



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

**“ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO CONTRA BACTERIAS RESISTENTES A  
MULTIFÁRMACOS DE HONGOS SELECTOS DE MÉXICO”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**QFB MARIAN ARIADNA LÓPEZ LOBATO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR**

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMITÉ TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

**“ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO CONTRA BACTERIAS RESISTENTES A  
MULTIFÁRMACOS DE HONGOS SELECTOS DE MÉXICO”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**QFB MARIAN ARIADNA LÓPEZ LOBATO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR**

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMITÉ TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
OFICIO FCIE/DAIP/209/2022  
**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 09 de mayo de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **LÓPEZ LOBATO MARIAN ARIADNA** con número de cuenta **312336451** con la tesis titulada **"ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO CONTRA BACTERIAS RESISTENTES A MULTIFÁRMACOS DE HONGOS SELECTOS DE MÉXICO"**, realizada bajo la dirección del **DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**  
Vocal: **DR. RICARDO REYES CHILPA**  
Vocal: **DR. SOL CRISTIANS NIIZAWA**  
Vocal: **DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR**  
Secretario: **DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de mayo de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCBiol), UNAM, por permitirme el desarrollo de las actividades de académicas y de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado a través de la beca no. 762504 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.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por todo el apoyo, confianza y las enseñanzas brindadas para la realización del presente proyecto de investigación.

A las Dras. Rachel Mata Essayag y María del Carmen González Villaseñor, quienes a lo largo de este proyecto enriquecieron con sus valiosas aportaciones y comentarios este proyecto en cada evaluación tutorial.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A los Dres. Nicholas H. Oberlies, Laura Flores Bocanegra y Manuel Eduardo Rangel Grimaldo de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EEUU, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), masas de alta resolución, rotación óptica y dicroísmo circular. A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) por el registro de algunos espectros RMN y al QFB Alejandro Camacho Cruz del Cepario de la FQ, UNAM, por proporcionar las cepas para las evaluaciones antimicrobianas. A los Dres. María del Carmen González Villaseñor del Instituto de Biología, Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, y Anahí Martínez Cárdenas de la FQ, UNAM por proporcionar los organismos fúngicos objeto de estudio, las cepas de *Acinetobacter baumannii* para los ensayos biológicos, y asistencia técnica durante la caracterización molecular de los hongos, respectivamente.

Al Dr. Carlos Fajardo por sus enseñanzas a lo largo de mi estancia en el laboratorio 125, sin su apoyo este proyecto no sería el mismo. A la M. en C. Alejandra Arista por su acompañamiento en esta etapa de mi vida académica, a los antes mencionados por su valiosa amistad y apoyo durante estos 5 años.

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

## ÍNDICE

	Página
<b>Lista de figuras</b>	<b>I</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedades infecciosas	1
1.2 Resistencia antimicrobiana	3
1.3 Microorganismos como fuente de antibióticos	5
1.4 Importancia de los hongos en la producción de antibióticos	9
1.5 Hábitats con condiciones extremas como fuente de PNs con actividad antimicrobiana	11
1.6 México, un país megadiverso	13
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>15</b>
<b>3.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>15</b>
<b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>16</b>
4.1 Acondicionamiento e identificación de los microorganismos	16
4.2 Preparación de los cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos	17
4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana	17
4.4 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala	19
4.5. Aislamiento y purificación de las fracciones activas	20
4.5.1 Estudio químico del hongo ORO2	21
4.5.1.1 Separación de la fracción F4	21
4.5.1.2 Separación de la fracción F5	21
4.5.1.3 Separación de la fracción F6	22
4.5.2 Estudio químico del hongo ORO3	22
4.5.2.1 Fraccionamiento secundario de la fracción F7	22
4.5.2.2 Separación de la fracción F7-5	22
4.5.2.3 Separación de la fracción F7-6	23
4.5.2.4 Separación de la fracción F7-7	23
4.5.2.5 Separación de la fracción F4.	23
4.5.2.6 Separación de la fracción F13	24
4.5.3 Caracterización estructural de los metabolitos aislados	24
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
5.1 Acondicionamiento e identificación de los organismos fúngicos	26
5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos en mediana escala	28
5.3 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala de los organismos seleccionados	29
5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones de los extractos de mediana escala	30
5.5 Estudio químico del hongo ORO2	32

<b>5.5.1</b>	Aislamiento y caracterización de 1-3 a partir de la fracción ORO2-4 y ORO2-5	32
<b>5.5.2</b>	Aislamiento y caracterización de 4 y 5 a partir de la fracción ORO2-6	43
<b>5.5.3</b>	Identificación de <b>6-11</b> mediante el análisis metabolómico del extracto orgánico por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS	48
<b>5.6</b>	Estudio químico y biológico del hongo ORO3	56
<b>5.6.1</b>	Estudio químico de las fracciones activas seleccionadas	57
<b>5.6.2</b>	Aislamiento y caracterización de <b>12</b> a partir de la fracción F7-6	58
<b>5.6.3</b>	Aislamiento y caracterización de <b>13</b> a partir de la fracción F7-5	62
<b>5.6.4</b>	Aislamiento y caracterización de <b>14</b> y <b>15</b> a partir de la fracción F4	66
<b>5.6.5</b>	Aislamiento y caracterización de <b>16-18</b> a partir de la fracción F13	71
<b>5.6.6</b>	Aislamiento y caracterización de <b>19</b> a partir de la fracción F7-7	77
<b>5.6.7</b>	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados a partir del hongo ORO3	83
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	85
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	86
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	87

## Lista de figuras

Figura		Página
1.	Principales causas de muerte a nivel global en el año 2019	1
2.	Principales causas de muerte en México en el año 2020	2
3.	Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos	4
4.	Ejemplos selectos de fármacos y PNs con actividad biológica	6
5.	Nuevas entidades químicas aprobadas por la FDA para uso medicinal (A) y medicamentos con actividad antimicrobiana entre 1981 y 2019 (B)	6
6.	Ejemplos selectos de clases de PNs con actividad antimicrobiana	9
7.	Actividad biológica de metabolitos producidos por microorganismos aislados de hábitats extremos.	12
8.	Ejemplos selectos de PNs bioactivos obtenidos a partir de organismos fúngicos en México	14
9.	Comparación de los cromatogramas (UV $\lambda$ 190-500 nm) de los extractos del hongo ORO2 sin sales (arriba) y con sales (abajo)	19
10.	Comparación de los cromatogramas (UV $\lambda$ 190-500 nm) de los extractos del hongo ORO2 sin sales (arriba) y con sales (abajo)	19
11.	Morfología de algunos organismos fúngicos estudiados	26
12.	Ejemplo del cultivo en mediana escala del hongo ORO3: (A) cultivo en medio sólido de arroz húmedo a los 21 días de crecimiento, (B) anverso y (C) reverso	27
13.	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash de los extractos de los hongos ORO2 (A) y ORO3 (B)	30
14.	Cromatograma por HPLC de las fracciones combinadas F-4 y F-5: (A) PDA 254 nm, (B) ELSD a nivel analítico y (C) separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	32
15.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (B) de 1	33
16.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) (A) y <sup>13</sup> C (150 MHz) (B) de 1 en CDCl <sub>3</sub>	35
17.	Estructura de la isororidina E (1)	36
18.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (B) de 2	37
19.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) (A) y <sup>13</sup> C (150 MHz) (B) de 2 en CDCl <sub>3</sub>	38
20.	Estructura de la roridina E (2)	39
21.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (B) de 3	40
22.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) (A) y <sup>13</sup> C (150 MHz) (B) de 3 en CDCl <sub>3</sub>	41
23.	Estructura de la verrucarina J (3)	42
24.	Cromatograma por HPLC de la fracción F-6: (A) PDA 254 nm, (B) ELSD a nivel analítico y (C) separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	43
25.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (B) de 4	44
26.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) de 4 en CDCl <sub>3</sub>	45
27.	Estructura de la acremonona C (4)	45
28.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (B) de 5	46
29.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) de 5 en CDCl <sub>3</sub>	47
30.	Estructura de la acremonona D (5)	47

31.	Cromatogramas TIC y de UV del extracto del hongo ORO2 (A). Espectro de masas en el modo ESI <sup>+</sup> del <i>t<sub>R</sub></i> 5.02-5.83 min (B)	48
32.	Espectro de masas en el modo ESI <sup>+</sup> de 6	50
33.	Espectro de MS/MS en el modo ESI <sup>+</sup> del ion <i>m/z</i> 943.5611 de 6	50
34.	Estructura de la neofrapeptina A (6)	51
35.	Espectro de masas en modo ESI <sup>+</sup> de 7	51
36.	Espectro de MS/MS en el modo ESI <sup>+</sup> del ion <i>m/z</i> 929.5451 de 7	52
37.	Estructura de la neofrapeptina D (7)	52
38.	Espectro de masas en modo ESI <sup>+</sup> de 8	53
39.	Ampliación de los espectros de masas en el modo ESI <sup>+</sup> de 6 (A) y 8 (B) entre <i>m/z</i> 450-750	53
40.	Estructura de la neofrapeptina F (8)	53
41.	Espectro de masas en modo ESI <sup>+</sup> de 9	54
42.	Espectro de masas en modo ESI <sup>+</sup> de 10	55
43.	Estructura de la neofrapeptina B (9)	55
44.	Estructura de la neofrapeptina C (10)	55
45.	Espectro de masas en modo ESI <sup>+</sup> de 11	56
46.	Estructura de la neofrapeptina E (11)	56
47.	Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash de la fracción F7	57
48.	Cromatogramas por HPLC de la fracción F7-6: (A) ELSD a nivel analítico. (B) PDA 254 nm. (C) Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	58
49.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (B) de 12	59
50.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) (A) y <sup>13</sup> C (150 MHz) (B) de 12 en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	60
51.	Estructura de rayos X de 12	61
52.	Estructura de la myrotelactona E (12)	62
53.	Cromatogramas por HPLC de la fracción F7-5: (A) ELSD a nivel analítico. (B) PDA 254 nm. (C) Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	62
54.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (PDA) (B) de 13	63
55.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) (A) y <sup>13</sup> C (150 MHz) (B) del 13 en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub>	64
56.	Espectro NOESY y estructura de 13 mostrando las correlaciones clave	65
57.	Estructura de la myrotecicina B (13)	66
58.	Cromatogramas por HPLC de la fracción F4: (A) ELSD. (B) PDA 254 nm. (C) Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	66
59.	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> (A) y de UV (PDA) (B) de 14	67
60.	Análisis comparativo de los espectros de RMN <sup>1</sup> H de 13 (A, 600 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 14 (B, 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), y 15 (C, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	68
61.	Propuesta de la formación de 14 y 15 a partir de las myrotecinas A y B (13)	68
62.	Comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup> H de 14 (A, 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), y 15 (B, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	69

<b>63.</b>	Estructura de <b>14 (A)</b> y <b>15 (B)</b>	70
<b>64.</b>	Espectro NOESY y estructura de <b>15</b> mostrando las correlaciones clave	70
<b>65.</b>	Cromatogramas por HPLC de la fracción F13: <b>(A)</b> ELSD. <b>(B)</b> PDA 254 nm. <b>(C)</b> Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	71
<b>66.</b>	Espectros de masas en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> <b>(A)</b> y de UV (PDA) <b>(B)</b> de <b>16</b>	72
<b>67.</b>	Comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup> H de <b>14 (A)</b> , 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> , <b>15 (B)</b> , 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> y <b>16-18 (C-E)</b> , 600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	73
<b>68.</b>	Comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup> H de <b>16 (A)</b> y <b>17 (B)</b> (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	73
<b>69.</b>	Estructura de <b>16 (A)</b> y <b>17 (B)</b>	74
<b>70.</b>	Espectro NOESY y estructura de <b>17</b> mostrando las correlaciones clave	75
<b>71.</b>	Estructura de <b>18 (A)</b> y la chartalactama K <b>(B)</b>	76
<b>72.</b>	Espectro NOESY y estructura de <b>18</b> mostrando las correlaciones clave	77
<b>73.</b>	Cromatogramas por HPLC de la fracción F7-7: <b>(A)</b> ELSD. <b>(B)</b> PDA 254 nm. <b>(C)</b> Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm)	78
<b>74.</b>	Espectros en los modos ESI <sup>+</sup> y ESI <sup>-</sup> <b>(A)</b> y de UV (PDA) <b>(B)</b> del compuesto <b>19</b>	78
<b>75.</b>	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) de <b>19</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub>	79
<b>76.</b>	Estructura de <b>19 (A)</b> y la bistachybotrisina Y <b>(B)</b>	80
<b>77.</b>	Espectro NOESY y estructura de <b>19</b> mostrando las correlaciones clave	81
<b>78.</b>	Espectro COSY y estructura de <b>19</b> mostrando las correlaciones clave entre C-22 y C-23'	82
<b>79.</b>	Espectro NOESY y estructura de <b>19</b> mostrando las correlaciones clave en la conectividad del dímero	82

## Lista de tablas

Tabla		Página
<b>1</b>	Clases y fuente de obtención de algunos antibióticos utilizados clínicamente	8
<b>2</b>	Ejemplo de metabolitos secundarios sintetizados por organismos fúngicos y sus aplicaciones	10
<b>3</b>	Ejemplos de PNs con actividad antimicrobiana aislados a partir de hongos de hábitats extremos	12
<b>4</b>	Identificación interna de los organismos de estudio y su sitio de colecta	16
<b>5</b>	Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo flash de los extractos de ORO2 y ORO3	20
<b>6</b>	Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo flash de la fracción F7 de ORO3	22
<b>7</b>	Identificación taxonómica preliminar de las cepas fúngicas	27
<b>8</b>	Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos en mediana escala	28
<b>9</b>	Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de los hongos ORO2 y ORO3	30
<b>10</b>	Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones del extracto en mediana escala de los hongos ORO2 y ORO3	31
<b>11</b>	Datos de RMN del <b>1</b> en CDCl <sub>3</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	35
<b>12</b>	Datos de RMN del <b>2</b> en CDCl <sub>3</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	38
<b>13</b>	Datos de RMN del <b>3</b> en CDCl <sub>3</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	41
<b>14</b>	Actividad antimicrobiana de <b>1-3</b> aislados del hongo ORO2	42
<b>15</b>	Datos de RMN de <sup>1</sup> H del <b>4</b> en CDCl <sub>3</sub> (400 MHz)	45
<b>16</b>	Datos de RMN de <sup>1</sup> H del <b>5</b> en CDCl <sub>3</sub> (400 MHz)	47
<b>17</b>	HRESIMS [M] <sup>+</sup> y secuencia de aminoácidos de las neoefrapeptinas <b>6-11</b> .	49
<b>18</b>	Fraccionamiento secundario de la fracción F7 del extracto del hongo ORO3	57
<b>19</b>	Datos de RMN de <b>12</b> en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	60
<b>20</b>	Valores experimentales y reportados de rotación óptica de <b>12</b>	61
<b>21</b>	Datos de RMN de <b>13</b> en acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	64
<b>22</b>	Datos de RMN de <b>14</b> y <b>15</b> en CDCl <sub>3</sub> (600 y 400 MHz para <sup>1</sup> H y 150 y 100 MHz para <sup>13</sup> C, respectivamente)	69
<b>23</b>	Datos de RMN de <b>16</b> y <b>17</b> en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	74
<b>24</b>	Datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de <b>18</b> en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C, respectivamente)	75
<b>25</b>	Datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de <b>19</b> en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C)	80
<b>26</b>	Resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados del hongo ORO3	83

## Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de Etilo	µg	Microgramo
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo	µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico	µm	Micrómetro
APD	Agar papa dextrosa	mg	Miligramo
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	mL	Mililitro
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	mm	Milímetro
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado	min	Minuto
CMI	Concentración mínima inhibitoria	nm	Nanómetro
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	OMS	Organización Mundial de la Salud
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia	RMN	Resonancia magnética nuclear
TIC	Cromatograma de corriente total de iones	RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
δ	Desplazamiento químico	RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	rpm	Revoluciones por minuto
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	d	Doblete
DMSO	Dimetil sulfóxido	dd	Doble de dobles
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado	dt	Doblete tripleteado
ITS	Espaciador transcrito interno	m	Multiplete
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución	t	Triplete
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por electrospray	td	Triplete dobleteado
YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa	s	Singulete
°C	Grados Celsius	sa	Singulete ancho
g	Gramos	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
ESI	Ionización por electrospray	MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> susceptible a meticilina
kV	Kilovolts	TMS	Tetrametilsilano
psi	Libras por pulgada cuadrada	<i>t</i> <sub>R</sub>	Tiempo de retención
MHz	Mega Hertz	UV	Ultravioleta
MeOH	Metanol	CFU	Unidades formadoras de colonia
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado	V	Volts

## RESUMEN

Como parte de un proyecto de investigación multidisciplinario enfocado en el descubrimiento de nuevos productos naturales con actividad antimicrobiana a partir de organismos fúngicos, se realizó el estudio químico y biológico de 15 hongos aislados de varios sustratos, recolectados en playas del Pacífico mexicano, en el pie de la montaña La Becerra en Cuatro Ciénegas en Coahuila, en Tepoztlán en Morelos y de una hormiga colectada en Chiapas.

Las especies se cultivaron a mediana escala en un medio sólido compuesto por arroz y se obtuvieron sus extractos orgánicos. Éstos fueron sometidos a un estudio químico biodirigido, empleando como ensayo de monitoreo, la evaluación de su potencial antimicrobiano contra una serie de bacterias pertenecientes al grupo ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*.

