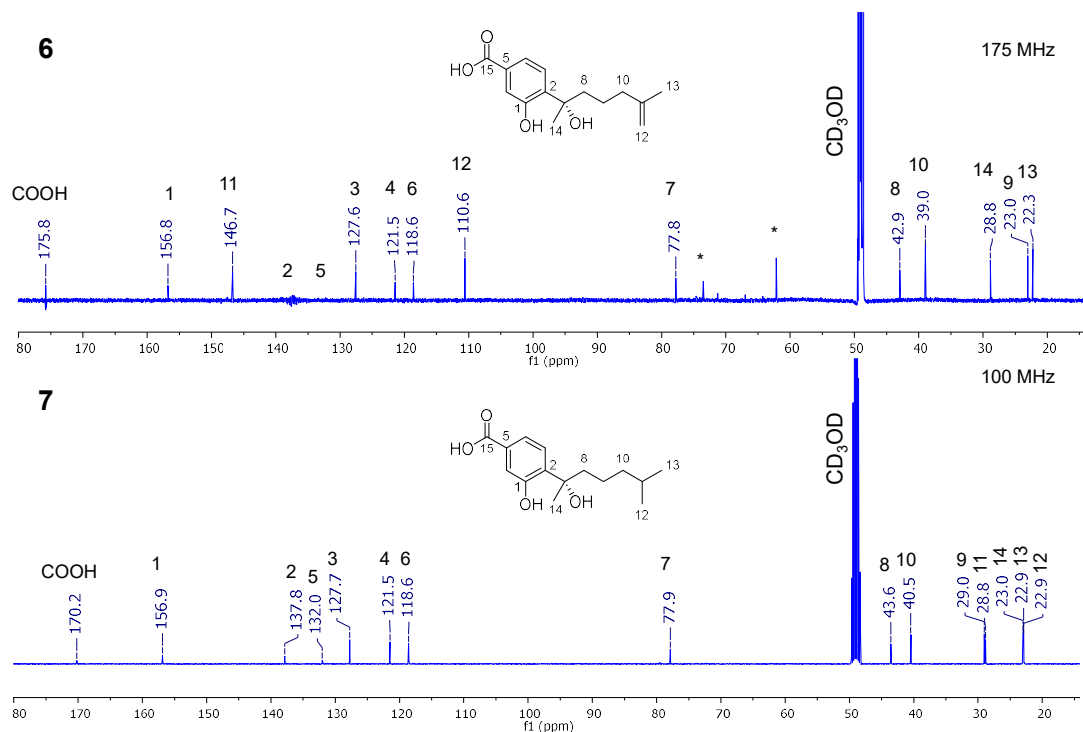


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C (MeOD- d_4 , 175 MHz **6**; MeOD- d_4 , 100 MHz **7**) de los productos ácido 11-dihidrosidónico (**6**) y ácido sidónico (**7**). *Impurezas

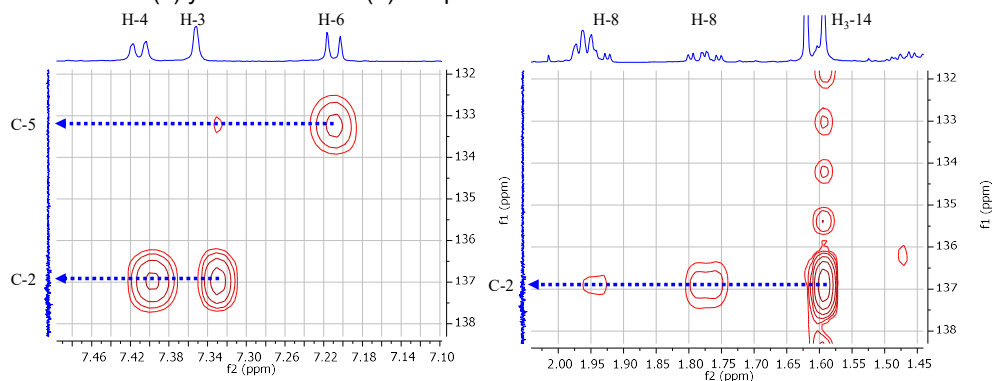


Figura 52. Correlaciones observadas para los carbonos C-2 y C-5 en el espectro de HMBC del compuesto **6**.

Por otra parte, la fórmula del compuesto **8** fue calculada como $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$ (IDH=8, calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_3$, $\Delta=-0.7$ ppm), en relación con los iones moleculares observados 231.1014 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 229.0863 $[\text{M}-\text{H}]^-$ en el espectro de HRESIMS (**Figura 49**). El espectro de RMN ^1H (**Figura 53**) mostró señales de un sistema aromático trisustituido con constantes de acoplamiento de tipo *meta* δ_{H} 6.40 (t, $J=2.6$ Hz, 4H) y 6.29 (t, $J=2.1$ Hz), así como una señal de hidroxilo δ_{H} 5.16 (s) y un metilo sobre anillo aromático δ_{H} 2.26 (s). De manera complementaria, el espectro de RMN ^{13}C mostró señales concordantes con 6 carbonos aromáticos δ_{C} 158.1, 156.5, 141.1, 112.3, 111.3 y 103.6 y un metilo δ_{C} 21.6. Basándose en la fórmula calculada, las señales previamente descritas sólo explicaron la mitad de la molécula, por lo que se propuso una molécula que presentara un eje de simetría, asignando la

identidad de **8** como el diorcinol.¹²⁹ El compendio de las constantes espectroscópicas observadas para los productos **6–8**, se muestra en la **Tabla 24**.

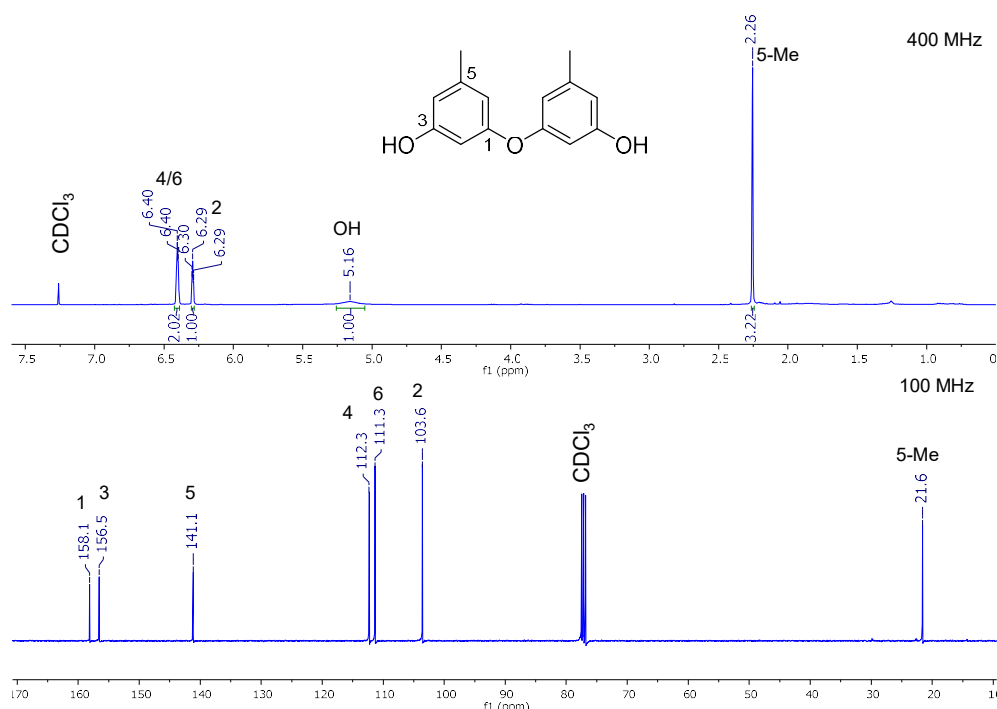


Figura 53. Espectro de RMN ¹H y RMN ¹³C (CDCl₃, 400 y 100 MHz) del producto diorcinol (**10**).

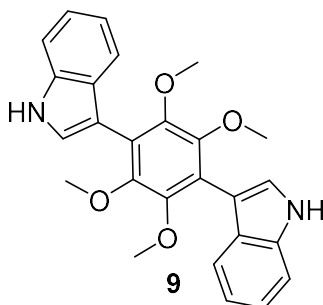
Tabla 24. Datos espectroscópicos de los compuestos **6–8**.

Posición	6		7		Posición	8	
	δ_c 175 MHz ^a	δ_H 700 MHz J (Hz) ^a	δ_c 100 MHz ^a	δ_H 400 MHz J (Hz) ^b		δ_c 100 MHz ^b	δ_H 400 MHz J (Hz) ^b
1	156.8		156.9		1, 1', 3, 3'	158.1, 156.5	
2	137.2		137.8		2, 2'	103.6	6.29, t (2.1), 2H
3	127.6	7.24, d (8.1)	127.7	7.07, d (8.2)	4, 6, 4', 6'	111.3, 112.3	6.40, t (2.6), 4H
4	121.5	7.43, dd (8.1, 1.4)	121.5	7.53, dd (8.2, 1.0)	5, 5'	141.1	
5	133.5		132.0		5-Me, 5'-Me	21.6	2.26, s, 6H
6	118.6	7.37, d (1.3)	118.6	7.55, s	3-OH, 3'-OH		5.16, s, 2H
7	77.8		77.9				
8	42.9	1.77, dd (13.0, 4.6) 1.95, dd (13.0, 3.7)	43.6	1.85, m 1.92, m			
9	23.0	1.47, m 1.32, m	29.0	1.29, m, 2H			
10	39.0	1.96, m, 2H	40.5	1.15, m, 2H			
11	146.7		28.8	1.49, hept (6.6)			
12	110.6	4.61, s 4.65, s	22.9	0.82, d (6.6), 6H			
13	22.3	1.62, s, 3H	22.9				
14	28.8	1.60, s, 3H	23.0	1.67, s, 3H			
COOH	175.8		170.2				

^a Registrado en MeOD-*d*₄; ^b Registrado en CDCl₃

5.1.3 Estudio químico de *Aspergillus* sp. NCA257.

A partir del estudio químico del hongo *Aspergillus* NCA257, se logró el aislamiento del compuesto **9** el cual pertenece a la clasificación química de los bis-indolil benzenoides.



La fórmula molecular $C_{26}H_{24}N_2O_4$ calculada para el producto **9**, se estableció con base en los iones m/z 429.1800 $[M+H]^+$ y 427.1662 $[M-H]^-$ (IDH=16, calculado para $C_{26}H_{24}N_2O_4$, $\Delta=-2.1$ ppm; **Figura 54**). En el espectro de RMN 1H (**Figura 55**) se observaron pocas señales que no son congruentes con el IDH de 16, lo que sugiere que se trata de una molécula simétrica. En δ_H 3.54 se observa una señal que integra para 6 hidrógenos y que se relaciona con la presencia de 2 grupos metoxilo, además de señales características de un núcleo bis-indolil benzenoide en δ_H 7.16-7.67. La comparación de estos datos con los descritos en la literatura especializada permitió establecer la identidad del producto **9** como el éter dimetilíco del asterriquinol D,^{130,131} los desplazamientos químicos observados se muestran en la **Tabla 25**.

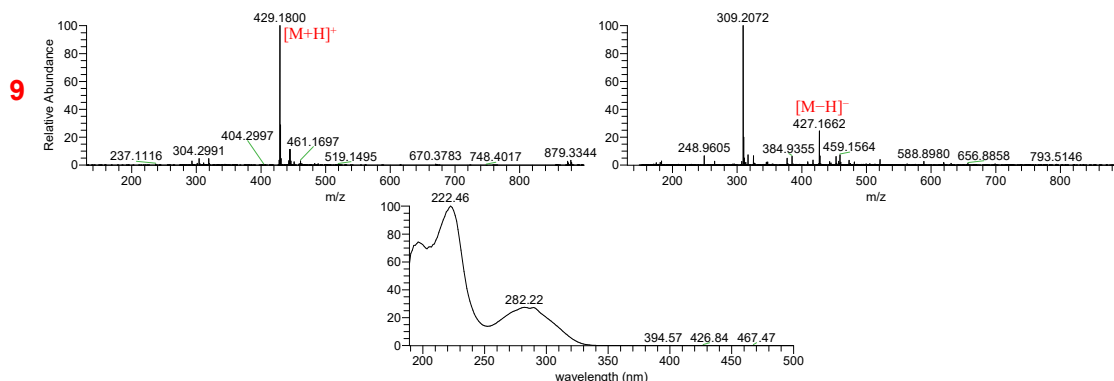


Figura 54. Espectro de HRESIMS y perfil de UV del producto **9**.

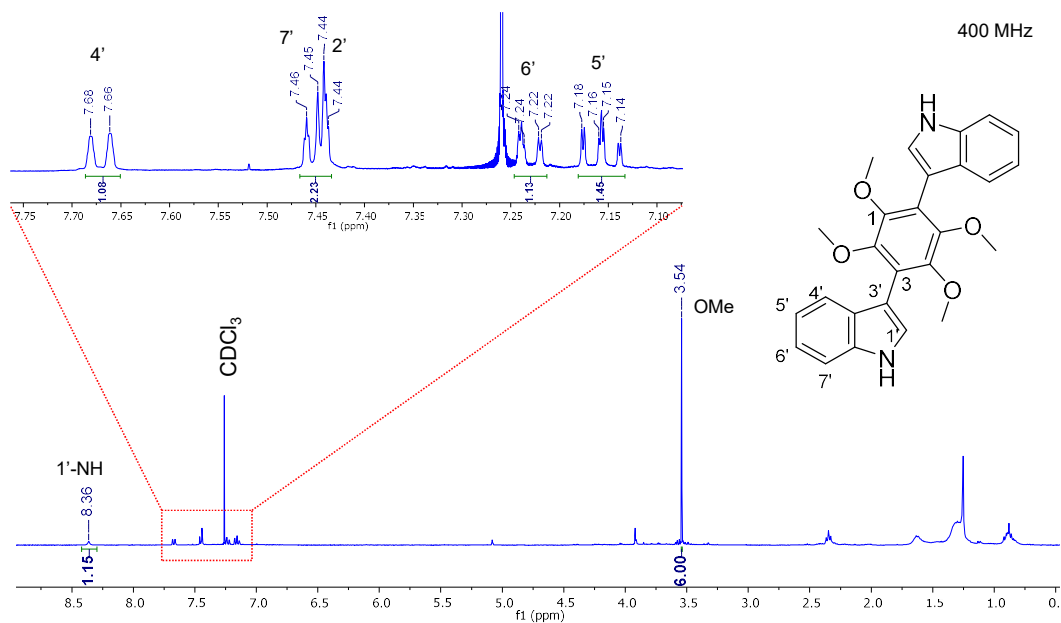


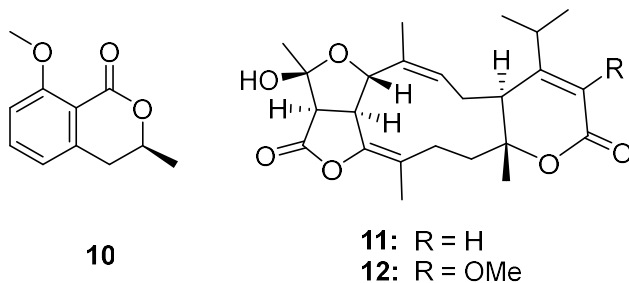
Figura 55. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del producto éter dimetilico del asterriquinol D (**9**).

Tabla 25. Datos espectroscópicos del compuesto **9** (CDCl₃).

Posición	9
	δ_H 400 MHz J(Hz)
2-OCH ₃	3.54, s, 12H
1'	8.36, s, 2H
2'	7.44, d (3.5), 2H
4'	7.67, d (7.8), 2H
5'	7.16, dd (9.0, 7.0), 2H
6'	7.23, m, 2H
7'	7.45, d (8.9), 2H

5.2 Estudio químico de *Stachybotrys* sp. NCA252

A partir del fraccionamiento del extracto orgánico del hongo *Stachybotrys* sp. NCA252 se logró el aislamiento de los productos **10–15**. El producto **10** pertenece a la clase de las isocumarinas, mientras que **11** y **12** son diterpenos de tipo dollabelano y los productos **13–15** poseen un esqueleto de fenilspirodrimano.



La fórmula molecular del compuesto **10** $C_{11}H_{12}O_3$, fue calculada con base en los iones m/z 215.0675 $[M+Na]^+$ y 238.8703 $[M-H+HCOO]^-$ (**Figura 56**) (IDH=6, calculado para $C_{11}H_{12}O_3Na$, $\Delta=+2.0$ ppm). En el espectro de RMN 1H (**Figura 57**) se observaron tres señales de un sistema aromático con acoplamiento de tipo *orto* δ_H 6.91 (d, $J=7.5$ Hz), 6.79 (d, $J=8.5$ Hz) y 7.44 (dd, $J=8.4, 7.6$ Hz), una señal múltiple para un oximetino δ_H 4.55 (dq, $J=10.7, 6.3, 3.6$ Hz), un metileno diastereotópico δ_H 2.84 (dd, $J=16.1, 3.5$ Hz) y 2.91 (dd, $J=16.1, 10.3$ Hz) y dos señales simples correspondientes a un metoxilo y a un metilo δ_H 3.94 (s) y 1.48 (d, $J=6.3$ Hz), respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron las señales correspondientes a un carbonilo de delta-lactona δ_C 162.9, así como señales de seis carbonos aromáticos δ_C 161.3, 142.1, 134.6, 119.3, 113.8 y 111.0 y dos carbonos base de oxígeno δ_C 74.9 y 55.3. Estas evidencias en conjunto permitieron identificar al compuesto **10** como la *O*-metilmeleína,¹³² el cual no había sido descrito previamente como producto de este género fúngico.

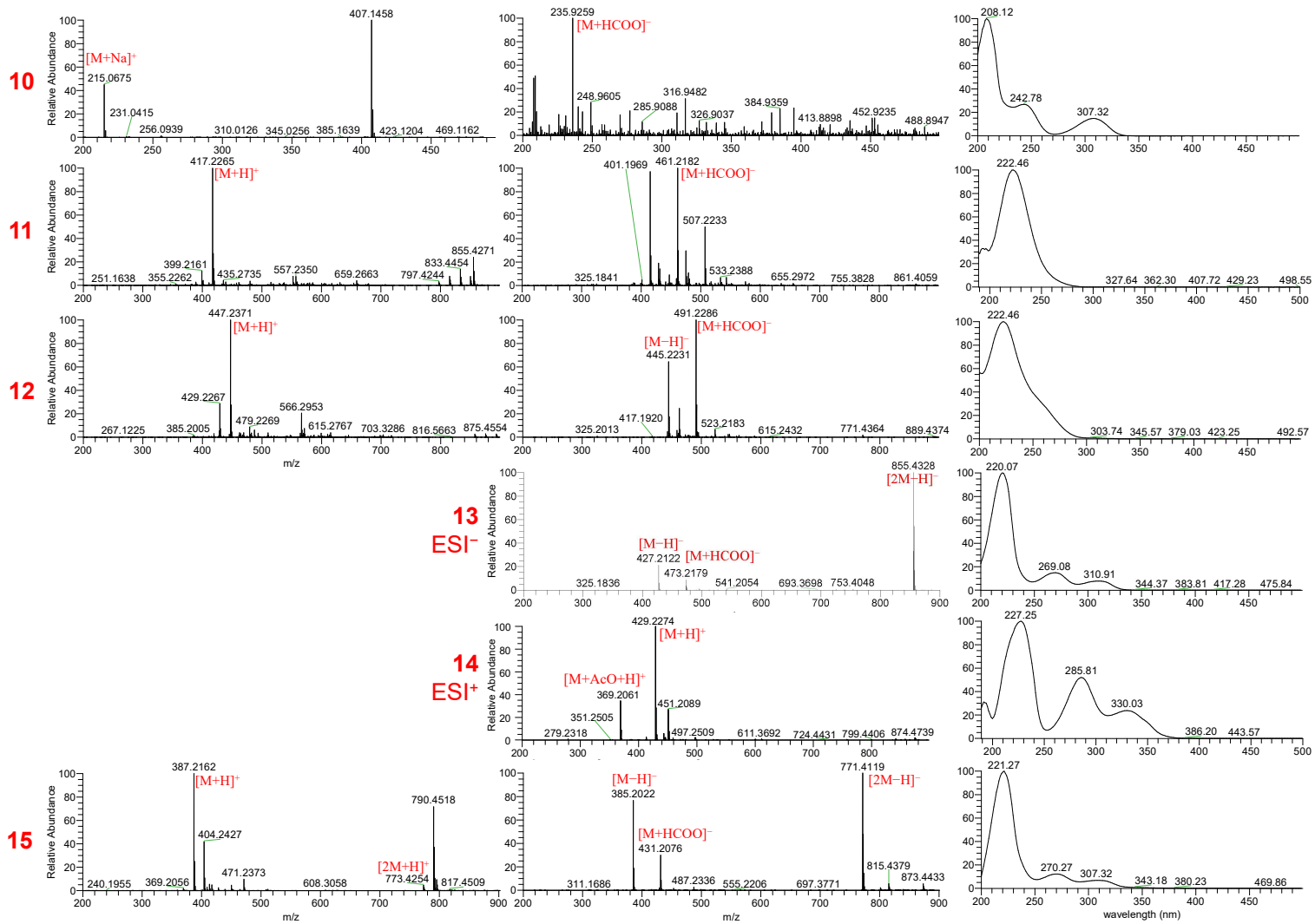


Figura 56. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos 10–15.

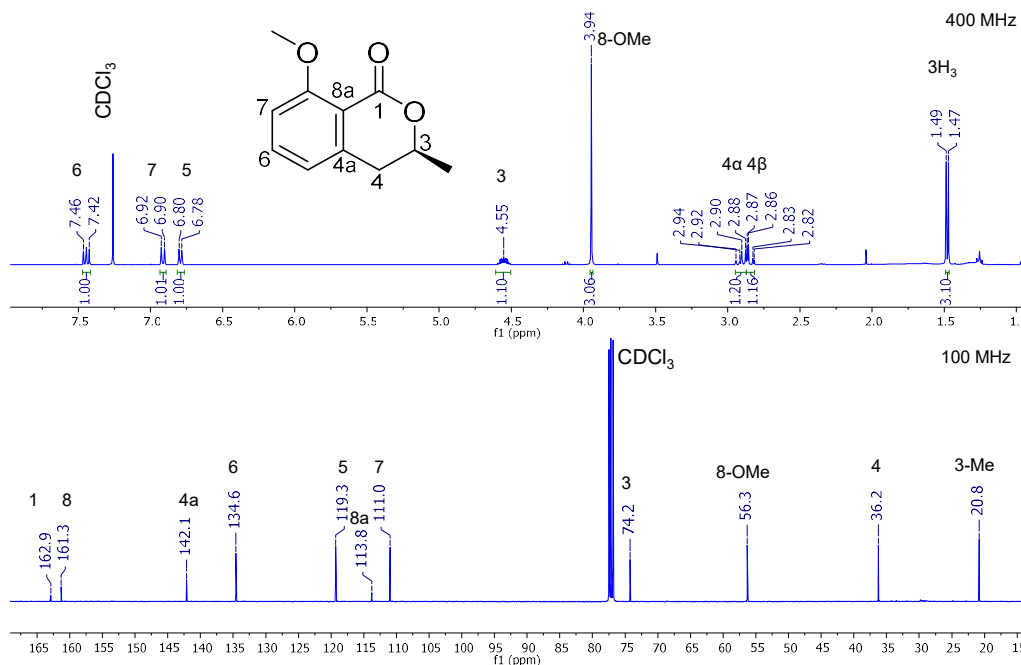


Figura 57. Espectro de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3 , 400 y 100 MHz) del producto O-metilmeleína (**10**).

Tabla 26. Datos espectroscópicos de los compuestos **10–12** (CDCl_3).

Posición	10		Posición	11		Posición	12	
	δ_{C} 100 MHz	δ_{H} 400 MHz J(Hz)		δ_{H} 400 MHz J(Hz)	δ_{C} 100 MHz		δ_{H} 400 MHz J(Hz)	
1	162.9		1		84.8			
2			2 α	1.80, m	39.2		1.67, m	
3	74.2	4.55, dqd (10.7, 6.3, 3.6)	2 β	2.47, ddd (11.4, 5.8, 3.0)	26.7		2.06, dd (13.6, 5.5)	
3-Me	20.8	1.48, d (6.3)	3 α	1.60, ddd (14.3, 7.0, 4.3)			1.67, dd (13.1, 2.7)	
4 β		2.84, dd (16.1, 3.5)	3 β	1.89, td, (13.5, 2.6)			1.88, td (13.4, 2.5)	
4 α	36.2	2.91, dd (16.1, 10.6)	4		112.5			
4a	142.1		5		146.0			
5	119.3	6.79, d (7.6)	6	2.27, d (13.4)	47.8		2.25, d (12.2)	
6	134.6	7.44, dd (8.5, 7.6)	7	5.30, d (4.0)	81.1		5.27, d (4.1)	
7	111.0	6.91, d (8.5)	8		134.1			
8	161.3		9	5.69, dd (12.0, 5.3)	129.5		5.61, dd (12.3, 4.9)	
8-OMe	56.3	3.94, s, 3H	10 α	1.70, m	24.8		1.49, dd (6.2, 4.0)	
8a	113.8		10 β	2.16 (m)			1.98, dd (13.4, 2.5)	
			11	2.84, dd (8.0, 2.5)	43.5		2.91, d (8.1)	
			12		145.3			
			13	5.89, d (2.8)	141.9		-	
			14		161.3			
			15	1.26, s, 3H	20.9		1.33, s, 3H	
			16	1.75, d (1.8), 3H	15.0		1.75, s, 3H	
			17	1.24, s, 3H	17.7		1.74, s, 3H	
			18	2.68, dt (13.4, 6.8)	29.3		2.54, dt (13.8, 6.9)	
			19	1.20, d (6.7), 3H	20.3		1.33, d (6.7), 3H	
			20	1.21, d (6.7), 3H	20.6		1.31, d (6.8), 3H	
			21	3.26, d (11.1)	57.4		3.27, d (11.1)	
			22		105.4			
			23	1.24, s, 3H	26.1		1.74, s, 3H	
			24		171			
			13-OMe		59.4		3.72, s, 3H	
			OH		-		2.41, s	

Por otra parte, la fórmula molecular calculada para el producto **11** fue $C_{24}H_{32}O_6$ (IDH=9, calculado para $C_{24}H_{33}O_6$, $\Delta=-1.6$ ppm), con base en el análisis de los iones m/z 417.2265 $[M+H]^+$ y 461.2182 $[M+HCOO]^-$ (**Figura 56**). En el espectro de RMN 1H (**Figura 58**) se observaron las señales correspondientes a seis metilos δ_H 1.30–1.80, dos metinos con hibridación sp^2 δ_H 5.89 (d, $J=2.8$ Hz), 5.69 (dd, $J=12.0, 5.3$ Hz) y cuatro metinos con hibridación sp^3 , de los cuales uno es base de oxígeno δ_H 5.30 (d, $J=4.0$ Hz), 3.26 (d, $J=11.1$ Hz), 2.84 (dd, $J=8.0, 2.5$ Hz) y 2.27 (d, $J=13.4$ Hz).

El producto **12** presentó los iones m/z 447.2374 $[M+H]^+$ y 445.2127 $[M-H]^-$, calculando con ellos una fórmula molecular de $C_{25}H_{34}O_7$ (IDH=9, calculado para $C_{25}H_{35}O_7$, $\Delta=-0.7$ ppm), la cual difirió en +30 uma (CH_2O) con respecto a **11** (**Figura 58**). En comparación con lo anterior, el espectro de RMN 1H de **12** (**Figura 58**) presentó gran similitud, destacando en este caso la presencia de una señal asignable a un grupo metoxilo δ_H 3.72 (s) y la desaparición del metino en la posición 13. Por otra parte, el espectro de RMN ^{13}C reveló 25 señales asignadas de la siguiente manera: dos carbonilos de éster δ_C 171.0 y 161.3, seis carbonos sp^2 δ_C 146.0, 145.3, 141.9, 134.1, 129.5 y 112.5, un carbono de un grupo hemicetal δ_C 105.4, tres carbonos base de oxígeno δ_C 84.8, 81.1 y 59.4, un carbono alfa a un grupo carbonilo δ_C 57.4, tres metinos δ_C 47.8, 43.5 y 29.3, tres metilenos δ_C 39.4, 26.7 y 24.8 y seis metilos δ_C 26.1, 20.9, 20.6, 20.3, 17.7 y 15.0. Estas evidencias en conjunto permitieron la identificación de los compuestos atranona A (**11**) y atranona B (**12**), los cuales habían sido descritos como producto de *Stachybotrys atra*.¹³³ Los desplazamientos químicos de los compuestos **10–12** se encuentran en la **Tabla 26**.

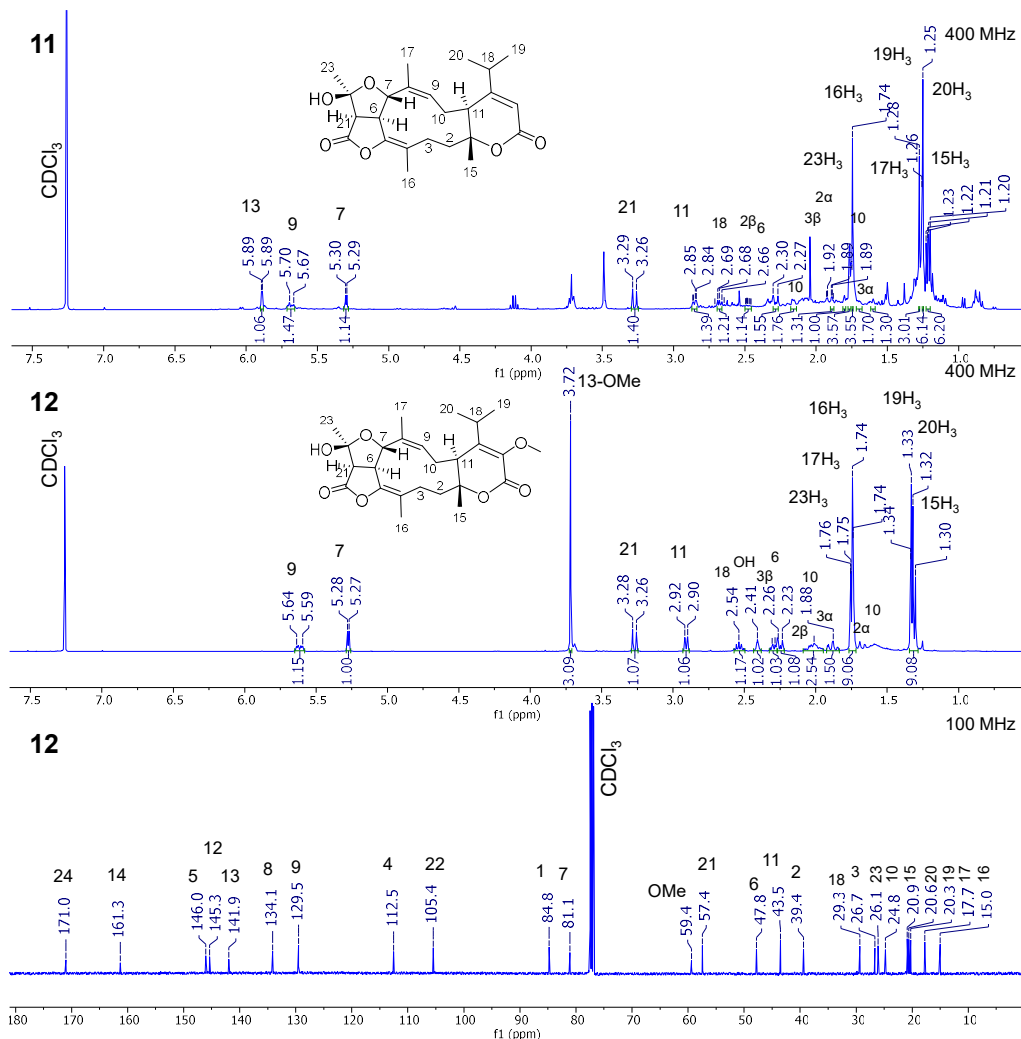
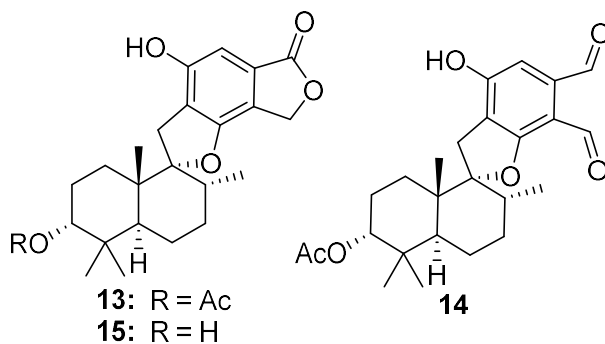


Figura 58. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del producto atranona A (**11**) y espectros de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3 , 400 y 100 MHz) del producto atranona B (**12**).



Para la caracterización estructural del producto **13**, los iones m/z 429.2272 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 427.2127 $[\text{M}-\text{H}]^-$ en los espectros de HRESIMS (**Figura 56**) fueron consistentes con la fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (IDH=10, calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_6$, $\Delta=+0.1$ ppm). En el espectro de RMN ^1H (**Figura 59**) se observó un hidrógeno aromático δ_{H} 6.93 (s), un oximetileno δ_{H} 5.14 (d, $J=14.8$ Hz) y 5.30 (d, $J=14.8$ Hz), un

oximetino δ_H 4.64 (t, $J=2.4$ Hz) y cinco señales asignables a grupos metilo, uno de estos de un grupo acetato δ_H 1.02 (s), 0.93 (s), 0.92 (s), 0.75 (d, $J=6.5$ Hz) y 2.04 (s), respectivamente. En igual forma, el espectro de RMN ^{13}C presentó señales asignables a dos carbonilos de éster δ_C 172.1 y 170.9, seis carbonos aromáticos δ_C 155.7, 153.9, 127.5, 120.4, 118.8 y 103.5, tres carbonos base de oxígeno, de los cuales uno de tipo espiro δ_C 78.1, 68.1 y 99.6, cinco metilenos δ_C 31.8, 30.9, 25.0, 22.4 y 20.8, dos metinos δ_C 41.0 y 36.9 y cinco metilos δ_C 15.7, 27.9, 22.0, 16.1 y 21.4, uno de ellos unido a un carbonilo. Todas estas señales fueron idénticas para las descritas en la literatura para el acetato de stachybotrólida (**13**).^{134,135}

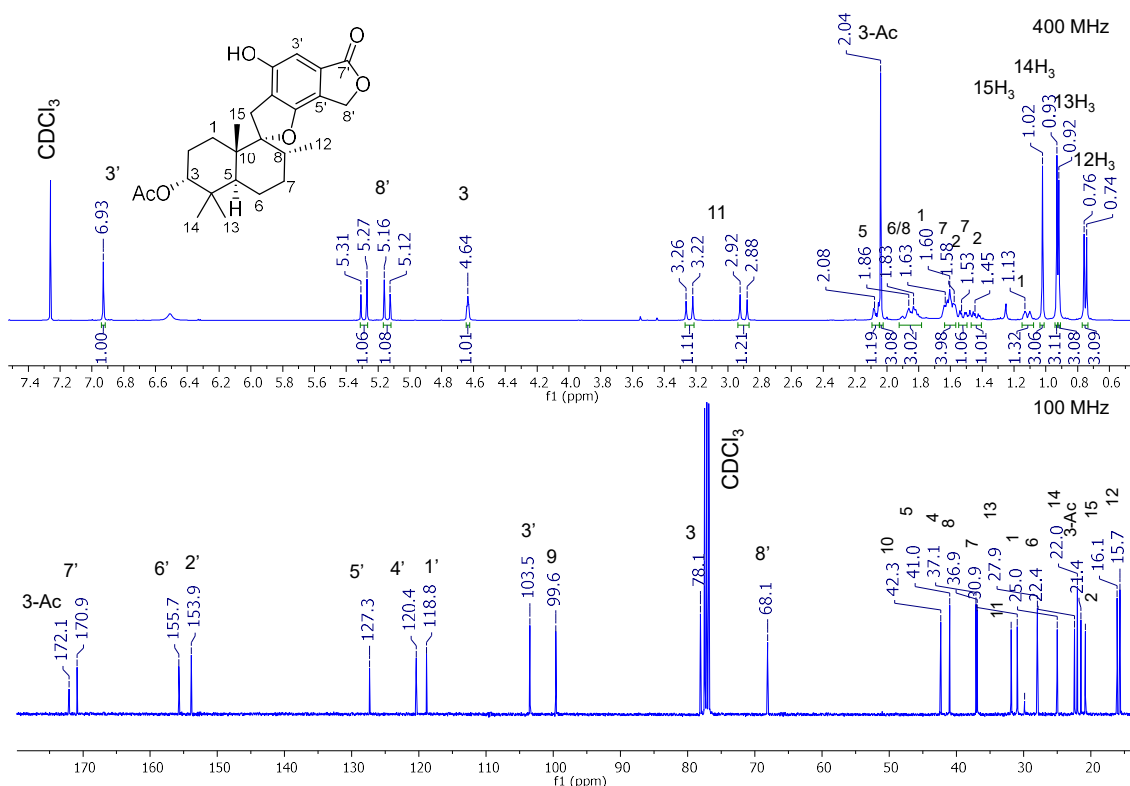


Figura 59. Espectros de RMN 1H y ^{13}C ($CDCl_3$, 400 y 100 MHz) del producto acetato de stachybotrólida (**13**).