Los extractos de los organismos identificados uno del orden *Hypocreales* (ORO2) y el otro perteneciente al género *Alfaria* (ORO3), fueron sujetos a procesos de separación y purificación de sus principios activos mediante técnicas cromatográficas de vanguardia. Así, a partir del hongo ORO2, se obtuvieron una serie de compuestos de tipo tricotecenos (**1-3**) e isocumarinas (**4-5**), además de una serie de peptabióticos conocidos como neofrapeptinas (**6-11**). Por otra parte, del hongo ORO3 se aisló una isocumarina novedosa (**12**) y una serie de fenilespirodrimanos (**13-19**), siendo cinco de estos novedosos. La determinación estructural de todos los productos se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Finalmente, algunos de los compuestos mostraron una importante actividad antimicrobiana contra las cepas *S. aureus* susceptible y resistente a metilina.

Así, los estudios químicos y biológicos realizados durante este proyecto contribuyen de forma importante al conocimiento de la biodiversidad de especies fúngicas del país y su capacidad de producir compuestos bioactivos que sirvan de inspiración para el desarrollo de nuevos fármacos.

## ABSTRACT

As part of a multidisciplinary research project focused on the discovery of new natural products with antimicrobial activity from fungi isolated from unexplored habitats in Mexico, a chemical and biological study of 15 isolates collected from beaches in the Mexican Pacific, at the base of La Becerra mountain in Cuatro Ciénegas, Coahuila, in Tepoztlán, Morelos, and from an ant collected in Chiapas.

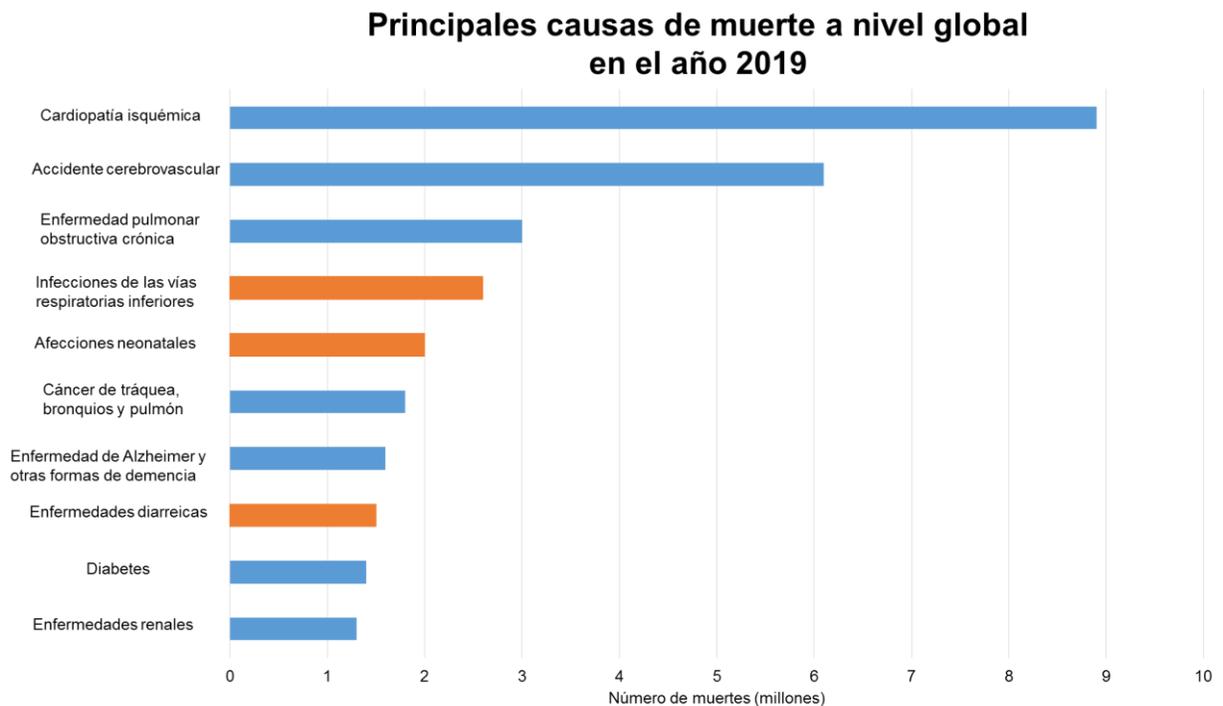
Fungi were grown in rice medium (medium scale) and its organic extracts were tested against bacteria from the ESKAPE group (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter cloacae*). The extracts of the organisms, one identified within the order *Hypocreales* (ORO2) and other from the genus *Alfaria* (ORO3), were subjected to a bioactive-guided fractionation study. From the ORO2 species, a series of trichothecene-type compounds (**1-3**), isocoumarins (**4-5**), and several peptabiotics known as neoefrapeptins (**6-11**) were identified. From ORO3, a novel isocoumarin (**12**) and a series of phenylspirodrimanes derivatives (**13-19**), five of these were new, were isolated and characterized. The structure of all isolates was established by spectroscopic and spectrometric techniques. Finally, some of these compounds showed significant antimicrobial activity against methicillin-susceptible and resistant *S. aureus* strains.

Overall, the chemical and biological studies carried out during this project contribute to the knowledge of the fungal biodiversity of Mexico, and the ability of these species to produce bioactive compounds that could serve as prototypes for the development of new antimicrobial drugs.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedades infecciosas

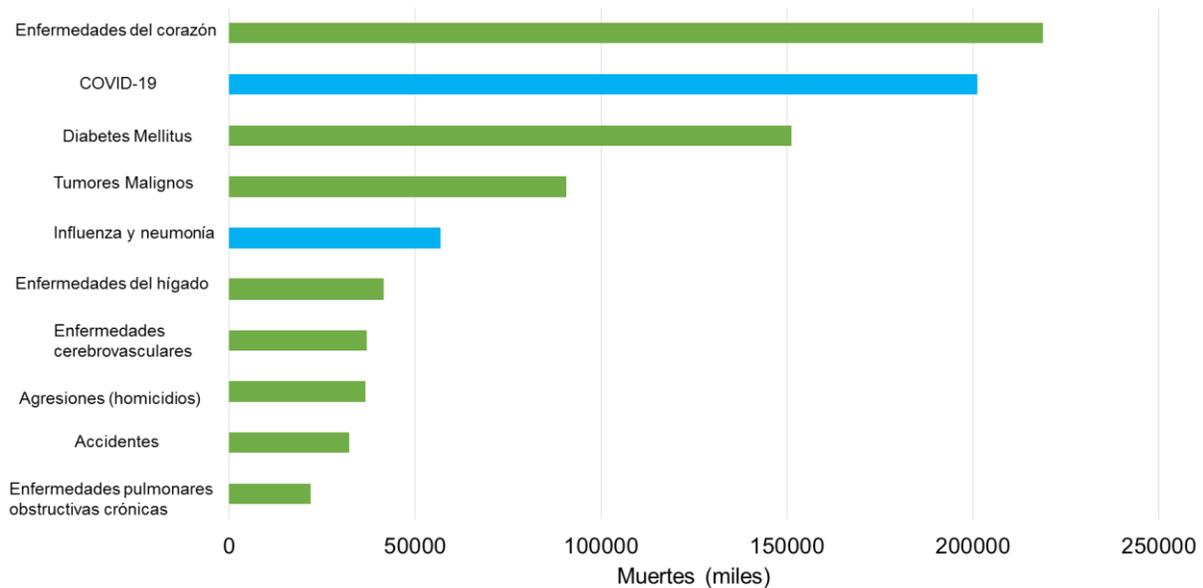
Las enfermedades infecciosas se definen como aquellas causadas por un agente patogénico específico o los productos tóxicos del mismo.<sup>1</sup> Estos agentes pueden ser bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microorganismos que pueden transmitirse de manera directa o indirecta de un individuo a otro.<sup>2, 3</sup> De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), las enfermedades infecciosas formaron parte de las 10 principales causas de muerte en el 2019, destacando entre éstas las infecciones de vías respiratorias inferiores, las afecciones neonatales y las enfermedades diarreicas (**Figura 1**).<sup>4</sup>



**Figura 1.** Principales causas de muerte a nivel global en el año 2019.<sup>4</sup> En color naranja se muestran aquellas debidas a procesos infecciosos.

En México, las enfermedades infecciosas fueron la segunda y quinta causa de muerte en el año 2020 (**Figura 2**).<sup>5</sup> Así mismo, dichas enfermedades son las tres principales causas de morbilidad a nivel nacional, donde las infecciones respiratorias agudas ocupan la primer posición, seguida de las intestinales y las urinarias.<sup>6</sup>

## Principales causas de muerte en México en el año 2020



**Figura 2.** Principales causas de muerte en México en el año 2020.<sup>5</sup> En color azul se muestran aquellas debidas a procesos infecciosos.

Cabe destacar que las enfermedades infecciosas no solo afectan directamente a la salud de las personas, si no también tienen implicaciones sociales, políticas y económicas en los sectores de salud, la industria, el turismo, el sector agrícola, entre otros.<sup>7, 8</sup>

Dentro de los diversos agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas, las bacterias han sido causantes de millones de muertes a lo largo de la historia de la humanidad, a pesar de que solo un pequeño porcentaje de estos organismos causan infecciones y enfermedades.<sup>9</sup> Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria causante de la tuberculosis, provocó la muerte de 1.5 millones de personas a nivel mundial en el año 2020.<sup>10</sup> Otra bacteria de gran relevancia por causar la muerte de aproximadamente 335 mil niños menores de 5 años en el 2015, es *Streptococcus pneumoniae*, uno de los agentes etiológicos de la neumonía bacteriana, meningitis y sepsis.<sup>11</sup>

A pesar de la mortandad, las infecciones bacterianas son fáciles de tratar debido a la existencia de diversos agentes antimicrobianos.<sup>9</sup> Sin embargo, la resistencia bacteriana a dichos agentes es un problema que hoy en día está en aumento y que está tendiendo consecuencias potencialmente devastadoras.

## 1.2 Resistencia antimicrobiana

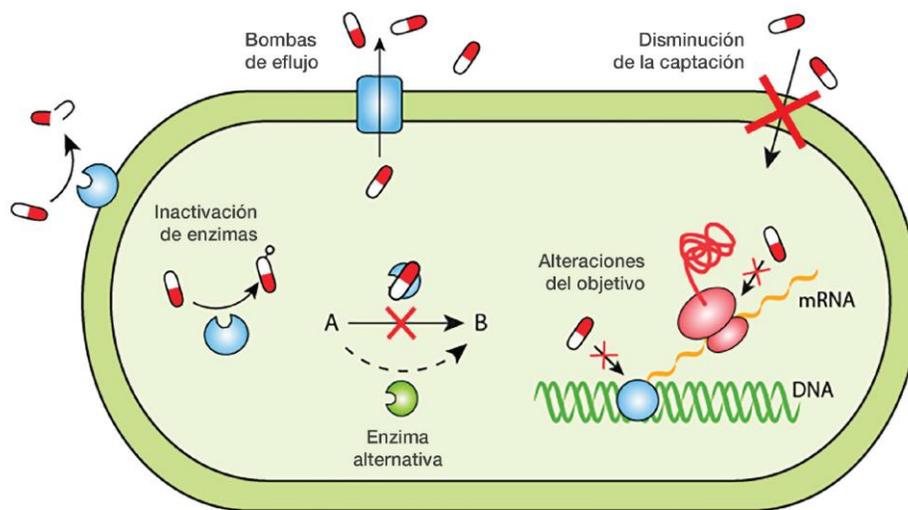
Los antibióticos son el medicamento que se receta con mayor frecuencia en el mundo<sup>12</sup>. Su función se ha expandido desde el tratamiento de infecciones graves, prevenir infecciones en pacientes quirúrgicos, proteger a los pacientes con cáncer y a las personas con sistemas inmunes comprometidos, así como para promover el crecimiento y prevenir enfermedades en el ganado y otros animales destinados a la alimentación.<sup>13,14</sup>

Desde su introducción en la década de 1940, los antibióticos han sido fundamentales para la atención médica moderna debido a que estos permitieron el manejo y el tratamiento de enfermedades como la tuberculosis, la neumonía bacteriana, la sepsis, etc., lo que condujo a una mejor supervivencia y resultados en los pacientes.<sup>15</sup> Hoy en día, las infecciones que alguna vez fueron tratables se están volviendo difíciles de curar, debido a un aumento del fenómeno conocido como resistencia antimicrobiana.

La resistencia antimicrobiana ocurre cuando las bacterias desarrollan la capacidad de evadir el efecto de los antibióticos diseñados para combatirlos, es decir, crecen en presencia de éstos.<sup>16</sup> Este fenómeno deriva de cambios en el genoma de los microorganismos, lo que les permite sobrevivir en medio en medios o ambientes donde los antibióticos se encuentran presentes<sup>17</sup>. Algunos de los mecanismos descritos para la resistencia son la formación de barreras celulares que impiden la entrada o absorción del antimicrobiano; cambios en los sistemas de expulsión de fármacos, alteraciones en los bancos de acción de los antibióticos, o sobreexpresión de enzimas que inactivan estos agentes( **Figura 3**).<sup>18, 19</sup> Cabe mencionar que estos procesos se ha acelerado en años recientes debido a un incremento en el uso inadecuado de los antibióticos y la presión selectiva que ejercen éstos a los microorganismos, lo que permite la propagación de mutaciones que promueven la supervivencia de las bacterias (resistencia adquirida).<sup>15</sup> Como consecuencia de todo esto, los antibióticos se vuelven ineficaces.

El fenómeno antes descrito ha llamado la atención a los distintos sectores de la sociedad, debido a que las infecciones bacterianas son cada día más frecuentes, y las estimaciones

indican que año con año alrededor de 700,000 personas mueren de infecciones causadas por bacterias resistentes.<sup>20</sup> Además, dichas infecciones tienen un gran impacto económico debido a que son significativamente más costosas para los sistemas de salud, dado a estadías hospitalarias más prolongadas y/o tratamientos más intensivos y costosos.<sup>21</sup> El *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de los Estados Unidos, estima que el costo de la resistencia a los antimicrobianos en ese país es de \$55 billones de dólares cada año, de los cuales \$20 billones son para la atención médica y \$35 billones por la pérdida de productividad. Aunado a esto, se estima que el costo de la resistencia antimicrobiana a nivel mundial para el año 2050 será aproximadamente de \$100-210 billones de dólares.<sup>22, 23</sup>

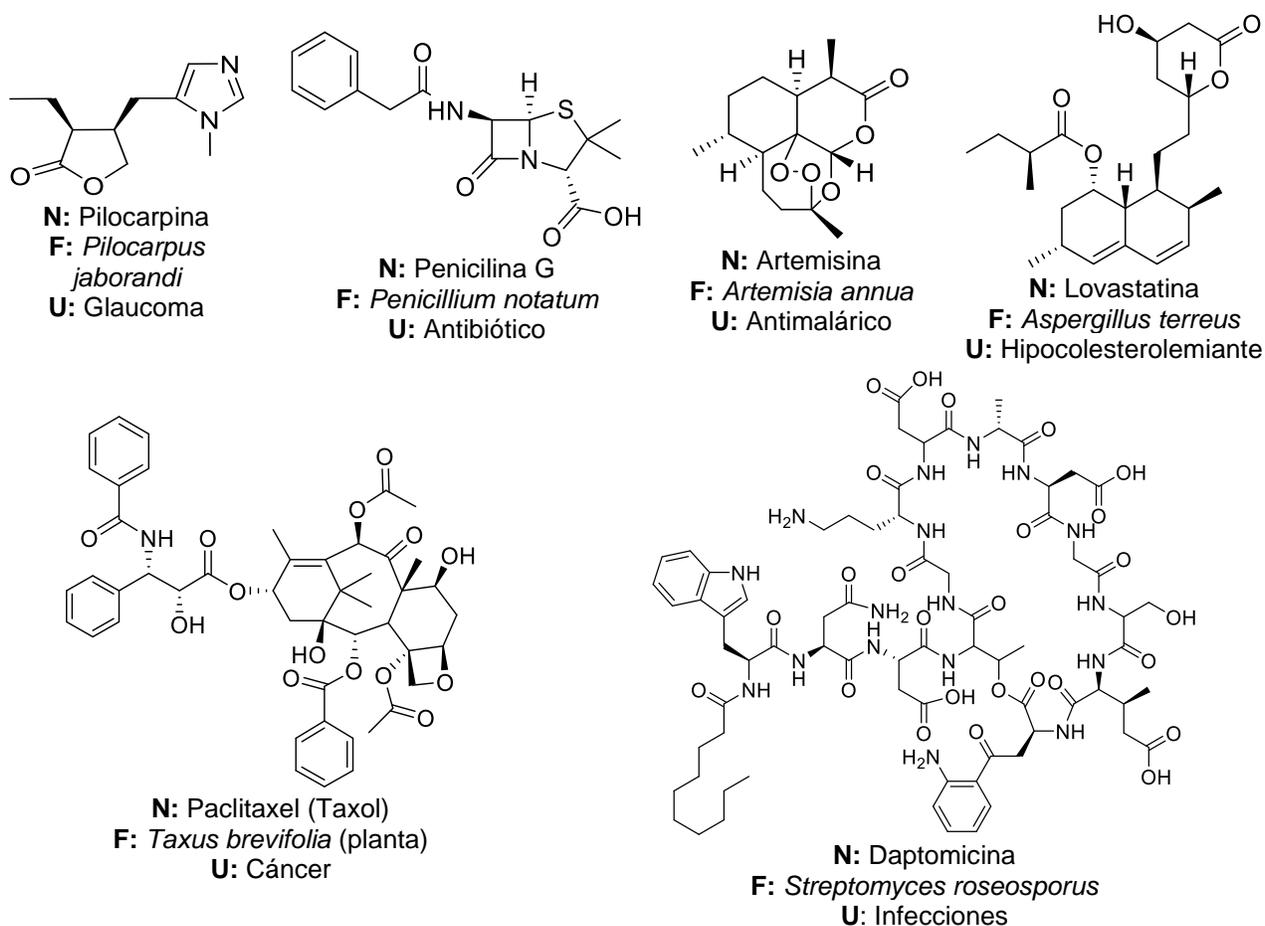


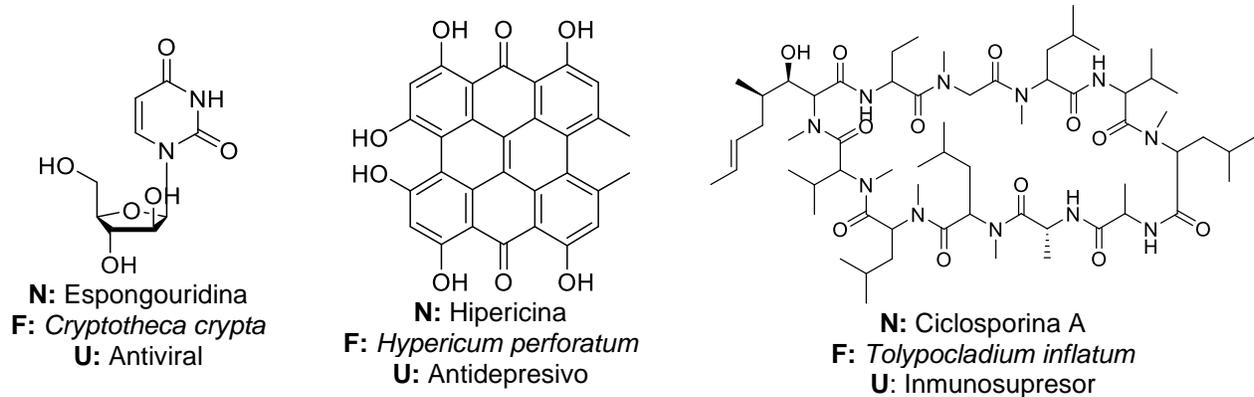
**Figura 3.** Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.<sup>22</sup>

En el año 2017, la OMS publicó una lista de patógenos hacia los que se necesita orientar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos con urgencia. Dentro de esta amplia lista, los microorganismos agrupados bajo el acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y algunas especies del género *Enterobacter*) fueron designados como "estado de prioridad".<sup>24</sup> Estos organismos son responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales y de aproximadamente 23,000 muertes por año,<sup>25</sup> además de poseer la capacidad para adquirir y diseminar diversos genes de resistencia<sup>26</sup> y evitar la capacidad biocida de más de un agente antimicrobiano.<sup>27</sup>

### 1.3 Microorganismos como fuente de antibióticos

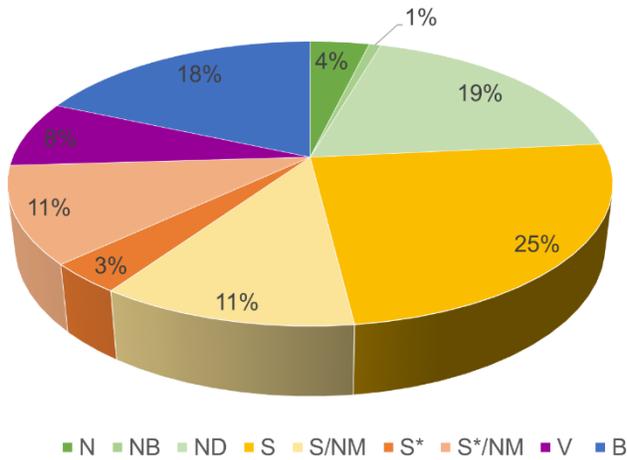
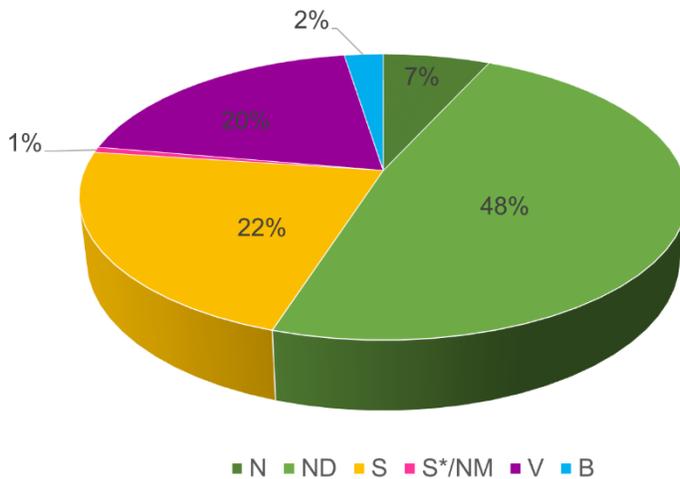
Las bacterias, los hongos y las plantas son los principales productores de moléculas con bajo peso molecular (<1500 Da), que presentan diversas funciones, principalmente les ayudan a sobrevivir en el medio ambiente donde se encuentran.<sup>28</sup> Estas moléculas se conocen como metabolitos secundarios, metabolitos especializados, o simplemente como productos naturales (PNs). Sin duda estas sustancias han sido una fuente importante de numerosos fármacos con estructuras químicas y actividades biológicas diversas, y/o de inspiración para el desarrollo de otros fármacos más eficaces (**Figura 4**).<sup>29-31</sup>





**Figura 4.** Ejemplos selectos de fármacos y PNs con actividad biológica (N, nombre; F, fuente natural; U, uso).<sup>29-32</sup>

Hoy en día, de las nuevas entidades químicas (NEQs) aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos para uso medicinal, aproximadamente el 70 % son PNs, derivados de éstos o moléculas sintéticas que mimetizan un PNs. En el caso particular de los fármacos para el tratamiento de infecciones, el 60% de los aprobados corresponden a estas mismas categorías (**Figura 5**).<sup>32</sup>

**A****B****Abreviaciones:****N:** producto natural**NB:** producto natural botánico**ND:** derivado de un producto natural**S:** sintético**S/NM:** sintético que mimetiza un producto natural**S\*:** sintético y el farmacóforo es un producto natural**S\*/NM:** sintético el farmacóforo es un producto natural y mimetiza un producto natural**V:** vacuna**B:** biológico

**Figura 5.** Nuevas entidades químicas aprobadas por la FDA para uso medicinal **(A)** y medicamentos con actividad antimicrobiana entre 1981 y 2019 **(B)**.<sup>32</sup>

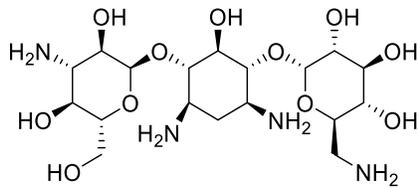
En particular, los hongos y las bacterias son considerados la principal fuente de obtención de los PNs con actividad antimicrobiana.<sup>33</sup> El uso de estos microorganismos para tratar infecciones data de al menos 1500 años a.C., en donde se hace referencia al uso de hongos para el tratamiento de heridas infectadas.<sup>34</sup>

El descubrimiento de la penicilina a partir del moho *Penicillium notatum* en 1929 por Alexander Fleming, dio origen a una era completamente nueva en la quimioterapia de las infecciones, cambiando así la calidad y expectativa de vida humana.<sup>35</sup> Para finales de la década de 1930, Selman Waksman comenzó un estudio sistemático en diversos microorganismos para determinar su potencial como productores de compuestos antimicrobianos.<sup>36</sup> Ambos eventos condujeron al inicio de la “era dorada de los antibióticos” (1950-1960) donde la mayoría de

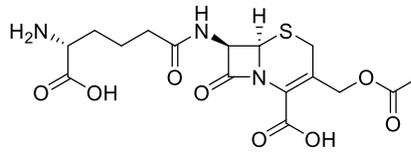
las clases de antibióticos que usamos como medicamentos hoy en día, fueron descubiertas e introducidas en el mercado.<sup>30</sup> Actualmente, las clases más importantes de antibióticos son las penicilinas, las cefalosporinas, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, los macrólidos, los polienos, los glicopéptidos, entre otros (**Tabla 1, Figura 6**).<sup>37</sup> De los antibióticos utilizados en la clínica y que son producidos por microorganismos, más de la mitad fueron descubiertos de actinomicetos, del 10 al 15% de bacterias no filamentosas, y alrededor del 20% de hongos filamentosos.<sup>36</sup>

**Tabla 1.** Clases y fuente de obtención de algunos antibióticos utilizados clínicamente.<sup>36</sup>

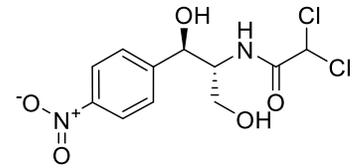
Clase	Descubrimiento	Introducción a la clínica	Ejemplo y organismo productor
<b>Antibióticos producidos por actinomicetos</b>			
Aminoglucósidos	1944	1946	Kanamicina A ( <i>Streptomyces kanamyceticus</i> )
Anfenicoles	1947	1949	Cloranfenicol ( <i>S. venezuelae</i> )
Tetraciclinas	1948	1948	Tetraciclina ( <i>S. aureofaciens</i> )
Tuberactinomicinas	1951	1953	Viomicina ( <i>S. puniceus</i> )
Macrólidos	1952	1952	Eritromicina ( <i>Saccharopolyspora erythraea</i> )
Estreptograminas	1953	1965	Pristinamicina ( <i>S. pristinaespiralis</i> )
Glicopéptidos	1954	1958	Vancomicina ( <i>Amycolatopsis orientalis</i> )
Cicloserinas	1955	1964	Seromicina ( <i>S. orchidaceus</i> )
Ansamincinas	1959	1963	Rifamicina ( <i>A. rifamycinica</i> )
Lincosamidas	1962	1963	Clindamicina, derivado sintético de la lincomicina ( <i>S. lincolnensis</i> )
Fosfonatos	1969	1971	Fosfomicina ( <i>S. fradiae</i> )
Lipiarmincinas	1975	2011	Fidaxomicina ( <i>Dactylosporangium aurantiacum</i> )
Carbapenos	1976	1985	Meropenem, derivado sintético de la tienamicina ( <i>S. cattleya</i> )
Lipopéptidos	1987	2003	Daptomicina ( <i>S. roseosporus</i> )
<b>Antibióticos producidos por hongos</b>			
Penicilinas	1928	1943	Penicilina G ( <i>P. notatum</i> )
Cefalosporinas	1948	1964	Cefalosporina C ( <i>C. acremonium</i> )
Pleuromutilinas	1951	2007	Retapamulina, derivado sintético de la Pleuromutilina ( <i>Pleurotus mutilus</i> )
Eniantinas	1953	1963	Fusafungina ( <i>F. lateritium</i> )
Esteroides	1958	1962	Ácido fusídico ( <i>Fusidium coccineum</i> )
<b>Antibióticos producidos por bacterias no filamentosas</b>			
Polipéptidos	1939	1941	Gramicidina A ( <i>B. brevis</i> )
Bacitracinas	1945	1948	Bacitracina A ( <i>B. subtilis</i> )
Polimixinas	1950	1958	Colistina ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )
Mupirocinas	1971	1985	Mupirocina ( <i>P. fluorescens</i> )
Monobactanos	1981	1986	Aztreonam, molécula sintética basada en SQ 26, 80 ( <i>Chromobacterium violaceum</i> )



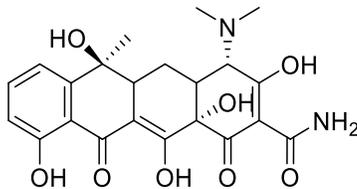
**Aminoglucósidos**  
Kanamicina A



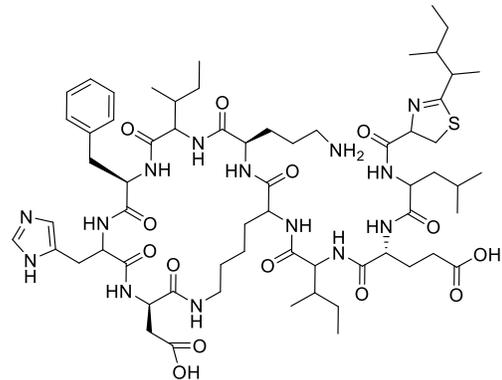
**Cefalosporinas**  
Cefalosporina C



**Anfenicoles**  
Cloranfenicol



**Tetraciclinas**  
Tetraciclina



**Bacitracinas**  
Bacitracina A

**Figura 6.** Ejemplos selectos de clases de PNs con actividad antimicrobiana.<sup>36,37</sup>

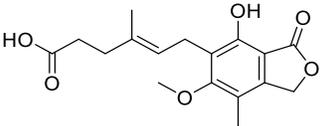
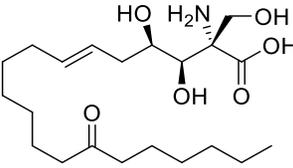
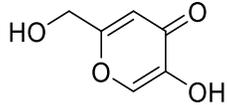
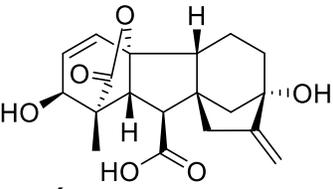
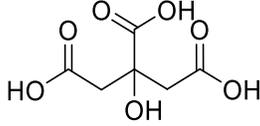
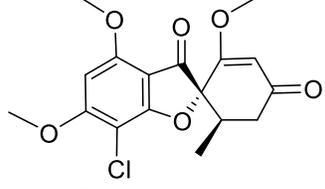
## 1.4 Importancia de los hongos en la producción de antibióticos

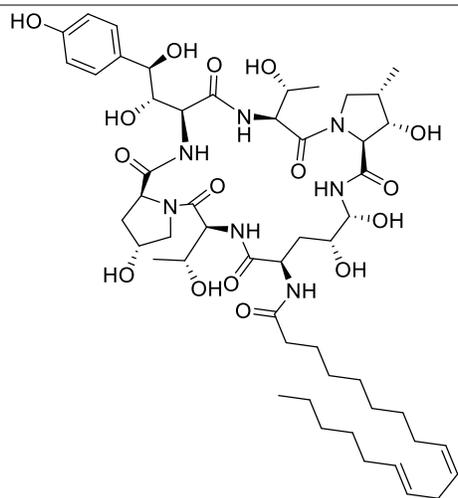
Los hongos son organismos eucariontes y heterótrofos con pared celular que contiene quitina.<sup>38</sup> Estos organismos tienen un papel clave en los ecosistemas como descomponedores, mutualistas y patógenos, aunque en la mayoría de los casos, su rol individual en la naturaleza aún se desconoce.<sup>39</sup> Actualmente se han identificado alrededor de 148,000 especies fúngicas en el mundo, aunque se cree que más del 90% de las especies siguen siendo desconocidas, ya que se estima hay entre 2.2 y 5 millones de especies de hongos en la Tierra.<sup>40</sup>

Los hongos se clasifican en dos grupos principales, aquellos que obtienen sus nutrientes a partir de organismos vivos (parásitos y mutualistas) y los que tienen la capacidad de degradar la materia orgánica (saprofitos). Independientemente del grupo en el que se encuentren, todos los hongos producen metabolitos secundarios, principalmente en la fase estacionaria de su crecimiento.<sup>40</sup>

Los PN de origen fúngico han mostrado una gran importancia económica, comercial y biotecnológica, como fármacos (antibióticos, reguladores del colesterol, inmunosupresores y antitumorales, etc.) o de utilidad en la agricultura (agentes de control de plagas) (**Figuras 4 y 6 y Tablas 1 y 2**). Por otra parte, de todos los PN aislados hasta el año 2015 aproximadamente 8360 compuestos mostraron alguna actividad biológica (antibacteriana, antifúngica o antitumoral).<sup>41, 42</sup>

**Tabla 2.** Ejemplo de metabolitos secundarios sintetizados por organismos fúngicos y sus aplicaciones.

Metabolito	Ejemplo de hongo productor	Uso
 <p><b>Ácido micofenólico</b></p>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Inmunosupresor empleado en la prevención del rechazo de órganos en trasplantes
 <p><b>Miriocina</b></p>	<i>Isaria sinclairii</i>	Base para el desarrollo del fingolimod empleado en el tratamiento de la esclerosis múltiple
 <p><b>Ácido kójico</b></p>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Antioxidante en productos cosméticos
 <p><b>Ácido gliberéico</b></p>	<i>Fusarium fujikuroi</i>	Hormona de crecimiento vegetal
 <p><b>Ácido cítrico</b></p>	<i>Aspergillus niger</i>	Productos medicinales y alimenticios
 <p><b>Griseofulvina</b></p>	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Tratamiento de infecciones tópicas contra hongos