El análisis comparativo de los espectros de RMN 1H de los productos **14** y **15** permitió apreciar que estos pertenecen a la misma clase estructural que **13** debido a las similitudes observadas (Figura 60). El producto **14** presentó un ion protonado m/z 429.2274 $[M+H]^+$ similar al observado en **13** (Figura 56) y, por lo tanto, se calculó la misma fórmula molecular $C_{25}H_{32}O_6$ (IDH=10, calculado para $C_{25}H_{33}O_6$, $\Delta=+0.5$ ppm), revelando que se trata de un isómero estructural. El análisis comparativo entre los espectros de RMN 1H (**13** y **14**) presentó como diferencia principal para **14** la aparición de dos señales simples en δ_H 10.45 y 10.68, correspondientes a dos grupos aldehído, además de la desaparición de la señal del oximetileno de la lactona en la posición 8'. Cabe mencionar que este producto fue inestable durante el periodo de registro de los espectros de RMN y se indujo la formación de la lactona, este fenómeno había sido descrito con anterioridad.¹³⁶ A pesar de esto y

con base en las evidencias antes descritas, se propuso la identidad de **14** como el acetato del stachybotrydial.^{134,136}

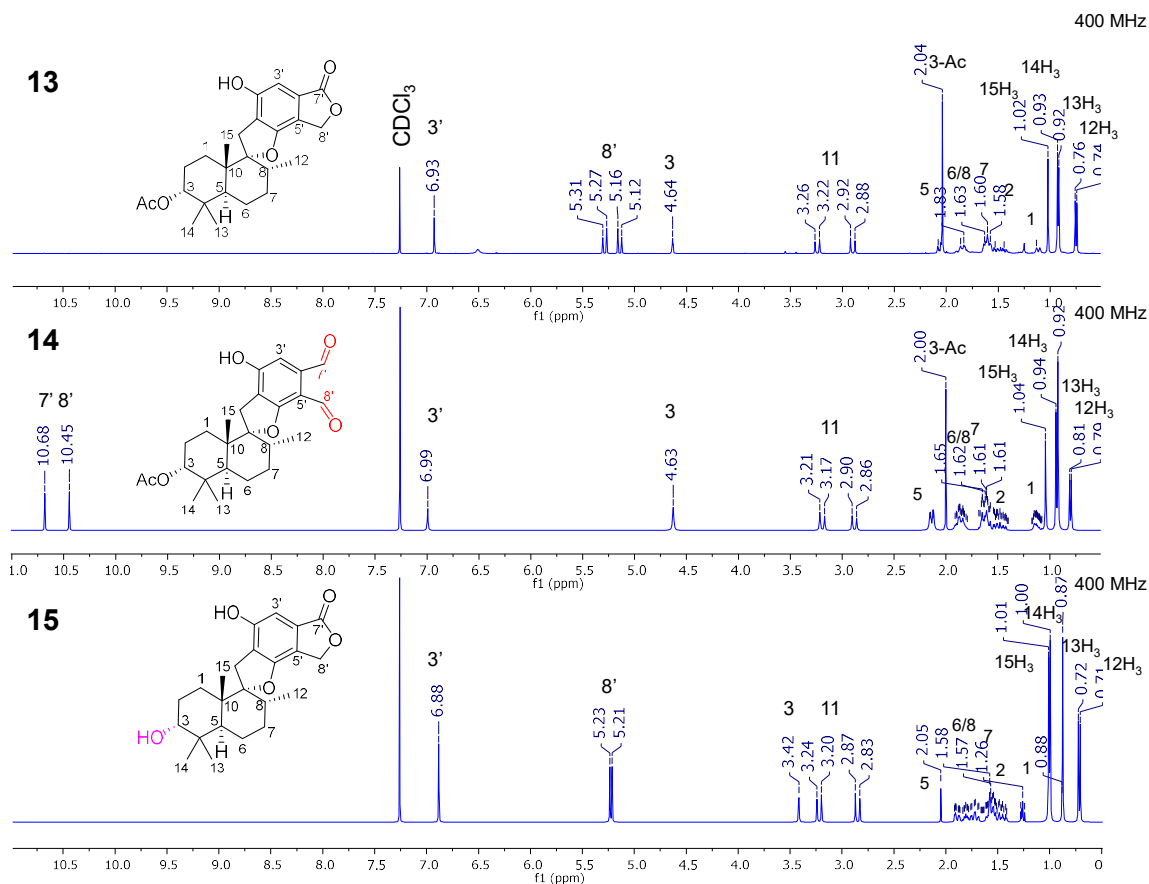


Figura 60. Análisis comparativo entre los espectros de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de los productos acetato de stachybotrólida (**13**), acetato de stachybotrydial (**14**) y stachybotrólida (**15**).

Finalmente, el espectro de HRESIMS del producto **15** (**Figura 56**) presentó los iones m/z 387.2160 $[M+H]^+$ y 385.2020 $[M-H]^-$, correspondientes a la fórmula molecular C₂₃H₃₀O₅ (IDH=9, calculado para C₂₅H₃₃O₆, $\Delta=-1.6$ ppm), la cual difiere en -42 uma (C₂H₂O) con respecto a **13**. El espectro de RMN ¹H de este producto fue muy similar al de **13** (**Figura 60**), la principal diferencia observada fue la ausencia de la señal correspondiente al grupo acetato y el cambio en el desplazamiento de la señal del oximetino de la posición 3 hacia campos altos. Estas diferencias, permitieron caracterizar a **15** como la stachybotrólida.¹³⁵

Tabla 27. Datos espectroscópicos de los compuestos **13–15** (CDCl₃).

Posición	13		14	15
	δ_c 100 MHz	δ_H 400 MHz J(Hz)	δ_H 400 MHz J(Hz)	δ_H 400 MHz J(Hz)
1	25.0	1.12, dt (12.7, 3.1) 1.61, m	1.65 (m) 1.12 (m)	1.89, ddd (14.2, 3.9, 2.4) 1.05, m*
2	20.8	1.45, dd (12.8, 8.2) 1.58, dd (6.3, 3.7)	1.84 (m) 1.62 (m)	1.72, td (13.7, 3.5) 1.55, m
3	78.1	4.64, t (2.43)	4.63 (s)	3.41, t (2.5)
4	37.1			
5	41.0	2.08, m	2.14, dd (12.4, 2.6)	2.04, dd (12.1, 2.5)
6	22.4	1.88, m, 2H	1.45, ddd (12.2, 7.1, 3.2) 1.59, m	1.43, m 1.60, m
7	30.9	1.52, dd (12.24, 3.47) 1.61, m	1.68, m 1.54, m	1.49, m 1.57, m
8	36.9	1.83, m	1.88, m	1.81, dt (11.3, 5.8)
9	99.6			
10	42.3			
11	31.8	2.90, d (17.2) 3.24, d (17.2)	3.19, d (18.0) 2.88, d (17.4)	3.22, d (17.1) 2.85, d (17.1)
12	15.7	0.75, d (6.52), 3H	0.80, d (6.5), 3H	0.71, d (6.5), 3H
13	27.9	0.92, s, 3H	0.92, s, 3H	1.00, s, 3H
14	22.0	0.93, s, 3H	0.94, s, 3H	0.87, s, 3H
15	16.1	1.02, s, 3H	1.04, s, 3H	1.01, s, 3H
1'	118.8			
2'	153.9			
3'	103.5	6.93, s	6.99, s	6.88, s
4'	120.4			
5'	127.3			
6'	155.7			
7'	170.9		10.45, s	
8'	68.1	5.14, d (14.8) 5.29, d (14.8)	10.68, s	5.25, d, (14.9) 5.19, d (14.9)
1"-CO	172.1			
2"-CH ₃	21.4	2.04, s, 3H	2.00, s, 3H	
OH		6.51, s	6.29, s	
*sobrepuesta				

5.3 Estudios de metabolómica de los organismos sujetos a estudio.

Para estudiar de manera integral el perfil químico de los organismos seleccionados, se decidió emplear un estudio basado en el análisis de redes moleculares (RM) generadas a partir de datos espectrométricos, debido a que en los últimos tiempos este enfoque ha surgido como una herramienta poderosa para procesar los datos de espectrometría de masas en tándem (MS²), con el propósito de identificar las moléculas presentes en los datos de HRESIMS² de los extractos crudos.¹³⁷

Conceptualmente, las RM se basan en la organización y visualización de datos de masas obtenidos en tándem, generando un mapa de similitud espectral y revelando la presencia de fragmentaciones homólogas, de esta manera, sus nodos tienden a permanecer juntos y crear clústeres de moléculas análogas. Uno de los enfoques más empleados es aquel en el que, partiendo de la premisa de que los compuestos relacionados entre sí por su estructura poseen un patrón de fragmentación similar,

se espera encontrar familias estructuralmente relacionadas que posean bioactividades similares, las cuales están moduladas por diferencias estructurales menores (concepto de relación estructural-actividad).

En este caso, las RM fueron empleadas con el fin de explorar a detalle el potencial biosintético de estos organismos, para lo que se emplea el MolNetEnhancer,¹¹⁶ una herramienta empleada principalmente para extractos bacterianos y vegetales, debido a que existe un contenido menor sobre metabolitos fúngicos en estas bases de datos. Esta herramienta cual tiende a clasificar los clústeres obtenidos en familias estructurales y de esta manera, descifrar el metaboloma a través de diferentes proyectos independientes *in silico* (VarQuest, MS2LDA, Dereplicator+).¹¹⁷

5.3.1 *Aspergillus* sp. NCA276.

El análisis de la RM de *Aspergillus* sp. **NCA276** (Figura 61), la cual se conforma de 800 nodos agrupados en 50 clústeres, denotó que la familia de compuestos que predominan son la de los derivados del ácido glutámico (moléculas de naturaleza peptídica) y la de las aspocalasinas. Para este último grupo mencionado, algunas de las identidades de las moléculas fueron imposibles de asignar, debido a que son isómeros estructurales y al tener el mismo prototipo estructural, los patrones de fragmentación no se modifican de manera significativa. De igual forma, existen dos clústeres pequeños (3 nodos) identificados, el primero dentro del grupo de derivados de la fenilalanina, y el segundo descrito como anilidas. Las observaciones relevantes y compuestos anotados durante esta investigación se presentan en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de *Aspergillus* sp. NCA276.

Compuesto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula	Masa exacta (m/z) ^e	Error (ppm)
17-desoxi-aspergilina PZ (1) ^{a,b}	386.268	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₆ NO ₃	386.2695	-2.0
Aspergilina PZ (2) ^{a,b}	402.263	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₆ NO ₄	402.2644	+1.3
Aspocalasina D (3) ^{a,b}	384.253	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₄ NO ₃	384.2538	+1.2
Asperfenamato (4) ^{a,c}	507.228	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₃₁ N ₂ O ₄	507.2284	+1.1
<i>N</i> -benzoil-L-fenilalaninol (19) ^{a,c}	256.133	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ NO ₂	256.1337	+1.9
Aspocalasina I ^c	416.240	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₄ NO ₅	416.2437	+1.3
Aspocalasina K ^c	434.289	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₀ NO ₅	434.2906	+1.2
Flavicalasina N ^c	434.253	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₀ NO ₅	434.2906	+1.2
Emerifenolicina F ^c	734.459	[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₆₄ NO ₈	734.4632	+0.8
Erythrokyrina ^c	456.235	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₄ NO ₆	456.2386	+1.2

^a Compuesto aislado. ^b Anotaciones hechas manualmente. ^c Anotación de GNPS. ^d Valores del GNPS. ^e Valores del análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS.

De manera general la familia de las aspocalasinas, a la cual pertenecen los compuestos **1-3** y otros anotados mediante la base de datos del GNPS son metabolitos producidos por diferentes especies de *Aspergillus* de los subgéneros *Flavipedes* (*A. micronesiensis*¹³⁸ y *A. flavipes*,¹³⁹ sección *Flavipedes*; *A. polyporicola*,¹⁴⁰ sección *Spelaei*), *Terrei* (*A. niveus*,¹⁴¹ sección *Terrei*; *A.*

*microcysticus*¹²³ sección; *Ambigui*), *Circumdati* (*A. elegans*,¹⁴² sección *Steyniorum*) y *Nigri* (*A. luchuensis* antes *A. awamori*,¹²² sección *Nigri*). Así como también son producidas por *Mariannaea elegans* (antes *Spicaria elegans*,¹⁴³ Nectriaceae) y *Trichoderma gamsii*¹²¹ (Hypocreaceae). Por otra parte, el asperfenamato (**4**) es un compuesto de naturaleza aromática que ha sido descrito en diversos organismos productores de origen vegetal,¹⁴⁴ liquénico¹²⁵ o fúngico.¹⁴⁵ Además de que el compuesto identificado dentro del mismo clúster (*N*-benzoil-L-fenilalaninol; **19**) es a la vez su precursor biosintético.¹⁴⁵ Finalmente, la 2-*O*-metilbutirolactona II (**5**) es un metabolito fúngico previamente descrito en hongos del género *Aspergillus* sp.,^{126,146} y fue imposible su localización dentro de la red, debido a que su aislamiento se realizó a partir del segundo extracto. Del análisis del primer extracto, no se encontró presente esta clase de metabolitos, a partir de los cuales se obtuvieron los espectros de masas de alta resolución (HRESIMS²) con los cuales se realizó el análisis por RM.

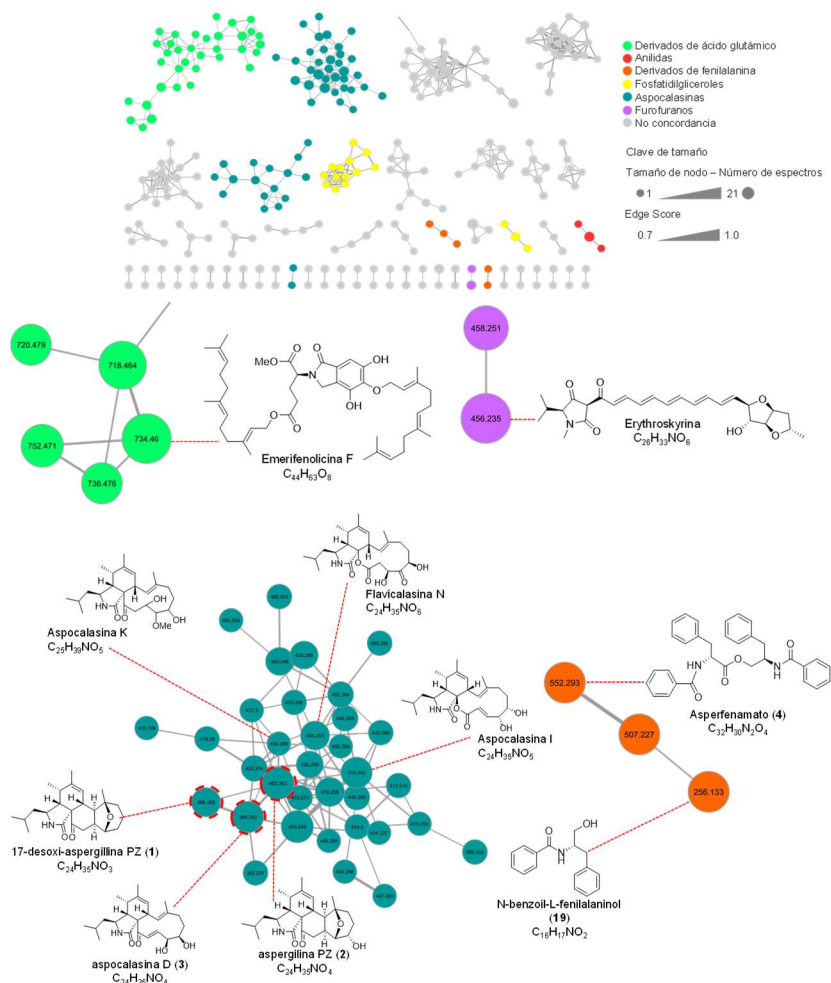


Figura 61. RM del extracto NCA276 *Aspergillus* sp. con MoInetEnhancer. La concordancia con los productos aislados y con la base de datos del GNPS se realizó empleando Parent Ion Mass como filtro. Los nodos que corresponden a los compuestos que no fueron anotaciones proporcionadas por la base de datos del GNPS sino fueron identificados por su aislamiento se muestran en un círculo punteado. Los nodos que no muestran correlación entre si se encuentran suprimidos de la imagen.²⁰⁴

5.3.2 *Aspergillus* sp. NCA264.

La RM del organismo *Aspergillus* sp. **NCA264** (Figura 62) generó 591 nodos agrupados en 59 clústeres, mostrando que la familia de compuestos más grande pertenece a la clasificación de sesquiterpenos, donde se encuentran clasificados los ácidos 11-dihidrosidónico (**6**) y sidónico (**7**), así como otros sesquiterpenos análogos de tipo bisabolano (dentro del mismo clúster), como por ejemplo el ácido (7*S*)-10-hidroxisidónico, el cual fue anotado mediante la base de datos del GNPS. Otras familias estructurales presentes son las de esteroides de tipo ergostano y estigmastano y unos cuantos nodos aislados representando la presencia de fenilpropanoides y policétidos, como es el caso del diorcinol (**8**). Las anotaciones realizadas se observan en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de *Aspergillus* sp. NCA264.

Compuesto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula	Masa exacta (m/z) ^e	Error (ppm)
Ácido 11-dihidrosidónico (6) ^{a,c}	229.086	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₃ O ₃	229.0865	-2.3
Ácido sidónico (7) ^{a,c}	265.144	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₁ O ₄	265.1439	-2.4
Diorcinol (8) ^{a,c}	263.129	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	263.1283	-2.2
Ácido (7 <i>S</i>)-10-hidroxisidónico ^c	281.139	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₁ O ₅	281.1389	-1.9

^a Compuesto aislado. ^b Anotaciones hechas manualmente. ^c Anotación de GNPS. ^d Valores del GNPS. ^e Valores del análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS.

Tanto el ácido sidónico (**7**) como el diorcinol (**8**) son metabolitos con una amplia distribución taxonómica, debido a que se ha encontrado como producto de diferentes especies fúngicas.

En el caso del ácido sidónico (**7**), los organismos productores son *Aspergillus*, principalmente *A. sydowii*¹⁴⁷ y *A. versicolor*,¹⁴⁸ los cuales pertenecen al subgénero *Nidulantes* y la sección *Versicolores*;¹⁴⁹ *Penicillium aculeatum*¹⁵⁰ y *P. expansum* (*Aspergillaceae*);¹²⁷ *Gibellula* sp. (*Cordycipitaceae*);¹⁵¹ *Pestalotiopsis microspora* (*Xylareaceae*)¹⁵² y *Botryotinia fuckeliana* (*Sclerotiniaceae*)¹⁵³ y un hongo del orden Pleosporales.¹⁵⁴

El diorcinol (**9**) ha sido descrito como producto de hongos de los géneros *Aspergillus* subgénero *Nidulantes*: *A. falconensis*¹⁵⁵ y *A. nidulans*¹⁵⁶ que pertenecen a la sección *Nidulantes* y *A. austroafricanus*¹⁵⁷ y *A. sydowii*¹⁴⁷ que pertenecen a la sección *Variocolores*; *A. flocculus*¹⁵⁸ (subgénero *Terrei*, sección *Terrei*) y *A. sulphureus*¹⁵⁹ (subgénero *Circumdati*); *Trichoderma erinaceum* (*Hypocreaceae*),¹⁶⁰ *Phoma* sp. (*Didymellaceae*),¹⁶¹ *Diplodia corticola* (*Botryosphaeriaceae*),¹⁶² *Scopulariopsis* sp. (*Microascaceae*);¹⁶³ *Beauveria felina* (antes *Isaria felina*),¹⁶⁴ *Cordyceps* sp.¹⁶⁵ y *Gibellula* sp. (*Cordycipitaceae*);¹⁵¹ *Ascomycota* sp.¹⁶⁶ y *Engyodontium album* (*Ascomycota incertae sedis*);¹⁶⁷ *Metarhizium anisopliae* (*Clavicipitaceae*)¹⁴⁸ y *Penicillium expansum* (*Aspergillaceae*).¹²⁷

A diferencia de estos, el ácido 11-dihidrosidónico (**6**) ha sido encontrado como producto de *Aspergillus versicolor*¹²⁸ y las especies de *Penicillium aculeatum*,¹⁵⁰ *P. expansum*¹²⁷ y *P. oxalicum*.¹⁶⁸

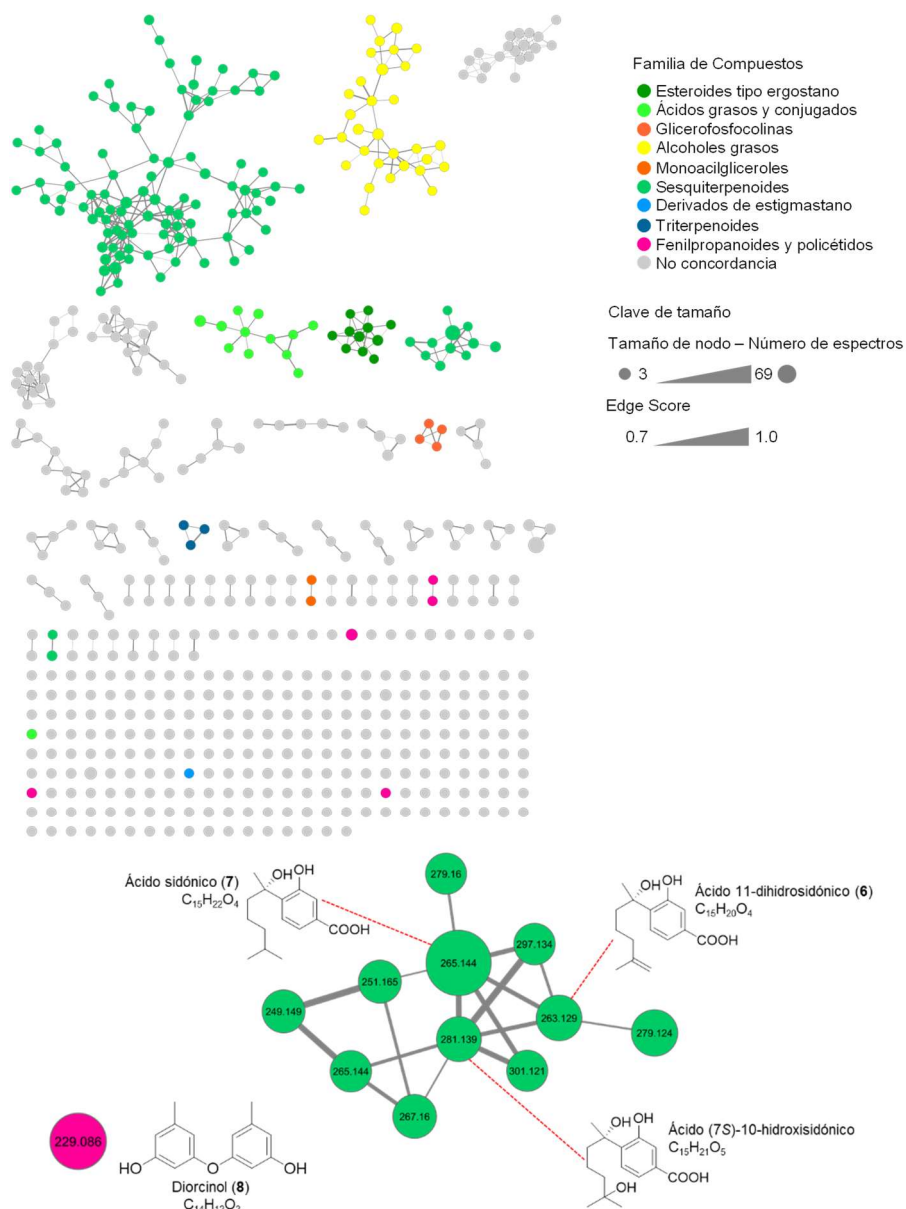


Figura 62. RM del extracto NCA264 *Aspergillus* sp. con MolNetEnhancer. La concordancia con los productos aislados y con la base de datos del GNPS se realizó empleando Parent Ion Mass como filtro.²⁰⁴

5.3.3 *Aspergillus* sp. NCA257.

En este caso, la RM obtenida (**Figura 63**) para el organismo *Aspergillus* sp. **NCA257** consistió en 159 nodos agrupados en 14 clústeres (más de dos nodos por clúster). Ninguna familia de compuestos fue identificada mediante el MolNetEnhancer, probablemente porque la colección de metabolitos de origen fúngico dentro de la base de datos del GNPS todavía se encuentra en sus inicios. Sin embargo, fue posible identificar al compuesto aislado, éter dimetílico del asterriquinol D (**9**) a m/z 429.1800 [M+H]⁺ (masa exacta m/z 429.1814), el cual se observó como un nodo individual por lo que tampoco fue posible relacionarlo a una familia estructural en primera instancia. Este metabolito ha sido aislado a partir de *A. kumbius*,¹³⁰ el cual pertenece al subgénero *Circumdati* y la

sección *Circumdati*,¹⁶⁹ *A. sclerotiorum*,¹³¹ el cual pertenece al subgénero *Circumdati* y la sección *Circumdati*,¹⁴⁹ y *A. candidus*,¹⁷⁰ el cual pertenece al subgénero *Circumdati* y la sección *Candidi*.¹⁴⁹

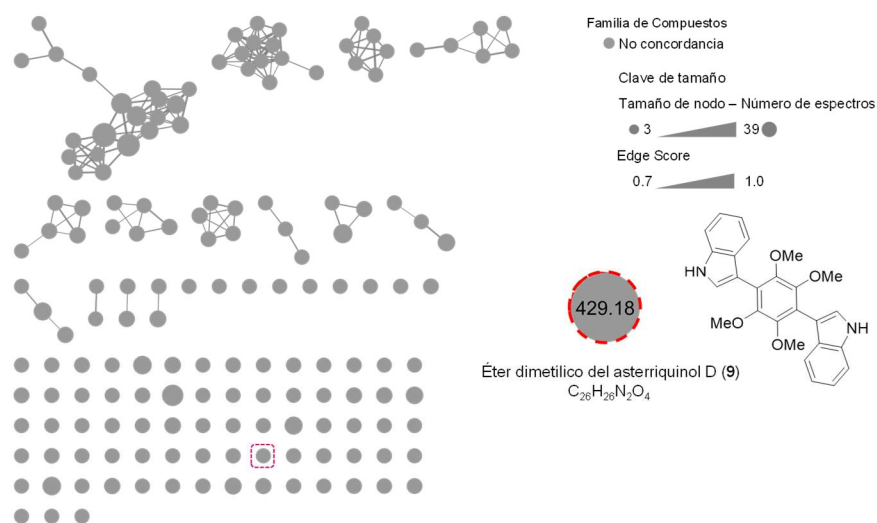


Figura 63. RM del extracto NCA257 *Aspergillus* sp. con MolNetEnhancer. La concordancia con los productos aislados y con la base de datos del GNPS se realizó empleando Parent Ion Mass como filtro. Los nodos que corresponden a los compuestos que no fueron anotaciones proporcionadas por la base de datos del GNPS sino fueron identificados por su aislamiento se muestran en un círculo punteado.²⁰⁴

5.3.4 *Stachybotrys* sp. NCA252.

La red molecular (RM) del organismo *Stachybotrys* sp. NCA252 (**Figura 64**) mostró 325 nodos, los cuales fueron agrupados en 29 clústeres (más de 2 nodos por clúster). El análisis de ésta reveló varias familias de compuestos, por ejemplo: benzofuranos (donde se encuentran los fenilespirodrimanos aislados), macrólidas, esteroides de tipo pregnano, cromenos, entre otras. Gracias a los resultados comparativos de los espectros de masas con los presentes en la base de datos del GNPS, se pudieron anotar algunos compuestos adicionales que se encuentran en la red molecular gracias a sus características estructurales. Estas anotaciones se presentan en la **Tabla 30**.

Todos los compuestos aislados fueron localizados en la red molecular, de manera inesperada, la atranona B (**12**) fue localizada en uno de los clústeres principales, mientras que para su análogo atranona A (**11**) fue encontrado el aducto $[M+HCOO]^-$ como un nodo independiente.

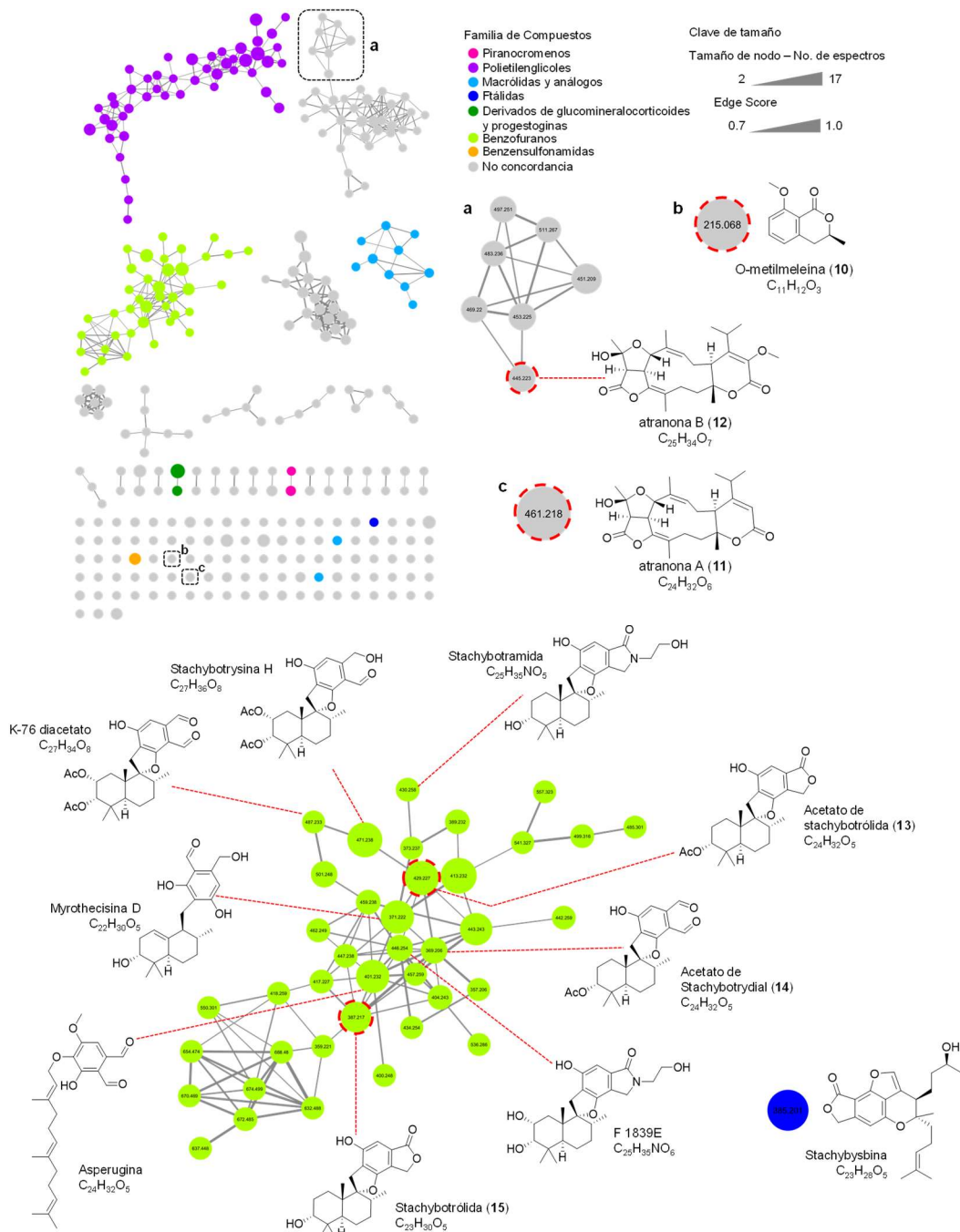


Figura 64. RM del extracto NCA252 *Stachybotrys* sp. con MolNetEnhancer. La concordancia con los productos aislados y la librería del GNPS se realizó empleando Parent Ion Mass como filtro. Los nodos que corresponden a los compuestos que no fueron anotaciones proporcionadas por la base de datos del GNPS sino fueron identificados por su aislamiento se muestran en un círculo punteado.²⁰⁴

Tabla 30. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de *Stachybotrys* sp. NCA252.

Compuesto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula	Masa exacta (m/z) ^e	Error (ppm)
O-metilmeleína (10) ^{a,b}	215.068	[M+Na] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Na	215.0684	+2.5
atranona A (11) ^{a,b}	461.218	[M+HCOO] ⁻	C ₂₅ H ₃₃ O ₈	461.2175	-1.3
atranona B (12) ^{a,b}	445.223	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₃ O ₇	445.2226	-1.3
Acetato de stachybotrólida (13) ^{a,b}	249.227	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ O ₆	249.2277	+1.2
Acetato de stachybotrydial (14) ^a	369.206	[M-AcO+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₉ O ₄	369.2066	+1.5
Stachybotrólida (15) ^{a,b}	387.217	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₁ O ₅	387.2171	+1.3
Stachybotramida ^c	430.258	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₆ NO ₅	430.2593	+1.2
K-76 diacetato ^c	487.233	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₅ O ₈	487.2332	+1.1
Stachybotrisina H ^c	471.238	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₅ O ₇	471.2383	+1.2
Myrothecisina D ^c	371.222	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₁ O ₄	371.2222	+1.4
F 1839 E ^c	446.254	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₆ NO ₆	446.2542	+1.1
Asperugina ^c	401.232	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₃ O ₅	401.2328	+1.4
Stachybisbina A ^c	385.201	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₉ O ₅	385.2015	+1.4

^a Compuesto aislado. ^b Anotaciones hechas manualmente. ^c Anotación de GNPS. ^d Valores del GNPS. ^e Valores del análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS.