*Aspergillus pachycristatus*

Tratamiento de infecciones  
fúngicas sistémicas

---

### Equinocandina B

---

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años, el espectro de microorganismos resistentes a diferentes antibióticos comerciales ha incrementado, por lo que uno de los objetivos para frenar el fenómeno de la resistencia antimicrobiana es encontrar o sintetizar nuevas clases de antibióticos. En este sentido las fuentes naturales son la mejor opción para la obtención de PNs con actividad antimicrobiana, en particular las especies fúngicas, debido a que han sido poco estudiadas desde el punto de vista químico. Se estima que solo el 7% del total de las especies ha sido estudiado con tales fines, por lo que existe la posibilidad de encontrar PNs novedosos con actividad antimicrobiana a partir de éstas.<sup>43</sup>

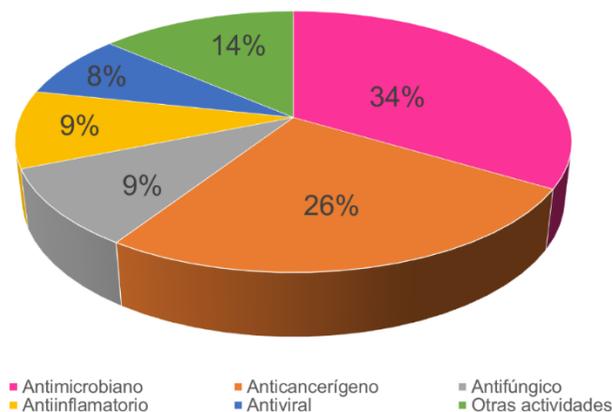
### 1.5 Hábitats con condiciones extremas como fuente de PNs con actividad antimicrobiana

La búsqueda de NEQs con actividad antimicrobiana que evadan los mecanismos de resistencia de los microorganismos, es sin lugar a duda una estrategia que numerosos centros de investigación, universidades y pequeñas industrias han continuado realizando para combatir el fenómeno de multiresistencia.<sup>39</sup> Para ello, se requiere de una mayor comprensión de la naturaleza y del alcance de la diversidad microbiana en los hábitats naturales, que junto con la aplicación de nuevas tecnologías en microbiología y química, permitan el descubrimiento de dichas moléculas biodinámicas con propiedades terapéuticas.<sup>45</sup>

Uno de los métodos para la obtención de estas sustancias es a partir de microorganismos que habitan ecosistemas poco explorados y con condiciones ambientales extremas, por

ejemplo, en regiones polares, fuentes hidrotermales, áreas marinas de alta presión o salinidad, etc., bajo la premisa de que los factores ambientales promoverán la síntesis de nuevos metabolitos secundarios que favorezcan su supervivencia y adaptación (**Figura 7**).<sup>45</sup>,

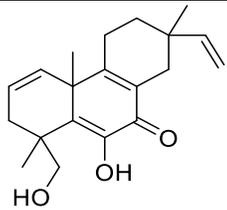
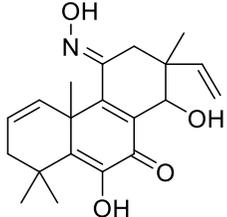
46

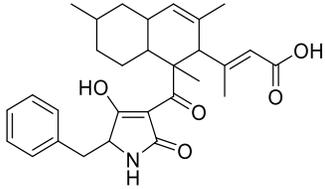
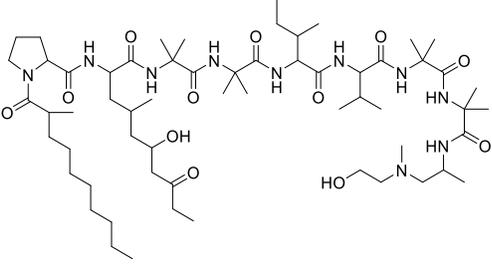
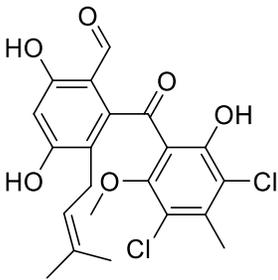


**Figura 7.** Actividad biológica de metabolitos producidos por microorganismos aislados de hábitats extremos<sup>45</sup>.

Los hongos de ambientes extremos son, por lo tanto, buenos candidatos potenciales para el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos, particularmente con actividad antimicrobiana.<sup>47</sup> En la **Tabla 3** podemos observar algunos ejemplos de PN con actividad antimicrobiana aislados a partir de hongos que habitan hábitats extremos.<sup>45, 48</sup>

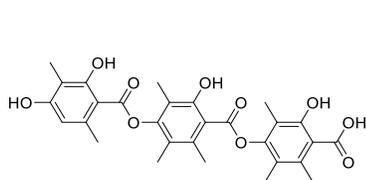
**Tabla 3.** Ejemplos de PN con actividad antimicrobiana aislados a partir de hongos de hábitats extremos.<sup>45-48</sup>

Producto natural	Hongo	Actividad	Lugar de aislamiento
 <b>Libertelenona G</b>	<i>Eutypella</i> sp.	Actividad contra bacterias Gram + y Gram -	Suelo Ártico
	<i>Eutypella</i> sp.	Actividad contra bacterias Gram + y Gram -	Suelo Ártico

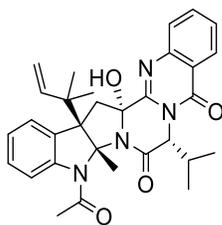
<b>Eutipenoide B</b>			
	<i>Lindgomycetaceae</i>	Actividad contra <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	Aislado de una esponja del Ártico
<b>Lindgomicina</b>			
<hr/>			
	<i>Trichoderma</i> sp.	Actividad contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	Aislado de una esponja marina
<b>Tricoderina A</b>			
<hr/>			
	<i>Pestalotia</i> sp.	Actividad contra MRSA y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina	Aislado de una alga marina
<b>Pestalona</b>			

## 1.6 México, un país megadiverso

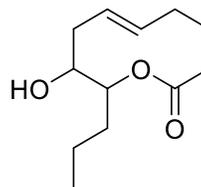
México es un país megadiverso que alberga cerca del 10% de las especies registradas en el mundo, gran parte de ellas endémicas.<sup>49</sup> En el caso de los organismos fúngicos, se estima que en nuestro país existen más de 200,000 especies, aunque sólo se han aislado e identificado alrededor del 5% de éstas.<sup>50</sup> En los últimos años se han realizado diversos estudios de bioprospección de hongos de México obteniéndose numerosos PNs bioactivos (**Figura 8**).<sup>51-53</sup>



**Tielavina A**

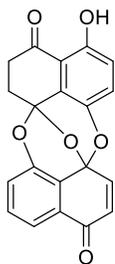


**Alboluteína A**



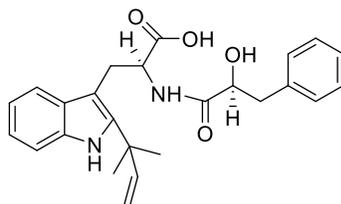
**Herbarumina III**

Inhibidor de alfa-glucosidasa



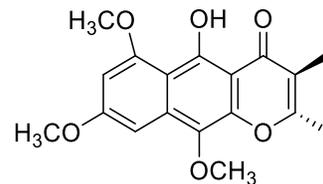
**Preussomerin EG<sub>1</sub>**  
Antifúngico y antioomiceto

Inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa 1B



**Ácido 4,9-dideoxi-seco-PF1233 B carboxílico**  
Inhibidor de la glicoproteína P

Inhibidor de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina.



**2,3-dihidro-5-hidroxi-6, 8, 10-trimetoxi-2,3-dimetil-4H-nafto [2,3-b] piran-4-ona.**  
Fitotóxico

**Figura 8.** Ejemplos selectos de PNs bioactivos obtenidos a partir de organismos fúngicos en México.<sup>51-53</sup>

## **2. HIPÓTESIS**

El estudio químico biodirigido de hongos aislados de regiones con condiciones extremas en México, como en la zona intermareal de las playas de Oro y la Bahía de Manzanillo en Colima, o la Bahía de Caleta en Guerrero, por mencionar algunos sitios, permitirá el descubrimiento de metabolitos secundarios con una diversidad química estructural inusual y/o posible aplicación en la terapéutica contra bacterias resistentes a antibióticos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este proyecto es descubrir nuevos PNs con actividad antimicrobiana contra bacterias del grupo ESKAPE a partir de organismos fúngicos obtenidos de diversos hábitats de México.

### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer la viabilidad y pureza de una serie de taxones fúngicos obtenidos de muestras colectadas de regiones inexploradas de México.
2. Cultivar cada cepa en medio sólido y obtener sus correspondientes extractos orgánicos mediante técnicas de maceración y reparto.
3. Establecer el potencial antimicrobiano de los extractos contra bacterias del grupo ESKAPE.
4. Realizar el estudio químico biodirigido de los taxones más activos mediante técnicas cromatográficas convencionales y ensayos biológicos de monitoreo.
5. Caracterizar a los metabolitos mayoritarios y minoritarios presentes en las fracciones activas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia, y establecer su potencial antimicrobiano.

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 4.1 Acondicionamiento e identificación de los microorganismos

Los organismos fúngicos objeto de estudio de la presente investigación fueron aislados a partir de muestras de arena (arenícolas) recolectadas en la zona intermareal de las playas de Oro y la Bahía de Manzanillo en Colima, y de la Bahía de Caleta en Acapulco en Guerrero, México. También se estudió un hongo coprófilo aislado a partir del guano del murciélago *Leptonycteris hivalis* en Tepoztlán, Morelos, México; uno hongo entomopatógeno obtenido de una hormiga encontrada en Chiapas, México; y un hongo saprófito aislado a partir de muestras de suelo en el pie de la montaña La Becerra en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México (Tabla 4).

**Tabla 4.** Identificación interna de los organismos de estudio y su sitio de colecta.

Organismo (código interno)	Lugar de colecta	Organismo (código interno)	Lugar de colecta
ORO1 <sup>a</sup>	Playa del Oro, Colima	ACA17 <sup>a</sup>	Acapulco, Guerrero
ORO2 <sup>a</sup>	Playa del Oro, Colima	ACA20 <sup>a</sup>	Acapulco, Guerrero
ORO3 <sup>a</sup>	Playa del Oro, Colima	ZL01 <sup>a</sup>	Bahía de Manzanillo, Colima
ORO4 <sup>a</sup>	Playa del Oro, Colima	ZL012 <sup>a</sup>	Bahía de Manzanillo, Colima
ACA1 <sup>a</sup>	Acapulco, Guerrero	CC6-15 <sup>b</sup>	Cuatro Ciénegas, Coahuila
ACA3 <sup>a</sup>	Acapulco, Guerrero	GH14 <sup>a</sup>	Aislado de hormiga, Chiapas
ACA4 <sup>a</sup>	Acapulco, Guerrero	GUANO <sup>a</sup>	Tepoztlán, Morelos
ACA11 <sup>a</sup>	Acapulco, Guerrero		

<sup>a</sup> Proporcionados por la Dra. María del Carmen González Villaseñor del IB, UNAM

<sup>b</sup> Aislado en el grupo de trabajo del Dr. Mario Figueroa.

De manera general, a partir de los cultivos axénicos en cajas de Petri con medio APD (agar papa dextrosa) de cada organismo, se hicieron transferencias en cajas con medio fresco y se incubaron por 7 días a temperatura ambiente (TA) hasta observar un crecimiento homogéneo de las colonias. Posteriormente, con estos cultivos se procedió a preparar los pre inóculos en medio YESD (15 mL, 1% de extracto de levadura, 2% de peptona de soya y 2% de dextrosa) para los cultivos en medio sólido, y a la extracción de su ADN genómico para la identificación taxonómica de las cepas. Brevemente, este último paso se realizó mediante la comparación por BLAST de las secuencias amplificadas de la región del espaciador de transcripción interno (ITS) con aquellas contenidas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esta actividad fue realizada con el apoyo de la investigadora postdoctoral

Anahí Martínez Cárdenas, de la Facultad de Química, UNAM, y del Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EUA.

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

Los cultivos en mediana escala para los estudios químicos y biológicos se realizaron en medio sólido de arroz húmedo (15 g de arroz y 30 mL de agua en matraces Erlenmeyer de 250 mL) a partir de los preinóculos en medio YESD, los cuales se mantuvieron en agitación constante (100 rpm) durante 5 días a TA. Al cabo de este periodo, los inóculos fueron vertidos sobre el sustrato sólido (10 matraces por organismo) y se dejaron crecer por 21 días a TA con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas. Por otra parte, los hongos arenícolas se cultivaron en presencia y en ausencia de sales marinas artificiales (*Instant Ocean Salts*, 32 g/L, 5 matraces por condición), con la finalidad de poder comparar sus perfiles metabólicos y actividad biológica bajo estas condiciones de crecimiento.

La preparación de los extractos orgánicos se realizó mediante procesos de maceración y reparto. En primer lugar, se adicionaron 60 mL de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) a cada matraz y luego se fragmentó el cultivo (biomasa y sustrato remanente) con la ayuda de una espátula. La suspensión resultante se mantuvo en agitación constante (100 rpm) durante 8 horas, se filtró al vacío y al filtrado se agregaron 60 mL de  $\text{CHCl}_3$  y agua hasta un volumen final de 200 mL. La fase orgánica se separó en un embudo de separación y la fase acuosa se extrajo de nuevo utilizando 60 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Las fases orgánicas se reunieron y concentraron a sequedad a presión reducida. Finalmente, la fase orgánica se resuspendió con 60 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -MeOH (1:1) y se sometió a un proceso de desengrase con 60 mL de hexano. El extracto de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -MeOH secó al vacío y se almacenó a temperatura ambiente.

## **4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Todos los extractos orgánicos, fracciones primarias y compuestos puros se evaluaron en el ensayo de actividad antimicrobiana empleado el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en placas de 96 pozos. Las

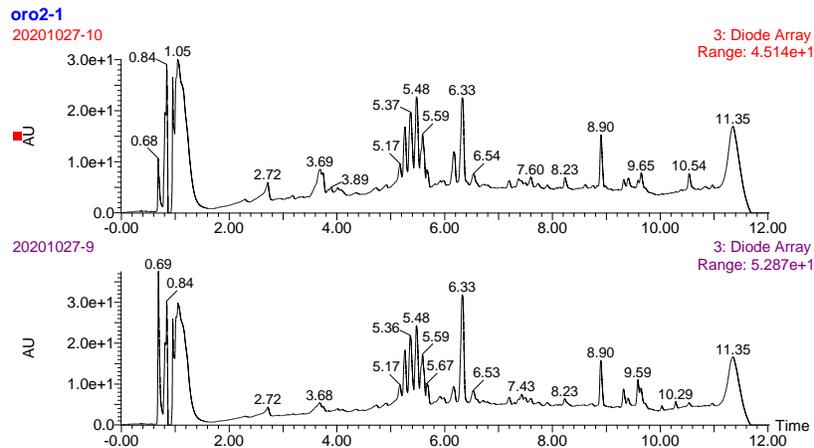
bacterias de prueba pertenecen al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *E. faecalis* ATCC 51299 resistente a vancomicina; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 susceptible a meticilina, MSSA; *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina, MRSA; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978; *A. baumannii* cepa 564 resistente a diversos antibióticos; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *K. aerogenes* ATCC 13048; y *E. cloacae* ATCC 700323).

Los microorganismos fueron proporcionados por el cepario de la FQ, UNAM y por el Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM. Los medios de cultivo empleados en el ensayo fueron caldo Müller-Hinton y Luria-Bertani, y como controles positivos se emplearon a los antimicrobianos ampicilina, gentamicina y vancomicina. En primer lugar se estableció la concentración mínima inhibitoria (CIM) de cada uno de los antibióticos siguiendo los protocolos ampliamente establecidos.<sup>49</sup> Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos, fracciones y compuestos. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado en el caso de extractos y fracciones a 20 y 200 µg/mL, y por duplicado para los compuestos puros a 10, 50 y 100 µg/mL. Brevemente, se colocaron en los pozos 50 µL de la solución de cada muestra a las concentraciones de 1 y 0.1 mg/mL (10% de DMSO en medio de cultivo) en el caso de los extractos y fracciones y de 0.5, 0.25 y 0.05 mg/mL (10% de DMSO en medio de cultivo) para compuestos puros. Luego se adicionaron 100 µL de medio de cultivo y 100 µL de una suspensión del microorganismo en solución salina ajustada al 0.5 del estándar de McFarland (1.5×10<sup>8</sup> CFU/mL); enseguida la placa se incubó durante 24 horas a 37°C. Al término del periodo de incubación, se adicionaron a cada pozo 10 µL del colorante MTT (5 mg/mL en MeOH) y la placa se incubó nuevamente durante 30 min a 37°C. La actividad de los extractos y fracciones se determinó de manera cualitativa mediante el grado de intensidad del color del MTT y que está relacionado con inhibición del crecimiento de los microorganismos. En el caso de los compuestos puros, la actividad se determinó midiendo la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 490 nm y 608 nm en un espectrofotómetro. El % de inhibición del crecimiento se determinó utilizando la siguiente fórmula.

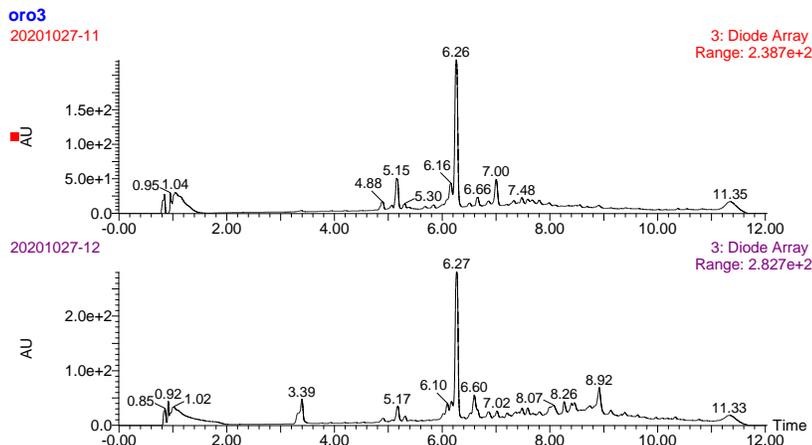
$$\% \text{ de Inhibición} = \left( 100 - \frac{\text{Abs células + muestra} - \text{Abs blanco}}{\text{Abs de células con DMSO al 10\%} - \text{Abs de blanco}} \right) * 100$$

#### 4.4 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala

A partir de los resultados de la actividad antimicrobiana, se seleccionó a los hongos con las claves ORO2 y ORO3 para su estudio químico biodirigido. Debido a que ambos hongos fueron cultivados en medios enriquecidos con sales o sin sales marinas artificiales, se analizó de manera preliminar su contenido metabólico en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) equipado con un detector PDA, y acoplado con un espectrómetro de masas de alta resolución de ionización por electrospray (HRESIMS). En las **Figuras 9 y 10**, se muestran la comparación de los cromatogramas obtenidos para cada organismo, y debido a que no se encontraron diferencias significativas en los perfiles obtenidos, se decidió juntar extractos de cada organismo en las dos condiciones de crecimiento para su fraccionamiento primario.



**Figura 9.** Comparación de los cromatogramas (UV  $\lambda$  190-500 nm) de los extractos del hongo ORO2 sin sales (arriba) y con sales (abajo).



**Figura 10.** Comparación de los cromatogramas (UV  $\lambda$  190-500 nm) de los extractos del hongo ORO3 sin sales (arriba) y con sales (abajo).

El fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala se realizó en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen, equipado con una bomba binaria, detectores de UV/visible con arreglo de fotodiodos (PDA) y de dispersión de luz evaporativo (ELSD) y un colector de fracciones. La separación se realizó en una columna empacada con gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil se emplearon gradientes de polaridad creciente entre mezclas de hexano, cloroformo, acetato de etilo y MeOH. Las condiciones generales de análisis se resumen en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo flash de los extractos de ORO2 y ORO3.

Muestra	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Tiempo de corrida (min)	Volúmenes por columna
ORO3	3.1	65	20	55	89.8	39.5
ORO2	0.9	40	15	40	69.7	58.1

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado **4.3**. Así, debido a que numerosas fracciones primarias de ambos hongos presentaron una buena actividad inhibitoria sobre algunas bacterias a ambas concentraciones de prueba, se decidió establecer su complejidad preliminar mediante su análisis en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítico.

#### **4.5. Aislamiento y purificación de las fracciones activas**

El aislamiento y purificación de algunos de los constituyentes presentes en las fracciones activas se realizó mediante HPLC a nivel preparativo. El equipo empleado está equipado con una bomba cuaternaria, inyector manual y automático, detectores de PDA ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  190-500 nm) y ELSD (ganancia 100, presión de N<sub>2</sub> 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de 75±5°C) y colector de fracciones. El control del equipo y el procesamiento y manipulación de los datos se realizó con el programa Empower versión 3.0. El establecimiento de los perfiles cromatográficos y las condiciones de separación de los compuestos se realizó en una columna Kinetex C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 4.6 mm) y como fase móvil se empleó ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B) y diferentes sistemas de elución. Una vez establecidas las condiciones de separación, se realizó el escalamiento de las

condiciones a nivel preparativo para la purificación de los compuestos. Esto se realizó en una columna Kinetex C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 21.2 mm;) con un flujo de 21.24 mL/min. Por cada inyección se utilizaron entre 20-30 mg de muestra y las todas las fracciones se llevaron a sequedad bajo una corriente de aire.

#### **4.5.1 Estudio químico del hongo ORO2**

##### **4.5.1.1 Separación de la fracción 4 (F4)**

La separación de la fracción activa F4 (150 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 40% de B por 5 min; 40% a 100% de B en 15 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (40% de B).
- Tiempo de corrida: 13 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 7.5 s.

##### **4.5.1.2 Separación de la fracción 5 (F5)**

La separación de la fracción activa F5 (22.9 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 40% de B por 5 min; 40% a 100% de B en 15 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (40% de B).
- Tiempo de corrida: 12 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 5.5 s.

### 4.5.1.3 Separación de la fracción 6 (F6)

La separación de la fracción activa F6 (60 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 40% a 100% de B en 15 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (40% de B).
- Tiempo de corrida: 21 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 11 s.

### 4.5.2 Estudio químico del hongo ORO3

#### 4.5.2.1 Fraccionamiento secundario de la fracción 7 (F7)

Debido al rendimiento obtenido de la fracción F7 (931 mg) en el fraccionamiento primario del extracto de este hongo y a su complejidad observada por HPLC a nivel analítico, se realizó un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash siguiendo las condiciones generales de análisis se resumen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo flash de la fracción F7 de ORO3.

Muestra	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Tiempo de corrida (min)	Volúmenes por columna
F7	0.72	40	25	40	72.0	60

#### 4.5.2.2 Separación de la fracción secundaria 5 (F7-5)

La separación de la fracción activa F7-5 (25 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 50% a 100% de B en 20 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (50% de B).
- Tiempo de corrida: 10 min.

- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 6 s.

#### **4.5.2.3 Separación de la fracción secundaria 6 (F7-6)**

La separación de la fracción activa F7-6 (107 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 50% a 100% de B en 20 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (50% de B).
- Tiempo de corrida: 19 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 11 s.

#### **4.5.2.4 Separación de la fracción secundaria 7 (F7-7)**

La separación de la fracción activa F7-7 (60 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 50% a 100% de B en 20 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (50% de B).
- Tiempo de corrida: 18 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 10 s.

#### **4.2.3.5 Separación de la fracción 4 (F4)**

La separación de la fracción activa F4 (40 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 50% a 100% de B en 10 min; 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (50% de B).
- Tiempo de corrida: 10 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 6 s.

#### **4.2.3.6 Separación de la fracción 13 (F13)**

La separación de la fracción activa F13 (50 mg) se realizó mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B).
- Gradiente: 35% a 70% de B en 15 min; 70% a 100% en 0.1 min, 100% de B por 5 min; y reacondicionamiento de la columna por 7 min (35% de B).
- Tiempo de corrida: 10 min.
- Flujo: 21.24 mL/min.
- Longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.
- Tiempo de colecta por tubo: 6 s.

#### **4.5.3 Caracterización estructural de los metabolitos aislados**

La caracterización estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante el análisis detallado de sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y los obtenidos por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Los espectros de RMN mono y bidimensionales se registraron en un equipo Varian VNMRs 400 o en un JEOL ECA 600 en CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, acetona-*d*<sub>6</sub> y dioxano-*d*<sub>6</sub>. Todos los análisis se realizaron en la USAII, FQ, UNAM.

Por otra parte, los espectros de masas se obtuvieron en UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS en los modos positivo (ESI<sup>+</sup>) y negativo (ESI<sup>-</sup>). Los análisis cromatográficos se registraron a una temperatura de 40°C empleando una columna C18 (1.7 μm, 2.1 × 10 mm,) y una mezcla

binaria de ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B), utilizando un gradiente de 15% a 100% de B en 8 min, luego 100% de B por 1.5 min, y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. La detección en el UV se realizó de 200 a 500 nm. Por otra parte, el espectrómetro de masas se empleó bajo las siguientes condiciones de análisis: temperatura del capilar: 275 °C; voltaje de la fuente, 3.5-4.5 kV; voltaje del capilar, 20-42 V; y voltaje del lente del tubo; 95-110 V. Se empleó N<sub>2</sub> como gas acarreador a 25 UA de flujo. Para cada uno de los análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de dioxano/MeOH (1:1) y el control del instrumento se realizó con el programa Xcalibur 2.1. Todos los análisis de HRMS se realizaron en la UNCG.

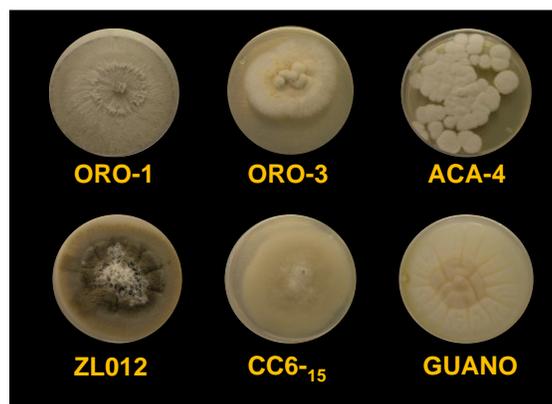
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo forma parte de un proyecto multidisciplinario de investigación que tiene como objetivo la obtención de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano a partir de fuentes inexploradas de nuestro país. Las cepas fúngicas estudiadas en este proyecto se obtuvieron de hábitats con condiciones climáticas y ambientales diversas (temperatura, luz, salinidad, nutrientes, etc.), y como se mencionó anteriormente, bajo estas condiciones los microorganismos son capaces de producir metabolitos secundarios inusuales y/o bioactivos que les permitan garantizar su supervivencia.<sup>45-48</sup>

En esta sección se discutirán, en primer lugar, los resultados obtenidos del acondicionamiento, el cultivo y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos en mediana escala de los hongos objeto de estudio. Posteriormente, se describirán los resultados de los estudios químicos realizados sobre las cepas seleccionadas por su potencial biológico, así como el aislamiento y caracterización de algunos de los metabolitos presentes en las fracciones activas.

### 5.1 Acondicionamiento e identificación de los organismos fúngicos

Se realizó el acondicionamiento de 15 cepas fúngicas provenientes de diferentes sitios de colecta, siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.1. En la **Figura 11** se ilustra la morfología de algunas de éstas en cajas de Petri con medio APD después de 5 días de crecimiento a temperatura ambiente.



**Figura 11.** Morfología de algunos organismos fúngicos estudiados.

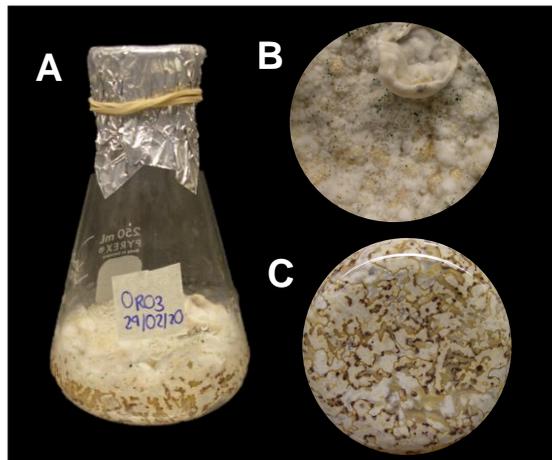
Cabe mencionar que algunos de estos organismos ya habían sido estudiados de manera preliminar en el grupo de trabajo, con excepción de los hongos con clave ORO, los cuales se trabajaron por primera vez en este proyecto. La identificación taxonómica preliminar de los organismos se realizó mediante el análisis de sus secuencias ARNr ITS (**Tabla 7**).<sup>55</sup>

**Tabla 7.** Identificación taxonómica preliminar de las cepas fúngicas.

Organismo (código interno)	Taxonomía	Organismo (código interno)	Taxonomía
ZL01	<i>Mucorales</i>	ACA11	<i>Onygenales</i>
ZL012	<i>Pleosporales</i>	ACA17	<i>Simplicillium obclavatum</i>
CC6-15	<i>Ascomycota</i>	ACA20	<i>Chrysosporium</i> sp.
GUANO	<i>Guanomyces polythrix</i>	ORO1	<i>Diaporthe</i> sp.
GH14	NI	ORO2	<i>Hypocreales</i>
ACA1	<i>Trichomonascaceae</i>	ORO3	<i>Alfaria</i> sp.
ACA3	<i>Malbranchea aurantiaca</i> CBS 127.77	ORO4	<i>Pleosporales</i>
ACA4	<i>Acremonium</i> sp.		

NI, no identificado.

Una vez confirmada la viabilidad y pureza de todos los organismos, se prepararon los correspondientes cultivos en mediana escala en medio sólido de arroz (**Figura 12**) siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.2. Al término del periodo de crecimiento establecido, se obtuvieron sus extractos orgánicos (inciso 4.2). Los rendimientos obtenidos de este proceso se resumen en la **Tabla 8**.



**Figura 12.** Ejemplo del cultivo en mediana escala del hongo ORO3: (A) cultivo en medio sólido de arroz húmedo a los 21 días de crecimiento, (B) anverso y (C) reverso.

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

El potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en mediana escala se estableció utilizando una serie de microorganismos ESKAPE susceptibles y resistentes a antibióticos (inciso 4.3). Los resultados de la evaluación de resumen en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos en mediana escala.

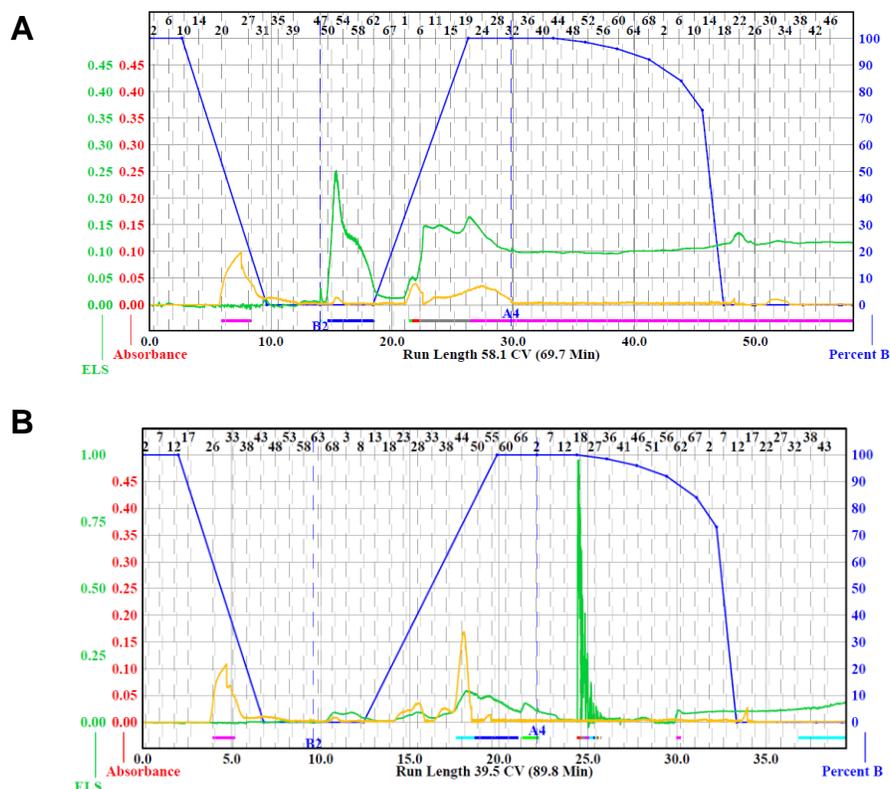
Extracto	Rendimiento (mg)	<i>MSSA</i> ATCC 25923	<i>MRSA</i> ATCC 43300	<i>E. cloacae</i> ATCC 700323	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299
ORO1	151.3				
ORO1*	121.9				
<b>ORO2</b>	566.7				
<b>ORO2*</b>	666.6				
<b>ORO3</b>	1876.4				
<b>ORO3*</b>	1693.8				
ORO4	201.9				
ORO4*	287.6				
ACA1	52.2				
ACA1*	54.5				
ACA3	326.6				
ACA3*	317.3				
ACA4	542.0				
ACA4*	663.1				
ACA11	483.0				
ACA11*	295.7				
ACA17	568.2				
ACA17*	544.2				
ACA20	159.7				
ACA20*	367.1				
ZL01	239.2				
ZL012	123.2				
GUANO	750.0				
GUANO*	154.0				
CC6-15	922.4				
GH14	736.5				
ZL01 h	3298.0				
ORO4 h	565.0				
ORO4* h	896.0				
ACA3 h	432.7				

ACA3 h	474.6				
BLANCO	69.2				
BLANCO*	93.6				
CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) control positivo		15.0	1.25	1.0	500
<b>Criterios de inhibición</b>					
Inhibición total a 200 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$ de extracto					
Inhibición total a 200 $\mu\text{g/mL}$ y parcial a 20 $\mu\text{g/mL}$ de extracto					
Inhibición total a 200 $\mu\text{g/mL}$ de extracto					
Inhibición parcial a 200 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$ de extracto					
Inhibición parcial a 200 $\mu\text{g/mL}$ de extracto					
Sin inhibición					
Ampicilina					
Vancomicina					
Gentamicina					

\*Con sales marinas; g= extracto hexánico; Ninguna muestra presentó actividad contra *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* cepa 564, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. aerogenes* ATCC 13048.