En el caso de todos los fenilespirodrimanos (13–15), es concordante su presencia en el clúster ya que la mayoría son metabolitos producidos por los géneros *Stachybotrys* sp. y *Myrothecium* sp. (Stachybotryaceae) los cuales están estrechamente relacionados quimiotaxonómicamente,¹⁷¹ por otra parte, la asperugina es un metabolito producido por una cepa mutante de *Aspergillus rugulosus*,¹⁷² el cual al ser farnesiloxigenado, difiere de los otros compuestos identificados en la red (C-prenilados). Todas las moléculas localizadas en la red molecular poseen como precursor en común a la ilicolina B (a excepción de la asperugina), un metabolito descrito inicialmente en *Fusarium* sp. y el cual posee un grupo funcional aril-aldehído.¹⁷³

5.4 Ensayos de cocultivo en placa de Petri entre especies selectas de hongos y bacterias.

5.4.1 Ensayos de interacción hongo-hongo.

Con la finalidad de explorar a fondo el potencial biosintético de los microorganismos de estudio, se realizaron cocultivos en placas de Petri empleando algunos organismos de la colección de hongos. Se seleccionaron las cepas *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276 debido a que presentaron un morfotipo similar a otros hongos dentro de la colección proporcionada (NCA254 y NCA270, respectivamente) y además se seleccionó a la especie *Aspergillus* sp. NCA257, ya que de los organismos que solo poseían un morfotipo, este era el que poseía una tasa de crecimiento similar a los seleccionados anteriormente. De esta manera, se propusieron tres cocultivos entre las cepas antes mencionadas.

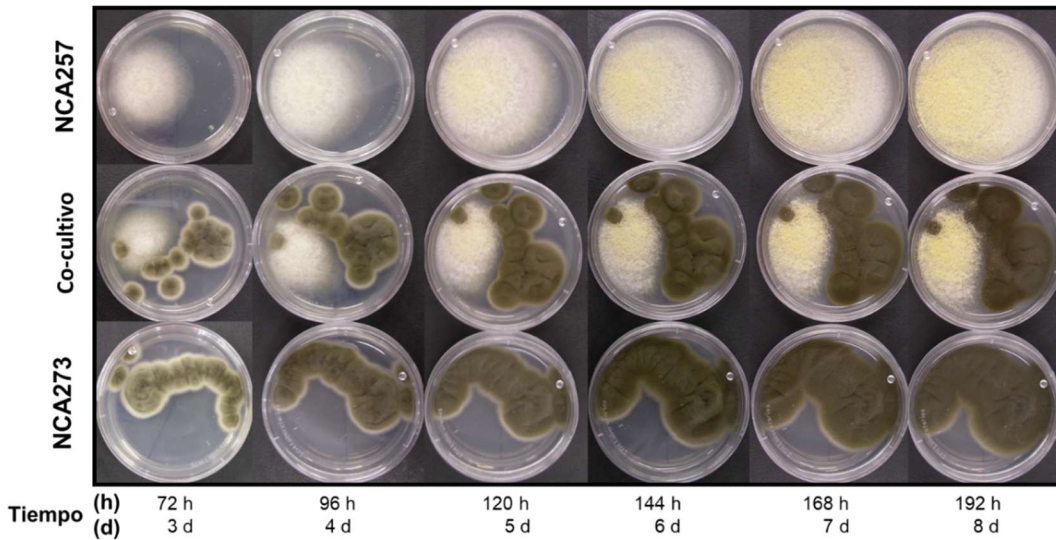


Figura 65. Cocultivo en caja de Petri de las especies *Aspergillus* sp. NCA257 y *Cladosporium* sp. NCA273; medio de cultivo APD + sales marinas artificiales.

El cocultivo entre los organismos *Aspergillus* sp. NCA257 y *Cladosporium* sp. NCA273 presentó un efecto de competencia entre ambas cepas (**Figura 65**). Durante el tiempo de experimentación se observó el crecimiento de *Aspergillus* sp. sobre el de *Cladosporium* sp. a partir del día 5, lo que sugiere otro tipo de mecanismos de defensa (micoparasitismo, interacción física, enzimática, entre otros),¹⁷⁴ a pesar de ello, no fue posible apreciar cual organismo es el que se vio más afectado por esta competencia.

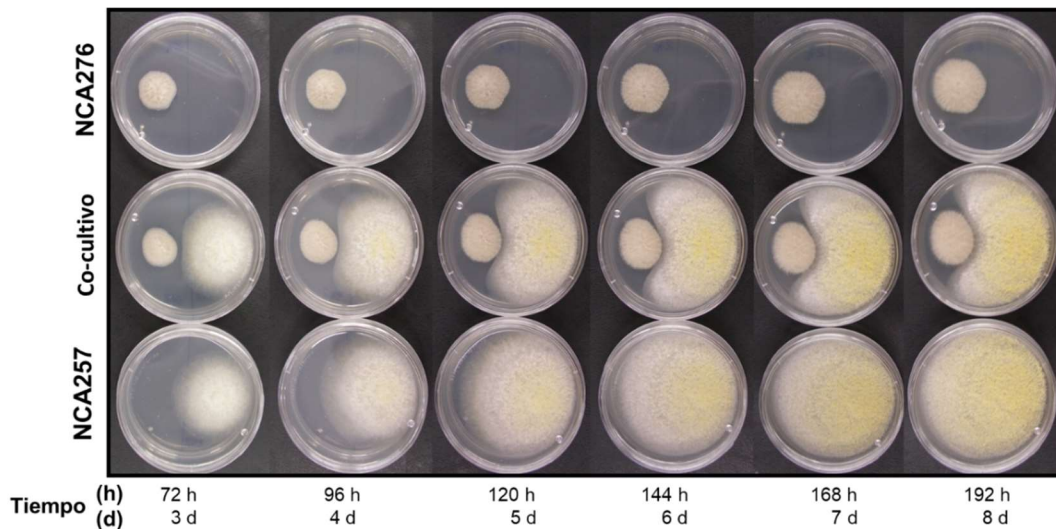


Figura 66. Cocultivo en caja de Petri de las especies *Aspergillus* sp. NCA257 y *Aspergillus* sp. NCA276; medio de cultivo APD + sales marinas artificiales.

De manera adicional, en el experimento de interacción entre ambas especies de *Aspergillus* spp. seleccionadas (NCA257/NCA273) hizo muy evidente el efecto antagónico que ejerció el taxa NCA276 con respecto al NCA257 (**Figura 66**), ocasionando la deformación de la colonia de este último. A pesar de que el crecimiento del hongo NCA257 es radial, en este caso se ve delimitado por

la presencia del hongo NCA276, el cual no cambia de manera considerable con respecto al control y no fue posible apreciar un cambio morfológico del micelio de ambas cepas, en la zona de confrontación.

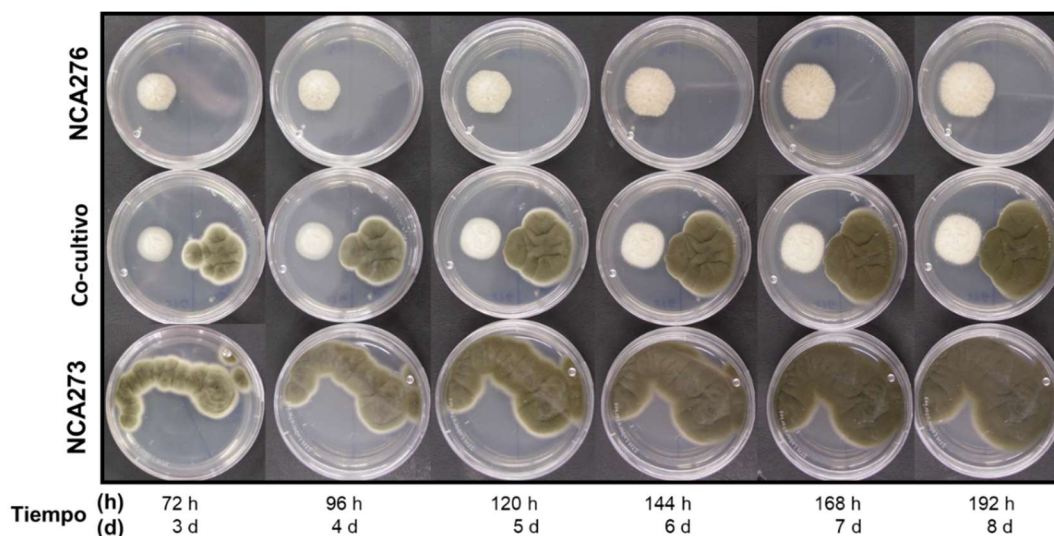


Figura 67. Cocultivo en caja de Petri de las especies *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276; medio de cultivo APD + sales marinas artificiales.

Finalmente, en el experimento de interacción entre *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276 fue concordante con lo observado en el cocultivo previamente descrito (**Figura 67**), ya que el crecimiento de la cepa de *Cladosporium* sp. en comparación al control se ve limitado de manera significativa por la presencia del otro organismo y no se observa la formación de barreras miceliales por ambos organismos. Por estas razones, se sugirió que la producción de metabolitos con actividad biológica podría ser el mecanismo de defensa principal del hongo *Aspergillus* sp. NCA276, ya que no hubo contacto físico evidente entre ambas colonias durante el tiempo de observación.

Con base en el estudio químico, algunos de los productos caracterizados han demostrado poseer moderada actividad antifúngica: la aspergilina PZ (**2**) frente *Pyricularia oryzae*.¹²² y la aspocalasina D (**3**) frente *P. oryzae* y *Cryptococcus neoformans*.^{140,175} Cabe destacar que este último había exhibido actividad citotóxica selectiva contra células Ba/F3, induciendo apoptosis.¹²⁴

5.4.2 Ensayos de interacción entre bacterias NCA250, NCA274 y las especies fúngicas selectas.

Se realizó el cocultivo de la bacteria NCA250 frente a la batería de hongos seleccionada anteriormente y se observaron los cambios más significativos a partir del día 6 de experimentación. Como se observa en la **Figura 68**, la bacteria NCA250 presentó distintos fenómenos de interacción, por ejemplo, frente al hongo *Aspergillus* sp. NCA257 se observó un crecimiento pobre por parte de ambos organismos, caso contrario en la interacción con el hongo *Cladosporium* sp. NCA273, donde aparentemente los organismos tuvieron un crecimiento medio y el del hongo no se vio afectado de

manera considerable. De manera adicional, el cocultivo con *Aspergillus* sp. NCA276 mostró una interacción en donde la bacteria tuvo una producción mayor de pigmento, el cual se difundió en el medio de cultivo. Por esta razón, se decidió proceder con las pruebas de crecimiento en otros medios de cultivo, y el escalamiento del cocultivo en un medio líquido.

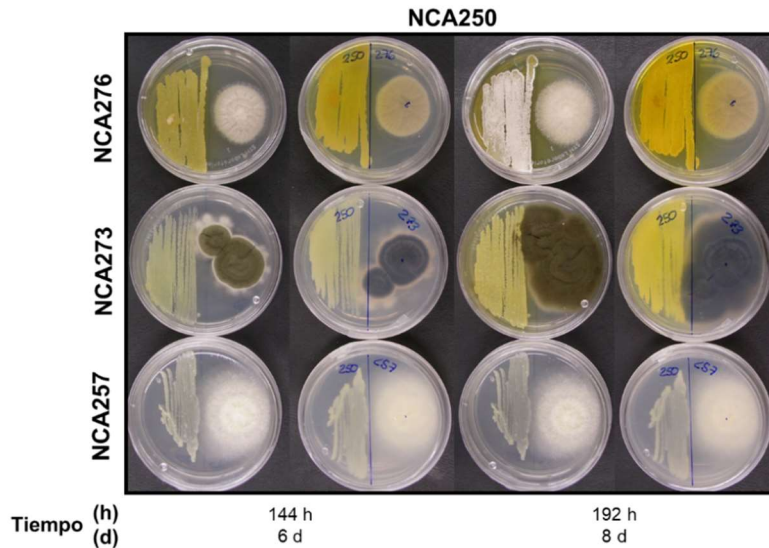


Figura 68. Cocultivo en caja de Petri de la bacteria NCA250 frente especies *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* spp. NCA257 y NCA276; medio de cultivo APD + sales marinas artificiales.

De manera paralela se realizaron los ensayos de interacción de la bacteria NCA274 frente a las mismas especies fúngicas, las observaciones a partir del día 6 se muestran en la **Figura 69**. Brevemente, se observó un efecto inhibitorio por parte del hongo *Aspergillus* sp. NCA276 debido a que la producción de pigmento de la bacteria se vio disminuida de manera progresiva a la cercanía de la colonia fúngica. Por otra parte, no se observaron cambios morfológicos significativos por ambas partes en la interacción con el hongo *Cladosporium* sp. NCA273 y en el cocultivo con *Aspergillus* sp. NCA257 exhibió el crecimiento de éste por encima del bacteriano, lo que podría significar la competencia por comensalismo por parte de la especie fúngica.

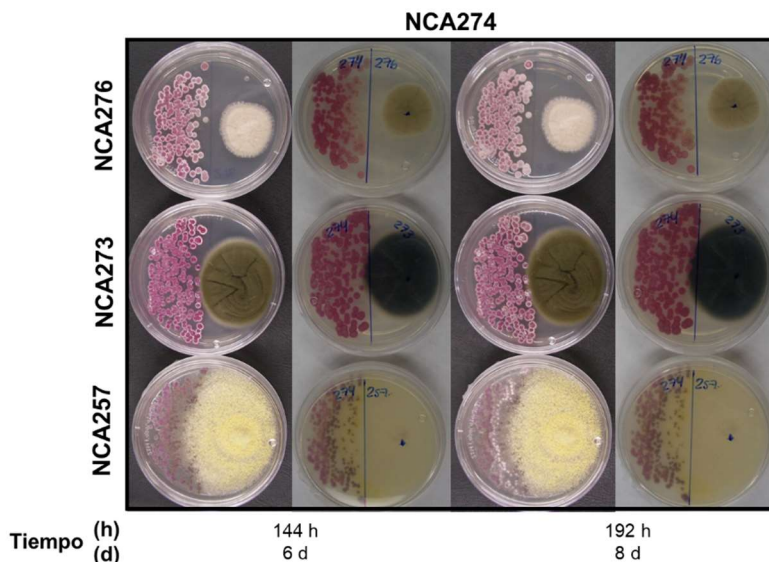


Figura 69. Cocultivo en caja de Petri de la bacteria NCA274 frente especies *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* spp. NCA257 y NCA276; medio de cultivo APD + sales marinas artificiales.

5.5 Análisis cromatográfico de los extractos obtenidos de cocultivos entre especies selectas.

5.5.1 Cocultivo *Aspergillus* sp. NCA257/*Cladosporium* sp. NCA273.

El análisis cromatográfico del extracto del hongo *Aspergillus* sp. NCA257 (**Figura 70**) presentó dos productos mayoritarios identificados como **16** y el éter dimetílico del asterriquinol D (**9**). Desafortunadamente, el extracto producido por el hongo *Cladosporium* sp. (**NCA273**) no presentó señales de relevancia que pudieran concluir al aislamiento o identificación de algún metabolito. El análisis cromatográfico del extracto del cocultivo de las especies *Aspergillus* sp./*Cladosporium* sp. reveló la producción del producto **16** en una proporción mayor (aproximadamente 270 % de incremento) con respecto al monocultivo del hongo *Aspergillus* sp. **NCA257**. El fraccionamiento y separación del extracto de cocultivo concluyó con el aislamiento de dos metabolitos, **17** el cual es un derivado del producto **16** y una molécula de tipo pirazinona (**18**). Ambos metabolitos no fueron detectados en los respectivos monocultivos.

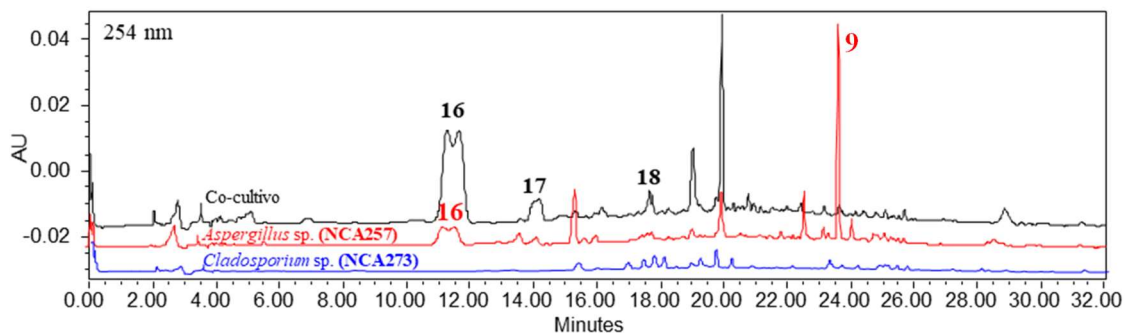


Figura 70. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo *Aspergillus* sp./*Cladosporium* sp. (NCA257/NCA273) y sus respectivos monocultivos (PDA: 254 nm).

5.5.2 Cocultivo *Aspergillus* sp. NCA257/*Aspergillus* sp. NCA276.

El extracto del hongo *Aspergillus* sp. NCA276 exhibió al compuesto 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**) como producto mayoritario (**Figura 71**), así como también se detectó la presencia de la aspocalasina D (**3**); el análisis de su cocultivo con la especie *Aspergillus* sp. NCA257 evidenció nuevamente la presencia de los metabolitos **16–18**. En este extracto, la presencia del compuesto **17** fue observada en mayor proporción con respecto a **16**, caso contrario al de la interacción descrita en el inciso anterior, en donde **16** se aprecia en mayor proporción.

Por otra parte, mediante HRESIMS se detectó la presencia del producto **18**, sin embargo, no se logró aislar a partir de este extracto. Por lo que se sospechó que el organismo productor de **18** también es la cepa *Aspergillus* sp. NCA257.

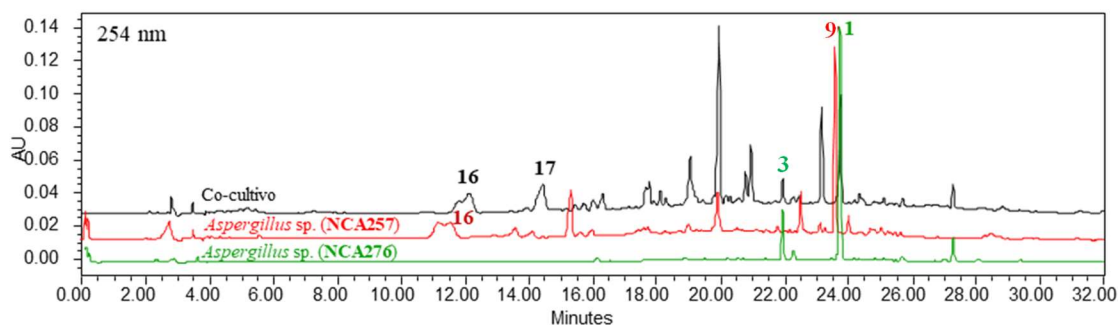


Figura 71. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo *Aspergillus* sp./*Aspergillus* sp. (NCA257/NCA276) y sus respectivos monocultivos (PDA: 254 nm).

5.5.3 Cocultivo *Cladosporium* sp. NCA273/*Aspergillus* sp. NCA276.

El estudio de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos obtenidos por los hongos *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA276, así como el de su respectivo cocultivo evidenció que la mayoría de las señales observadas en el extracto del cocultivo pertenecen al hongo *Aspergillus* sp. (**Figura 72**).

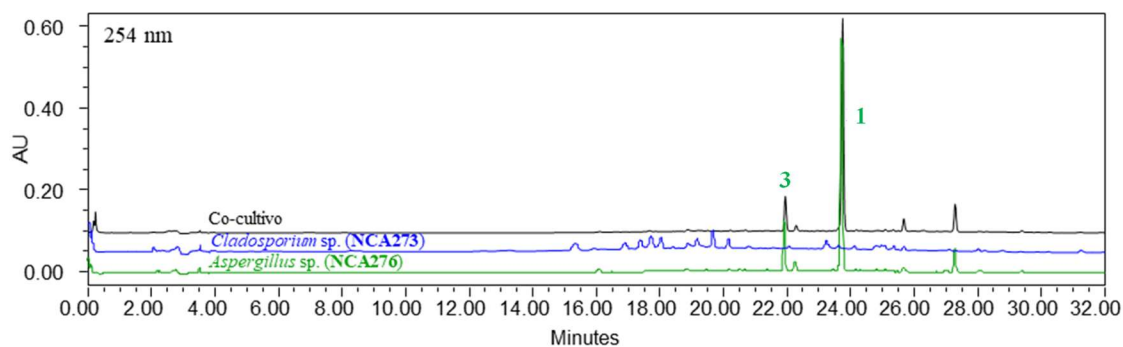


Figura 72. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo *Cladosporium* sp./*Aspergillus* sp. (NCA273/NCA276) y sus respectivos monocultivos (PDA: 254 nm).

5.5.4 Cocultivo *Aspergillus* sp. NCA276/bacteria NCA250.

El análisis de los perfiles cromatográficos correspondiente a los extractos de los monocultivos con el cocultivo de ambas especies (**Figura 73**) reveló que la mayoría de las señales observadas en el cocultivo se encontraron presentes en el monocultivo de la bacteria. Los procedimientos de fraccionamiento y separación concluyeron con la caracterización de dos productos adicionales: el producto **19** el cual se encontró en el perfil cromatográfico del extracto NCA276d y el producto **20** el cual fue obtenido a partir del extracto NCA250b.

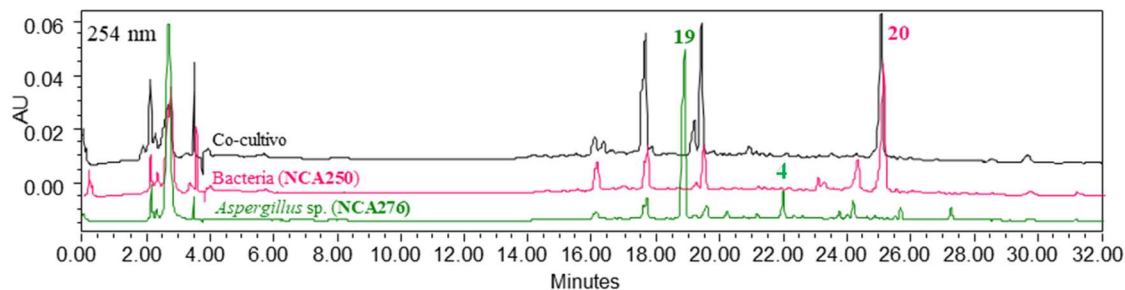
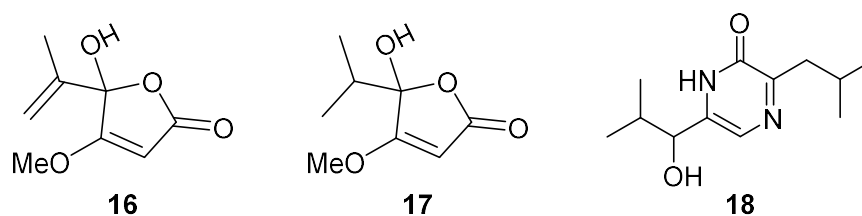


Figura 73. Comparación entre los perfiles cromatográficos del cocultivo bacteria NCA250/*Aspergillus* sp. (NCA250/NCA276) y sus respectivos monocultivos (PDA: 254 nm).

5.6 Caracterización estructural de los productos 16-18.

El estudio químico de los extractos orgánicos obtenidos a partir del cocultivo de las especies fúngicas antes mencionadas, dio como resultado el aislamiento de los metabolitos **16–18**.



Las fórmulas moleculares de estos compuestos, $C_8H_{10}O_4$ (**16**; IDH=4, calculado para $C_8H_{11}O_4$, $\Delta=+0.1$ ppm) y $C_8H_{12}O_4$ (**17**; IDH=3, calculado para $C_8H_{13}O_4$, $\Delta=+1.0$ ppm), se establecieron con base en los iones observados por HRESIMS: m/z 171.0652 $[M+H]^+$ y 169.0508 $[M-H]^-$ y m/z 173.0810 $[M+H]^+$ y 171.0665 $[M-H]^-$, respectivamente (**Figura 74**). De manera adicional, ambos productos mostraron un perfil similar en el ultravioleta con un máximo de absorción en 226 nm.

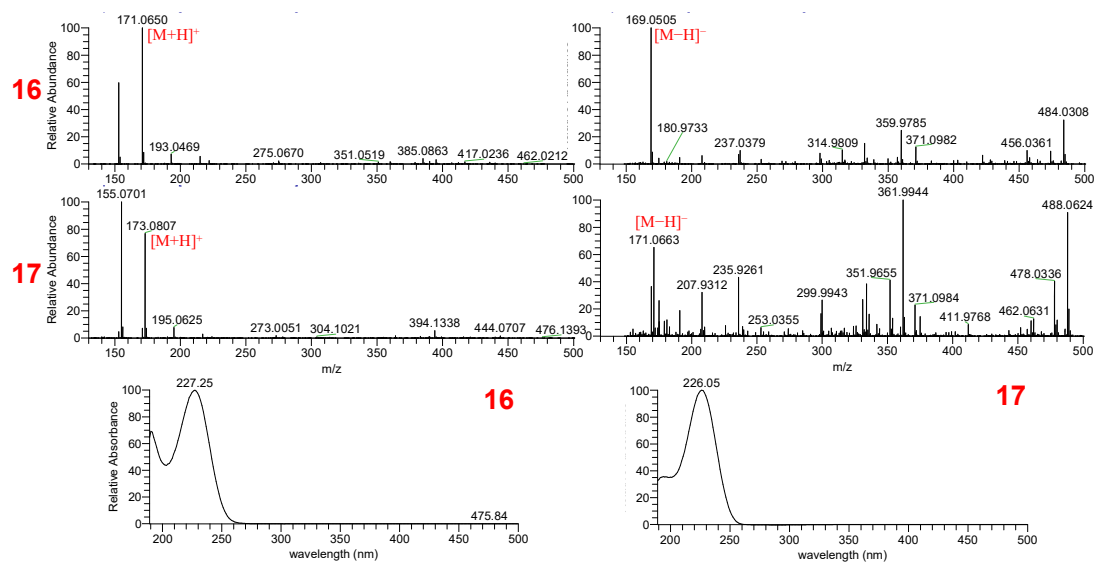


Figura 74. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos **16** y **17**.

El análisis comparativo de sus espectros de RMN ¹H (**Figura 75**) reveló que ambos compuestos comparten señales características: la presencia de un metoxilo en δ_{H} 3.9 (s, 3H) y un metino en posición alfa a un carbonilo alrededor de δ_{H} 5.0 (s). Por otra parte, el compuesto **17** posee una señal múltiple en δ_{H} 2.19 y dos señales simples correspondientes a dos metilos en δ_{H} 0.91 (d, $J=6.9$ Hz, 3H) y δ_{H} 1.07 (d, $J=6.8$ Hz, 3H). En cambio, para el compuesto **16** se observó una señal desplazada a campos más altos en δ_{H} 1.77 (s, 3H). En el espectro de RMN ¹³C (**Figura 75**) del compuesto **16** se confirmó la desaparición de uno de los grupos metilo, apreciando en su lugar la señal de un vinilo terminal en δ_{C} 139.8. Este análisis permitió identificar estos metabolitos como el ácido penicílico (**16**)¹⁷⁶ y su derivado 5-6-dihidro (**17**).¹⁷⁷

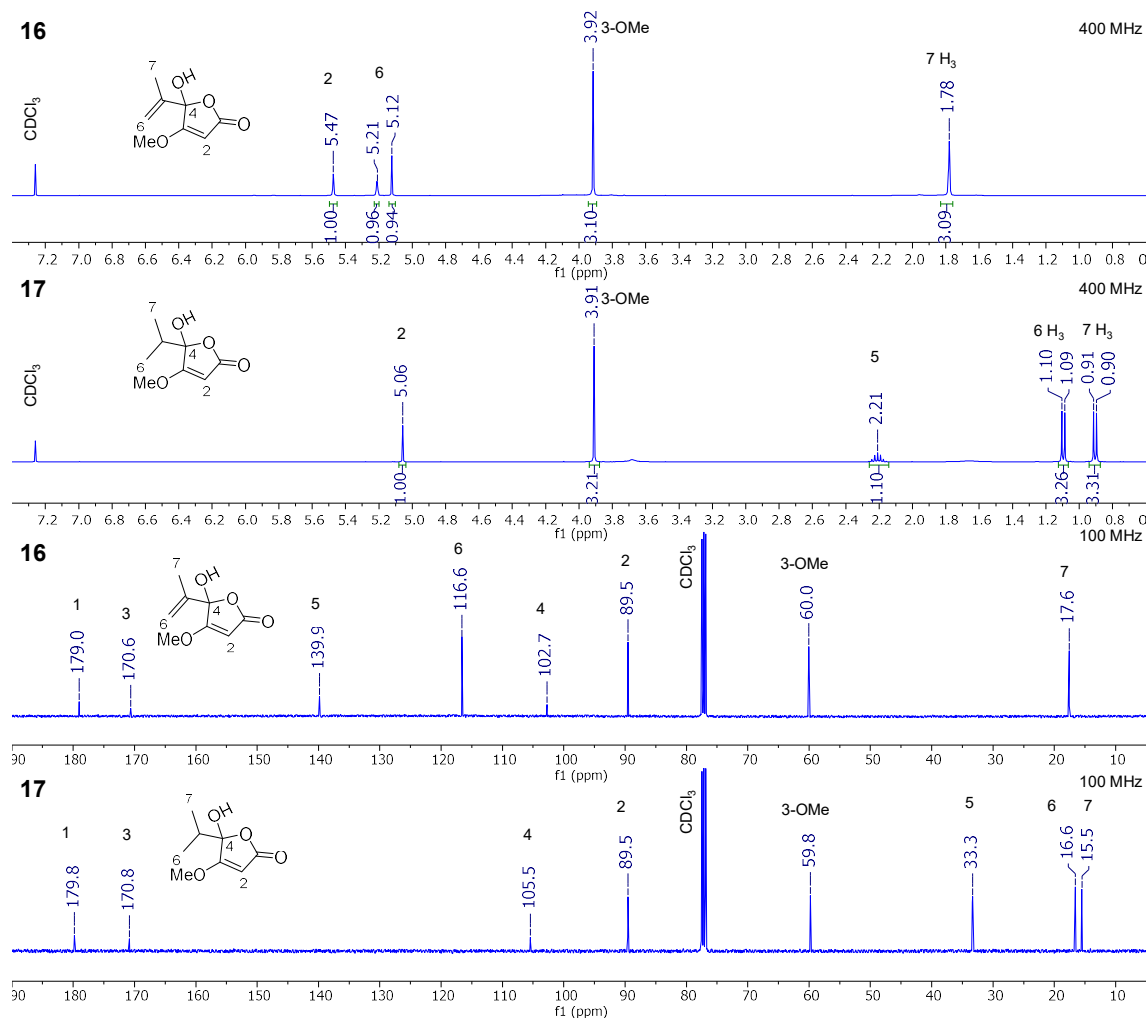


Figura 75. Espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 y 100 MHz) de los productos ácido penicílico (**16**) y ácido 5,6-dihidropenicílico (**17**).

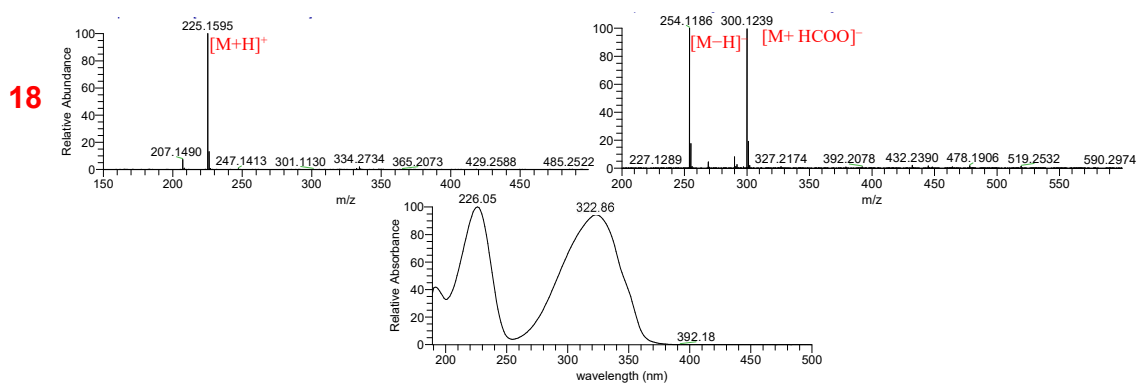


Figura 76. Espectros de HRESIMS y perfil de UV del producto **18**.

Por otra parte, la fórmula molecular del compuesto **18** se estableció como $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (IDH=4, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$, $\Delta=-1.1$ ppm), con base en los iones m/z 225.1595 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 223.1499 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (**Figura 76**). En el espectro de RMN ^1H (**Figura 77**) se observaron cuatro señales dobles características de metilos geminales en δ_{H} 0.92 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J=6.7$ Hz, 3H), 0.96 (d,

$J=6.7$ Hz, 3H), y 1.03 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), así como señales múltiples que corresponden a sus metinos vecinos hacia campo bajo en δ_H 2.02 (hex, $J=6.7$ Hz) y 2.20 (hept, $J=6.8$ Hz) y una señal de un hidrógeno aromático en δ_H 7.25 (s). Adicionalmente, se observó una señal correspondiente a dos hidrógenos diasterotópicos de un metileno en δ_H 2.69 (dd, $J=13.9, 7.2$ Hz) y 2.63 (dd, $J=13.9, 7.1$ Hz) y un metino base de oxígeno en δ_H 4.30 (d, $J=6.5$ Hz). Comparando las evidencias observadas con las descritas en la literatura, se pudo identificar el producto **18** como la 3-isobutil-6-(1-hidroxi-2metilpropil)-2(1H)-pirazinona.¹⁷⁸ El resumen de los desplazamientos químicos observados para los productos **16–18** se muestran en la **Tabla 31**.

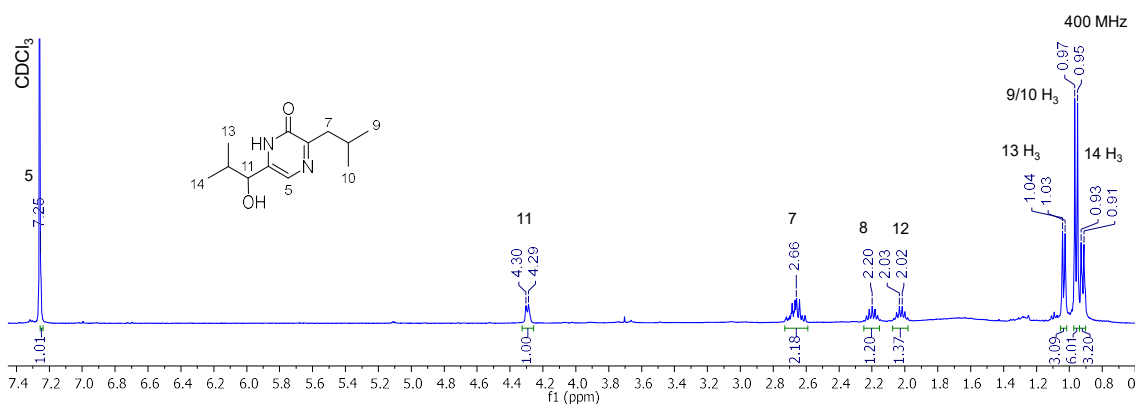


Figura 77. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del producto 3-isobutil-6-(1-hidroxi-2metilpropil)-2(1H)-pirazinona (**18**).

Tabla 31. Datos espectroscópicos de los compuestos **16–18** (CDCl_3).

Posición	16		17		Posición	18 δ_H 400 MHz J(Hz)
	δ_C 100 MHz	δ_H 400 MHz J(Hz)	δ_C 100 MHz	δ_H 400 MHz J(Hz)		
1	179.0		179.8		2	
2	89.5	5.48, s	89.5	5.05, s	3	
3	170.6		170.9		4	
4	102.7		105.5		5	7.25, s
5	139.8		33.4	2.19, hept	6	
6	116.6	5.12, s 5.22, s	16.6	1.07, s, 3H	7	2.69, dd (13.9, 7.2) 2.63, dd (13.9, 7.1)
7	17.6	1.76, s, 3H	15.5	0.89, s, 3H	8	2.20, hept (6.8)
8	60.0	3.91, s, 3H	59.8	3.91, s, 3H	9	0.96, d (6.7), 3H
					10	0.96, d (6.7), 3H
					11	4.30, d (6.5)
					12	2.02, hex (6.7)
					13	0.92, d (6.8), 3H
					14	1.03, d (6.6), 3H

5.7 Análisis por redes moleculares de los cocultivos entre las especies seleccionadas.

Para este análisis se tomaron como objeto de estudio los extractos resultantes del cocultivo de las especies *Aspergillus* sp. NCA257/*Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* sp. NCA257/*Aspergillus* sp. NCA276, así como los respectivos mono-cultivos de cada organismo. El extracto perteneciente al cocultivo entre las especies *Cladosporium* sp. NCA273/*Aspergillus* sp. NCA276 fue excluido de este análisis debido a que el conjunto de señales observadas en el cocultivo

fueron principalmente las detectadas en el monocultivo del hongo *Aspergillus* sp. NCA276. La RM elaborada consistió en 1380 nodos, los cuales fueron agrupados en 114 clústeres (más de 2 nodos por clúster; **Figura 78**).

A partir de ello, se hizo especial énfasis en las anotaciones realizadas por la misma plataforma del GNPS y los observados con la herramienta Derreplicator+ (**Tabla 32**). Como resultado, se observó la presencia de algunos compuestos que aparecieron *de novo* con el experimento de cocultivo: el alterporriol B, cuya presencia ha sido descrita previamente en distintas especies de *Alternaria* (Pleosporaceae)¹⁷⁹ y el hongo endófito *Stemphylium globuliferum* (Pleosporaceae)¹⁸⁰ y el aspocalasinol B, el cual se describió como producto del cocultivo entre *Aspergillus flavipes* (Aspergillaceae) y *Chaetomium globosum* (Chaetomiaceae).¹⁸¹

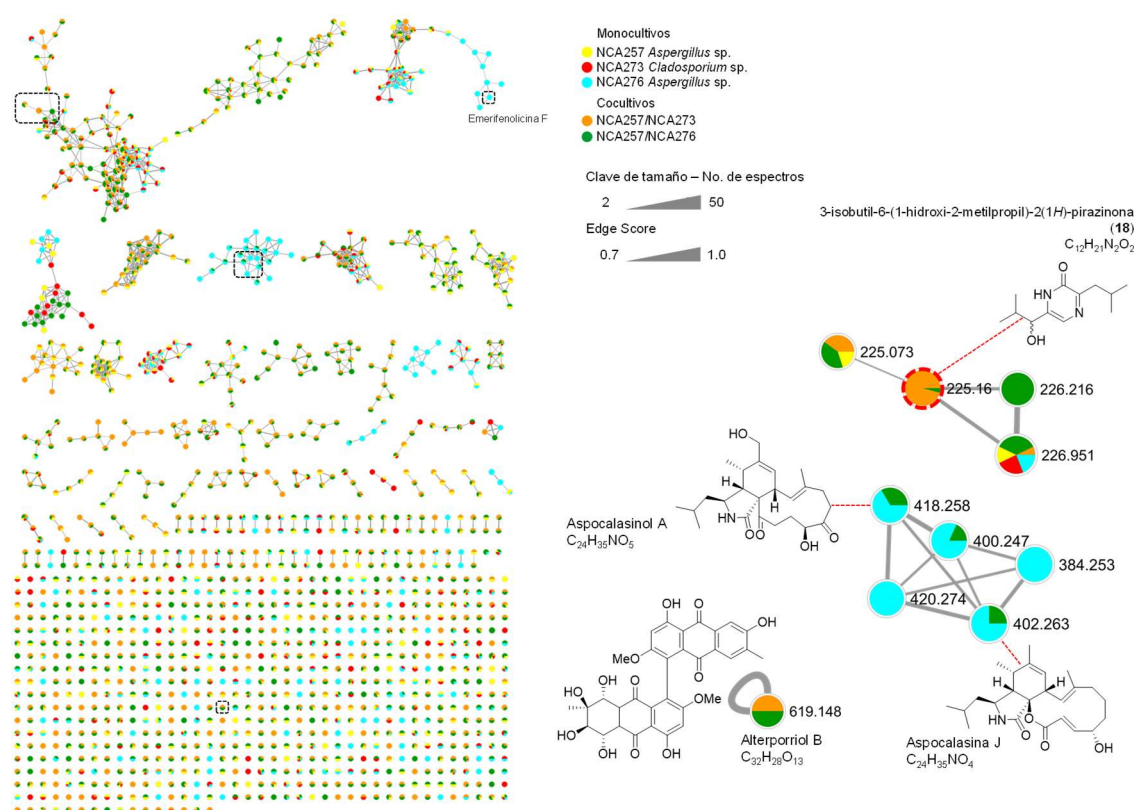


Figura 78. RM de los extractos NCA257 (*Aspergillus* sp.) en amarillo, NCA273 (*Cladosporium* sp.) en rojo y su respectivo cocultivo en naranja; NCA276 (*Aspergillus* sp.) en cian y su cocultivo con NCA257 en verde.²⁰²

De manera general, mediante este experimento se reveló que la mayoría de los nodos observados dentro de ambos cocultivos (resaltados en naranja y verde) se relacionan intrínsecamente con aquellos detectados en el monocultivo (de color amarillo) de la especie *Aspergillus* sp. NCA257.

Tabla 32. Anotaciones realizadas a partir de la RM de *Cladosporium* sp. NCA273 y *Aspergillus* spp. (NCA257 y NCA276) y sus respectivos cocultivos.

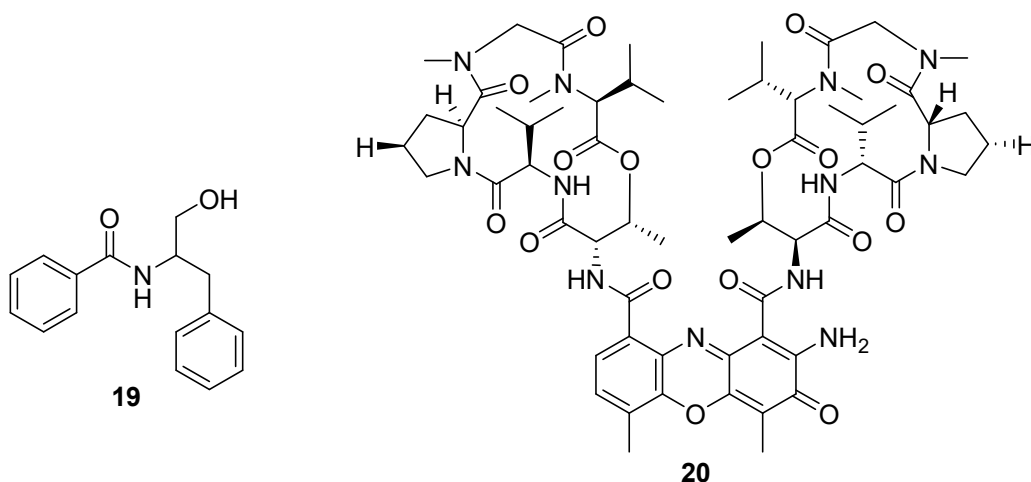
Compuesto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula	Masa exacta (m/z) ^e	Error (ppm)	Extracto de origen
3-isobutil-6-(1-hidroxi-2metilpropil)-2(1H)-pirazinona (18) ^{a,b}	225.160	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₂	225.1595	+2.4	NCA257/NCA273; NCA257/NCA276
Aspocalasina J ^c	402.263	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₆ NO ₄	402.2644	+1.3	NCA276; NCA257/NCA276
Alterporriol B ^c	619.148	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₂₇ O ₁₃	619.1452	+0.9	NCA257/NCA273; NCA257/NCA276
Emerifenolicina F ^c	734.459	[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₆₄ NO ₈	734.4632	+0.8	NCA276
Aspocalasinol A ^c	418.258	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₆ NO ₅	418.2593	+1.2	NCA276; NCA257/NCA276

^a Compuesto aislado. ^b Anotaciones hechas manualmente. ^c Anotación de GNPS. ^d Valores del GNPS. ^e Valores del análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS.

Esto puede explicarse debido al incremento en la producción en ambos cocultivos del ácido penicílico (**16**), el cual es una micotoxina de bajo peso molecular producida comúnmente por más de 100 especies diferentes de hongos, dentro de las cuales se encuentran en mayor proporción especies de *Aspergillus* subgénero *Circumdati*.¹⁸² Este producto posee una alta toxicidad asociada a un mecanismo específico, debido a su unión con los grupos funcionales sulfhidrilo (cisteína y glutatión) presentes en las proteínas.¹⁸² Por lo que responsable de la supresión de las vías metabólicas de las otras cepas presentes en el cocultivo otorgando al organismo *Aspergillus* sp. NCA257 una ventaja de crecer y producir sus propios metabolitos, sobre las otras especies seleccionadas. Finalmente, este análisis proporcionó la evidencia suficiente para determinar que el organismo productor del producto 3-isobutil-6-(1-hidroxi-2metilpropil)-2(1H)-pirazinona (**18**) es el organismo *Aspergillus* sp. NCA257 debido a que el nodo asignado para este compuesto se encontró presente en ambos cocultivos y forma parte del clúster más grande que existe en la red (**Figura 78**).

5.8 Caracterización de los productos 19 y 20.

Como resultado del estudio químico de los extractos obtenidos por el cultivo de la especie fúngica *Aspergillus* sp. NCA276 y la bacteria NCA250 en medio líquido, se obtuvieron los compuestos **19** y **20**. El metabolito **19** fue obtenido a partir del hongo *Aspergillus* sp. NCA276, mientras que el producto **20** por la bacteria NCA250.



El análisis por HPLC-PDA del compuesto **19** (4.5 mg) fue similar al de **4** (inciso **5.1.1**), observando en ambos, dos máximos de absorción en 195 y 225 nm (**Figura 79**). La presencia de los iones m/z 256.1328 $[M+H]^+$ y 254.1186 $[M-H]^-$ en los espectros de HRESIMS de **19** permitieron establecer la fórmula molecular como $C_{16}H_{17}NO_2$ (IDH=9, calculado para $C_{16}H_{18}NO_2$, $\Delta=-1.6$ ppm). Debido a que este compuesto fue obtenido como un cristal durante el fraccionamiento, se sometió de manera inmediata a un análisis por difracción de rayos X (**Figura 79**), el cual confirmó la estructura de este producto como el *N*-benzoil-L-fenilalaninol (**19**).¹⁴⁵ En el procedimiento de separación de **19** también se obtuvo otro compuesto (0.5 mg), cuyos valores de fórmula molecular $C_{32}H_{30}N_2O_4$, tiempo de retención y perfil de UV se encontraron en perfecta armonía con los obtenidos en el inciso **5.1.1** para el producto **4** (asperfenamato).

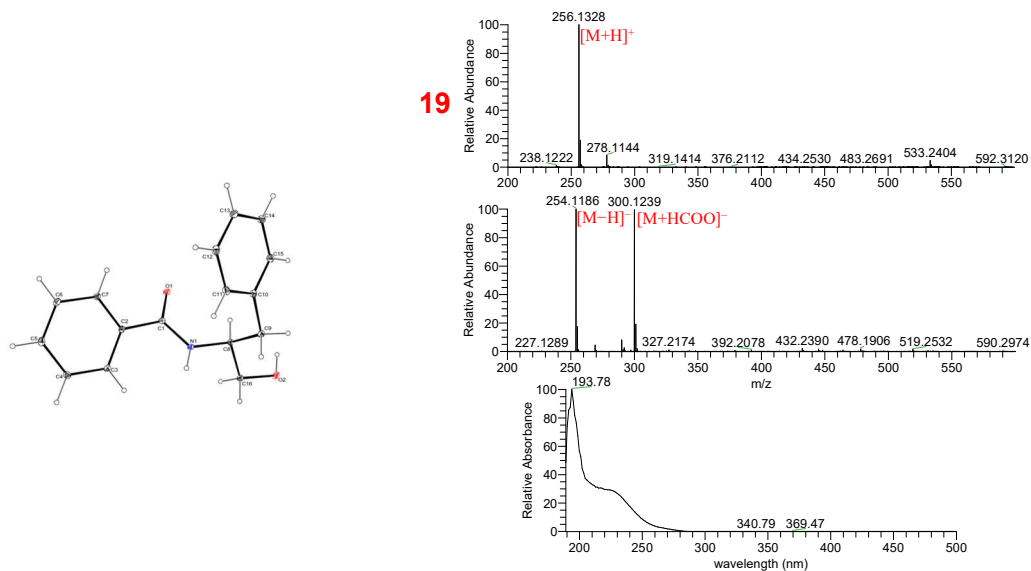
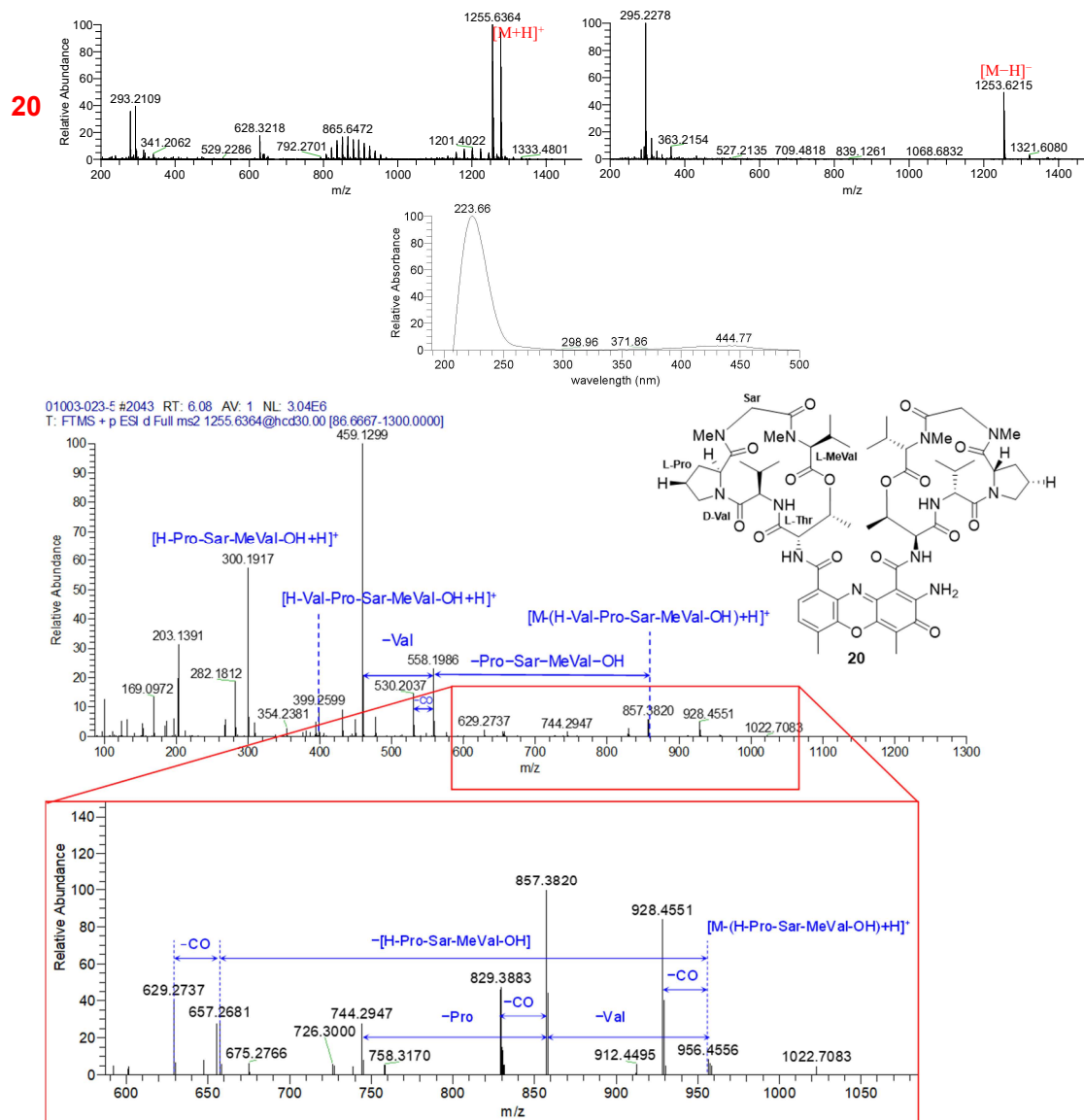


Figura 79. Estructura obtenida de la difracción de rayos X del monocristal obtenido del producto **19** y espectros de HRESIMS y perfil de UV del producto **19**.

Por otra parte, en los espectros de HRESIMS del compuesto **20** (obtenido de la bacteria NCA250) se identificaron los iones m/z 1255.6356 $[M+H]^+$ y 1253.6215 $[M-H]^-$, los cuales permitieron

establecer la fórmula molecular como $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ (IDH=26, calculado para $C_{62}H_{87}N_{12}O_{16}$, $\Delta=-0.1$ ppm; **Figura 80**). La búsqueda de esta fórmula en la base de datos Dictionary of Natural Products⁷⁷ y el análisis de los fragmentos generados en el espectro de MS/MS en modo positivo (**Figura 80**), fueron consistentes con los descritos para el antibiótico actinomicina D (**20**).¹⁸³



5.9 Ensayo de estría cruzada para evaluar el potencial antibacteriano de las bacterias seleccionadas.

Se seleccionó el ensayo de estría cruzada como un método rápido para determinar el potencial antimicrobiano de las cepas de estudio. Para establecer la actividad antimicrobiana de las bacterias sujeto de estudio, se observó que tanto proliferaba el crecimiento de las bacterias de prueba alrededor de la estría. Por lo que se logró establecer la actividad bajo los siguientes criterios: como inhibición total (++) se tomó en cuenta la ausencia del crecimiento de las bacterias de prueba

en toda la caja de Petri (por ejemplo, en la **Figura 81**, la ausencia del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en la caja inoculada con la bacteria NCA250); como inhibición parcial (+) se tomó la cuenta el detenimiento del crecimiento de manera progresiva a la cercanía de la estría principal (por ejemplo, en la **Figura 81**, el detenimiento del crecimiento de *Salmonella typhi* frente la estría de la bacteria NCA271). En algunos casos se observó la deformación del crecimiento o cambio en la morfología (\pm) de las bacterias sujeto de estudio con las bacterias de prueba (como es el caso de la bacteria NCA258 y *Pseudomonas aeruginosa*, **Figura 81**). Dichas observaciones se resumen en la **Tabla 33**.

Figura 81. Resultados del ensayo de actividad antimicrobiana (estría cruzada) de las bacterias NCA250, NCA258 y NCA271 contra: a) *E. coli*, b) *S. typhi*, c) *P. aeruginosa*, d) *S. aureus*, e) *B. subtilis* y f) *C. albicans*.

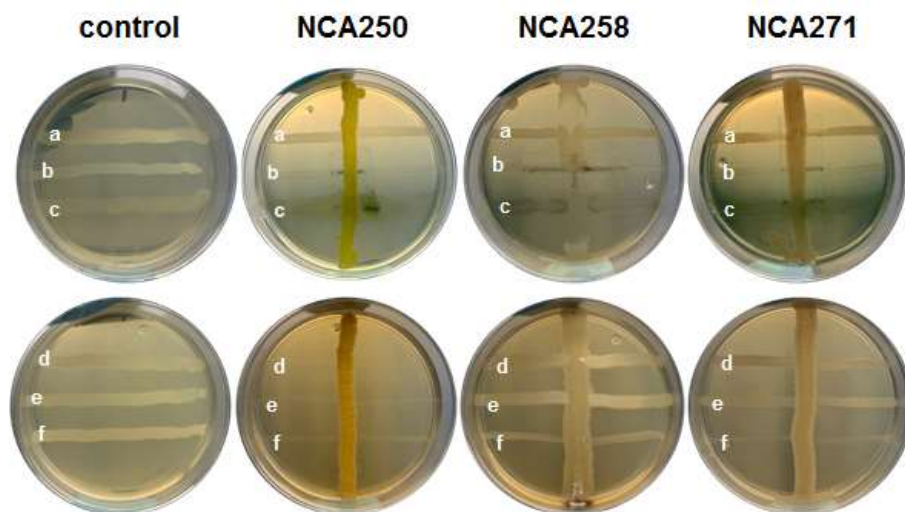


Tabla 33. Actividad antimicrobiana en el ensayo de estría cruzada.

Bacteria	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	
NCA250				++			
NCA251						++	
NCA253						+	
NCA255		+				++	
NCA258			±				
NCA259			±				
NCA260						+	
NCA266			++			+	
NCA269	+	++	+	+	+	++	
NCA271	+	++		+	+	++	
NCA274						+	
	+	Inhibición del crecimiento a la proximidad de la estría principal					
	++	Inhibición total del crecimiento					
	±	Interacción entre ambos organismos					

De acuerdo con las observaciones realizadas de este ensayo y las características morfológicas de los organismos, se seleccionaron algunas bacterias candidatas realizar los extractos correspondientes, las cuales se mencionan según los morfotipos observados: NCA250; NCA258 y NCA259; NCA260 y NCA274; NCA269 y NCA271.

A partir del estudio químico de los extractos provenientes del cultivo en medio sólido de arroz de la bacteria NCA250, se obtuvo cantidad adicional del producto actinomicina D (**20**), con la cual fue posible el registro del espectro de RMN ^1H (**Figura 82**) y su concordancia con lo descrito en la literatura especializada (**Tabla 34**).¹⁸⁴ Por otro lado, se obtuvieron los productos **21** y **22** provenientes del extracto de la bacteria NCA274.

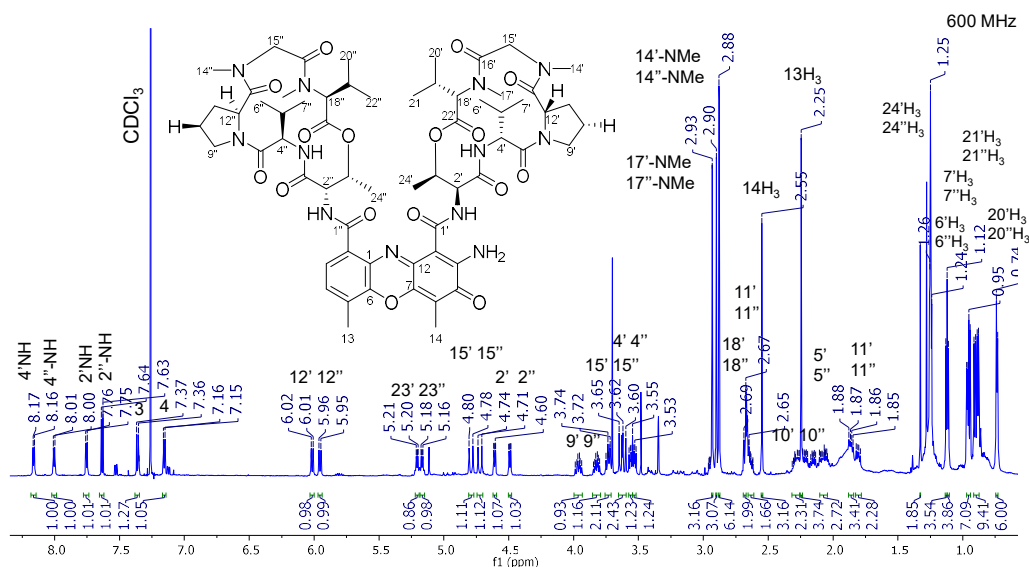


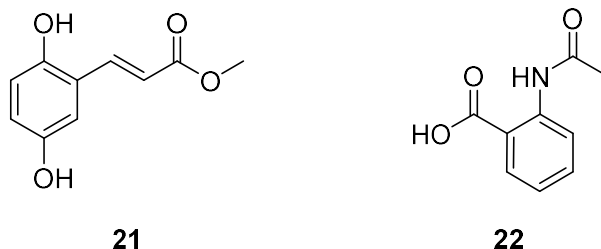
Figura 82. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del producto actinomicina D (**20**).

Tabla 34. Datos espectroscópicos del compuesto **20** (CDCl_3).

Posición	20 δ_{H} 600 MHz J(Hz)	Posición	20 δ_{H} 600 MHz J(Hz)
3	7.63, d (7.8)	4	7.36, d (8.1)
2'	4.49, dd (6.8, 2.7)	2''	4.61, dd (6.5, 2.5)
NH-2'	7.15, d (6.8)	NH-2''	7.75, d (6.5)
4'	3.53, dd (10.1, 6.1)	4''	3.56, dd (9.6, 6.4)
NH-4'	8.16, d (5.9)	NH-4''	8.00, d (6.3)
5'	2.22, td (10.1, 6.9)	5''	2.15, td (9.4, 6.8)
6'	1.13, d (6.1), 3H	6''	1.12, d (6.2), 3H
7'	0.95, d (6.2), 3H	7''	0.97, d (6.0), 3H
9'	3.73, m	9''	3.73, m
	3.96, td (11.2, 7.1)		3.82, td (11.3, 7.0)
10'	2.07, m; 2.28, m	10''	2.07, m; 2.28, m
11'	1.81, dd (11.7, 6.8)	11''	1.86, dd (12.0, 6.6)
	2.65, m		2.95, m
12'	6.02, d (9.2)	12''	5.95, d, (9.2)
13	2.55, s, 3H	14	2.25, s, 3H
14'	2.88, s, 3H	14''	2.88, s, 3H
15'	3.63, d (17.3)	15''	3.61, d (17.4)
	4.72, d (17.5)		4.79, d (17.5)
17'	2.93, s, 3H	17''	2.87, s, 3H
18'	2.68, d (9.4)	18''	2.68, d (9.4)
19'	2.63, m	19''	2.63, m
20'	0.74, d, (6.5), 3H	20''	0.74, d (6.5), 3H
21'	0.88, d, (6.8), 3H	21''	0.91, d (6.8), 3H
23'	5.21, dd (6.3, 2.6)	23''	5.17, dd (6.3, 2.5)
24'	1.24, d (6.0), 3H	24''	1.24, d (6.0), 3H

5.10 Caracterización de los productos **21** y **22**.

Los productos **21** y **22** fueron obtenidos a partir del extracto orgánico de la bacteria NCA274 sobre arroz húmedo.



La fórmula molecular del producto **21** fue calculada como $C_{10}H_{10}O_4$ (IDH=6, calculado para $C_{10}H_{11}O_4$, $\Delta=+1.1$ ppm) y se determinó por los iones observados en los espectros de masas de alta resolución, 195.0654 $[M+H]^+$ y 193.0499 $[M-H]^-$ en los modos positivo y negativo, respectivamente (**Figura 83**). El espectro de RMN 1H (**Figura 84**) mostró las señales de dos metinos vecinales con constantes de acoplamiento de tipo *trans* en δ_H 7.48 ($J=15.8$ Hz) y 6.33 ($J=15.8$ Hz). De manera adicional, se observaron señales de un anillo aromático trisustituido con constantes de acoplamiento de tipo *orto* en δ_H 6.79 ($J=8.2$ Hz); *orto* y *meta* en δ_H 7.02 ($J=8.2, 1.9$ Hz) y *meta* en δ_H 7.15 ($J=1.9$ Hz). Debido a la cantidad obtenida (0.6 mg) se dificultó la obtención de los experimentos de RMN ^{13}C y bidimensionales.

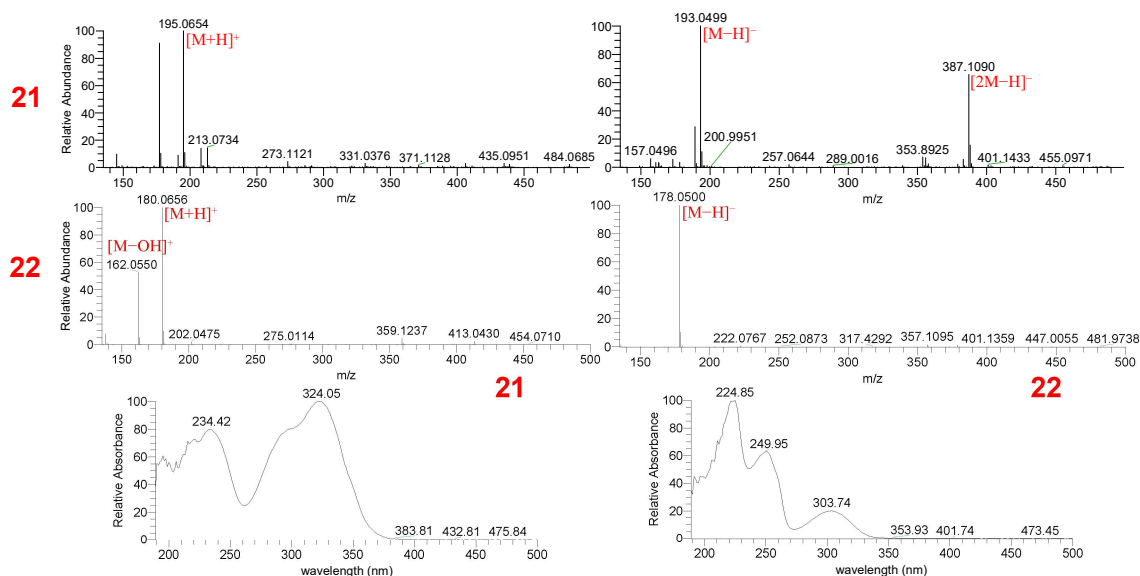


Figura 83. Espectros de HRESIMS y perfil de UV de los productos **21** y **22**.

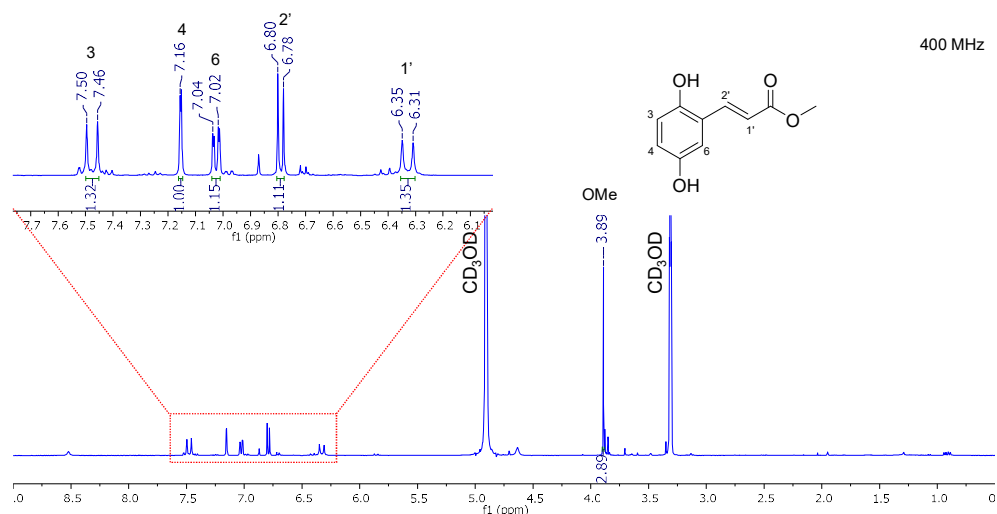


Figura 84. Espectro de RMN ^1H (MeOD- d_4 , 400 MHz) del producto 2,5-dihidroxicinamato de metilo (**21**).

Los desplazamientos químicos observados fueron congruentes con los descritos previamente para el 2,5-dihidroxicinamato de metilo (**21**), el cual es un producto natural aislado de diversas fuentes vegetales principalmente, debido a que deriva de la ruta biosintética del ácido siquímico.¹⁸⁵ Sin embargo, es necesario de más experimentos y el aislamiento de cantidad adicional de este compuesto para su caracterización inequívoca.

Consecutivamente para el producto **22**, se obtuvo la fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$ (IDH=6, calculado para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_3$, $\Delta=+0.4$ ppm) basada en los iones observados: 180.0656 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 178.0500 $[\text{M}-\text{H}]^-$ en los modos positivo y negativo, respectivamente (**Figura 83**). Como resultado del análisis del espectro de RMN ^1H (**Figura 85**), se encontraron evidencias de un grupo acetilo en δ_{H} 2.17 (s), así como de un sistema aromático trisustituido con constantes de acoplamiento de tipo *orto* en δ_{H} 8.46 (d, $J=7.8$ Hz), *orto* y *meta* en δ_{H} 8.04 (dd, $J=7.8, 1.6$ Hz), 7.37 (ddd, $J=8.4, 7.3, 1.6$) y 7.05 (td, $J=7.8, 1.1$).

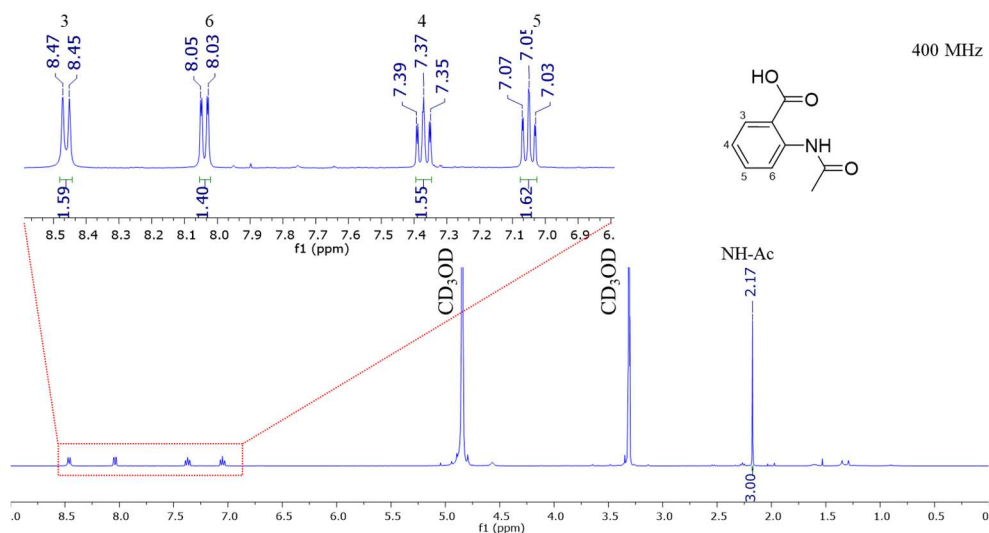


Figura 85. Espectro de RMN ¹H (MeOD-*d*₄, 400 MHz) del producto ácido *N*-acetil antranílico (**22**).

Con esta información fue posible la identificación de este compuesto como el ácido *N*-acetilantranílico (**22**), debido a la armonía de estas señales con las presentes en la literatura.¹⁸⁶ Las constantes espectroscópicas de ambos productos se resumen en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Datos espectroscópicos de los compuestos **21** y **22** (MeOD-*d*₄).

Posición	21	Posición	22
	δ_{H} 600 MHz J(Hz)		δ_{H} 400 MHz J(Hz)
1'	6.33, d (15.8)	3	8.46, d (7.8)
2'	7.48, d (15.8)	4	7.37, ddd (8.4, 7.3, 1.6)
3	7.15, d (1.8)	5	7.05, td (7.8, 1.1)
4	7.02, dd (8.2, 1.9)	6	8.04, dd (7.8, 1.6)
6	6.79, d (8.2)	NH-Ac	2.17, s, 3H
3'-OMe	3.89, s, 3H		

5.11 Ensayos de actividad antimicrobiana de los compuestos puros.

5.11.1 Actividad antimicrobiana frente bacterias ESKAPE.

Los compuestos puros (**1**, **3–5**, **7**, **9–17**, **19** y **20**) obtenidos durante este proyecto fueron evaluados *in vitro* empleando el método de microdilución en placas de 96 pozos, frente una batería de bacterias Gram(+) y Gram(-), enlistada en el **inciso 4.13.1** de la parte experimental. Los compuestos fueron evaluados a dos concentraciones (100 y 10 $\mu\text{g/mL}$) y como controles positivos, se empleó vancomicina para ambas cepas de *E. faecalis* y SARM, ampicilina para *S. aureus* ATCC 6538 y ATCC 25923 y gentamicina para las bacterias Gram(-). Se empleó MTT como agente revelador.

Los resultados de este ensayo se muestran en la **Tabla 36**. Cabe mencionar que se observó una inhibición del crecimiento mayor frente a organismos Gram(+), en especial de las cepas de *S. aureus* y SARM. No se observó actividad considerable frente a los organismos *Acinetobacter baumannii*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa*.