### 5.3 Fraccionamiento primario de los extractos fúngicos en mediana escala de los organismos seleccionados

Con base en los resultados de actividad antimicrobiana indicados en la tabla anterior, se seleccionaron a los hongos ORO2 y ORO3 para continuar con su estudio químico biodirigido ya que mostraron una inhibición importante sobre el crecimiento de *MSSA* y *MRSA* a ambas concentraciones de prueba. Así, en primer lugar se realizó el fraccionamiento primario de los extractos mediante una cromatografía en columna tipo Flash siguiendo la metodología descrita en 4.4. Los conjuntos de fracciones se reunieron con base en los perfiles en el UV y ELSD (**Figura 13**), obteniéndose 11 fracciones para el extracto del hongo ORO2 y 15 fracciones para el de ORO3 (**Tabla 9**).



**Figura 13.** Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash de los extractos de los hongos ORO2 (A) y ORO3 (B). Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELS y PDA, y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH).

**Tabla 9.** Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de los hongos ORO2 y ORO3.

Hongo ORO2				Hongo ORO3			
Fración	Peso (mg)	Fración	Peso (mg)	Fración	Peso (mg)	Fración	Peso (mg)
1 (1-46)	38.4	7 (75-87)	106.6	1 (1-64)	23.5	9 (157-158)	6.5
2 (47)	0.5	8 (88-100)	99.3	2 (65-72)	233.2	10 (159-160)	4.9
3 (48-53)	37.8	9 (101-159)	132.9	3 (73-88)	18.8	11 (161)	4.8
4 (54-69)	177.3	10 (160-163)	10.6	4 (89-100)	161.1	12 (162-163)	6.1
5 (70-74)	31.6	11 (164-fin)	73.0	5 (101-110)	195.1	13 (164-198)	237.8
6 (75-87)	243.4	<b>Recuperado (mg)</b>	<b>725.6</b>	6 (111-117)	448.7	14 (199-223)	260.6
		<b>Recobro (%)</b>	<b>77.6</b>	7 (118-135)	931.4	15 (224-fin)	44.4
				8 (136-156)	216.7	<b>Recuperado (mg)</b>	<b>2793.5</b>
						<b>Recobro (%)</b>	<b>89.9</b>

#### 5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones de los extractos de mediana escala

La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos en mediana escala y sus correspondientes fracciones primarias se realizó siguiendo la metodología descrita en el

inciso 4.3 (Tabla 10). Dichas fracciones fueron evaluadas únicamente contra *MSSA* y *MRSA*, debido a que fueron las bacterias que fueron inhibidas principalmente por los extractos en pequeña escala.

**Tabla 10.** Resultados de actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones del extracto en mediana escala de los hongos ORO2 y ORO3.

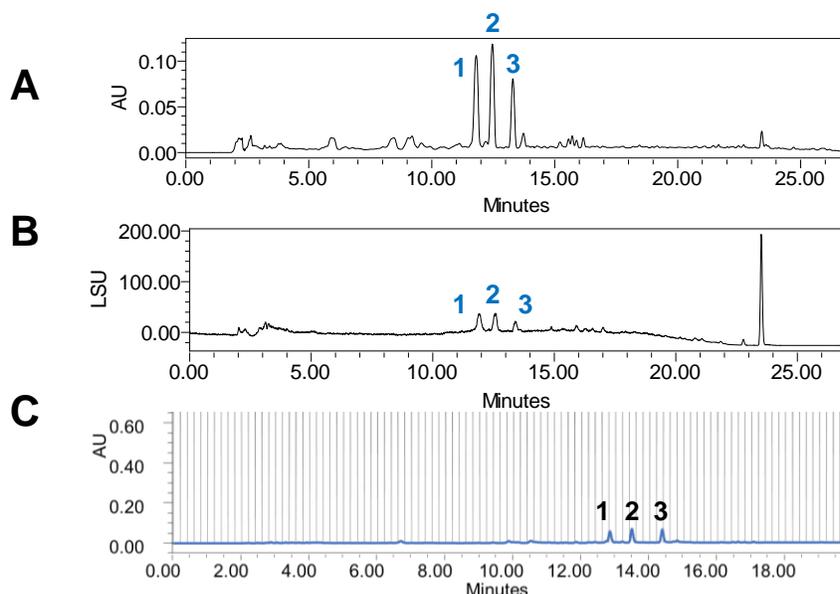
<b>Extracto/ fracción</b>	<b>MRSA</b>	<b>MSSA</b>
ORO2		
ORO2-3		
ORO2-4		
ORO2-5		
ORO2-6		
ORO2-7		
ORO2-8		
ORO2-9		
ORO2-10		
ORO2-11		
ORO3		
ORO3-1		
ORO3-2		
ORO3-3		
ORO3-4		
ORO3-5		
ORO3-6		
ORO3-7		
ORO3-8		
ORO3-9		
ORO3-10		
ORO3-11		
ORO3-12		
ORO3-13		
ORO3-14		
ORO3-15		
CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) control positivo	1.25	15.0
<b>Criterios de inhibición</b>		
Inhibición total a 200 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de muestra		
Inhibición total a 200 y parcial a 20 $\mu\text{g/mL}$ de muestra		
Inhibición total a 200 $\mu\text{g/mL}$ de muestra		
Inhibición parcial a 200 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de muestra		
Inhibición parcial a 200 $\mu\text{g/mL}$ de muestra		
Sin inhibición		
Ampicilina		
Vancomicina		

## 5.5 Estudio químico del hongo ORO2

El hongo ORO2 pertenece al orden Hypocreales (**Tabla 7**) el cual contiene 14 familias, 434 géneros y 5313 especies.<sup>56</sup> Algunos de los géneros más representativos dentro de este orden son *Fusarium*, *Claviceps*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*, los cuales contienen especies parásitas de plantas, insectos y hongos.<sup>57</sup> Estos hongos son productores de una gran cantidad de metabolitos secundarios estructuralmente diversos y con actividades biológicas relevantes para el desarrollo de fármacos o sustancias de uso en la veterinaria y la agricultura.<sup>58</sup>

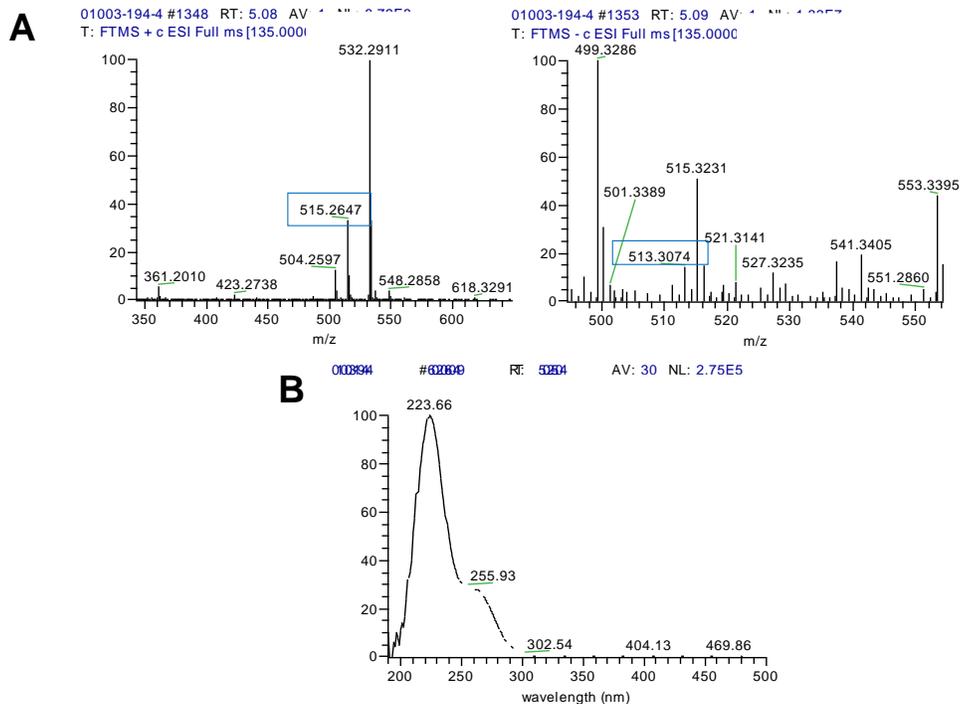
### 5.5.1 Aislamiento y caracterización de 1-3 a partir de la fracción ORO2-4 y ORO2-5

Con base en los resultados de actividad de las fracciones primarias del hongo ORO2 (**Tabla 10**), se seleccionaron las fracciones ORO2-4, ORO2-5 y ORO2-6 para la separación de los componentes mayoritarios mediante HPLC a nivel preparativo (incisos **4.5.1.1**, **4.5.1.2**, **4.5.1.3**). Así, a partir de las fracciones combinadas ORO2-4 y ORO2-5, se logró el aislamiento de 1.7 mg del compuesto **1** ( $t_R$  12.89 min), 3.5 mg de **2** ( $t_R$  13.51 min) y 2.7 mg del compuesto **3** ( $t_R$  14.40 min) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Cromatograma por HPLC de las fracciones combinadas F-4 y F-5: (A) PDA 254 nm, (B) ELSD a nivel analítico y (C) separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

El compuesto **1** se aisló como un sólido blanco y su fórmula molecular se estableció como  $C_{29}H_{38}O_8$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  515.2647  $[M+H]^+$  y 513.3074  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = 1.5$  ppm), la cual permite 11 grados de insaturación (**Figura 15**).



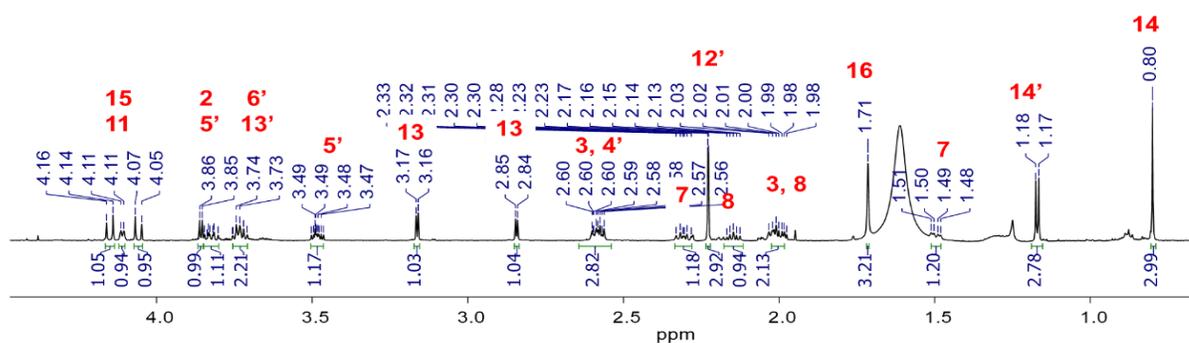
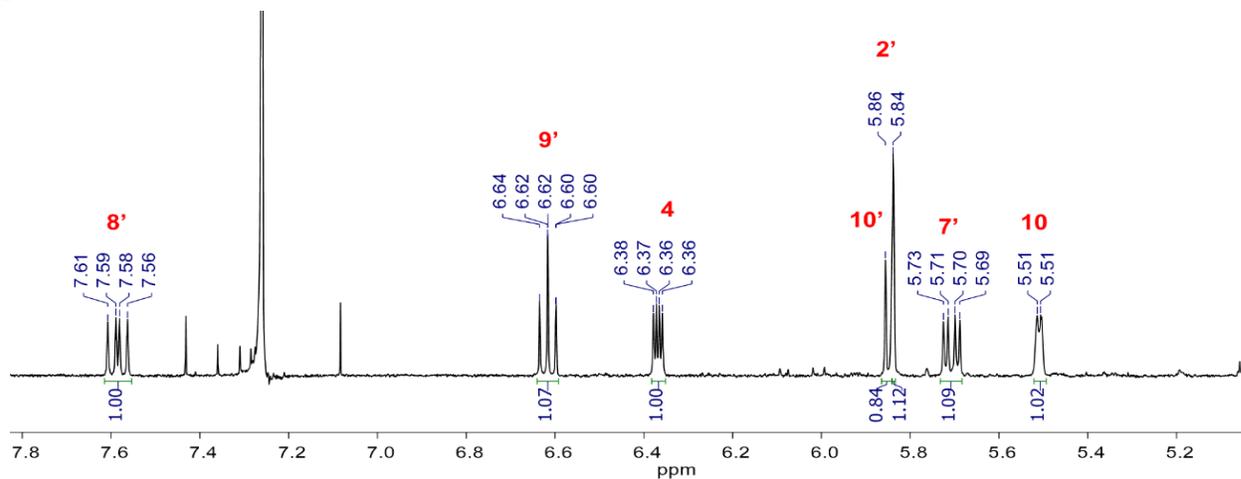
**Figura 15.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y de UV (**B**) de **1**.

El análisis detallado del espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 16A** y **Tabla 11**) permitió identificar los siguientes conjuntos de señales: En  $\delta_H$  0.80 (s), 1.17 (d,  $J = 6.0$ ), 1.71 (s) y en 2.23 (d,  $J = 1.2$ ) se observan cuatro señales asignables a grupos metilo; entre  $\delta_H$  1.50-2.58 se observan un conjunto de señales correspondientes a seis hidrógenos asignables a 3 metilenos; en  $\delta_H$  2.0 (m), 2.58 (m), 3.48 (m), 3.86 (dt,  $J = 10.3, 7.9$ ), 4.06 (d,  $J = 12.5$ ), 4.15 (d,  $J = 12.5$ ) se observan seis señales atribuibles a 3 metilenos unidos a oxígeno; en  $\delta_H$  2.84 (d,  $J = 4.0$ ) y 3.16 (d,  $J = 4.0$ ) se observan dos hidrógenos de un epoxi-metileno; en  $\delta_H$  3.74 (m), 3.86 (d,  $J = 5.0$ ), 4.11 (d,  $J = 5.6$ ), 6.37 (dd,  $J = 8.1, 4.1$ ) se observan las señales asignables a 5 metinos bases de oxígeno; en  $\delta_H$  5.51 (d,  $J = 4.4$ ) y en 5.84 (s) se observan dos señales correspondientes a 2 hidrógenos vinílicos; y en  $\delta_H$  5.71 (dd,  $J = 15.7, 6.4$ ), 5.86 (d,  $J = 11.0$ ), 6.61 (dd,  $J = 11.3, 1.0$ ), 7.59 (dd,  $J = 15.7, 10.9$ ) se observan los protones de un dieno 1,4-disustituido.

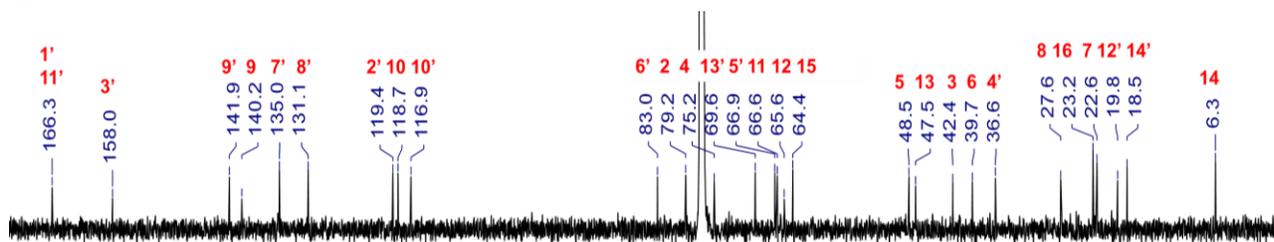
Por otra parte, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 16B** y **Tabla 11**), se observan 29 señales asignables a cuatro carbonos de metilos en  $\delta_c$  6.3, 18.5, 19.8 y 23.2, tres carbonos de metilenos en  $\delta_c$  22.6, 27.6, 39.7, cuatro carbonos de tipo oximetileno en  $\delta_c$  36.6, 47.5, 64.4, 66.9, seis carbonos de metinos en  $\delta_c$  116.9, 118.7, 119.4, 131.1, 135.0, 141.9, cinco carbonos de tipo oximetino en  $\delta_c$  66.6, 69.6, 75.2, 79.2, 83.0 y siete carbonos no protonados en  $\delta_c$  42.4, 48.5, 65.6, 140.2, 158.0, 166.3.

El análisis combinado de los datos experimentales antes descritos y lo encontrado en la literatura especializada permitió caracterizar a este producto como la isororidina E (**Figura 17**).<sup>59</sup> Este tricoteceno, junto con otras micotoxinas, son producidas por diversos hongos del orden *Hypocreales*, incluyendo los géneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium* y *Cylindrocarpon*.<sup>60</sup> A pesar de que este tipo de compuestos han sido asociados con un gran número de intoxicaciones en animales y seres humanos,<sup>61</sup> así como causantes de enfermedades en cultivos e importancia agrícola, se han considerado candidatos para el desarrollo de agentes citotóxicos y antimicrobianos.<sup>59</sup> En particular, la isororidina E ha sido aislada de *Cylindrocarpon* spp., *Polyporus confluens* y *Myrothecium verrucaria*, y ha mostrado una importante actividad citotóxica, insecticida, herbicida, fitotóxica, antimicrobiana y fungicida.<sup>61-63</sup> En este proyecto se estableció su actividad antimicrobiana contra *MRSA* y *MSSA*, inhibiendo el 100% del crecimiento de ambas bacterias a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , y el 75.7% de *MRSA* a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  (**Tabla 14**).

**A**



**B**



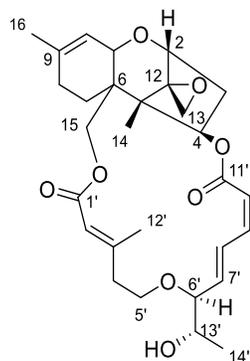
**Figura 16.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) (A) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) (B) de **1** en  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabla 11.** Datos de RMN del **1** en  $\text{CDCl}_3$  (600 y 150 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente).

Posición	<b>1</b>		<b>Isororidina E<sup>a,b,c</sup></b>	
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)
2	79.2, CH	3.86, d (5.0)	79.2, CH	3.84, d (5.0)
3a	36.6, CH <sub>2</sub>	2.58, m	36.6, CH <sub>2</sub>	2.58, m
3b		2.0, m		2.03, m
4	75.2, CH	6.37, dd (8.1, 4.1)	75.3, CH	6.35, dd (8.0, 4.0)
5	48.5, C	-	48.5, C	-
6	42.4, C	-	42.6, C	-

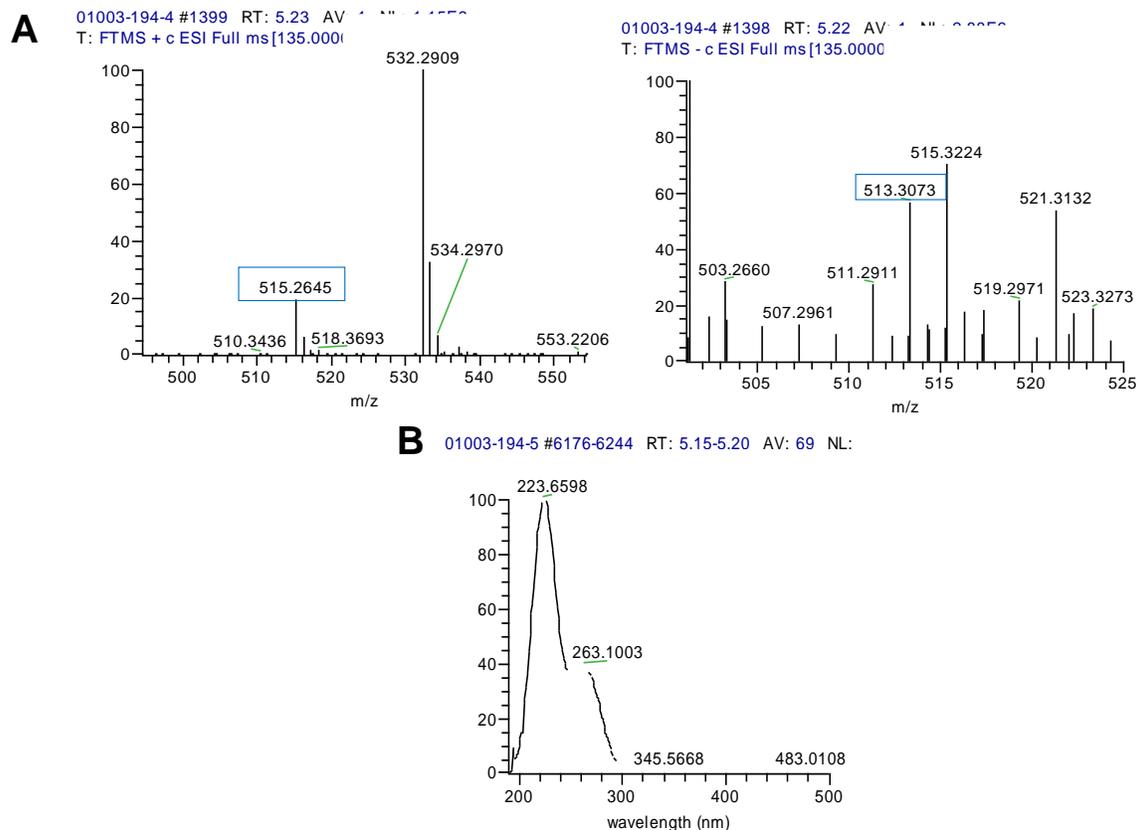
7a	22.6, CH <sub>2</sub>	1.50, dd (13.1, 5.5)	22.7, CH <sub>2</sub>	1.49, m
7b		2.31, dt (13.7, 8.2)		2.0, m
8a	27.6, CH <sub>2</sub>	2.15, dt, (12.8, 6.2)	27.7, CH <sub>2</sub>	2.0, m
8b		2.0, m		
9	140.2, C	-	140.1, C	-
10	118.7, CH	5.51, d (4.4)	118.9, CH	5.50, d (4.3)
11	66.6, CH	4.11, d (5.6)	66.7, CH	4.09, d (5.5)
12	65.6, C	-	65.7, C	-
13a	47.5, CH <sub>2</sub>	3.16, d (4.0)	47.7, CH <sub>2</sub>	3.15, d (4.0)
13b		2.84, d (4.0)		2.83, d (4.0)
14	6.3, CH <sub>3</sub>	0.80, s	6.4, CH <sub>3</sub>	0.77, s
15a	64.4, CH <sub>2</sub>	4.06, d (12.5)	64.5, CH <sub>2</sub>	4.06, d (12.5)
15b		4.15, d (12.5)		4.16, d (12,5)
16	23.2, CH <sub>3</sub>	1.71, s	23.2, CH <sub>3</sub>	1.71, s
1'	166.3, C	-	166.3, C	-
2'	119.4, CH	5.84, s	119.5, CH	5.83, s
3'	158.0, C	-	158.0, C	-
4'a	39.7, CH <sub>2</sub>	2.58, m	40.0, CH <sub>2</sub>	2.55, m
4'b				2.32, m
5'a	66.9, CH <sub>2</sub>	3.82, dt (10.3, 7.9)	67.0, CH <sub>2</sub>	3.81, m
5'a		3.48, m		3.48, m
6'	83.0, CH	3.74, m	83.2, CH	3.74, m
7'	135.0, CH	5.71, dd (15.7, 6.4)	135.2, CH	5.71, dd (16.0, 6.0)
8'	131.1, CH	7.59, dd (15.7, 10.9)	131.0, CH	7.55, dd (16.9, 11.0)
9'	141.9, CH	6.61, dd(11.3, 11.0)	142.0, CH	6.60, ddd (11.4, 11.4)
10'	116.9, CH	5.86, d (11.0)	117.1, CH	5.82, d (11.0)
11'	166.3, C	-	166.3, C	-
12'	19.8, CH <sub>3</sub>	2.23, d (1.2)	19.8, CH <sub>3</sub>	2.21, d (1.2)
13'	69.6, CH	3.74, m	69.6, CH	3.70, m
14'	18.5, CH <sub>3</sub>	1.17, d (6.0)	18.5, CH <sub>3</sub>	1.16, d (6.0)

<sup>a</sup> Matsumoto, M., et al., 1977; <sup>b</sup> De Carvalho, M., 2015, Jarvis, B. B., y Wang, S., 1999.



**Figura 17.** Estructura de la isororidina E (1).

El compuesto **2** se aisló como un sólido blanco y su fórmula molecular se estableció como  $C_{29}H_{38}O_8$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  515.2645  $[M+H]^+$  y 513.3073  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = 1.1$  ppm), la cual permite 11 grados de insaturación (**Figura 18**).

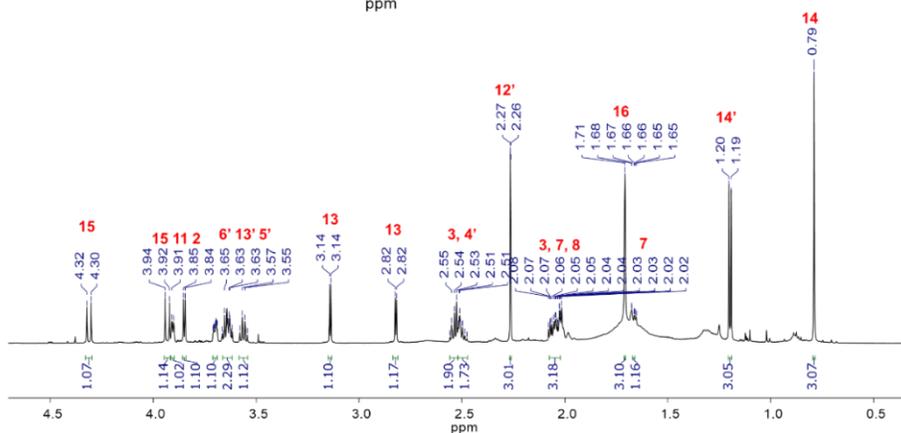
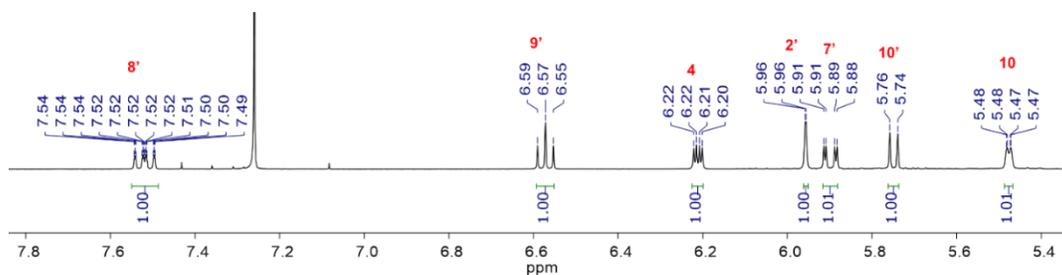


**Figura 18.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y de UV (**B**) de **2**.

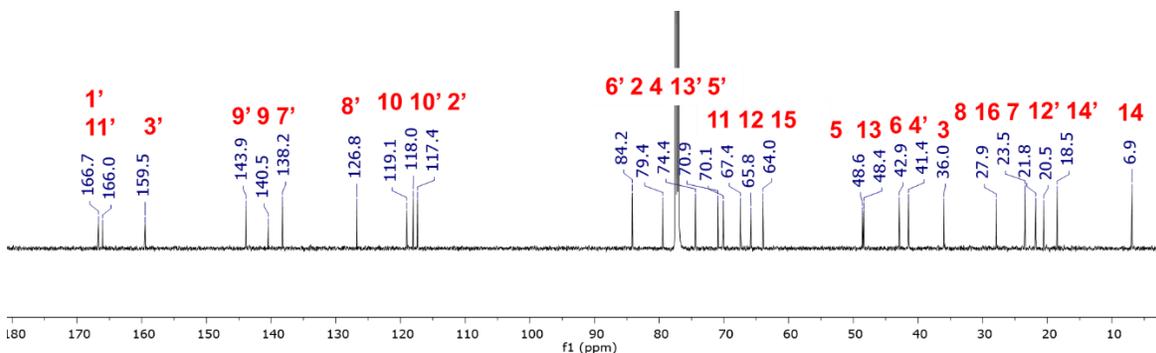
El análisis detallado del espectro de RMN  $^1H$  y de  $^{13}C$  (**Figura 19** y **Tabla 12**) reveló señales y desplazamientos similares a los del compuesto **1**, que aunado a que ambos comparten el mismo peso molecular, se podría deducir que podría tratarse de dos isómeros. La diferencia más importante en los espectros de RMN  $^1H$  de estos compuestos fue la constante de acoplamiento entre los hidrógenos 6' y 7': **1**,  $J_{6',7'} = 6.4$  Hz; **2**,  $J_{6',7'} = 3.4$  Hz. Cabe destacar que la isororidina E (**1**) es uno de los 4 isómeros de la rodidina E, que presenta una configuración C-6'(S)/C-13'(S) y con un valor de  $J_{6',7'}$  6 Hz. Por otro lado, los isómeros con configuración C-6' (R), tienen un valor de  $J_{6',7'}$  de alrededor de 3 Hz. Además, la diferencia entre los desplazamientos de RMN  $^{13}C$  para los epímeros con 6'R es de alrededor de 12 ppm, mientras que para los que tienen la configuración 6'S, la diferencia es de 4 ppm.<sup>61</sup> El análisis anterior permitió caracterizar a **2** como la roridina E (**Figura 20**). Este compuesto ha sido aislado de

*Myrothecium verrucaria*, *M. roridum*, *Stachybotrys atra*, *Baccharis cordifolia*, *Cercophora areolata* y *Fusarium* sp. LS68,<sup>61, 63</sup> y presenta actividades biológicas similares a las de **1**. Finalmente **2** inhibió el 100% del crecimiento de *MRSA* y *MSSA* a la concentración de 100 µg/mL, y el 93.9% de *MRSA* a la concentración de 50 µg/mL (**Tabla 14**).

**A**



**B**



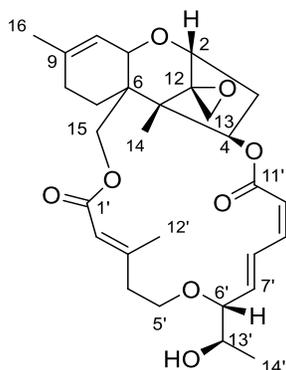
**Figura 19.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) (A) y <sup>13</sup>C (150 MHz) (B) de **2** en CDCl<sub>3</sub>.

**Tabla 12.** Datos de RMN del **2** en CDCl<sub>3</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente).

<b>2</b>			<b>Roridina E<sup>a</sup></b>	
Posición	δ <sub>c</sub> , tipo	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)	δ <sub>c</sub> , tipo	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)
2	79.4, CH	3.85, d (5.2)	79.5, CH	3.83, d (5.0)
3a	36.0, CH <sub>2</sub>	2.54, m	36.1, CH <sub>2</sub>	2.51, dd (15.0, 8.0)
3b		2.05, m		2.04, ddd (15.0, 5.0, 4.0)

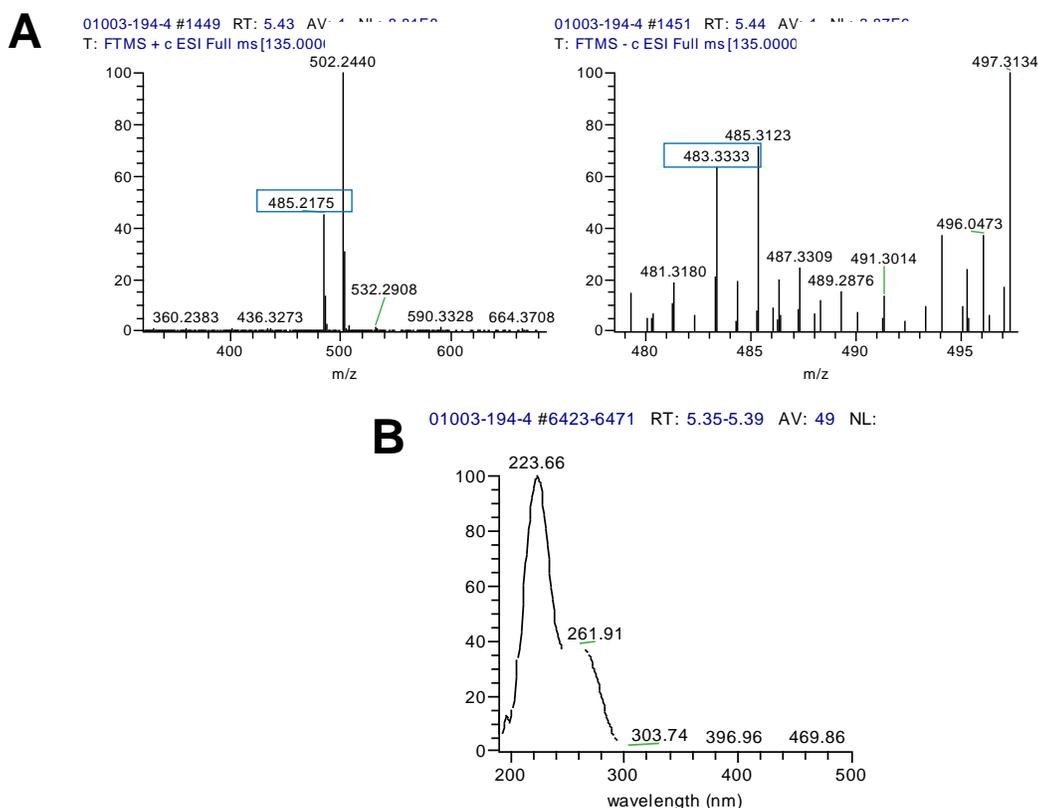
4	74.4, CH	6.21, dd (8.1, 4.0)	74.4, CH	6.20, dd (8.0, 4.0)
5	48.4, C	-	48.6, C	-
6	42.9, C	-	42.9, C	-
7a	21.8, CH <sub>2</sub>	2.05, m	21.8, CH <sub>2</sub>	2.02, ddd (12.6, 12.6, 5.0)
7b		1.66, dt (12.8, 5.1, 1.6)		1.65, ddd (12.6, 5.0, 1.4)
8a	27.9, CH <sub>2</sub>	2.05, m	27.8, CH <sub>2</sub>	2.01, ddd (12.6, 12.6, 5.0)
8b		2.05, m		2.00, ddd (12.6, 5.0, 1.4)
9	140.5, C	-	140.4, C	-
10	119.1, CH	5.48, dd (5.7, 1.8)	119.0, CH	5.46, d (5.0)
11	67.4, CH	3.90, d (5.4)	67.4, CH	3.89, d (5.0)
12	65.8, C	-	65.8, C	-
13a	48.4, CH <sub>2</sub>	3.14, d (4.1)	48.4, CH <sub>2</sub>	3.12, d (4.1)
13b		2.82, d (4.1)		2.80, d (4.1)
14	6.9, CH <sub>3</sub>	0.79, s	6.9, CH <sub>3</sub>	0.77, s
15a	64.0, CH <sub>2</sub>	4.31, d (12.5)	64.0, CH <sub>2</sub>	4.29, d (12.5)
15b		3.93, d (12.5)		3.92, d (12.5)
16	23.5, CH <sub>3</sub>	1.71, s	23.5, CH <sub>3</sub>	1.69, sa
1'	166.7, C	-	166.7, C	-
2'	117.4, CH	5.96, d (1.4)	117.4, CH	5.94, sa
3'	159.5, C	-	159.4, C	-
4'a	41.4, CH <sub>2</sub>	2.54, m	41.5, CH <sub>2</sub>	2.51, ddd (13, 7.3, 1.0)
4'b		2.51, m		2.48, ddd (13, 6.8, 1.0)
5'a	70.1, CH <sub>2</sub>	3.63, ddd (15.0, 6.2, 1.1)	70.1, CH <sub>2</sub>	3.62, ddd (15.1, 6.8, 1.0)
5'b		3.56, q (7.1)		3.54, ddd (15.1, 7.3, 1.0)
6'	84.2, CH	3.70, ddd (6.8, 2.9, 1.6)	84.2, CH	3.68, ddq (6.7, 3.2, 1.0)
7'	138.2, CH	5.90, dd (15.7, 3.4)	138.2, CH	5.88, dd (15.7, 3.2)
8'	126.8, CH	7.52, ddt (15.7, 11.4, 1.4)	126.8, CH	7.51, dd (15.7, 11.3)
9'	143.9, CH	6.57, t (11.4)	143.8, CH	6.55, t (11.3)
10'	118.0, CH	5.75, d (11.4)	118.0, CH	5.73, d (11.3)
11'	166.0, C	-	166.0, C	-
12'	20.5, CH <sub>3</sub>	2.26, d (1.3)	20.5, CH <sub>3</sub>	2.24, d (1.1)
13'	70.9, CH	3.65, q (7.0, 6.4)	70.9, CH	3.63, dq (6.7, 6.2)
14'	18.5, CH <sub>3</sub>	1.20, d (6.2)	18.5, CH <sub>3</sub>	1.18, d (6.2)
13'-OH	-	-	-	2.62, sa