De los compuestos evaluados, resalta la actividad de los fenilespirodrimanos (**13–15**) contra las tres cepas de *S. aureus*, incluyendo SARM. El acetato de stachybotrólida (**13**) (CMI \leq 23 nM) fue el compuesto más activo entre ellos. En estudios previos, la stachybotrólida (**15**) exhibió potencial antibacteriano frente *S. aureus* y SARM, y se describió como un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa bacteriana con una potente afinidad de unión dosis dependiente (CMI 32 $\mu\text{g/mL}$).¹⁸⁷ Con lo antes mencionado, se encontró que el acetato de stachybotrólida (**13**), debido a sus características estructurales podría ser un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa más potente que el descrito en la literatura. De manera adicional, esta familia de compuestos ha mostrado distintas actividades en investigaciones previas: antiviral, antiinflamatoria, antiplasmódica, citotóxica y antimicrobiana.¹⁸⁸⁻

Por otra parte, el acetato de stachybotrólida (**13**) ha mostrado un efecto inhibitorio para el virus de influenza A (IC₅₀ 18.9 µM), mientras que el acetato de stachybotrydial (**14**) ha sido descrito como un inhibidor de la proteína cinasa 2 humana (CK2; IC₅₀ 0.69 µM).¹⁹³

El éter dimetílico del asterriquinol D (**9**) resultó inactivo frente *S. aureus* y *E. faecalis* en una investigación previa;¹⁷⁰ El ácido sidónico (**7**) había resultado inactivo frente SARM, *S. aureus*, *E. faecalis* y las bacterias Gram(-) *A. baumannii*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Esta información es congruente con la observada en esta evaluación.¹⁴⁷

Tabla 36. Resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos puros (% de inhibición del crecimiento).

Compuesto	GRAM (+)										GRAM (-)									
	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecalis</i> ERV ¹		<i>S. aureus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. aureus</i> SARM ¹		<i>A. baumannii</i>		<i>A. baumannii</i> ¹		<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603		<i>E. cloacae</i>			
	ATCC29212	ATCC51299	ATCC6538	ATCC25923	ATCC43300	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978	ATCC17978		
Concentración de prueba (mg/mL)	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10
1 17-desoxi-aspergilina PZ	0.0	0.0	0.0	0.0	25.4	32.1	11.8	30.3	27.7	37.5	12.2	16.3	0.0	0.0	0.0	0.0	28.1	0.0	28.1	0.0
2 aspergilina PZ	0.0	0.0	0.0	0.0	19.5	0.0	0.0	0.0	23.0	3.3	0.0	0.0	16.9	27.0	0.0	0.0	9.0	2.4	9.0	2.4
3 aspocalasina D	37.2	0.0	23.8	0.0	97.0	6.6	81.4	5.2	87.2	1.5	12.9	17.5	11.6	27.9	0.0	0.0	15.8	30.9	15.8	30.9
4 asperfenamato	0.0	0.0	0.0	0.0	48.7	27.4	10.4	0.0	62.9	19.9	8.4	8.2	22.2	19.2	0.0	0.0	22.5	3.6	22.5	3.6
5 2-O-metilbutirolactona II	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.0	0.0	14.0	0.0
7 ácido sidónico	0.0	0.0	0.0	0.0	26.8	48.7	0.0	27.7	34.0	47.7	18.7	13.3	0.0	0.0	27.6	0.0	11.9	17.1	11.9	17.1
9 éter dimetilico de asterriquinol D	0.0	0.0	0.0	0.0	67.3	29.9	50.9	21.9	62.3	26.8	0.0	1.3	20.1	1.7	53.8	19.8	48.2	5.4	48.2	5.4
10 O-metilmeleína	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.6	0.0	19.8	33.6	38.1	8.8	13.1	21.5	13.8	13.8	0.0	16.2	17.6	16.2	17.6
11 atranona A	13.0	0.0	0.0	0.0	23.9	25.7	0.0	0.0	20.8	30.8	7.2	9.6	40.5	2.7	45.5	0.0	6.0	7.5	6.0	7.5
12 atranona B	0.0	0.0	0.0	0.0	35.5	29.3	0.0	0.0	38.6	27.1	12.9	18.7	13.5	19.0	0.0	0.0	12.0	2.2	12.0	2.2
13 acetato de stachybotrólida	0.0	0.0	0.0	0.0	92.2	97.6	85.0	81.0	92.8	92.9	19.9	19.6	18.7	15.8	27.6	0.0	21.5	4.4	21.5	4.4
14 acetato de stachybotrydial	0.0	0.0	0.0	0.0	96.4	12.4	82.7	32.8	89.3	26.6	12.3	15.0	8.5	6.4	20.7	0.0	18.3	2.1	18.3	2.1
15 stachybotrólida	0.0	0.0	0.0	0.0	97.3	10.1	82.2	0.0	91.2	33.7	26.4	24.2	27.4	16.1	19.5	9.0	23.7	14.3	23.7	14.3
16 ácido penicílico	0.0	0.0	0.0	0.0	99.2	42.0	80.4	1.1	51.4	47.6	13.3	10.1	0.0	0.0	2.0	1.4	13.5	2.1	13.5	2.1
17 ácido 5,6-dihidropenicílico	38.3	0.0	0.0	0.0	11.2	38.8	0.0	5.6	0.0	39.3	11.0	11.9	27.7	25.2	8.8	0.0	11.0	11.9	11.0	11.9
19 N-benzoil-L-fenilalaninol	0.0	0.0	0.0	0.0	42.8	0.0	13.3	27.3	50.7	52.0	17.4	14.7	25.5	0.0	0.0	0.0	11.4	9.2	11.4	9.2
20 actinomicina D	68.3	48.1	67.8	79.9	99.3	99.5	96.2	97.1	96.4	95.1	89.4	17.3	12.6	0.0	33.5	14.6	37.4	6.1	37.4	6.1
Concentración mínima inhibitoria (CMI) µg/mL	3.75 ^a		25 ^a		100 ^b		200 ^b		2.5 ^a		1.25 ^c		700 ^c		9.38 ^a		0.50 ^c		0.50 ^c	

Controles positivos: ^aVancomicina; ^bAmpicilina; ^cGentamicina; ¹ Cepas multirresistentes a fármacos.

5.11.12 Actividad antimicrobiana frente *Mycobacterium* spp.

De manera adicional e independiente a la evaluación antimicrobiana descrita en el inciso anterior, se exploró el potencial anti-*Mycobacterium* en colaboración con grupo de investigación del Dr. Scott G. Franzblau del Institute for Tuberculosis Research de la University of Illinois Chicago, USA.

Los compuestos se probaron sobre cepas tuberculosas (*M. tuberculosis* H₃₇Rv) y no tuberculosas (*M. abscessus* ATCC19977, *M. chelonae* ATCC35752, *M. marinum* ATCC927, *M. avium* ATCC15769 y *M. kansasii* (ATCC12478), empleando el ensayo en microplaca azul de Alamar (MABA), para cepas replicantes de *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Los compuestos que exhibieron una inhibición mayor del 90% a la concentración de 50 µg/mL, posteriormente fueron sometidos un ensayo de baja recuperación de oxígeno (LORA), el cual representa las condiciones anaeróbicas del estado de la infección (no replicantes), así como su evaluación frente al resto de las cepas (empleando MABA). Finalmente, se determinó su potencial citotóxico frente la línea celular Vero (ATCC CCL-81). Los resultados de estas pruebas se muestran en las **Tablas 37 y 38**.

Tabla 37. Resultados de la evaluación anti-*M. tuberculosis* H₃₇Rv de los compuestos aislados.

Compuesto	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	
	MABA ^a	LORA ^b
<i>Aspergillus</i> sp. NCA276		
17-desoxi-aspergilina PZ (1)	19 (ND)	ND
aspocalasina D (3)	101 (39.5)	>50
asperfenamato (4)	101 (16.6)	>50
2-O-metilbutirolactona II (5)	83 (ND)	ND
N-benzoil-L-fenilalaninol (19)	20 (ND)	ND
<i>Aspergillus</i> sp. NCA264		
ácido sidónico (7)	30 (ND)	ND
diorcinol (8)	100 (47.9)	>50
<i>Aspergillus</i> sp. NCA257		
éter dimetilico de asterriquinol D (9)	13 (ND)	ND
<i>Stachybotrys</i> sp. NCA252		
O-Metilmeleína (10)	22 (ND)	ND
atranona A (11)	29 (ND)	ND
atranona B (12)	33 (ND)	ND
acetato de stachybotrólida (13)	99 (48.3)	>50
acetato de stachybotridial (14)	38 (ND)	ND
stachybotrólida (15)	103 (49.4)	>50
<i>Aspergillus</i> sp. NCA257 (cocultivo con <i>Aspergillus</i> sp. NCA276/<i>Cladosporium</i> sp. NCA273)		
ácido penicílico (16)	98 (49.5)	>50
ácido 5,6-dihidropenicílico (17)	42 (ND)	ND
3-isobutil-6-(1-hidroxi-2-metilpropil)-2(1H)-pirazinona (18)	23 (ND)	ND
Bacteria NCA250		
actinomicina D (20)	101 (5.4)	22.7
CMI rifampicina (µM)	0.03 ^a	0.08 ^a

^a % de inhibición a 50 µg/mL (CMI, concentración mínima inhibitoria en µM).
^b CMI en µM.
 ND, no determinado (solo se determinó para los productos que mostraron >90% de inhibición a 50 µg/mL vs *M. tuberculosis* H₃₇Rv en MABA.

Tabla 38. Resultados de la evaluación antimicobacteriana frente cepas no tuberculosas de los compuestos que mostraron >90% de inhibición a 50 µg/mL vs *M. tuberculosis* H₃₇Rv en MABA.

Compuesto	<i>M. abscessus</i> ATCC19977	<i>M. chelonae</i> ATCC35752	<i>M. marinum</i> ATCC927	<i>M. avium</i> ATCC15769	<i>M. kansasii</i> ATCC12478	Células Vero ^b
	MABA ^a					
<i>Aspergillus</i> sp. NCA276						
aspocalasina D (3)	>50 (0)	>50 (17)	>50 (31)	22.55	>50 (16)	37.5
asperfenamato (4)	>50 (0)	>50 (6)	>50 (22)	37.00	>50 (0)	>50
<i>Aspergillus</i> sp. NCA264						
diorcinol (8)	>50 (0)	>50 (12)	47.24	19.98	>50 (0)	39.9
<i>Stachybotrys</i> sp. NCA252						
acetato de stachybotrólida (13)	>50 (0)	>50(0)	23.15	11.63	>50(0)	38.2
stachybotrólida (15)	>50 (0)	>50 (0)	47.02	16.92	>50(0)	39.7
<i>Aspergillus</i> sp. NCA257 (co-cultivo con <i>Aspergillus</i> sp. NCA276/<i>Cladosporium</i> sp. NCA273)						
ácido penicílico (16)	>50 (0)	>50 (73)	>50 (58)	>50 (53)	>50(0)	35.4
Bacteria NCA250						
actinomicina D (20)	>50 (0)	>50 (34)	20.12	1.37	49.94	14.9
CMI rifampicina (µM)	>8	4.25	0.09	0.05	0.41	>100

^a CMI en µM (% de inhibición a 50 µM)
^b Concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de la línea celular (CI₅₀) en µM.

De los compuestos evaluados, sólo los compuestos **3, 4, 8, 13, 15, 16** y **20** mostraron una inhibición mayor al 90% frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv y de ellos, únicamente la actinomicina D (**20**) fue capaz de inhibir a *M. tuberculosis* bajo condiciones anaeróbicas. Nuevamente los fenilespirodrimanos (**13–15**) resultaron ser metabolitos bioactivos, se podría hablar de una especificidad estructural en cuanto a su actividad, debido a que el compuesto que presenta el dialdehído en lugar de la lactona que no presentó una inhibición considerable.

El compuesto 2-O-metilbutirolactona II (**5**) resultó inactivo de acuerdo los criterios de estas evaluaciones, en investigaciones previas, demostró su eficacia como agente antiincrustante de larvas de percebe, así como moderada actividad contra bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Vibrio*.¹²⁶

De los compuestos que resultaron activos: el diorcinol (**8**), a pesar de no evaluarse en este trabajo, previamente ha demostrado diversas bioactividades, como agente antituberculoso frente *Mycobacterium tuberculosis* cepa H₃₇Ra (CMI 50 µg/mL),¹⁶⁵ congruente con la observada. De manera adicional, existen descripciones de su actividad antimicrobiana moderada frente especies selectas de *Staphylococcus* y *Vibrio* (CMI: 20–40 µg/mL),¹⁹⁴ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (CMI: 17.4 µM)¹⁹⁵ y *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213, SARM y *E. coli* ATCC 25922 (CMI: 0.45, 0.45, 0.45 y 0.9 µg/mL, respectivamente);¹⁹⁶ antifúngica frente *Cryptococcus neoformans*,¹⁹⁴ el oomiceto *Saprolegnia parasitica* (CMI: 8 µg/disco),¹⁹⁷ y *Candida albicans* (CMI 22.8 µM).¹⁹⁸

El asperfenamato (**4**) había resultado inactivo frente *M. tuberculosis* en investigaciones previas, pero fue encontrado activo en esta evaluación.^{199,200} Anteriormente, había demostrado actividad selectiva frente *Staphylococcus epidermidis* (CMI 10 µM).¹⁴²

Finalmente, la aspocalasina D (**3**) había exhibido actividad antibacteriana moderada contra *S. aureus* y SARM en investigaciones anteriores (CMI 32 µg/mL),²⁰¹ su evaluación frente micobacterias es novedosa. De manera adicional, el compuesto **3** ha presentado diferentes actividades: citotóxica,²⁰² antimicrobiana frente *B. subtilis* (CMI 32 µg/mL),²⁰² *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *B. cereus* (CMI 10 µM en todos los casos)¹⁴² y antifúngica frente *C. neoformans* resistente a flucitosina (CMI 32 µg/mL).¹⁴⁰

El ácido penicílico (**17**) mostró actividad antibacteriana, la cual fue asociada a las propiedades intrínsecas del compuesto, previamente explicadas.¹⁸² De igual forma, la actinomicina D (**20**) es un metabolito con diversas actividades ampliamente estudiadas, de las cuales sobresalen la antibiótica y anticancerígena, cuyo mecanismo de acción principal consiste en inhibir la transcripción al unirse al ADN de doble cadena.²⁰³

6. CONCLUSIONES

- Las especies de hongos y bacterias provenientes de dos cenotes de la península de Yucatán resultaron ser buenas candidatas para la obtención de moléculas con actividad biológica. Su crecimiento en condiciones de laboratorio y la extracción de sus cultivos dio como resultado el aislamiento de 19 metabolitos fúngicos y 3 metabolitos a partir de bacterias.
- Se estableció la configuración absoluta del producto 17-desoxi-aspergilina PZ (**1**) mediante su análisis por cristalografía de rayos X.
- Se identificó por primera vez el producto O-metilmeleína (**10**) a partir de un hongo del género *Stachybotrys*.
- Los ensayos de interacción en caja de Petri entre las cepas estudiadas, permitieron establecer algunos fenómenos relacionados con su coexistencia en el ambiente de donde se aislaron. La obtención y el fraccionamiento de los extractos de los cocultivos de las especies *Aspergillus* sp. NCA257 y *Cladosporium* sp. NCA273, permitieron el aislamiento de los productos ácido 5,6-dihidropenicílico (**17**) y 3-isobutil-6-(1-hidroxi-2-metilpropil)-2(1H)-pirazinona (**18**), los cuales no habían sido detectados en el estudio de estos organismos en monocultivo.
- Se estableció la diversidad química que poseen los organismos estudiados mediante los análisis metabolómicos no dirigidos y por redes moleculares, demostrando así que son una fuente potencial de recursos químicos que pueden ser investigados con otros fines.
- Se realizó una contribución a la base de datos del GNPS mediante la anotación de los compuestos aislados que no se encontraban presentes en la base de datos.
- Se determinó el potencial antimicrobiano de los extractos obtenidos de las bacterianas provenientes de cenotes, encontrando una alta tasa de organismos que pueden ser objeto de estudios futuros.
- Se demostró el potencial antibacteriano de los fenilespirodrimanos (**13-15**), en especial el acetato de stachybotrólida (**13**), el cual tuvo una CMI de 23 nM contra las tres cepas de *S. aureus* ensayadas. Este hecho es muy relevante ya que estos productos pueden ser candidatos para el desarrollo de nuevos agentes contra cepas de SARM.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio químico del extracto NCA252b del hongo *Stachybotrys* sp., debido a que este organismo demostró poseer el potencial biosintético para producir distintas clases de compuestos.
- Explorar el posible mecanismo de acción anti-SARM del acetato de stachybotrólida (**13**) en ensayos *in vitro* específicos o mediante métodos computacionales de interacción blanco molecular-ligando.
- Realizar el estudio químico del organismo NCA256 *Arachniotus verruculosus*, debido a que sólo existen 9 metabolitos reportados como productos de este género y no hay una descripción en la literatura de esta especie.
- Analizar mediante redes moleculares los extractos obtenidos a partir de las cepas bacterianas, con la finalidad de establecer su diversidad metabólica y potencial para el aislamiento de compuestos novedosos.
- Aislar cantidad adicional del producto **21**, producido por la bacteria NCA274 para su caracterización estructural inequívoca.
- Realizar análisis de componentes principales y otros estudios que permitan establecer las correlaciones relaciones entre los distintos organismos y sus metabolitos.

REFERENCIAS

1. Baker, D., U. Mocek, C. Garr. Natural products vs. combinatorials: a case study, en: S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries*. 2000, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
2. Cragg, G. M., Newman, D. J. *Pure Appl. Chem.*, 2005, 77, 7-24.
3. Cragg, G. M., Newman, D. J. *Pharm. Biol.* (Abingdon, U. K.), 2001, 39, 8-17.
4. Fallarino, M. *Herbalgram*, 1994, 31, 38-4.
5. Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., Kim, E., Cho, H. J., Reynolds, J. M., Song, M. C., Park, S. R., Yoon, Y. J. *Front. Microbiol.*, 2019, 10, 1404.
6. Fleming A. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1929, 10: 226-236.
7. Sykes, R. *Bull. W. H. O.*, 2001, 79, 778-779.
8. Abraham, E. P., Chain, E., Fletcher, C. M., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Florey, H. *W. Curr. Opin. Microbiol.*, 2019, 51, 72-80.
9. Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2019, 51, 72-80.
10. Raistrick, H. *Proc. R. Soc.*, 1949, 199, 141-168.
11. Keller, M., Zengler, K. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, 2, 141-150.
12. Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G., Fenical, W. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 87, 43-48.
13. Waksman SA, Woodruff HB. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1940, 45, 609.
14. Waksman SA, Woodruff HB. *J Bacteriol*, 1942, 44, 373-384.
15. Schatz A, Waksman SA. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1944, 57, 244-248.
16. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, 80, 1-43.
17. Demain, A. L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 41, 185-201.
18. Peláez, F., *Biochem. Pharmacol.* 2006, 71, 981-990.
19. Cragg, G. M., Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2013, 1830, 3670-3695.
20. Butler, M. S., Buss, A. D. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 71, 919-929.
21. Pace, N. R. *Science (New York, N.Y.)*, 1997, 276, 734-740.
22. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Supuran, C. T. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2021, 20, 200-216.
23. Newman, D. J., Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.*, 2020, 83, 770-803.
24. Strobel, G., Daisy, B. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, 67, 491-502.
25. Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A. *ChemBioChem*, 2002, 3, 619-627.
26. Brakhage, A. A., Schroeckh, V. *Fungal Genet. Biol.*, 2011, 48, 15-22.
27. Zhu, F., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z., Ma, X., Jia, J., Tan, Y., Cui, C., Lin, J., Tan, C., Jiang, Y., Chen, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, 108, 12943-12948.
28. Zarins-Tutt, J. S., Barberi, T. T., Gao, H., Mearns-Spragg, A., Zhang, L., Newman, D. J., Goss, R. J. M. *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33, 54-72.
29. Hertweck, C. *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5, 450-452.
30. Brakhage, A.A., Schuemann, J., Bergmann, S., Scherlach, K., Schroeckh, V., Hertweck, C. Activation of fungal silent gene clusters: A new avenue to drug discovery. en: Petersen, F., Amstutz, R. (eds) *Natural Compounds as Drugs. Progress in Drug Research*, vol 66. 2008, Birkhäuser Basel.
31. Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A., Hertweck, C. *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3, 213-217.
32. Cichewicz, R. H. *Nat. Prod. Rep.*, 2010, 27, 11-22.
33. Nützmann, H.-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schümann, J., Hertweck, C., Strauss, J., Brakhage, A. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108, 14282-14287.
34. Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., Schroeckh, V., Brakhage, A. A. *Front. Microbiol.*, 2015, 6, 299.
35. Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Bujard, A., Azzollini, A., Monod, M., Gindro, K., Wolfender, J. L. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1292, 219-228.
36. Mueller, G. M. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*, 2011, Elsevier.
37. Knowles, S. L., Raja, H. A., Roberts, C. D., Oberlies, N. H. *Nat. Prod. Rep.*, 2022.
38. Shank, E. A., Kolter, R. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, 12, 205-214.
39. Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T. G., Lessard, P. A., Barbara, J. E., Rha, C., Sinskey, A. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 1126-1127.
40. Oh, D. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. *J. Nat. Prod.*, 2007, 70(4), 515-520.
41. Arora, D., Gupta, P., Jaglan, S., Roullier, C., Grovel, O., Bertrand, S. *Biotechnol. Adv.* 2020, 40, 107521.

42. Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., Valenzuela, R. *Rev. Mex. Biodivers.*, 2014, 85, 76-81.
43. Hawksworth, D.L. *Biodivers Conserv*, 2012, 21, 2425-2433.
44. Mueller, G.M., Schmit, J.P. *Biodivers Conserv*, 2007, 16, 1-5.
45. Hawksworth, D. L., Lücking, R. *Microbiol. Spectrum*, 2017, 5, 5-4.
46. Guzmán, G. N. *Biodivers Conserv*, 1998, 7, 369-384.
47. Dykhuizen D. *Proc. Calif. Acad. Sci.*, 2005, 56, 62–71.
48. Rodríguez-Salazar, J., Loza, A., Ornelas-Ocampo, K., Gutierrez-Rios, R. M., Pardo-López, L. *Front. Mar. Sci.*, 2021, 8, 625477.
49. Hautbergue, T., Jamin, E. L., Debrauwer, L., Puel, O., Oswald, I. P. *Nat. Prod. Rep.*, 2018, 35(2), 147-173.
50. Mata, R., Figueroa, M., Rivero-Cruz, I., Macías-Rubalcava, M. L. *Planta Med.*, 2018, 84, 594-605.
51. Barrera, A. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 1962, 23, 71–105.
52. Hernández-Bolio, G. I., Ruiz-Vargas, J. A., Pena-Rodríguez, L. M. *J. Nat. Prod.* 2019, 82, 647-656.
53. Pulido Salas, M. T., Peraza, S., del Socorro, L. E. *Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el Estado de Quintana Roo, México*, Chetumal. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. 1993.
54. Ankli, A., Sticher, O., Heinrich, M. *Econ. Bot.*, 1999, 53, 144-160.
55. Estrada-Medina, H., Canto-Canché, B. B., De los Santos-Briones, C., O'Connor-Sánchez, A. *Microbiol. Res.*, 2016, 188, 23–33.
56. Marfil-Santana, M. D., O'Connor-Sánchez, A., Ramírez-Prado, J. H., De los Santos-Briones, C., Lluvia, K., Rojas-Herrera, R., Lago-Lestón, A., Prieto-Davó, A. *J. Microbiol.*, 2016, 54, 774–781
57. Parera-Valadez, Y., Yam-Puc, A., López-Aguilar, L. K., Borges-Argáez, R., Figueroa-Saldivar, M. A., Cáceres-Farfán, M., Márquez-Velázquez, N. A., Prieto-Davó, A. *Microb. Ecol.*, 2019, 77, 839–851.
58. Perry, E., Velazquez-Oliman, G., Marin, L. *Int. Geol. Rev.*, 2002, 44, 191-221.
59. Bautista, F., Palma-López, D., Huchin-Malta, W. *Caracterización y manejo de los suelos de la Península de Yucatán: Implicaciones agropecuarias, forestales y ambientales*, 2005, 105-122.
60. Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B., Charvet, G., Marín, L. E., Rebolledo-Vieyra, M., Merediz-Alonso, G. *Hydrogeol. J.*, 2011, 19, 507-524.
61. Hildebrand, A. R., Pilkington, M., Connors, M., Ortiz-Aleman, C., Chavez, R. E. *Nature*, 1995, 376, 415-417.
62. Connors, M., Hildebrand, A. R., Pilkington, M., Ortiz-Aleman, C., Chavez, R. E., Urrutia-Fucugauchi, J., Graniel-Castro, E., Camara-Zi, A., Vasquez, J., Halpenny, J. F. *Geophys. J. Int.*, 1996, 127, F11-F14.
63. Beddows, P. A., Blanchon, P., Escobar, E., Torres-Talamante, O. *Arqueol. Mex.*, 2007, 16, 32-35.
64. Schmitter-Soto, J. J., Escobar-Briones, E., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Marín, L. E. Los cenotes de la península de Yucatán. En: De la Lanza-Espino, G. y JL García-Calderón (Comps.). *Lagos y Presas de México*. 2002, AGT. México, 337-381.
65. Cruz Sánchez, M., Mora Mora, J., Giron Garcia, M. P., Salcedo Luna, C. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química, UAM Azcapotzalco*, 2018, 4, 4
66. Pérez, L., Bugja, R., Lorenschat, J., Brenner, M., Curtis, J., Hoelzmann, P., Islebe, G., Scharf, B., Schwalb, A. *Hydrobiologia*, 2011, 661(1), 407-433.
67. Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L. E. Steinich, B. *Hydrobiologia*, 2002, 467, 215-228.
68. De la Rosa-García, S. C., Muñoz-García, A. A., Barahona-Pérez, L. F., Gamboa-Angulo, M. M. *Letf. Appl. Microbiol.*, 2007, 45, 289-294.
69. Gamboa-Angulo, M., De la Rosa, S. D. C., Heredia-Abarca, G., Medina-Baizabal, I. L. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2012, 6, 2305-2312.
70. Ruiz-Jiménez, A. L., González-Coloma, A., Andrés-Yeves, M. F., Ruiz-Sánchez, E., Heredia, G., Peraza-Sánchez, S. R., Medina-Baizabal, I. L., Reyes-Estebanez, M., Canto-Caché, B., Gamboa-Angulo, M., *Rev. Argent. Microbiol.*, 2017, 49, 83-92.
71. Ruiz-Jiménez, A. L., Ruiz-Sánchez, E., Heredia, G., Tapia-Tussell, R., González-Coloma, A., Peraza-Jiménez, K., Moo-Koh, F. A., Medina-Baizabal, I. L., Hernández-Romero, Y., Mena-Rejón, G. J., Quijano-Quifones, R. F., Gamboa-Angulo, *Microorganisms* 2019, 7,712.
72. Frisvad, J. C., Larsen, T. O. *Front. Microbiol.*, 2019, 6, 1485.
73. Vadlapudi, V., Borah, N., Yellusani, K. R., Gade, S., Reddy, P., Rajamanikyam, M., Vempati, L. N. S., Gubbala, S. P., Chopra, P., Upadhyayula, S. M., Amanchy, R., *Sci. Rep.*, 2017, 7, 1-10.
74. Schoch C. L., et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: [baaa062](https://doi.org/10.1093/database/baaa062). PubMed: 32761142 PMC: [PMC7408187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761142/).
75. Bentley, R., Bennett, J. W. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2008, 63, 1-32.
76. Goswami, S., Vidyarthi, A. S., Bhunia, B., Mandal, T. J. *Biochem. Technol.*, 2013, 4(1), 581-587.

77. Dictionary of Natural Products 30.1, Disponible en línea en <https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>
78. Frisvad, J. C., Larsen, T. O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, **99**, 7859-7877.
79. Zhao, W. Y., Yi, J., Chang, Y. B., Sun, C. P., Ma, X. C. *Phytochemistry*, 2022, **193**, 113011.
80. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. Dictionary of the Fungi. 2008, CABI, Wallingford, p 659
81. Wang, A., Xu, Y., Gao, Y., Huang, Q., Luo, X., An, H., Dong, J. *Phytochem. Rev.*, 2015, **14**, 623-655.
82. Harrach, B., Bata, A., Bajmocy, E., Benko, M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, **45**, 1419-1422.
83. Andersen, B., Nielsen, K. F., Thrane, U., Szaro, T., Taylor, J. W., Jarvis, B. B. *Mycologia*, 2003, **95**, 1227-1238.
84. Gutzwiller, J., & Tamm, C. *Helv. Chim. Acta*, 1965, **48**, 177-182.
85. Hinkley, S. F., Mazzola, E. P., Fettingner, J. C., Lam, Y. F., Jarvis, B. B., *Phytochemistry*, 2000, **55**, 663-673.
86. Zhang, Y., Tian, R., Liu, S., Chen, X., Liu, X., Che, Y. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 2627-2634.
87. Jagels, A., Hövelmann, Y., Zielinski, A., Esselen, M., Köhler, J., Hübner, F., Humpf, H. U. *Mycotoxin Res.*, 2018, **34**, 179-185.
88. De Silva, L. B., Herath, W. H. M. W., Gunawardena, D. S. S., Wijesundera, R. L. C., Medis, S. A., Choudhary, M. I., Clardy, J. *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 1997-2000.
89. Fujioka, T., Yao, K., Hamano, K., Hosoya, T., Kagasaki, T., Furukawa, Y., Haruyama, H., Sato, S., Koga, T., Tsujita, Y. *J. Antibiot.*, 1996, **49**, 409-413.
90. Jiang, M., Wu, Z., Liu, L., Chen, S. *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 1644-1704.
91. Sakai, K., Watanabe, K., Masuda, K., Tsuji, M., Hasumi, K., Endo, A. *J. Antibiot.*, 1995, **48**, 447-456.
92. Nozawa, Y., Ito, M., Sugawara, K., Hanada, K., Mizoue, K. *J. Antibiot.*, 1997, **50**(8), 641-645.
93. Kohyama, T., Hasumi, K., Hamanaka, A., Endo, A. *J. Antibiot.* 1997, **50**, 172-174.
94. Singh, S. B., Zink, D. L., Williams, M., Polishook, J. D., Sanchez, M., Silverman, K. C., Lingham, R. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 2071-2076.
95. Minagawa, K., Kouzuki, S., Yoshimoto, J. U. N., Kawamura, Y., Tani, H., Iwata, T., Terui, Y., Nakai, H., Yagi, S., Hattori, N., Fujiwara, T., Kamigauchi, T., *J. Antibiot.*, 2002, **55**, 155-164.
96. Minagawa, K., Kouzuki, S., Nomura, K., Kawamura, Y., Tani, H., Terui, Y., Nakai, H., Kamigauchi, T., *J. Antibiot.*, 2001, **54**, 896-903.
97. Founou, R. C., Founou, L. L., & Essack, S. Y. *PloS One*, 2017, **12**, e0189621.
98. Dadgostar, P. *Infect. Drug Resist.*, 2019, **12**, 3903.
99. D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Wright, G. D. *Nature*, 2011, **477**, 457-461.
100. Antimicrobial Resistance Collaborators. *Lancet*, 2022, **399**, 629-655.
101. Interagency coordination group on antimicrobial resistance (IACGs) 2019. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>
102. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., Pardesi, K. R. *Fron. Microbiol.*, 2019, **10**, 539.
103. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Zorzet, A. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, **18**, 318-327.
104. Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Camacho-Ortiz, A. *PLoS One*, 2019, **14**, e0209865.
105. Miranda, C., Silva, V., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., Poeta, P. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2020, **75**, 3413-3416.
106. Gardes, M., Bruns, T. D. *Mol. Ecol.*, 1993, **2**, 113-118.
107. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego, 1990, **18**, 315-322.
108. Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P. W., Robert, V., Verkley, G. J. M. *Stud. Mycol.*, 2019, **92**, 135-154.
109. Zuck, K. M., Shipley, S., Newman, D. J. *J. Nat. Prod.*, 2011, **74**, 1653-1657.
110. Wang, J. N., Zhang, H. J., Li, J. Q., Ding, W. J., Ma, Z. J. *J. Nat. Prod.*, 2018, **81**, 949-956.
111. Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E., Mata, R. *J. Food Sci.*, 2011, **76**, C309-C317
112. Lertcanawanichakul, M., Sawangnop, S. *Walailak J. Sci. & Tech.* 2008, **5**, 161-171.
113. Cho, S., Lee, H. S., Franzblau, S. en *Mycobacteria Protocols*; Parish, T., Roberts, D. M., Eds.; Springer: New York, 2015; 281– 292.

114. Nandikolla, A., Srinivasarao, S., Khetmalis, Y. M., Kumar, B. K., Murugesan, S., Shetye, G., Ma, R., Franzblau, S. G., Sekhar, K. V. G. C. *Toxicol. In Vitro* **2021**, *74*, 105137.
115. Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J. J. J., Ernst, M., Kang, K. B., Aceves, C. M., Caraballo-Rodríguez, A. M., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C., Sun, K., Tehan, R. M., Boya P., C. A., Christian, M. H., Gutiérrez, M., Moreno Ulloa, A., Tejeda, J. A., Mojica-Flores, R., Lakey-Beitia, J., Vázquez-Chaves, V., Zhang, Y., Calderón, A. I., Tayler, N., Keyzers, R. A., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A. A., Jarmusch, A. K., Schmid, R., Truman, A. W., Bandeira, N., Wang, M., Dorrestein, P. C. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 1954-1991.
116. Ernst, M., Kang, K. B., Caraballo-Rodríguez, A. M., Nothias, L. F., Wandy, J., Chen, C., Wang, M., Rogers, S., Medema, M. H., Dorrestein, P. C., Van Der Hooft, J. J. *Metabolites* **2019**, *9*, 144.
117. Mohimani, H., Gurevich, A., Shlemov, A., Mikheenko, A., Korobeynikov, A., Cao, L., Shcherbin, E., Nothias, L. F., Dorrestein, P. C., Pevzner, P. A. *Nat. Commun.*, **2018**, *9*, 4035
118. Sheldrick, G. M. *SHELXL-2018: Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 2018.
119. Rigaku Oxford Diffraction. *CrysAlisPro: Empirical absorption correction using spherical harmonics, implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm*; Agilent Technologies Ltd.: Yarnton, U.K., 2019.
120. Ding, X., Terui, Y., Chen, Y. *Chem. Res. Appl.* **2006**, *18*, 1026-1028.
121. Chen, L., Liu, Y. T., Song, B., Zhang, H. W., Ding, G., Liu, X. Z., Gu Y. C., Zou, Z. M. *Fitoterapia* **2014**, *96*, 115-122.
122. Zhang, Y., Wang, T., Pei, Y., Hua, H., Feng, B. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 693-695.
123. Keller-Schierlein, W., Kupfer, E. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 1501-1524.
124. Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H., Hayakawa, Y. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 379-381.
125. Garg, N., Zeng, Y., Edlund, A., Melnik, A. V., Sanchez, L. M., Mohimani, H., Gurevich, A., Miao, V., Schiffler, S., Lim, Y. W., Luzzatto-Knaan, T., Cai, S., Rohwer, Pevzner, P. A., Cichewicz, R. H., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C. *MSystems* **2016**, *1*, e00139-16.
126. Chen, M., Wang, K. L., Liu, M., She, Z. G., Wang, C. Y. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 1398-1406.
127. Lu, Z., Zhu, H., Fu, P., Wang, Y., Zhang, Z., Lin, H., Liu, P., Zhuang, Y., Hong, K. Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 911-914.
128. Li, X. B., Zhou, Y. H., Zhu, R. X., Chang, W. Q., Yuan, H. Q., Gao, W., Zhang, L. L., Zhao, Z. T., Lou, H. X. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 575-592.
129. Takenaka, Y., Tanahashi, T., Nagakura, N., Hamada, N. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 794-797.
130. Lacey, H. J., Vuong, D., Pitt, J. I., Lacey, E., Piggott, A. M. *Austr. J. Chem.* **2015**, *69*, 152-160.
131. Whyte, A. C., Joshi, B. K., Gloer, J. B., Wicklow, D. T., Dowd, P. F. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1006-1009.
132. Glauser, G., Gindro, K., Fringeli, J., De Joffrey, J. P., Rudaz, S., Wolfender, J. L. *J. Agr. Food Chem.* **2009**, *57*, 1127-1134.
133. Hinkley, S. F., Jiang, J., Mazzola, E. P., Jarvis, B. B. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2725-2728.
134. Ayer, W. A., Miao, S. *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 487-493.
135. Kamalov, L. S., Aripova, S. F., Isaev, M. I. *Chem. Nat. Compd.* **1998**, *34*, 616-619.
136. Jagels, A., Lindemann, V., Ulrich, S., Gottschalk, C., Cramer, B., Hübner, F., Gareis, M., Humpf, H. U. *Toxins* **2019**, *11*, 133.
137. Olivon, F., Allard, P. M., Koval, A., Righi, D., Genta-Jouve, G., Neyts, J., Apel, C., Pannecouque, C., Nothias, L. F., Cachet, X., Marcourt, L., Roussi, F., Katanaev, V. L., Touboul, D., Wolfender, J. L., Litaudon, M. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2644-2651.
138. Wu, Z., Zhang, X., Al Anbari, W. H., Zhang, M., Chen, X., Luo, Z., Li, X. N., Chen, C., Liu, J., Wang, J., Zhu, H., Zhang, Y. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 5483-5491.
139. Wei, G., Tan, D., Chen, C., Tong, Q., Li, X. N., Huang, J., Liu, J., Xue, Y., Wang, J., Luo, Z., Zhu, H., Zhang, Y. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-12.
140. Choochuay, J., Xu, X., Rukachaisirikul, V., Guedduaythong, P., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J., Chen, J., Shen, X. *Phytochem. Lett.* **2017**, *22*, 122-127.
141. Gebhardt, K., Schimana, J., Hoeltzel, A., Dettner, K., Draeger, S., Beil, W., Rheinheimer, J., Fiedler, H. P. *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 707-714.
142. Zheng, C. J., Shao, C. L., Wu, L. Y., Chen, M., Wang, K. L., Zhao, D. L., Sun, X. P., Chen, G. Y., Wang, C. Y. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2054-2068.
143. Lin, Z., Zhu, T., Wei, H., Zhang, G., Wang, H., Gu, Q. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, *2009*, 3045-3051.
144. Wu, S. J., Chan, Y. Y. *Molecules* **2014**, *19*, 15521-15534.
145. Li, W., Fan, A., Wang, L., Zhang, P., Liu, Z., An, Z., Yin, W. B. *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, 2589-2594.
146. Pang, X., Zhao, J. Y., Fang, X. M., Zhang, T., Zhang, D. W., Liu, H. Y., Su, J., Cen, S., Yu, L. Y., *J. Nat. Prod.*, **2017**, *80*, 2595-2601.
147. Liu, N., Peng, S., Yang, J., Cong, Z., Lin, X., Liao, S., Yang, B., Zhou, X., Zhou, X., Liu, Y., Wang, J. **2019**, *135*, 27-32.

148. Guo, Z. Y., Tan, M. H., Liu, C. X., Lv, M. M., Deng, Z. S., Cao, F., Zou, K., Proksch, P. *Molecules*, 2018, 23, 1291.
149. Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., Frisvad, J. C., *Stud. Mycol.*, 2020, 95, 5-169.
150. Li, X. D., Li, X. M., Xu, G. M., Zhang, P., Wang, B. G. *J. Nat. Prod.*, 2015, 78, 844-849.
151. Bunbamrung, N., Intaraudom, C., Supothina, S., Komwijit, S., Pittayakhajonwut, P. *Phytochem. Lett.*, 2015, 12, 142-147.
152. Riga, R., Happyana, N., Holisotan Hakim, E. *Nat. Prod. Res.*, 2020, 34, 2229-2231.
153. Niu, S., Peng, G., Xia, J. M., Xie, C. L., Li, Z., Yang, X. W. *Chem. Biodivers.*, 2019, 16, e1900519.
154. Hosoe, T., Gloer, J. B., Wicklow, D. T., Raja, H. A., Shearer, C. A. *Heterocycles*, 2010, 81, 2123-2129.
155. El-Kashef, D. H., Youssef, F. S., Reimche, I., Teusch, N., Müller, W. E., Lin, W., Frank, M., Liu, Z., Proksch, P. *Bioorgan. Med. Chem.*, 2021, 29, 115883.
156. Sanchez, J. F., Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Ahuja, M., Oakley, C. E., Bok, J. W., Keller, N., Oakley, B. R., Wang, C. C. *Mol. Biosyst.*, 2010, 6, 587-593.
157. Ebrahim, W., El-Neketi, M., Lewald, L. I., Orfali, R. S., Lin, W., Rehberg, N., Kalscheuer, R., Daletos, G., Proksch, P. *J. Nat. Prod.*, 2016, 79, 914-922.
158. Tawfike, A. F., Romli, M., Clements, C., Abbott, G., Young, L., Schumacher, M., Diederich, M., Farag, M., Edrada-Ebel, R. *J. Chromatogr. B*, 2019, 1106, 71-83.
159. Zhuravleva, O. I., Afiyatullo, S. S., Vishchuk, O. S., Denisenko, V. A., Slinkina, N. N., Smetanina, O. F. *Arch. Pharm. Res.*, 2012, 35, 1757-1762.
160. Guo, Y. W., Gong, B. Q., Yuan, J., Li, H. J., Mahmud, T., Huang, Y., Li, J. F., Yang, D. P., Lan, W. J. *J. Nat. Prod.*, 2019, 83, 79-87.
161. Wu, X., Chen, Z., Ding, W., Liu, Y., Ma, Z. *Nat. Prod. Res.*, 2018, 32, 1562-1566.
162. Cimmino, A., Maddau, L., Masi, M., Evidente, M., Linaldeddu, B. T., Evidente, A. *Tetrahedron* 2016, 72, 6788-6793.
163. Elnaggar, M. S., Ebada, S. S., Ashour, M. L., Ebrahim, W., Müller, W. E., Mándi, A., Kurtán, T., Singab, A., Lin, W., Liu, Z., Proksch, P. *Tetrahedron*, 2016, 72, 2411-2419.
164. Yurchenko, A. N., Smetanina, O. F., Kalinovskiy, A. I., Pushilin, M. A., Glazunov, V. P., Khudyakova, Y. V., Kirichuk, N. N., Ermakova, S. P., Dyshlovoy, S. A., Yurchenko, E. A., Afiyatullo, S. S. *J. Nat. Prod.*, 2014, 77, 1321-1328.
165. Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Intereya, K., Kocharin, K. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55, 304-307.
166. Tian, Y. Q., Lin, X. P., Liu, J., Kaliyaperumal, K., Ai, W., Ju, Z. R., Yang, B., Wang, J., Yang, X. W., Liu, Y. *Nat. Prod. Res.*, 2015, 29, 820-826.
167. Yao, Q., Wang, J., Zhang, X., Nong, X., Xu, X., Qi, S. *Mar. Drugs*, 2014, 12, 5902-5915.
168. Jia, L. C. *Zhongcaoyao*, 2022, 5681-5686.
169. Pitt, J. I., Lacey, H. J., Lacey, E. *Persoonia*, 2020, 44, 358-359.
170. Buttachon, S., Ramos, A. A., Inácio, Â., Dethoup, T., Gales, L., Lee, M., Costa, P. M., Silva, A. M. S., Sekeroglu, N., Rocha, E., Pinto, M. M. M., Pereira, J. A., Kijjoa, A. *Mar. Drugs*, 2018, 16, 119.
171. Jarvis, B. B. *Phytochemistry*, 2003, 64, 53-60.
172. Ballantine, J. A., Ferrito, V., Hassall, C. H. *Phytochemistry*, 1971, 10, 1309-1313.
173. Li, C., Matsuda, Y., Gao, H., Hu, D., Yao, X. S., Abe, I. *ChemBioChem*, 2016, 17, 904-907.
174. Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., Kariman, K. *Biol. Control*, 2018, 117, 147-157.
175. Kobayashi, H., Namikoshi, M., Yoshimoto, T., Yokochi, T. *J. Antibiot.*, 1996, 49, 873-879.
176. Nonaka, K., Chiba, T., Suga, T., Asami, Y., Iwatsuki, M., Masuma, R., Ōmura, S., Shiomi, K. *J. Antibiot.*, 2015, 68, 530-532.
177. Kimura, Y., Nakahara, S., Fujioka, S. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 1996, 60, 1375-1376.
178. Li, H. J., Cai, Y. T., Chen, Y. Y., Lam, C. K., Lan, W. J. *Chem. Res. Chin. Univ.*, 2010, 26, 415-419.
179. Ohnishi, K., Tanabe, H., Hayashi, S., Suemitsu, R. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 1992, 56, 42-43.
180. Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E., Totzke, F., Zirrgiebel, U., Schächtele C., Kubbutat, M. H. G., Lin, W. H., Mosaddak, M., Hakiki, A., Proksch, P., Ebel, R. *J. Nat. Prod.*, 2009, 72, 626-631.
181. Wang, W., Gong, J., Liu, X., Dai, C., Wang, Y., Li, X. N., Wang, J., Luo, Z., Zhou, Y., Xue, Y., Zhu, H., Chen, C., Zhang, Y. *J. Nat. Prod.*, 2018, 81, 1578-1587.
182. Frisvad, J. C. *World Mycotoxin J.*, 2018, 11, 73-100.
183. Barber, M., Bell, D., Morris, M., Tetler, L., Woods, M., Bycroft, B. W., Monaghan W. E., Morden, B. N., Green, B. N. *Talanta*, 1988, 35, 605-611.
184. Zhang, X., Ye, X., Chai, W., Lian, X. Y., Zhang, Z. *Mar. Drugs*, 2016, 14, 181.
185. Shabbir, M., Sultani, S. Z., Jabbar, A., Choudhary, M. I. Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*. *Phytochemistry*, 1997, 44, 683-685.
186. Tian, S., Yang, Y., Liu, K., Xiong, Z., Xu, L., Zhao, L. *Nat. Prod. Res.*, 2014, 28, 344-346.

187. Kwon, Y. J., Sohn, M. J., Kim, H. J., Kim, W. G. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014, 37, 1406-1410.
188. Yang, B., Long, J., Pang, X., Lin, X., Liao, S., Wang, J., Liu, Y. *J. Antibiot.*, 2021, 74, 190-198.
189. Zhang, P., Li, Y., Jia, C., Lang, J., Niaz, S. I., Li, J., Yuan, J., Yu, J., Chen, S., Liu, L. *RSC Adv.*, 2017, 7, 49910-49916.
190. Wu, Z. H., Li, Y., Li, Y., Ma, M., Chen, J. L. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2018, 20, 985-991.
191. Sawadjoon, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Kirtikara, K., Madla, S., Thebtaranonth, Y. *Planta Med.*, 2004, 70, 1085-1087.
192. Zhao, J., Feng, J., Tan, Z., Liu, J., Zhao, J., Chen, R., Xie, K., Zhang, D., Li, Y., Yu, L., Chen, X., Dai, J. *J. Nat. Prod.*, 2017, 80, 1819-1826.
193. Haidar, S., Jürgens, F. M., Aichele, D., Jagels, A., Humpf, H. U., Jose, J. *Molecules*, 2021, 26, 4453.
194. Liu, S., Wang, H., Su, M., Hwang, G. J., Hong, J., Jung, J. H. *Nat. Prod. Res.*, 2017, 31, 1682-1686.
195. Liu, W., Wang, L., Wang, B., Xu, Y., Zhu, G., Lan, M., Zhu, W., Sun, K. *Mar. drugs*, 2019, 17, 6
196. Li, J. X., Lei, X. X., Tan, Y. H., Liu, Y. H., Yang, B., Li, Y. Q. *Nat. Prod. Res.*, 2020, 1-8.
197. Takahashi, K., Sakai, K., Fukasawa, W., Nagano, Y., Sakaguchi, S. O., Lima, A. O., Pellizari, V. H., Iwatsuki, M., Takishita, K., Yoshida, T., Nonaka, K., Fujikura, K., Ōmura, S. *J. Antibiot.*, 2018, 71, 741-744.
198. Zhang, D., Yi, W., Ge, H., Zhang, Z., Wu, B. *Nat. Prod. Res.*, 2019, 1-6.
199. Macabeo, A. P. G., Tudla, F. A., Krohn, K., Franzblau, S. G. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2012, 5, 777-780.
200. Umeokoli, B. O., Onyegbule, F. A., Okoye, F. B., Wang, H., Kalscheuer, R., Müller, W. E., Hartmann, R., Liu, Z., Proksch, P. *Fitoterapia*, 2017, 122, 16-19.
201. Ratnaweera, P. B., Williams, D. E., de Silva, E. D., Andersen, R. J. *Curr. Sci. India*, 2016, 1473-1479.
202. Si, Y., Tang, M., Lin, S., Chen, G., Feng, Q., Wang, Y., Pei, Y. *Tetrahedron Lett.*, 2018, 59, 1767-1771.
203. Yoo, H., Rill, R. L. *J. Mol. Recognit.*, 2001, 14, 145-150.
204. Fajardo-Hernández, C. A., Khan, F. S. T., Flores-Bocanegra, L., Prieto-Davó, A., Wan, B., Ma, R., Qader, M., Villanueva-Silva, R., Martínez-Cárdenas, A., López-Lobato, M. A., Hematian, S., Franzblau, S. G., Raja, H. A., García-Contreras, R., Figueroa, M. Insights into the Chemical Diversity of Selected Fungi from the Tza Itzá Cenote of the Yucatan Peninsula. *ACS Omega*, 2022, 7, 12171-12185.

ANEXOS

- I. Artículo derivado de este trabajo de investigación
- II. Resumen y cartel presentado en el congreso virtual *Vanguards of Natural Product Research 2021*, ASP.

Insights into the Chemical Diversity of Selected Fungi from the Tza Itzá Cenote of the Yucatan Peninsula

Carlos A. Fajardo-Hernández, Firoz Shah Tuglak Khan, Laura Flores-Bocanegra, Alejandra Prieto-Davó, Baojie Wan, Rui Ma, Mallique Qader, Rodrigo Villanueva-Silva, Anahí Martínez-Cárdenas, Marian A. López-Lobato, Shabnam Hematian, Scott G. Franzblau, Huzefa A. Raja, Rodolfo García-Contreras, and Mario Figueroa*



Cite This: *ACS Omega* 2022, 7, 12171–12185



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

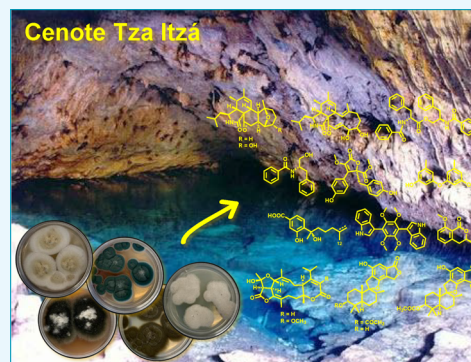


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Cenotes are habitats with unique physical, chemical, and biological features. Unexplored microorganisms from these sinkholes represent a potential source of bioactive molecules. Thus, a series of cultivable fungi (*Aspergillus* spp. NCA257, NCA264, and NCA276, *Stachybotrys* sp. NCA252, and *Cladosporium* sp. NCA273) isolated from the cenote Tza Itzá were subjected to chemical, coculture, and metabolomic analyses. Nineteen compounds were obtained and tested for their antimicrobial potential against ESKAPE pathogens, *Mycobacterium tuberculosis*, and nontuberculous mycobacteria. In particular, phenylspirodrimanones from *Stachybotrys* sp. NCA252 showed significant activity against MRSA, MSSA, and mycobacterial strains. On the other hand, the absolute configuration of the new compound 17-deoxy-aspergillin PZ (**1**) isolated from *Aspergillus* sp. NCA276 was established via single-crystal X-ray crystallography. Also, the chemical analysis of the cocultures between *Aspergillus* and *Cladosporium* strains revealed the production of metabolites that were not present or were barely detected in the monocultures. Finally, molecular networking analysis of the LC-MS-MS/MS data for each fungus was used as a tool for the annotation of additional compounds, increasing the chemical knowledge on the corresponding fungal strains. Overall, this is the first systematic chemical study on fungi isolated from a sinkhole in Mexico.



INTRODUCTION

One of the most famous geological features in the Yucatan peninsula is the ring of cenotes (from the Maya word *ts'otot*), which is a group of sinkholes formed by the process of karstification.¹ The origin of cenotes is related to the impact of the Chicxulub asteroid around 66 millions of years ago, which caused changes in the karst features.^{2,3} These habitats are physically and chemically unique due to the phototrophic activity of its microbial communities. In particular, the carbon and sulfur cycles completed by different microbes affect the sulfate reduction into aqueous sulfide, accelerating the limestone dissolution, and increasing alkalinity.^{4,5} In addition, most of the cenotes have hydraulic connections or networks across the region, and the microbial communities, especially freshwater fungi and bacteria, play a key role in keeping the balance of the entire ecosystem.⁶

Metagenomic analysis of soil samples from freshwater environments in the Yucatan peninsula revealed a remarkable microbial diversity, where fungi (ascomycetes) prevail over bacteria (actinobacteria) in terms of biomass production and enzymatic substrate degradation.⁷ Furthermore, the biosynthetic potential of these communities of microbes was assessed using bioinformatics tools coupled with direct amplification of environmental DNA.^{8–10} The number of studies demonstrat-

ing the potential of microorganisms from cenotes for the discovery of bioactive natural products is scarce. Such studies have focused on the biological activity of extracts, exhibiting a high percentage of hits (~81%). About half of the extracts showed varied activities, including insecticidal and nematotoxic.^{11–13} To date, the only formal chemical study reported from a fungal strain isolated from plant litter submerged in a sinkhole in Merida, Yucatan, led to the discovery of the novel hexahydroacremointriol. This compound showed moderate insecticidal activity against phytophagous *Myzus persicae*, and *Rhopalosiphum padi*.¹⁴

The number of microorganisms from this region seems to be underexplored. The Yucatan peninsula thus remains an invaluable source of biological diversity for bioprospecting purposes.^{15,16} In this study, the chemical diversity and antimicrobial properties of a series of cultivable fungi isolated

Received: January 26, 2022

Accepted: March 14, 2022

Published: March 28, 2022





Figure 1. Location of cenote Tza Itzá ($20^{\circ}43'50.27''$ N, $89^{\circ}27'56.82''$ W) in the Yucatan peninsula.

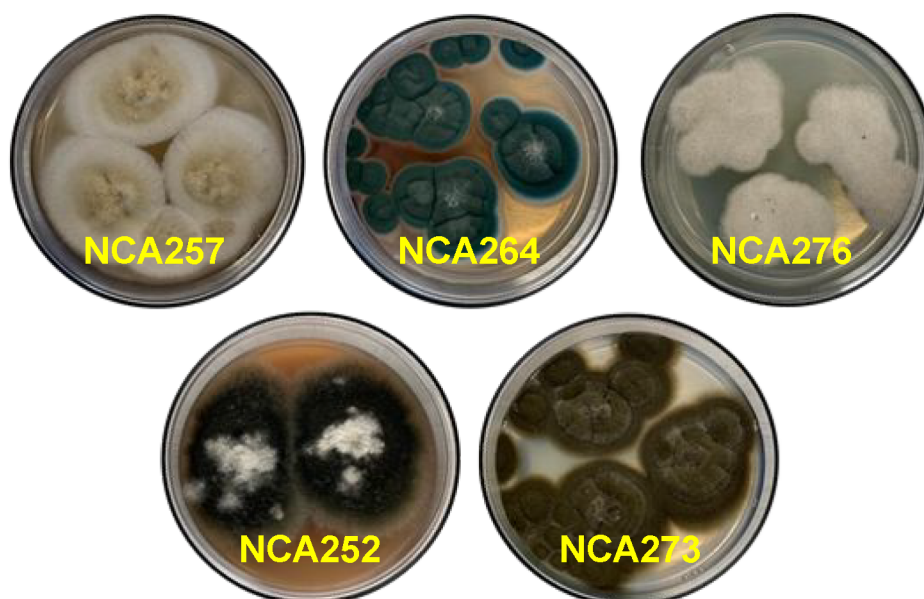


Figure 2. Fungal isolates from cenote Tza Itzá on PDA medium: *Aspergillus* spp. NCA257, NCA264, and NCA276; *Stachybotrys* sp. NCA252; and *Cladosporium* sp. NCA273.

from the Tza Itzá cenote were explored by combining conventional chemical studies, cocultures analysis, and metabolomics (Figure 1). The isolation of several compounds from single-strain cultures demonstrated their potential to produce interesting chemistry. In addition, the analysis of cocultures led to the identification of compounds that were not present, or were barely detected, in the monocultures. Moreover, molecular networking (MN) analysis of the liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) data of each fungus, allowed the annotation of additional compounds beyond to the isolated. Finally, several

isolated compounds showed significant antibacterial activity against ESKAPE pathogens, *Mycobacterium tuberculosis*, and nontuberculous mycobacterias.

RESULTS AND DISCUSSION

Fungal Strains Isolation and Identification. Five culturable fungal strains were isolated from sediments samples collected in the cenote Tza Itzá. The taxonomic identity of the strains was determined by molecular sequencing of the ITS rDNA, followed by BLAST search and maximum likelihood analysis.^{17,18} The strains were identified as *Aspergillus*

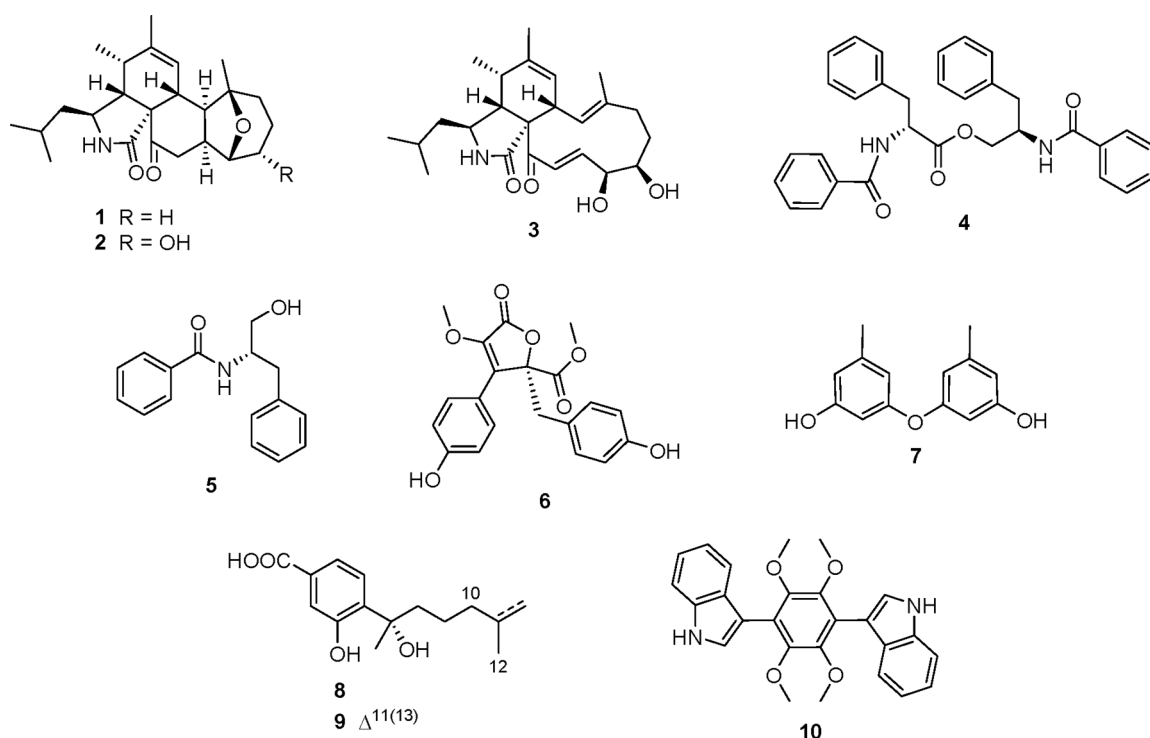


Figure 3. Isolated compounds from *Aspergillus* spp. NCA257, NCA264, and NCA276.

(NCA257, NCA264, and NCA276), *Stachybotrys* (NCA252), and *Cladosporium* (NCA273) (Figure 2 and Table S1, Supporting Information). Next, and as part of a program to explore the chemical diversity and antimicrobial potential of fungal species isolated from unexplored areas of Mexico, isolated strains were subjected to chemical, biological, and metabolomic analyses.

Chemical Study and Molecular Networking Analysis of *Aspergillus* spp. The chemical study of the defatted extracts from moist rice cultures of the *Aspergillus* spp. yielded a new compound, 17-deoxy-aspergillin PZ (1),¹⁹ and the known aspergillin PZ (2),²⁰ aspochalasin D (3),²¹ asperphenamate (4),²² *N*-benzoyl-*L*-phenylalaninol (5),²³ and 2-*O*-methylbutyrolactone II (6)²⁴ from strain NCA276; diorcinol (7),²⁵ sydonic acid (8),²⁶ and 11-dehydroxy sydonic acid (9)²⁷ from NCA264; and asterriquinol D dimethyl ether (10)²⁸ from NCA257 (Figure 3). All known compounds were elucidated by comparison with reported spectroscopic data (Supporting Information). Compound 1 was originally isolated from a jar fermentation of a presumably *Aspergillus* species, and its planar structure was established by NMR analysis.¹⁹ However, its absolute configuration had not been determined before. Suitable colorless crystals (Figure S1, Supporting Information) of 1 were obtained for X-ray structural determination and its absolute configuration was established as 3*S*,3*a**R*,4*S*,6*a*-*S*,8*a**S*,9*R*,13*S*,13*a**R*,13*b**R*-1 (Figure 4).

Next, the organic extracts of these strains were analyzed by ultrahigh-performance liquid chromatography tandem high-resolution electrospray mass spectrometry (UPLC-HRESIMS-MS/MS). Then, metabolomic analyses were performed using an in-house dereplication procedure^{29,30} and the Global Natural Products Social (GNPS) platform to perform feature-based molecular networking (FBMN) and spectral library search.^{31–33} The strain NCA276 showed the largest and most chemically diverse MN. Its metabolite features were

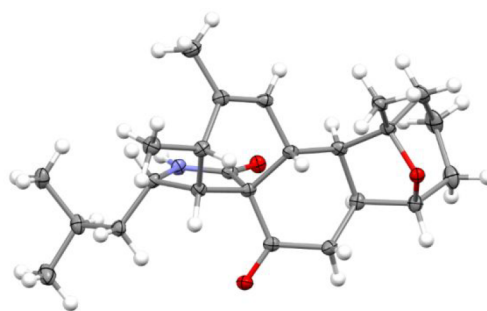


Figure 4. Displacement ellipsoid plot (50% probability level) of 1 at 100(2) K.

grouped into 800 nodes arranged in 22 clusters or chemical families with >3 nodes per cluster, 29 with two nodes, and 506 singletons (Figure 5). Chemical ontology analysis by the MolNetEnhancer GNPS tool classified the molecular features in six classes of compounds (Figure 5). Detailed analysis of the aspochalasins (cytochalasins) cluster allowed to manually annotate the isolated compounds 1–3 using their HRMS-MS/MS data along with a series of related compounds (aspochalasins I and K, and flavichalasin N)^{34,35} annotated by GNPS (Figure 5 and Table 1). In the phenylalanine and derivatives cluster, 4 and its precursor 5 were annotated (Figure 5). Lastly, emeriphenolicin F³⁶ and erythrokyrin³⁷ were found by GNPS in the glutamic and derivatives and furofurans nodes (Figure 5). For strain NCA264, FBMN analysis grouped the molecular features (591 nodes) into 9 classes of compounds clustered in 29 chemical families with >3 nodes per cluster, 29 with two nodes, and 542 singletons (Figure 6). The biggest family in the network belongs to the sesquiterpenoids, where 8, 9, and its derivative (*S*)-10-hydroxysydonic acid³⁸ were annotated (Figure 6). In addition, 7 was successfully annotated by GNPS in the phenyl-

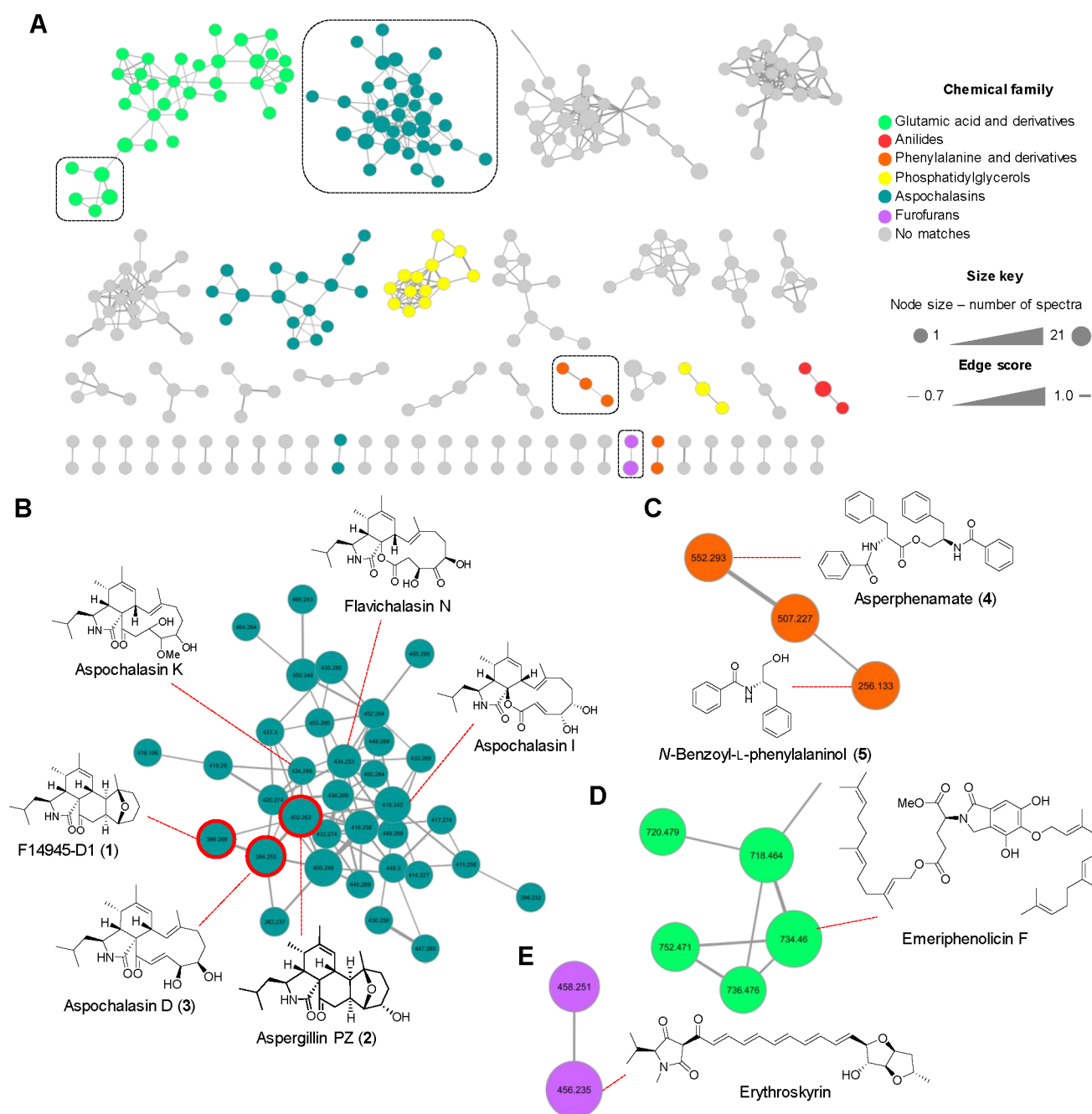


Figure 5. Metabolomic analysis of *Aspergillus* sp. NCA276. (A) FBMN (>2 nodes per cluster) and (B–E) selected clusters with nodes showing the compounds manually annotated (red circles) and by GNPS library search. Singletons (no molecular relatives) are not shown in the network.

propanoids and polyketides family (Table 1). Finally, MN of strain NCA257 showed 154 nodes grouped in 11 clusters with >3 nodes per cluster, 3 with two nodes, and 99 singletons. Interestingly, FBMN analysis did not show any structural families, but the annotation of 10 was possible using its HRMS-MS/MS data (Figure 7 and Table 1).

Chemical Study and Molecular Networking Analysis of *Stachybotrys* sp. NCA252 and *Cladosporium* sp. NCA273. From the organic extract of *Stachybotrys* sp. NCA252 culture, the isocoumarin, *O*-methylmellein (11),³⁹ the dolabellane-type diterpenoids, atranones A and B (12 and 13),⁴⁰ and the phenylspirodrimanones, stachybotrolide acetate (14), stachybotryol acetate (15), and stachybotryolide (16),^{41,42} were isolated (Figure 8 and Supporting Informa-

tion). Compounds 12 and 13 are commonly observed in the chemotype A of *Stachybotrys* spp., and no compounds from chemotype S (e.g., macrocyclic trichothecenes such as satratoxins and roridins) were detected in the NCA252 strain.^{43,44} In addition, the interconversion of 15 into lactone 14 was observed by NMR⁴⁵ (Figure S44). Finally, this is the first report of the isolation of 11 in a fungus of the *Stachybotrys* genera.

GNPS analysis of this strain grouped the metabolite features into 325 nodes arranged in 12 clusters with >3 nodes per cluster, 17 with two nodes, and 103 singletons. Chemical ontology analysis showed the presence of seven classes of compounds (Figure 9). Detailed analysis of the benzofurans and phtalides nodes allowed the manual annotation of 14 and

Table 1. Chemical Annotation of Metabolites from *Aspergillus* spp

compound	observed ion (m/z) ^d	adduct	molecular formula	exact mass (m/z) ^e	mass accuracy (ppm)
<i>Aspergillus</i> sp. NCA276					
17-deoxyaspergillin PZ (1) ^{a,b}	386.268	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₆ NO ₃	386.2682	-2.0
aspergillin PZ (2) ^{a,b}	402.263	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₆ NO ₄	402.2630	-2.2
aspochalasin D (3) ^{a,b}	384.253	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₄ NO ₃	384.2523	-2.7
asperphenamate (4) ^{a,c}	507.228	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₃₁ N ₂ O ₄	507.2279	+0.1
<i>N</i> -benzoyl-L-phenylalaninol (5) ^{a,c}	256.133	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ NO ₂	256.1328	+1.6
aspochalasin I ^c	416.240	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₄ NO ₅	416.2437	+1.3
aspochalasin K ^c	434.289	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₀ NO ₅	434.2906	+1.2
flavichalasin N ^c	434.253	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₀ NO ₅	434.2906	+1.2
emeriphenolicin F ^c	734.459	[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₆₄ NO ₈	734.4632	+0.8
erythrokyrin ^c	456.235	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₄ NO ₆	456.2386	+1.2
<i>Aspergillus</i> sp. NCA264					
diorcinol (7) ^{a,c}	229.086	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₃ O ₃	229.0863	-3.1
sydonic acid (8) ^{a,c}	265.144	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₁ O ₄	265.1442	-1.3
11-dehydrosydonic acid (9) ^{a,c}	263.129	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	263.1286	-1.1
(<i>S</i>)-10-hydroxysydonic acid ^c	281.139	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₁ O ₅	281.1389	-1.9
<i>Aspergillus</i> sp. NCA257					
Asterriquinol D dimethyl ether (10) ^{a,b}	429.180	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₅ N ₂ O ₄	429.1800	-2.1

^aIsolated compound. ^bManual annotation. ^cGNPS annotation. ^dValues from GNPS. ^eValues from UPLC-HRESIMS-MS/MS analysis.

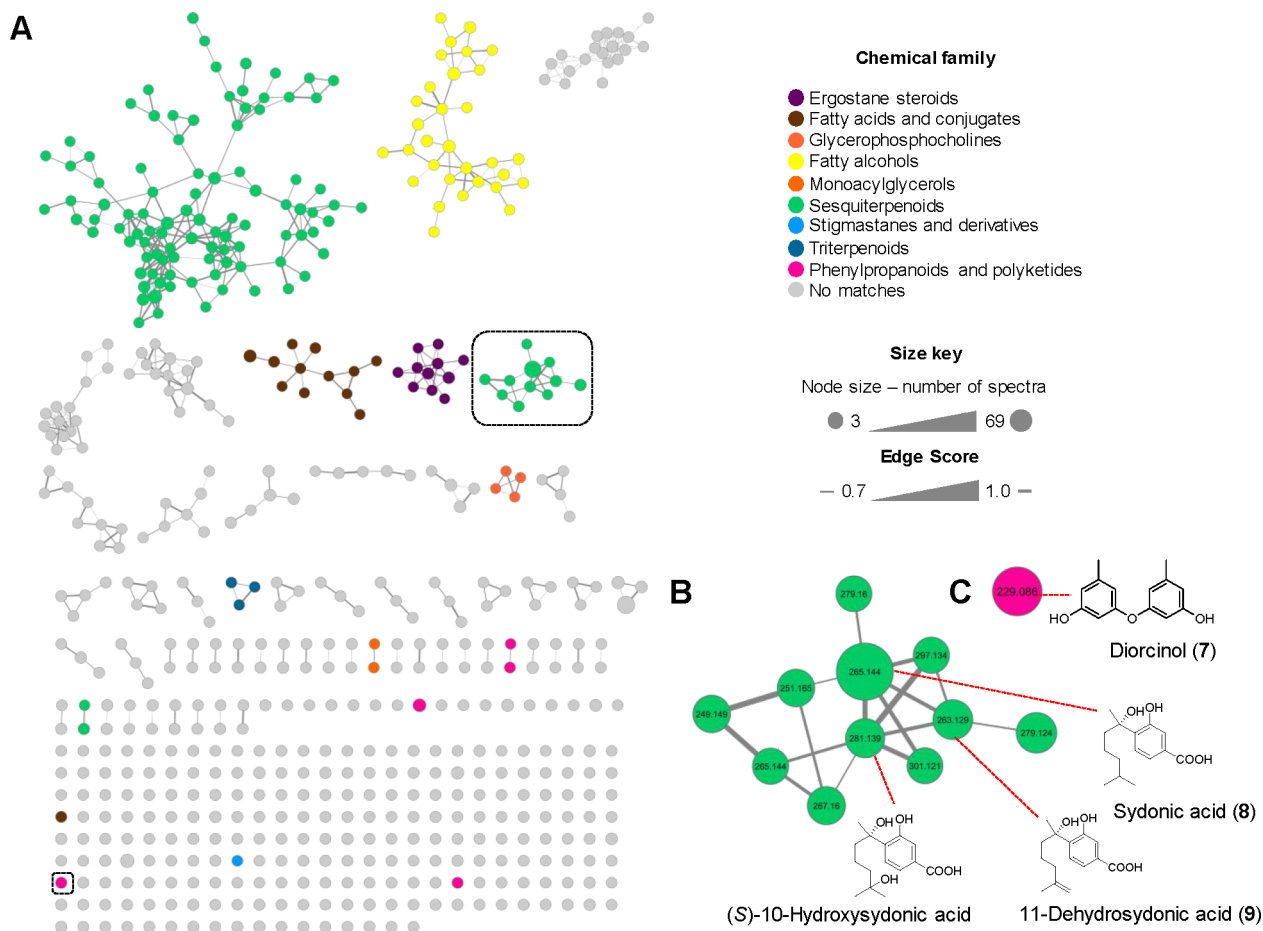


Figure 6. Metabolomic analysis of *Aspergillus* sp. NCA264. (A) FBMN and (B,C) selected clusters with nodes showing the compounds annotated by GNPS library search.

16, and by GNPS the annotation of a series of related phenylpydrodrimanes, including 15, asperugin,⁴⁶ and stachy-bysbin A⁴⁷ (Figure 9 and Table 2).

The chemical study of the culture of *Cladosporium* sp. NCA273 did not yield any pure compound due to the scarcity

of the organic extract obtained from the solid culture (poor growth in this medium). In addition, the MN analysis of this strain grouped the metabolite features into 77 nodes arranged in 6 clusters with >3 nodes per cluster, 8 with two nodes, and 63 singletons. No matches were found using the in-house

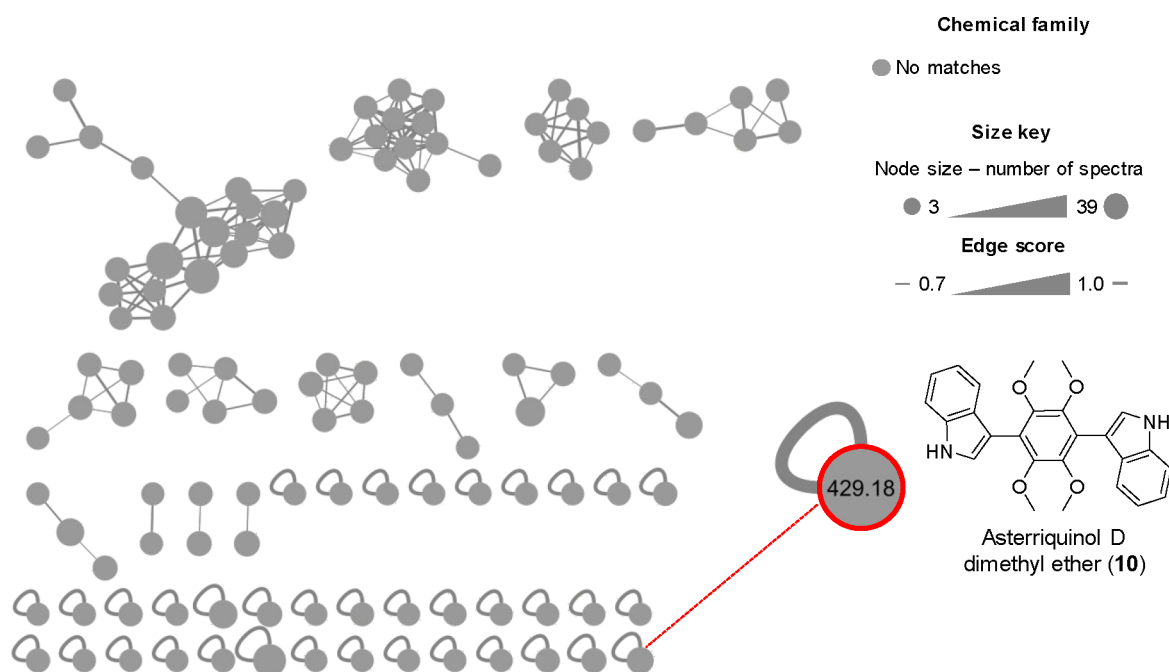


Figure 7. Metabolomic analysis of *Aspergillus* sp. NCA257 and selected node showing manually annotated 9 (red circle).

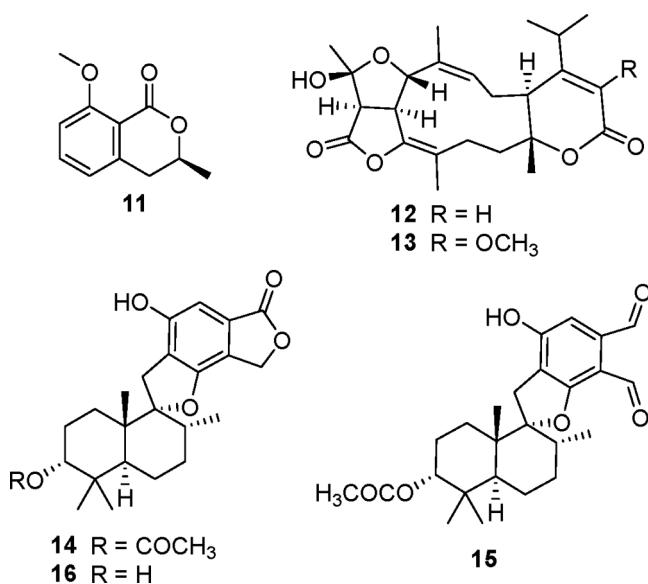


Figure 8. Isolated compounds from *Stachybotrys* sp. NCA252.

dereplication procedure nor the spectral library search in the GNPS, and only two chemical families (O-glycosyl compounds and glycerophosphocholines) were observed by FBMN (Figure S45).

***Aspergillus* spp. NCA257 and NCA276 and *Cladosporium* sp. NCA273 Coculture Analysis.** During the isolation process of the fungal strains from the cenote sediment samples, a series of antagonistic interactions between *Aspergillus* spp. NCA257 and NCA276 and *Cladosporium* sp. NCA273 were observed (Figure 10). It is known that coculture fermentation can trigger the expression of silent biosynthetic gene clusters to produce new secondary metabolites, increase the amounts of others, or in some cases inhibit the production of some compounds.^{48–50} This strategy was thus employed to analyze

the chemical variation of these strains when cocultivated in solid media (Supporting Information).

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the organic extract of the coculture of *Aspergillus* sp. NCA257 and *Cladosporium* sp. NCA273 revealed the presence of penicillic acid (17),⁵¹ 5,6-dihydropenicillic acid (18),⁵² and 3-isobutyl-6-(1-hydroxy-2-methylpropyl)-pyrazin-2(1H)-one (19)⁵³ (Figure 11). Compound 17 was not isolated from the monoculture of *Aspergillus* sp. NCA257 due to its low abundance. However, the induction of 17–19 by coculture allowed its isolation and structural elucidation (Supporting Information). Interestingly, 17 abundance (AUC by HPLC analysis) was 250% times higher in the coculture compared to the monoculture of *Aspergillus* sp. NCA257, whereas 10 was totally suppressed. On the other hand, the analysis of the *Aspergillus* spp. NCA257 and NCA276 coculture revealed similar results than those of NCA257 and NCA273 coculture, that is, 17–19 were induced in the coculture, and the aspochalasins 1 and 3 were suppressed (Figure 12).

The MN analysis by GNPS of the cocultures of NCA257/NCA273 and NCA257/NCA276, and the single-cultures of all three strains consisted of 1380 nodes, which were grouped into 114 clusters with >2 nodes per cluster (Figure S46). Interestingly, the MN showed a major contribution from strain NCA257 (*Aspergillus* sp.) in the clusters of the chemical features (Figure S46). This agrees with the HPLC profiles (Figures 11 and 12), where the production of the penicillic acids 17 and 18, and the pyrazinone 19 suppresses the biosynthesis of the main metabolites from the other strains.⁵⁴ Finally, aspochalasin J, aspochalasinol A, and alterporriol B were annotated by GNPS in MN (Figure S46 and Table S4, Supporting Information).

Biological Activity of Pure Compounds. The antibacterial activity of the isolated compounds was assessed against a panel of ESKAPE pathogens using the microdilution assay^{55,56} at 100 $\mu\text{g/mL}$ or 10 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3). From these, the aspochalasin 3, the amino acid ester 4, the bis-indolyl

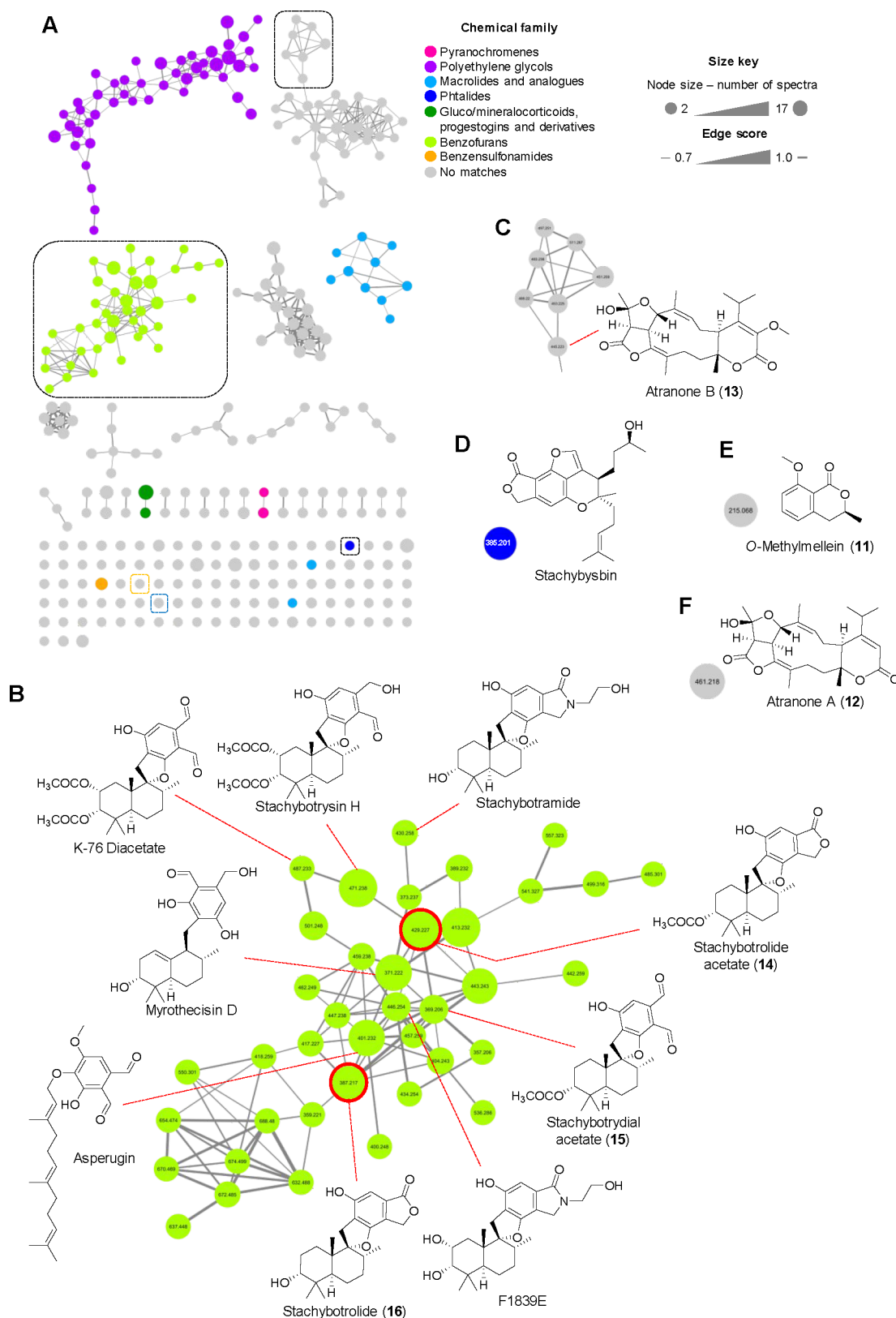


Figure 9. Metabolomic analysis of *Stachybotrys* sp. NCA252. (A) FBMN and (B–F) selected clusters with nodes showing the compounds manually annotated (red circles) and by GNPS library search.

benzenoid 10, and the phenylspirodrimanes 14–16 showed high activity (>50% inhibition) against MSSA and MRSA strains with 14 as the most potent metabolite (>81% inhibition at test concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). None of the tested

compounds were active against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, and the multidrug-resistant *A. baumannii* clinical strain A564.⁵⁷

Table 2. Chemical Annotation of Metabolites from *Stachybotrys* sp. NCA252

compound	observed ion (m/z) ^d	adduct	molecular formula	exact mass (m/z) ^e	mass accuracy (ppm)
O-methylmellein (11) ^{a,b}	215.068	[M+Na] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Na	215.0675	+1.7
atranone A (12) ^{a,b}	461.218	[M+HCOO] ⁻	C ₂₅ H ₃₃ O ₈	461.2182	+0.2
atranone B (13) ^{a,b}	445.223	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₃ O ₇	445.2226	-1.3
stachybotrolide acetate (14) ^{a,b}	429.227	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ O ₆	429.2272	+0.1
stachybotrydial acetate (15) ^a	369.206	[M-AcO+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₉ O ₄	369.2061	+0.2
stachybotrolide (16) ^{a,b}	387.217	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₁ O ₅	387.2160	-1.6
stachybotramide ^c	430.258	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₆ NO ₅	430.2593	+1.2
K-76 diacetate ^c	487.233	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₅ O ₈	487.2332	+1.1
stachybotrysin H ^c	471.238	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₅ O ₇	471.2383	+1.2
myrothecisin D ^c	371.222	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₁ O ₄	371.2222	+1.4
F1839E ^c	446.254	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₆ NO ₆	446.2542	+1.1
asperugin ^c	401.232	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₃ O ₅	401.2328	+1.4
stachybybin A ^c	385.201	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₉ O ₅	385.2015	+1.4

^aIsolated compound. ^bManually annotation. ^cGNPS annotation. ^dValues from GNPS. ^eValues from UPLC-HRESIMS-MS/MS analysis.

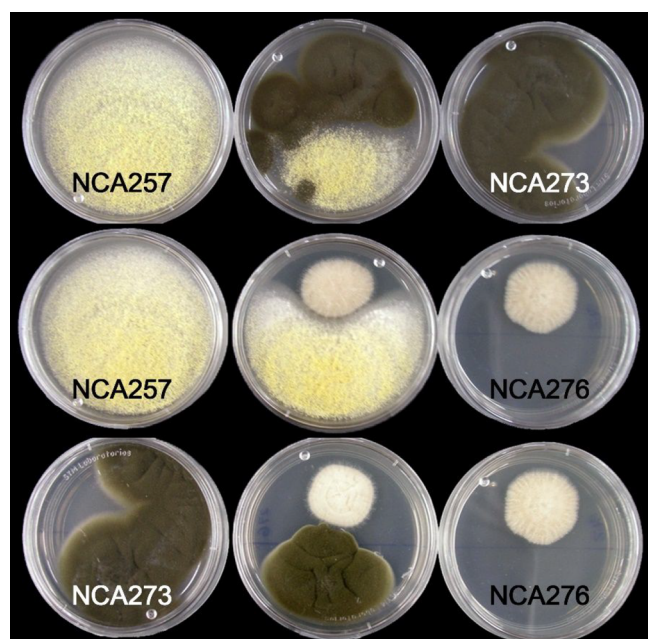


Figure 10. Fungal interaction between *Aspergillus* spp. NCA257 and NCA276 and *Cladosporium* sp. NCA273 in PDA plates.

Finally, 7, 9, and 19 were not tested due to the scarcity of the isolated material.

In addition, the anti-mycobacteria activity of the isolated compounds was assessed using the microplate Alamar blue (MABA) and low oxygen recovery (LORA) assays^{58,59} against tuberculous (TB) and nontuberculous mycobacterias (NTM), respectively, and a cytotoxicity assay against Vero cell line (ATCC CCL-81)⁶⁰ (Table 4). Compounds 3, 4, 7, 14, 16, and 17 showed >98% growth inhibition of TB at 50 μ g/mL and CC₅₀ values >35 μ M against Vero cells. Moreover, 3, 4, 7, 14, and 16, displayed anti-*M. avium* activity with MIC values of 22.6, 37.0, 20.0, 11.6, and 17.0 μ M, respectively, and 7, 14, and 16 against *M. marinum* with MIC values of 47.2, 23.1, and 47.0 μ M, respectively. Compounds 2 and 9 were not tested in these assays due to the paucity of the isolated material.

CONCLUSIONS

In summary, this work represents the first contribution to the chemical diversity and biology of fungi from sediments in a

cenote of the Yucatan peninsula. Strains *Aspergillus* (NCA257, NCA264, and NCA276), *Stachybotrys* (NCA252), and *Cladosporium* (NCA273) were isolated from sediments' samples collected in the cenote Tza Itzá and taxonomically identified by molecular sequencing of the ITS rDNA. From this, several isolated compounds showed significant activity against MSSA, MRSA, other ESKAPE pathogens and mycobacterial strains and could be further studied for the development of potential drug leads. The absolute configuration of new 17-deoxy-aspergillin PZ (1) was established via single-crystal X-ray crystallography. Finally, cocultures and metabolomics analysis revealed that communication between the strains is needed to produce metabolites that were not present in the monocultures. Overall, this work uncovers the chemical and biological potential of understudied fungal strains to produce biosynthetic bioactive natural products.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations, and UV data were measured using a Rudolph Research Autopol III polarimeter (Rudolph Research Analytical), and a Varian Cary 100 Bio UV-vis spectrophotometer (Varian Inc.), respectively. NMR experiments were conducted in CDCl₃ or methanol-*d*₄, using a JEOL ECA-600 spectrometer (JEOL Ltd.), a Varian VNMRS 400 (Varian Inc.), or a Bruker Avance III 400 MHz (Bruker BioSpin Corp.). HRESIMS data were acquired using a Q Exactive Plus system (Thermo Fisher Scientific), equipped with an electrospray ionization source with an HCD cell. Data were collected in both positive and negative modes via direct injection or through an Acquity UPLC system (Waters Corp.) using a BEH C₁₈ column (50 \times 2.1 mm i.d., 1.7 μ m; Waters Corp.) with a gradient solvent system from 15:85 to 100:0 CH₃CN-0.1% aqueous formic acid for 10 min at a flow rate of 0.3 mL/min. Analytical and preparative HPLC were carried out on a Waters HPLC system equipped with a 2535 quaternary pump, a 2707 autosampler, and 2998 PDA and 2424 ELSD detectors, using Gemini C₁₈ and Kinetex C₁₈ columns (5 μ m, 110 Å, 250 \times 4.6 mm i.d. and 5 μ m, 110 Å, 250 \times 21.2 mm i.d.; Phenomenex) for analytical and preparative runs, respectively. Data acquisition and management were performed with the Empower 3 software (Waters Corp.). Flash chromatography was conducted on a CombiFlash Rf+ Lumen system (Teledyne Technologies Inc.) equipped with PDA and ELSD detectors using RediSep Rf Gold Si-gel columns (Teledyne Technologies Inc.). Reagent-

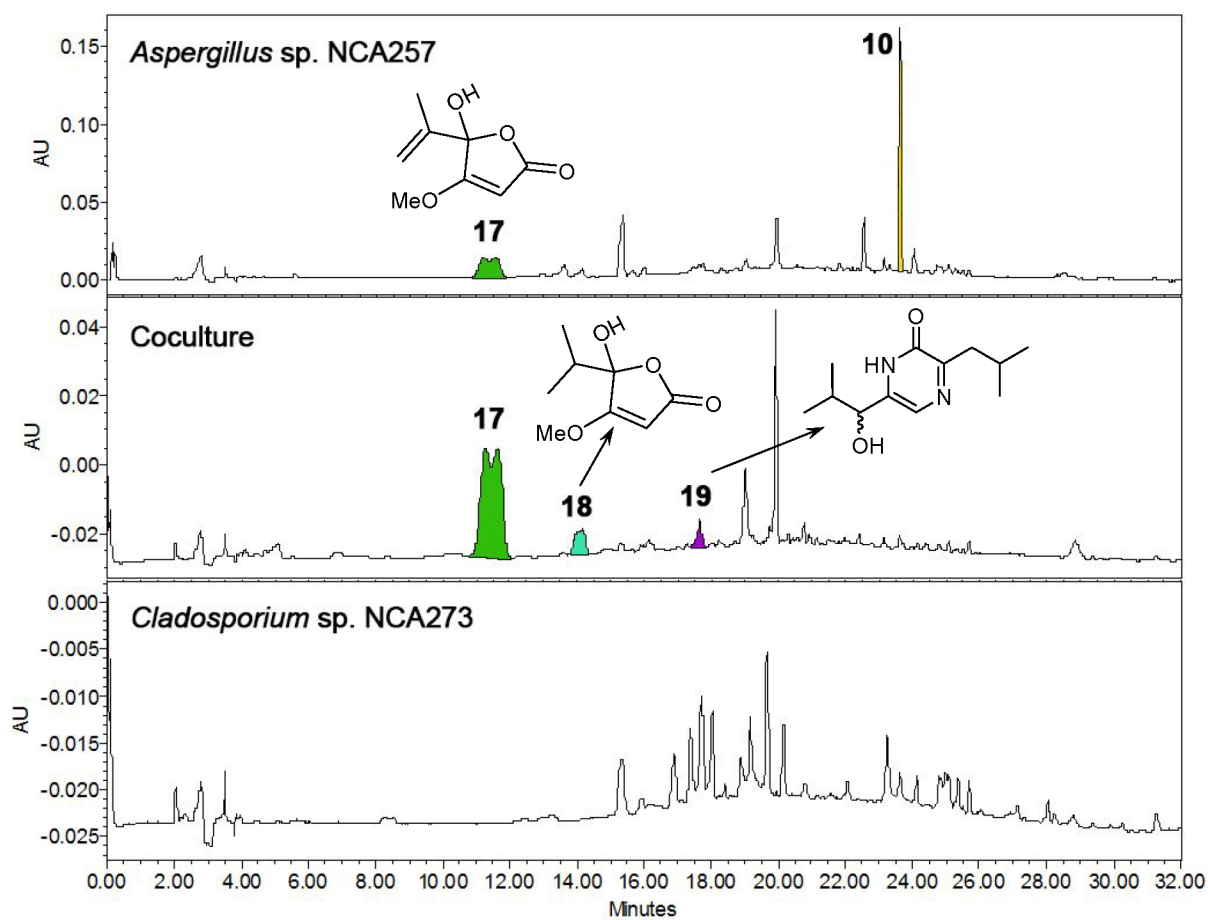


Figure 11. HPLC traces (PDA UV $\lambda = 254$ nm) of monoculture extracts of *Aspergillus* sp. NCA257 and *Cladosporium* sp. NCA273 and the coculture extract.

grade chloroform, *n*-hexane, and methanol, and HPLC- and MS-grade acetonitrile, methanol, and water were purchased from J.T. Baker (Avantor Performance Materials). Deuterated NMR solvents were acquired from Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Fungal Strains Isolation and Identification. The fungi of interest were isolated from sediment samples collected from cenote *Tza Itzá* (20°43'50.27" N, 89°27'56.82" W), in the state of Yucatán, Mexico in 2018. The cenote dimensions are a maximum depth of 40 m, water mirror of 7.6 × 10.5 m, and dry cave of 30 × 8 × 5 m (L × W × H). The isolation of the strains was made in A1 10% media with peptone (0.4 g), starch (1.0 g), yeast extract (0.2 g), supplemented with rifampicin (5 μ g/mL) and cycloheximide (0.1 mg/mL) to reduce the growth of Gram-negative bacteria as previously described.¹⁰ The fungal cultures are maintained at -80 °C at the microbial culture collection from Unidad de Química en Sisal, Facultad de Química, UNAM, in Yucatan, Mexico. A copy of each strain used for the chemical studies is also maintained at the Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Mexico. Axenic cultures of strains NCA252, NCA257, NCA264, NCA273, and NCA276 were subjected to molecular identification by ITS sequencing and BLAST search with the RefSeq database using the methodologies reported.^{61,62} For designation of taxonomic names, the results of the ITS BLAST search using GenBank were interpreted with caution using modification of outlined criteria.⁶³ Since we sequenced only the ITS region, we chose a rather conservative approach and

made identifications only to the genus level even when BLAST sequence homology was $\geq 99\%$. Sequences for each strain were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and given the GenBank Data Base accession numbers indicated in (Table S1 Supporting Information).

Fungal Cultivation, Extraction, and Isolation and Characterization of Pure Compounds. The methods utilized to culture the fungal strains (mono and cocultures) to prepare their organic extracts and to isolate and structurally elucidate compounds 1–19 from the fungi followed well-established protocols^{64–67} and are detailed in the Supporting Information.

17-Deoxy-aspergillin PZ (1). Colorless solid; $[\alpha]_D^{18.1} + 7.5$ (*c* 0.1, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 322 (3.28), 285 (3.34) nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table S3 on Supporting Information; HRESIMS *m/z* 386.2682 [M + H]⁺ (calcd. for C₂₄H₃₆NO₃, 386.2695).

X-ray Crystallographic Analysis of 17-deoxy-aspergillin PZ (1). Suitable X-ray quality single crystals for 17-deoxy-aspergillin PZ (1) were successfully obtained from MeOH–CHCl₃–H₂O (20:1:1) recrystallization mixture. The crystallographic data and data collection parameters are mentioned in Table S2. All reflection intensities were measured at 100(2) K using a Gemini R diffractometer (equipped with Atlas detector) with CuK α radiation ($\lambda = 1.54178$ Å) under the program CrysAlisPro (Version CrysAlisPro 1.171.38.43f, Rigaku OD, 2015). The refinement

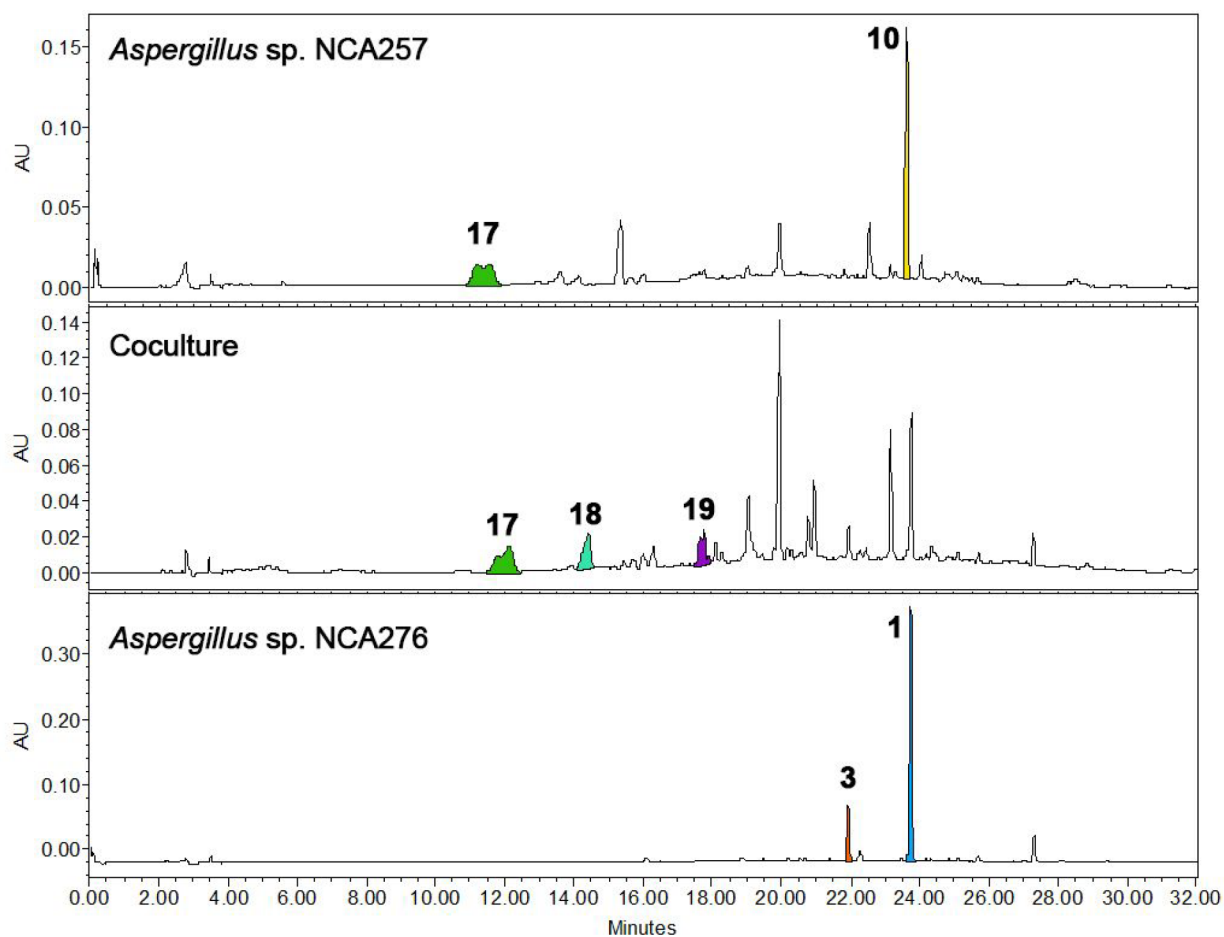


Figure 12. HPLC traces (PDA UV $\lambda = 254$ nm) of monoculture extracts of *Aspergillus* spp. NCA257 and NCA276 and the coculture extract.

Table 3. Antimicrobial Activity of Isolated Compounds against ESKAPE Bacteria at 100 $\mu\text{g/mL}$

compound	growth inhibition (%)				
	VSEF ^c	VREF ^c	MSSA ^c	MRSA ^c	EC ^c
17-deoxy-aspergillin PZ (1)			11.8	27.7	28.1
aspergillin PZ (2)				23.0	9.0
aspochalasin D (3)	37.2	23.8	81.4	87.2	
asperphenamate (4)			10.4	62.9	22.5
<i>N</i> -benzoyl- <i>L</i> -phenylalaninol (5)			13.3	50.7	
2- <i>O</i> -methylbutyrolactone II (6)					
sydonic acid (8)				34.0	11.9
asterriquinol D dimethyl ether (10)			50.9	62.3	48.2
<i>O</i> -methymllelin (11)					16.2
atranone A (12)	13.0				6.0
atranone B (13)					12.2
stachybotrolide acetate (14) ^d			81.0	92.9	21.5
stachybotrydial acetate (15)			82.7	89.3	18.3
stachybotrolide (16)			82.2	91.2	23.7
penicillic acid (17)			80.4	51.4	
5,6-dihydropenicillic acid (18)	38.3				
MIC positive control in $\mu\text{g/mL}$.	3.75 ^a	25.0 ^a	200.0 ^b	2.5 ^a	0.5 ^c

^aVancomycin - Inactive at 100 $\mu\text{g/mL}$. ^bAmpicillin - Inactive at 100 $\mu\text{g/mL}$. ^cGentamicin - Inactive at 100 $\mu\text{g/mL}$. ^dTested at 10 $\mu\text{g/mL}$. ^eVSEF, vancomycin-susceptible *E. faecalis* ATCC 29212; VREF, vancomycin-resistant *E. faecalis* ATCC 51299; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus* ATCC 25923; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300; and EC, *E. cloacae* ATCC 700323.

of cell dimensions and data reduction were performed using the most recent version of the program (viz. CrysAlisPro 1.171.40.53, Rigaku OD, 2019). The structure was solved with the program SHELXT-2018/2 and was refined on F^2 by the

full-matrix least-squares method using SHELXL-2018/3.⁶⁸ An empirical absorption correction was applied using CrysAlisPro 1.171.40.53.⁶⁹ Non-hydrogen atoms were refined anisotropically. In the refinement, hydrogens attached to carbon, were

Table 4. Anti-mycobacteria and Cytotoxic Activities of Isolated Compounds

compound	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	<i>M. marinum</i> ATCC 927	<i>M. avium</i> ATCC 15769	<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	Vero cell ATCC CCL-81 ^d
	MABA ^a	LORA ^b			MABA ^c			
17-deoxy-aspergillin PZ (1)	19 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
aspochalasin D (3)	101 (39.5)	>50	>50 (0)	>50 (17)	>50 (31)	22.55	>50 (16)	37.5
asperphenamate (4)	101 (16.6)	>50	>50 (0)	>50 (6)	>50 (22)	37.00	>50 (0)	>50
<i>N</i> -benzoyl-L-phenylalaninol (5)	20 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2- <i>O</i> -methylbutyrolactone II (6)	83 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
diorcinol (7)	100 (47.9)	>50	>50 (0)	>50 (12)	47.24	19.98	>50 (0)	39.9
sydonic acid (8)	30 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
asterriquinol D dimethyl ether (10)	13 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>O</i> -methylmellein (11)	22 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
atranone A (12)	29 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
atranone B (13)	33 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
stachybotrolide acetate (14)	99 (48.3)	>50	>50 (0)	>50(0)	23.15	11.63	>50(0)	38.2
stachybotrydial acetate (15)	38 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
stachybotrolide (16)	103 (49.4)	>50	>50 (0)	>50 (0)	47.02	16.92	>50(0)	39.7
penicillic acid (17)	98 (49.5)	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5,6-dihydropenicillic acid (18)	42 (ND)	ND	>50 (0)	>50 (73)	>50 (58)	>50 (53)	>50(0)	35.4
3-isobutyl-6-(1-hydroxy-2-methylpropyl)-pyrazin-2(1H)-one (19)	23 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MIC Rifampicin ($\mu\text{g/mL}$)	100 (0.03)	0.08	>8.0	4.25	0.09	0.05	0.41	>8.0

^a% Inhibition at 50 $\mu\text{g/mL}$ (MIC μM). ^bMIC μM . ^cMIC μM (% Inhibition). ^dCC₅₀, cytotoxic concentration to 50% inhibition of the cell line. ND, not determined since % inhibition of *M. tuberculosis* H37Rv using MABA was below 90%.

treated as riding atoms using SHELXL default parameters, while those attached to nitrogen were located with electron difference maps. The crystallographic data of **1** in CIF format was deposited in the Cambridge Structural Database (CSD) (CCDC no. 2142221).

Biological Activity Assays. Pure compounds were tested *in vitro* for antibacterial activity using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth dilution standard method.^{55,56} Target bacteria used in the assays belong to the ESKAPE group: vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (VSEF), vancomycin-resistant *E. faecalis* ATCC 51299 (VREF), methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, multidrug-resistant *A. baumannii* strain 564 (clinical isolated),⁵⁷ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Enterobacter cloacae* ATCC 700323. The compounds were dissolved in DMSO to obtain a stock solution and then tested at a final concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ or 10 $\mu\text{g/mL}$. The bioassays were carried out in 96-well plates in triplicate at concentrations of pure compound. In addition, pure compounds were also tested against *M. tuberculosis* H37Rv (MT) strain under both aerobic (replicating) and anaerobic (nonreplicating; NRMT) conditions using MABA and LORA assays.⁵⁸ Compounds with activity >90% of inhibition of the growth of MT in MABA were further tested against *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. marinum* ATCC 927, *M. avium* ATCC 15769, and *M. kansasii* ATCC 12478, using MABA⁵⁸ and a cytotoxicity assay against Vero cell line ATCC CCL-81.⁶⁰ For the latter, 0.6 mM of resazurin was used and the absorbance was recorded at 530 nm (excitation) and 590 nm (emission). Positive controls for all assays are indicated in Tables 3 and 4.

Molecular Networking and Metabolomics Analysis.

Each extract from the mono and cocultures was analyzed by LC-HRMS-MS/MS using a previously described methodology.^{66,67} Raw data were converted to mzML format using the ProteoWizard tool MsConvert (version 3.0.20239) and the resulting files uploaded to the Global Natural Products Social (GNPS; <https://gnps.ucsd.edu>) Web server using the FTP Server Version 5.17.16. Molecular networks were generated following the workflow previously published.^{31,32} Data was filtered by removing all MS/MS fragment ions within ± 17 Da of the precursor *m/z*. The precursor ion mass tolerance was set to 0.01 Da and a MS/MS fragment ion tolerance of 0.02 Da. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than five matched peaks. Furthermore, edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 10 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 100, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against GNPS' spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.7 and at least five matched peaks. GNPS MolNetEnhancer and Dereplicator+ tools were applied for chemical classification.^{33,70} Molecular networks were visualized with Cytoscape 3.8.1.⁷¹ Finally, manual dereplication was assessed using UV-absorption maxima and HRMS-MS/MS data against MS/MS data of **1–19** and by comparison with those reported in the Dictionary of Natural Products,⁷² SciFinder,⁷³ and an in-house mycotoxins database. The annotation of isolated compounds was at confidence level 1, according to the metabolomics standards initiative and exact mass accuracy <5 ppm.⁷⁴

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c00544>.

Methods for fungal cultivation, extraction, and isolation and characterization of pure compounds; identity of fungal isolates; NMR and MS spectra of 1–19; crystallographic data of 1; MN and chemical annotation of cocultures (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Mario Figueroa – *Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico*; orcid.org/0000-0001-7004-0591; Email: mafiquer@unam.mx

Authors

Carlos A. Fajardo-Hernández – *Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico*; orcid.org/0000-0003-1487-1926

Firoz Shah Tuglak Khan – *Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North Carolina 27402, United States*; orcid.org/0000-0002-3800-0423

Laura Flores-Bocanegra – *Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North Carolina 27402, United States*; orcid.org/0000-0002-1393-7834

Alejandra Prieto-Davó – *Unidad de Química en Sisal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán 97356, Mexico*

Baojie Wan – *Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612, United States*

Rui Ma – *Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612, United States*

Mallique Qader – *Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612, United States*

Rodrigo Villanueva-Silva – *Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico*

Anahí Martínez-Cárdenas – *Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico*

Marian A. López-Lobato – *Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico*

Shabnam Hematian – *Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North Carolina 27402, United States*; orcid.org/0000-0002-0788-7615

Scott G. Franzblau – *Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612, United States*; orcid.org/0000-0002-8698-0243

Huzefa A. Raja – *Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, North*

Carolina 27402, United States; orcid.org/0000-0002-0824-9463

Rodolfo García-Contreras – *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico*; orcid.org/0000-0001-8475-2282

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.2c00544>

Author Contributions

This work was part for the Ph.D. thesis of C.A.F.-H. from the Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM. C.A.F.-H. and M.F. designed the experiments. C.A.F.-H., F.S.T.K., L.F.-B., A.P.-D., B.W., R.M., M.Q., S.G.F., R.V.-S., A.M.-C., M.A.L.-L., and H.A.R. performed the experiments. C.A.F.-H., A.P.-D., S.H., S.G.F., H.A.R., R.G.-C., and M.F. analyzed the data and revised the manuscript. C.A.F.-H. and M.F. wrote, reviewed, and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the revised version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest. LC-MS/MS data can be accessed at MassIVE (accession no. MSV000088691; accessed on January 26, 2022). The molecular network data set of fungal coculture species *Aspergillus* spp. NCA257, NCA276 and *Cladosporium* sp. NCA273 can be accessed at MassIVE (accession no. MSV000088690; accessed on January 26, 2022). The molecular network of *Stachybotrys* sp. NCA252 at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2e6ed82df2854ee481908c5e7be883e0> (MolNetEnhancer analysis; accessed on January 26, 2022), molecular network of *Aspergillus* sp. NCA257 at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2aea96c6e47746e28349aa3241c8d065> (MolNetEnhancer analysis; accessed on January 26, 2022), molecular network of *Aspergillus* sp. NCA264 at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=63f8482f83c94d3ea4b34910a972f170> (MolNetEnhancer analysis; accessed on January 26, 2022), molecular network of *Cladosporium* sp. NCA273 at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=5f13c0f6339742879130611c389af5da> (MolNetEnhancer analysis; accessed on January 26, 2022) and molecular network of *Aspergillus* sp. NCA276 at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ee9f321cb43d4e1da6f38fde4cfa696b> (MolNetEnhancer analysis; accessed on January 26, 2022). Molecular network of fungal coculture species *Aspergillus* spp. NCA257, NCA276 and *Cladosporium* sp. NCA273 at <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=66c153a4faa4418485b252df22c99023> (accessed on January 26, 2022).

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from UNAM-DGAPA-PAPIIT IN222220 (M.F.) and FQ-PAIP 5000-9145 (M.F.). A.P.-D. thanks to CONACyT, Ciencia Básica Project A1-S-10785 and the Rockefeller University for providing funds for sampling expeditions and to the divers Biol. Luis Arturo Liévano and M.S. Efraín Chávez Solís for collecting the samples from the cenote. C.A.F.-H. thanks to CONACyT for the fellowship (no. 596831) to pursue his Ph.D. studies. A.M.-C. acknowledges the postdoctoral fellowship from DGAPA, UNAM. S.H. and F.S.T.K. gratefully acknowledge the JNT

School of Nanoscience and Nanoengineering (JSNN) for providing access to the X-ray diffraction facility. M.F. thanks to Q.F.B. Alejandro Camacho Cruz (Cepario, FQ, UNAM), Dr. Isabel Rivero-Cruz and Ramiro del Carmen (FQ, UNAM), Dr. Norma Angélica Márquez-Velázquez (Unidad de Química en Sisal, FQ, UNAM), and M.S. Rosa Isela del Villar and M.S. Nayeli López-Balbiaux, (USAI, FQ, UNAM) for their valuable technical assistance. The authors are deeply grateful to Professor Nicholas H. Oberlies for providing access to the nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) facilities at the University of North Carolina at Greensboro.

REFERENCES

- (1) Schmitter-Soto, J. J.; Comín, F. A.; Escobar-Briones, E.; Herrera-Silveira, J.; Alcocer, J.; Suárez-Morales, E.; Elías-Gutiérrez, M.; Díaz-Arce, V.; Marín, L. E.; Steinich, B. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan peninsula (SE Mexico). *Hydrobiol.* **2002**, *467* (1–3), 215–228.
- (2) Gómez-Nicolás, M.; Rebolledo-Vieyra, M.; Canto-Lugo, E.; Huerta-Quintanilla, R.; Ochoa-Sandoval, P. Connectivity in a karst system using electrical resistivity tomography and network theory. *Groundwater* **2018**, *56* (5), 732–741.
- (3) Hildebrand, A. R.; Pilkington, M.; Connors, M.; Ortiz-Aleman, C.; Chavez, R. E. Size and structure of the Chicxulub crater revealed by horizontal gravity gradients and cenotes. *Nature* **1995**, *376* (6539), 415–417.
- (4) Lian, B.; Yuan, D.; Liu, Z. Effect of microbes on karstification in karst ecosystems. *Chin. Sci. Bull.* **2011**, *56*, 3743–3747.
- (5) Stoessell, R. K.; Moore, Y. H.; Coke, J. G. The occurrence and effect of sulfate reduction and sulfide oxidation on coastal limestone dissolution in Yucatan cenotes. *Groundwater* **1993**, *31* (4), 566–575.
- (6) Hahn, M. W. The microbial diversity of inland waters. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17* (3), 256–261.
- (7) Krauss, G. J.; Sole, M.; Krauss, G.; Schlosser, D.; Wesenberg, D.; Baerlocher, F. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35* (4), 620–651.
- (8) Estrada-Medina, H.; Canto-Canché, B. B.; De los Santos-Briones, C.; O'Connor-Sánchez, A. Yucatán in black and red: Linking edaphic analysis and pyrosequencing-based assessment of bacterial and fungal community structures in the two main kinds of soil of Yucatán State. *Microbiol. Res.* **2016**, *188*, 23–33.
- (9) Marfil-Santana, M. D.; O'Connor-Sánchez, A.; Ramírez-Prado, J. H.; De los Santos-Briones, C.; Lluvia, K.; Rojas-Herrera, R.; Lago-Lestón, A.; Prieto-Davó, A. A computationally simplistic poly-phasic approach to explore microbial communities from the Yucatan aquifer as a potential sources of novel natural products. *J. Microbiol.* **2016**, *54* (11), 774–781.
- (10) Parera-Valadez, Y.; Yam-Puc, A.; López-Aguilar, L. K.; Borges-Argáez, R.; Figueroa-Saldivar, M. A.; Cáceres-Farfán, M.; Márquez-Velázquez, N. A.; Prieto-Davó, A. Ecological strategies behind the selection of cultivable actinomycete strains from the Yucatan peninsula for the discovery of secondary metabolites with antibiotic activity. *Microb. Ecol.* **2019**, *77* (4), 839–851.
- (11) De la Rosa-García, S. C.; Muñoz-García, A. A.; Barahona-Pérez, L. F.; Gamboa-Angulo, M. M. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Letts. Appl. Microbiol.* **2007**, *45* (3), 289–294.
- (12) Marcela Gamboa-Angulo. Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, *6* (10), 2305–2312.
- (13) Ruiz-Jiménez, A. L.; González-Coloma, A.; Andrés-Yeves, M. F.; Ruiz-Sánchez, E.; Heredia, G.; Peraza-Sánchez, S. R.; Medina-Baizabal, I. L.; Reyes-Estebanez, M.; Canto-Caché, B.; Gamboa-Angulo, M. Insect deterrent and nematicidal screening of microfungi from Mexico and anti-aphid compounds from *Gliomastix maseei*. *Rev. Argent. Microbiol.* **2017**, *49* (1), 83–92.
- (14) Ruiz-Jiménez, A. L.; Ruiz-Sánchez, E.; Heredia, G.; Tapia-Tussell, R.; González-Coloma, A.; Peraza-Jiménez, K.; Moo-Koh, F. A.; Medina-Baizabal, I. L.; Hernández-Romero, Y.; Mena-Rejón, G. J.; Quijano-Quiñones, R. F.; Gamboa-Angulo, M. Identification of insect-deterrent metabolites from *Acremonium maseei* strain CICY026, a saprophytic fungus from a sinkhole in Yucatán. *Microorganisms* **2019**, *7* (12), 712.
- (15) Pech-Puch, D.; Pérez-Povedano, M.; Lenis-Rojas, O. A.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. Marine natural products from the Yucatan peninsula. *Mar. Drugs* **2020**, *18* (1), 59.
- (16) Hernández-Bolio, G. I.; Ruiz-Vargas, J. A.; Peña-Rodríguez, L. M. Natural products from the yucatecan flora: Structural diversity and biological activity. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (3), 647–656.
- (17) Gardes, M.; Bruns, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **1993**, *2* (2), 113–118.
- (18) White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. J. W. T.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*; Academic Press: San Diego, 1990; Vol. 18, pp 315–322.
- (19) Ding, X.; Terui, Y.; Chen, Y. Separation and structural confirmation of three new compounds with antibacterial activity. *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong* **2006**, *18* (9), 1026–1028.
- (20) Chen, L.; Liu, Y. T.; Song, B.; Zhang, H. W.; Ding, G.; Liu, X. Z.; Gu, Y. C.; Zou, Z. M. Stereochemical determination of new cytochalasins from the plant endophytic fungus *Trichoderma gamsii*. *Fitoterapia* **2014**, *96*, 115–122.
- (21) Tomikawa, T.; Shin-Ya, K.; Kinoshita, T.; Miyajima, A.; Seto, H.; Hayakawa, Y. Selective cytotoxicity and stereochemistry of aspochalasin D. *J. Antibiot.* **2001**, *54* (4), 379–381.
- (22) Hou, X. M.; Zhang, Y. H.; Hai, Y.; Zheng, J. Y.; Gu, Y. C.; Wang, C. Y.; Shao, C. L. Aspersymmetide A, a new centrosymmetric cyclohexapeptide from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Mar. drugs* **2017**, *15* (11), 363.
- (23) Li, W.; Fan, A.; Wang, L.; Zhang, P.; Liu, Z.; An, Z.; Yin, W. B. Asperphenamate biosynthesis reveals a novel two-module NRPS system to synthesize amino acid esters in fungi. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (9), 2589–2594.
- (24) Chen, M.; Wang, K. L.; Liu, M.; She, Z. G.; Wang, C. Y. Bioactive steroid derivatives and butyrolactone derivatives from a Gorgonian-derived *Aspergillus* sp. fungus. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12* (9), 1398–1406.
- (25) Sanchez, J. F.; Chiang, Y. M.; Szewczyk, E.; Davidson, A. D.; Ahuja, M.; Oakley, C. E.; Bok, J. W.; Keller, N.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6* (3), 587–593.
- (26) Li, D.; Xu, Y.; Shao, C. L.; Yang, R. Y.; Zheng, C. J.; Chen, Y. Y.; Fu, X. M.; Qian, P. Y.; She, Z. G.; de Voogd, N. J.; Wang, C. Y. Antibacterial bisabolane-type sesquiterpenoids from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Mar. drugs* **2012**, *10* (12), 234–241.
- (27) Lu, Z.; Zhu, H.; Fu, P.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Lin, H.; Liu, P.; Zhuang, Y.; Hong, K.; Zhu, W. Cytotoxic polyphenols from the marine-derived fungus *Penicillium expansum*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (5), 911–914.
- (28) Lacey, H. J.; Vuong, D.; Pitt, J. I.; Lacey, E.; Piggott, A. M. Kumbicins A–D: bis-indolyl benzenoids and benzoquinones from an Australian soil fungus, *Aspergillus kumbius*. *Aust. J. Chem.* **2016**, *69* (2), 152–160.
- (29) 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* (9), 1709–1716.
- (30) Paguigan, N. D.; El-Elimat, T.; Kao, D.; Raja, H. A.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Enhanced dereplication of fungal cultures via use of mass defect filtering. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 553–561.
- (31) Aron, A. T.; Gentry, E. C.; McPhail, K. L.; Nothias, L. F.; Nothias-Espósito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J. M.; Sikora, N.; Vargas, F.; et al. Reproducible molecular networking of

- untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 1954–1991.
- (32) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837.
- (33) Ernst, M.; Kang, K. B.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Nothias, L. F.; Wandy, J.; Chen, C.; Wang, M.; Rogers, S.; Medema, M. H.; Dorrestein, P. C.; Van Der Hoof, J. J. MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites* **2019**, *9* (7), 144.
- (34) Zhou, G. X.; Wijeratne, E. K.; Bigelow, D.; Pierson, L. S.; VanEtten, H. D.; Gunatilaka, A. L. Aspochalasins I, J, and K: three new cytotoxic cytochalasins of *Aspergillus flavipes* from the rhizosphere of *Ericameria laricifolia* of the Sonoran Desert. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (3), 328–332.
- (35) Si, Y.; Tang, M.; Lin, S.; Chen, G.; Feng, Q.; Wang, Y.; Hua, H.; Bai, J.; Wang, H.; Pei, Y. Cytotoxic cytochalasins from *Aspergillus flavipes* PJ03–11 by OSMAC method. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (18), 1767–1771.
- (36) Zhou, H.; Sun, X.; Li, N.; Che, Q.; Zhu, T.; Gu, Q.; Li, D. Isoindolone-containing meroperpenoids from the endophytic fungus *Emericella nidulans* HDN12–249. *Org. Lett.* **2016**, *18* (18), 4670–4673.
- (37) Shibata, S.; Sankawa, U.; Taguchi, H.; Yamasaki, K. Biosynthesis of Natural Products. III. Biosynthesis of erythrokyrine, a coloring matter of *Penicillium islandicum* SOPP. *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14* (5), 474–478.
- (38) Li, X. D.; Li, X. M.; Xu, G. M.; Zhang, P.; Wang, B. G. Antimicrobial phenolic bisabolanes and related derivatives from *Penicillium aculeatum* SD-321, a deep sea sediment-derived fungus. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (4), 844–849.
- (39) Glauser, G.; Gindro, K.; Fringeli, J.; De Joffrey, J. P.; Rudaz, S.; Wolfender, J. L. Differential analysis of mycoalexins in confrontation zones of grapevine fungal pathogens by ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and capillary nuclear magnetic resonance. *J. Agr. Food Chem.* **2009**, *57* (4), 1127–1134.
- (40) Hinkley, S. F.; Jiang, J.; Mazzola, E. P.; Jarvis, B. B. Atranes: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (14), 2725–2728.
- (41) Jarvis, B. B.; Salemme, J.; Morales, A. *Stachybotrys* toxins. I. *Nat. Toxins* **1995**, *3* (1), 10–16.
- (42) Ayer, W. A.; Miao, S. Secondary metabolites of the aspen fungus *Stachybotrys cylindrospora*. *Can. J. Chem.* **1993**, *71* (4), 487–493.
- (43) Andersen, B.; Nielsen, K. F.; Thrane, U.; Szaro, T.; Taylor, J. W.; Jarvis, B. B. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* **2003**, *95* (6), 1227–1238.
- (44) Semeiks, J.; Borek, D.; Otwinowski, Z.; Grishin, N. V. Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genomics* **2014**, *15* (1), 590.
- (45) Jagels, A.; Lindemann, V.; Ulrich, S.; Gottschalk, C.; Cramer, B.; Hübner, F.; Gareis, M.; Humpf, H. U. Exploring secondary metabolite profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. *Toxins* **2019**, *11* (3), 133.
- (46) Ballantine, J. A.; Hassall, C. H.; Jones, G. Asperugin, a metabolite associated with abnormal morphology of *Aspergillus rugulosus*. *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5* (49), 3739–3740.
- (47) Bao, Y. R.; Chen, G. D.; Wu, Y. H.; Li, X. X.; Hu, D.; Liu, X. Z.; Li, Y.; Yao, X. S.; Gao, H. Stachybisbins A and B, the first cases of seco-bisabosquals from *Stachybotrys bisbyi*. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 151–155.
- (48) Arora, D.; Gupta, P.; Jaglan, S.; Roullier, C.; Grovel, O.; Bertrand, S. Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: Current status and outlook. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *40*, 107521.
- (49) Knowles, S. L.; Raja, H. A.; Roberts, C. D.; Oberlies, N. H. Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, DOI: 10.1039/D1NP00070E.
- (50) Li, H. L.; Li, X. M.; Yang, S. Q.; Cao, J.; Li, Y. H.; Wang, B. G. Induced terreins production from marine red algal-derived endophytic fungus *Aspergillus terreus* EN-539 co-cultured with symbiotic fungus *Paecilomyces lilacinus* EN-531. *J. Antibiot.* **2020**, *73* (2), 108–111.
- (51) Nonaka, K.; Chiba, T.; Suga, T.; Asami, Y.; Iwatsuki, M.; Masuma, R.; Ōmura, S.; Shiomi, K. Coculnol, a new penicillic acid produced by a coculture of *Fusarium solani* FKI-6853 and *Talaromyces* sp. FKA-65. *J. Antibiot.* **2015**, *68* (8), 530–532.
- (52) Sassa, T.; Hayakari, S.; Ikeda, M.; Miura, Y. Plant growth inhibitors produced by fungi Part I. Isolation and identification of penicillic acid and dihydropenicillic acid. *Agr. Biol. Chem.* **1971**, *35* (13), 2130–2131.
- (53) Li, H. J.; Cai, Y. T.; Chen, Y. Y.; Lam, C. K.; Lan, W. J. Metabolites of marine fungus *Aspergillus* sp. collected from soft coral *Sarcophyton tortuosum*. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2010**, *26* (3), 415–419.
- (54) Frisvad, J. C. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin J.* **2018**, *11* (1), 73–100.
- (55) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6* (2), 71–79.
- (56) Clinical and Laboratory Standards Institute, <https://clsi.org/standards/?page=1&sort=date&sortdir=desc&subcat=&area=>.
- (57) Cruz-Muñoz, M. Y.; López-Jacome, L. E.; Hernández-Durán, M.; Franco-Cendejas, R.; Licona-Limón, P.; Ramos-Balderas, J. L.; Martínez-Vázquez, M.; Belmont-Díaz, J. A.; Wood, T. K.; García-Contreras, R. Repurposing the anticancer drug mitomycin C for the treatment of persistent *Acinetobacter baumannii* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49* (1), 88–92.
- (58) Cho, S.; Lee, H. S.; Franzblau, S. Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for *Mycobacterium tuberculosis*. In *Mycobacteria Protocols*; Parish, T., Roberts, D. M., Eds.; Springer: New York, 2015; pp 281–292.
- (59) Gao, W.; Kim, J.-Y.; Anderson, J. R.; Akopian, T.; Hong, S.; Jin, Y.-Y.; Kandror, O.; Kim, J.-W.; Lee, I.-A.; Lee, S.-Y.; et al. The cyclic peptide ecumicin targeting ClpC1 is active against *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 880–889.
- (60) Nandikolla, A.; Srinivasarao, S.; Khetmalis, Y. M.; Kumar, B. K.; Murugesan, S.; Shetye, G.; Ma, R.; Franzblau, S. G.; Sekhar, K. V. G. C. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1, 2, 3-triazole analogues of Imidazo-[1, 2-a]-pyridine-3-carboxamide against *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicol. In Vitro* **2021**, *74*, 105137.
- (61) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (3), 756–770.
- (62) Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W.; Bolchacova, E.; Voigt, K.; Crous, P. W.; Miller, A. N.; Wingfield, M. J.; Aime, M. C.; An, K.-D.; Bai, F.-Y.; Barreto, R. W.; Begerow, D.; Bergeron, M.-J.; Blackwell, M.; Boekhout, T.; Bogale, M.; Boonyuen, N.; Burgaz, A. R.; Buyck, B.; Cai, L.; Cai, Q.; Cardinali, G.; Chaverri, P.; Coppins, B. J.; Crespo, A.; Cubas, P.; Cummings, C.; Damm, U.; de Beer, Z. W.; de Hoog, G. S.; Del-Prado, R.; Dentinger, B.; Dieguez-Urbeondo, J.; Divakar, P. K.; Douglas, B.; Duenas, M.; Duong, T. A.; Eberhardt, U.; Edwards, J. E.; Elshahed, M. S.; Fliiegerova, K.; Furtado, M.; Garcia, M. A.; Ge, Z.-W.; Griffith, G. W.; Griffiths, K.; Groenewald, J. Z.; Groenewald, M.; Grube, M.; Gryzenhout, M.; Guo, L.-D.; Hagen, F.; Hambleton, S.; Hamelin, R. C.; Hansen, K.; Harrold, P.; Heller, G.; Herrera, C.; Hirayama, K.; Hirooka, Y.; Ho, H.-M.; Hoffmann, K.; Hofstetter, V.; Hognabba, F.; Hollingsworth, P. M.; Hong, S.-B.; Hosaka, K.; Houbaken, J.; Hughes, K.; Huhtinen, S.; Hyde, K. D.; James, T.; Johnson, E. M.; Johnson, J. E.; Johnston, P. R.; Jones, E.B. G.; Kelly, L. J.; Kirk, P. M.; Knapp, D. G.; Koljalg, U.; Kovacs, G. M.; Kurtzman, C. P.; Landvik, S.; Leavitt, S. D.; Liggensstoffer, A. S.; Liimatainen, K.

Lombard, L.; Luangsa-ard, J. J.; Lumbsch, H. T.; Maganti, H.; Maharachchikumbura, S. S. N.; Martin, M. P.; May, T. W.; McTaggart, A. R.; Methven, A. S.; Meyer, W.; Moncalvo, J.-M.; Mongkolsamrit, S.; Nagy, L. G.; Nilsson, R. H.; Niskanen, T.; Nyilasi, I.; Okada, G.; Okane, I.; Olariaga, I.; Otte, J.; Papp, T.; Park, D.; Petkovits, T.; Pino-Bodas, R.; Quaedvlieg, W.; Raja, H. A.; Redecker, D.; Rintoul, T. L.; Ruibal, C.; Sarmiento-Ramirez, J. M.; Schmitt, I.; Schußler, A.; Shearer, C.; Sotome, K.; Stefani, F. O.P.; Stenroos, S.; Stielow, B.; Stockinger, H.; Suetrong, S.; Suh, S.-O.; Sung, G.-H.; Suzuki, M.; Tanaka, K.; Tedersoo, L.; Telleria, M. T.; Tretter, E.; Untereiner, W. A.; Urbina, H.; Vagvolgyi, C.; Vialle, A.; Vu, T. D.; Walther, G.; Wang, Q.-M.; Wang, Y.; Weir, B. S.; Weiß, M.; White, M. M.; Xu, J.; Yahr, R.; Yang, Z. L.; Yurkov, A.; Zamora, J.-C.; Zhang, N.; Zhuang, W.-Y.; Schindel, D. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (16), 6241–6246.

(63) Goncalves, V. N.; Vaz, A. B. M.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *82* (2), 459–471.

(64) Aparicio-Cuevas, M. A.; Rivero-Cruz, I.; Sánchez-Castellanos, M.; Menéndez, D.; Raja, H. A.; Joseph-Nathan, P.; González, M. C.; Figueroa, M. Dioxomorpholines and derivatives from a marine-facultative *Aspergillus* species. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (8), 2311–2318.

(65) Aparicio-Cuevas, M. A.; González, M. C.; Raja, H. A.; Rivero-Cruz, I.; Kurina, S. J.; Burdette, J. E.; Oberlies, N. H.; Figueroa, M. Metabolites from the marine-facultative *Aspergillus* sp. MEXU 27854 and *Gymnoascus hyalinosporus* MEXU 29901 from Caleta Bay, Mexico. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (25), 1649–1652.

(66) Martínez-Cárdenas, A.; Cruz-Zamora, Y.; Fajardo-Hernández, C. A.; Villanueva-Silva, R.; Cruz-García, F.; Raja, H. A.; Figueroa, M. Genome Mining and Molecular Networking-Based Metabolomics of the Marine Facultative *Aspergillus* sp. MEXU 27854. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5362.

(67) Villanueva-Silva, R.; Velez, P.; Riquelme, M.; Fajardo-Hernández, C. A.; Martínez-Cárdenas, A.; Arista-Romero, A.; Wan, B.; Ma, R.; Qader, M.; Franzblau, S. G.; Figueroa, M. Chemical Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Fungi from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Molecules* **2021**, *26* (23), 7328.

(68) Sheldrick, G. M. *SHELXL-2018: Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 2018.

(69) Rigaku Oxford Diffraction. *CrysAlisPro: Empirical absorption correction using spherical harmonics, implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm*; Agilent Technologies Ltd.: Yarnton, U.K., 2019.

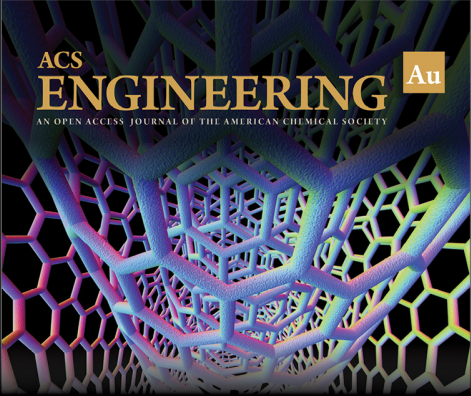
(70) Mohimani, H.; Gurevich, A.; Shlemov, A.; Mikheenko, A.; Korobeynikov, A.; Cao, L.; Shcherbin, E.; Nothias, L. F.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P. A. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4035.

(71) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13* (11), 2498–2504.

(72) Dictionary of Natural Products 30.1. Available online at <https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml> (accessed on 26 November 2021).

(73) SciFinder—CAS. Available online at <https://scifinder.cas.org> (accessed on 26 November 2021).


(74) Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T.W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L.; et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3*, 211–221.




ACS
ENGINEERING Au
AN OPEN ACCESS JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

Editor-in-Chief: **Prof. Shelley D. Minteer**, University of Utah, USA

Deputy Editor:
Prof. Vivek Ranade
University of Limerick, Ireland

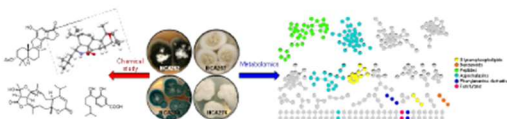
Open for Submissions 

pubs.acs.org/engineeringau  ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

P-087 – Chemical Studies of Fungi from Cenotes of the Yucatan Peninsula

Carlos A. Fajardo-Hernández¹, Alejandra Prieto-Davó², Firoz S. Khan³, Shabnam Hematian³, and Mario Figueroa¹. ¹Facultad de Química and ²Unidad de Química-Sisal, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico. ³Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, NC 27402.

The Yucatan Peninsula has one of the most spectacular and developed karstic aquifers in the world. To expand the chemical knowledge of the microorganisms from this unique ecosystem, the organic extracts of four fungal strains obtained from sediments of the Kankirixché and Noh Mozón cenotes were subjected to chemical studies and metabolomic analysis. The isolated compounds, asterriquinols, penicillic acids, a bisabolene, phenylalanine derivatives, and aspochalasins from three *Aspergillus* spp. and melleins, and aspochalasins from three *Aspergillus* spp. and melleins, and phenylspirodrimanes from a *Stachybotrys* sp., were annotated in the GNPS molecular network of each strain. In addition, the absolute configuration of the 17-deoxyaspergillin PZ was established by X-Ray analysis [Flack parameter 0.08(10)]. Some of these compounds were active against MRSA.



Chemical Studies of Fungi from Cenotes of the Yucatan Peninsula

Carlos A. Fajardo-Hernández¹, Alejandra Prieto-Davó², Firoz S. Khan³, Shabnam Hematian³, and Mario Figueroa¹. ¹Facultad de Química and ²Unidad de Química-Sisal, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico. ³Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina Greensboro, Greensboro, NC 27402.

The Yucatan Peninsula, which belonged to the seabed and coral reefs during the Cretaceous-Paleogene era, has unique ecological features. The most famous geological feature found in this area is the cenotes (from the Maya word *ts'oonot*), which are sinkholes formed by the dissolution of carbonate rocks in the karstic platform (Figure 1).³⁻²



Figure 1. Geographical location of the sampling site.

As part of our continuing search of bioactive compounds, nine fungi isolated from sediments of two cenotes (Kankirixché and Noh Mozón) were chemically studied. The CHCl₃-MeOH extracts were obtained from rice cultures (21 days) and then fractionated via Flash chromatography. Compounds 1-6 from *Stachybotrys* sp. NCA252, 7 from *Aspergillus* sp. NCA257, 8-9 from *Aspergillus* sp. NCA264, and 10-14 from *Aspergillus* sp. NCA276 were separated by reverse-phase HPLC and identified by NMR, HRMS and X-ray analysis (Figures 2-4).

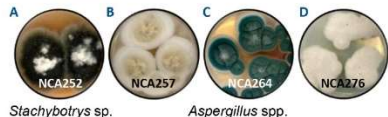


Figure 2. (A-D) Fungal strains chemically studied.

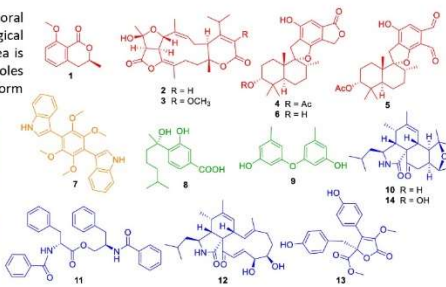


Figure 3. Isolated compounds.

The absolute stereochemistry of aspergillin PZ (10) was established via X-ray diffraction analysis (Figure 4).

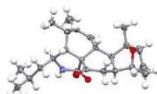


Figure 4. X-ray structure of 17-deoxyaspergillin PZ [Flack parameter 0.08(10)]

GNPS molecular networking analyses were generated as a tool to improve the dereplication of metabolites and to show the chemical diversity of these fungal strains.³ Thus, we were able to annotate all isolated compounds as well several match compounds included in the GNPS library (Figure 5).

Acknowledgements. This work was supported by grants from UNAM-DGAPA IN22220 and UNAM-PAIP 5000-9145. C.A.F.H. acknowledges the fellowship from CONACYT (596831). **References.** ¹Schmitter-Soto JJ, et. al. *Hydrobiologia*, 2002, 467, 215-228. ²Estrada-Medina H, et. al. *Microb. Res.*, 2016, 188, 23-33. ³Aron AT, et. al. *Nat. Protoc.*, 2020, 15(6), 1954-1991. ⁴Rivero-Cruz I, et. al. *J. Food Sci.*, 2011, 76(2), C309-C317.

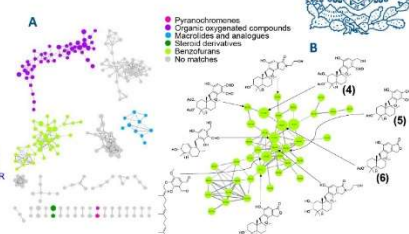


Figure 5. (A) GNPS molecular networking analysis of *Stachybotrys* sp. NCA252 and (B) benzofuranes cluster.

Finally, 1-8 and 10-13 were tested against ESKAPE bacteria.⁴ The phenylspirodrimanes (4-6) showed important activity, specially 4 (MIC 23 nM) against both *S. aureus* and MRSA (Table 1).

Table 1. Antimicrobial activity of 4-6 (MIC in μM).

Compound	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 43300
4	≤ 0.023	≤ 0.023	≤ 0.023
5	0.23	0.23	0.23
6	0.26	0.26	0.26
Control MIC (μM)	1.43 ^a	572.40 ^b	0.86 ^b

^aAmpicillin; ^bVancomycin.