<sup>a b</sup> Ridge, C., et al., 2016



**Figura 20.** Estructura de la roridina E (2).

Finalmente, el compuesto **3** se aisló como un sólido blanco y su fórmula molecular se estableció como  $C_{27}H_{32}O_8$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  485.2175  $[M+H]^+$  y 483.3333  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = 1.0$  ppm), la cual permite 12 grados de insaturación (**Figura 21**).

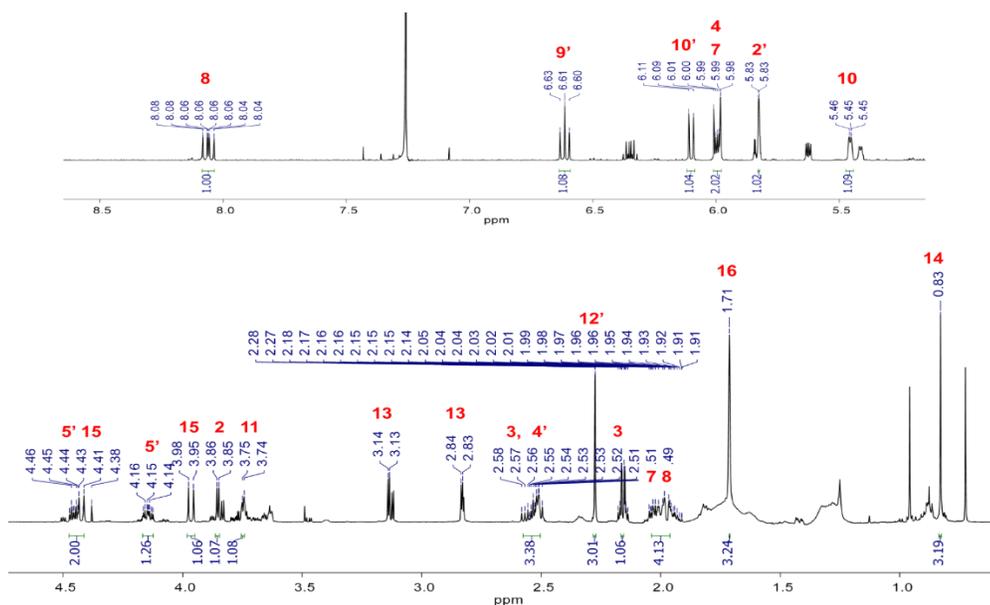


**Figura 21.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y de UV (**B**) de **3**.

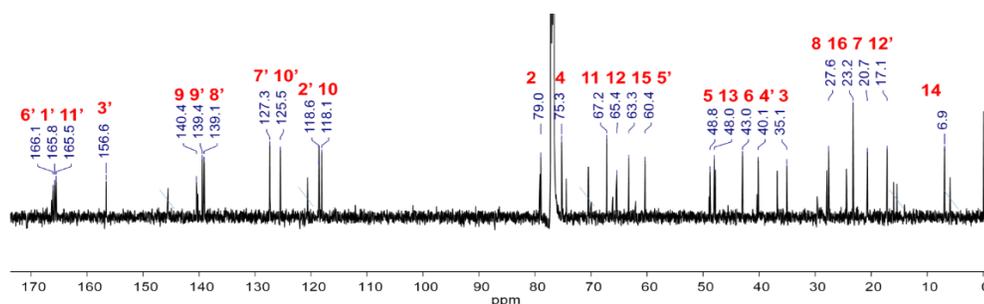
El análisis detallado del espectro de RMN  $^1H$  y de  $^{13}C$  (**Figura 22** y **Tabla 13**) reveló señales y desplazamientos similares a las de **1** y **2**, con la diferencia de que **3** presenta un carbono de carbonilo en la posición C-6' ( $\delta_c$  166.1), en lugar de un carbono de tipo oximetino como en **1** y **2** ( $\delta_c$  83.0 y 84.1 respectivamente). Además, **3** tiene 2 carbonos menos que **1** y **2**, confirmando que este producto no cuenta la cadena lateral de hidroxietil en C-6'. El análisis anterior más lo descrito en la literatura permitió caracterizar a **3** como la verrucarina J o muconomicina B (**Figura 23**). Este tricoteceno macrocíclico ha sido aislado también a partir de especies como *M. verrucaria*, *M. roridum* y *Fusarium* sp. LS68; tiene actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de ovario, induciendo apoptosis, daño en el ADN y

generación de especies reactivas de oxígeno.<sup>64</sup> También se ha reportado su actividad antiviral y antimalárica.<sup>65, 66</sup> En este trabajo, **3**, inhibió el 100.0% del crecimiento *MRSA* a la concentración de 100 µg/mL y en un 89.6% a la de 50 µg/mL (**Tabla 14**).

**A**



**B**



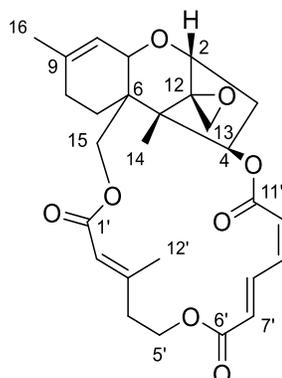
**Figura 22.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) (**A**) y <sup>13</sup>C (150 MHz) (**B**) de **3** en CDCl<sub>3</sub>.

**Tabla 13.** Datos de RMN del **3** en CDCl<sub>3</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente).

Posición	<b>3</b>		<b>Verrucarina J<sup>a</sup></b>	
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)
2	79.0, CH	3.85, d (5.1)	79.0, CH	3.85, d (5.2)
3a	35.1, CH <sub>2</sub>	2.16, ddd (14.9, 5.3)	35.1, CH <sub>2</sub>	2.16, ddd (15.2, 5.2, 5.2)
3b		2.53, m		2.45-2.60, m
4	75.3, CH	5.99, dd (8.3, 4.4)	75.3, CH	5.99, dd (8.2, 4.3)
5	48.8, C	-	48.8, C	-
6	43.0, C	-	43.0, C	-
7a	20.7, CH <sub>2</sub>	2.0, m	20.7, CH <sub>2</sub>	1.7-2.1, m
7b				

8a	27.6, CH <sub>2</sub>	2.0, m	27.7, CH <sub>2</sub>	1.7-2.1, m
8b				
9	140.4, C	-	140.4, C	-
10	118.1, CH	5.45, d (5.4)	118.1, CH	5.46, d (5.1)
11	67.2, CH	3.75, d (4.7)	67.3, CH	3.75, d (5.1)
12	65.4, C	-	65.4, C	-
13a	48.0, CH <sub>2</sub>	3.14, d (4.0)	48.0, CH <sub>2</sub>	3.14, d (4.1)
13b		2.83, d (3.8)		2.83, d (4.1)
14	6.9, CH <sub>3</sub>	0.83, s	6.9, CH <sub>3</sub>	0.83, s
15a	63.3, CH <sub>2</sub>	4.42, d (12.7)	63.3, CH <sub>2</sub>	4.42, d (12.2)
15b		3.96, d (12.6)		3.97, d (12.2)
16	23.2, CH <sub>3</sub>	1.71, s	23.6, CH <sub>3</sub>	1.72, s
1'	165.8, C	-	165.8, C	-
2'	118.6, CH	5.83, sa	118.6, CH	5.83, sa
3'	159.6, C	-	156.6, C	-
4'a	40.1, CH <sub>2</sub>	2.53, m	40.2, CH <sub>2</sub>	2.45-2.60, m
4'b				
5'a	60.4, CH <sub>2</sub>	4.46, m,	60.4, CH <sub>2</sub>	4.45, m
5'b		4.14, ddd (11.3, 9.3, 4.2)		4.15, ddd (11.7, 8.0, 5.3)
6'	166.1, C	-	166.1, C	-
7'	127.3, CH	6.0, d (15.4)	127.4, CH	6.00, d (15.2)
8'	139.1, CH	8.06, ddd (15.7, 11.6, 1.0)	139.1, CH	8.06, dd (15.2, 11.5)
9'	139.4, CH	6.61, t (11.4)	139.5, CH	6.62, dd (11.5, 11.5)
10'	125.5, CH	6.10, d (11.1)	125.5, CH	6.10, d (11.5)
11'	165.5, C	-	165.5, C	-
12'	17.1, CH <sub>3</sub>	2.27, d (1.2)	17.9, CH <sub>3</sub>	2.28, d (1.5)

<sup>a</sup>Saikawa, Y., et al., 2001



**Figura 23.** Estructura de la verrucarina J (3).

**Tabla 14.** Actividad antimicrobiana de 1-3 aislados del hongo ORO2.

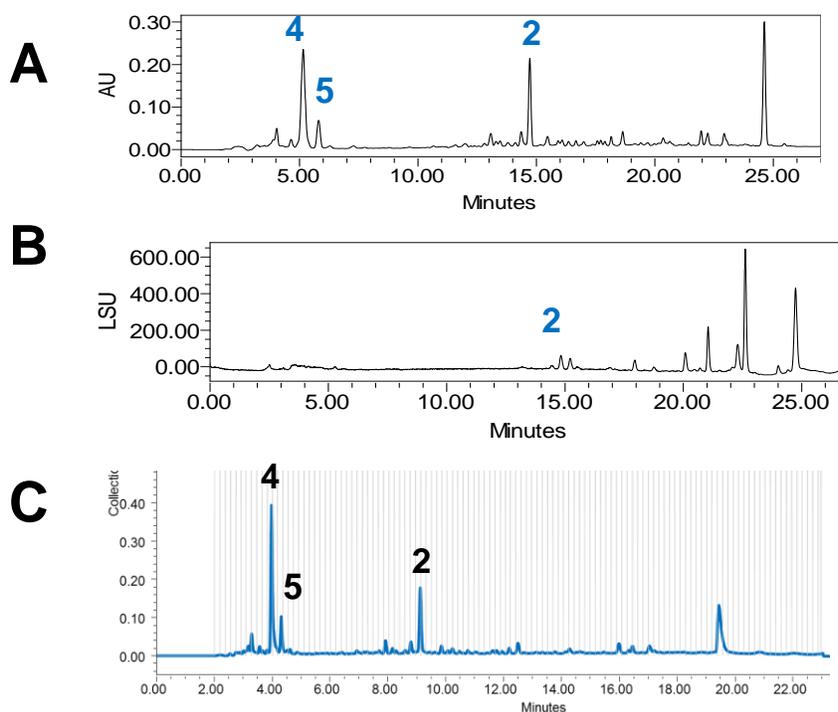
Compuesto	Concentración (µg/mL)	<i>MRSA</i>	% de inhibición	<i>MSSA</i>	% de inhibición
1	10		0.0%		0.0%
	50		75.7%	-	-
	100		100.0%		100.0%

2	10		0.0%		0.0%
	50		93.9%	-	-
	100		100.0%		100.0%
3	10		0.0%		0.0%
	50		89.6%	-	-
	100		100.0%		100.0%
CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) control positivo		1.56		400	
Criterios de inhibición					
Inhibición total					
Inhibición parcial					
Sin inhibición					
Vancomicina					
Ampicilina					

-, No se determinó.

### 5.5.2 Aislamiento y caracterización de 4 y 5 a partir de la fracción ORO2-6

A partir de la fracción ORO2-6, se obtuvieron 1.6 mg del compuesto **4** ( $t_R$  3.98 min), 0.9 mg de **5** ( $t_R$  4.31 min), y 0.8 mg adicionales de **2** ( $t_R$  9.11 min) (**Figura 24**).



**Figura 24.** Cromatograma por HPLC de la fracción F-6: (A) PDA 254 nm, (B) ELSD a nivel analítico y (C) separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).



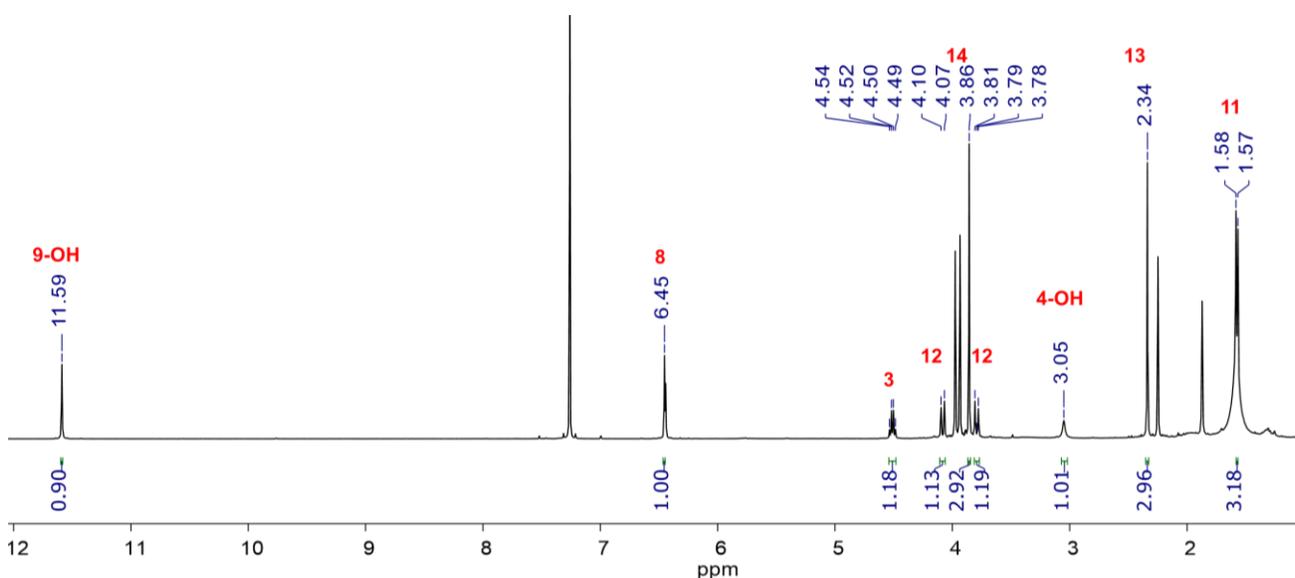


Figura 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) **4** en  $\text{CDCl}_3$ .

Tabla 15. Datos de RMN de  $^1\text{H}$  del **4** en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).

Posición	<b>4</b>	<b>Acremonona C<sup>a</sup></b>
	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)
<b>3</b>	4.51, q (6.7)	4.44, q (6.5)
<b>4-OH</b>	3.05, s	2.97, s
<b>8</b>	6.45, s	6.39, s
<b>9-OH</b>	11.59, s	11.52, s
<b>11</b>	1.58, d (6.5)	1.51, d (6.5)
<b>12</b>	4.08, d (11.5)	4.02, d (11.0)
	3.79, d (11.6)	3.72, d (11.0)
<b>13</b>	2.34, s	2.27, s
<b>14</b>	3.86, s	3.79, s

<sup>a</sup>Rukachaisirikul, V., et al., 2012.

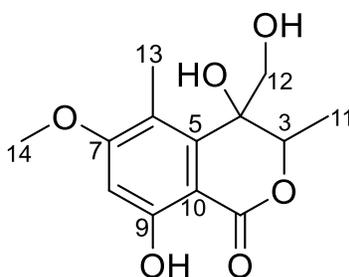
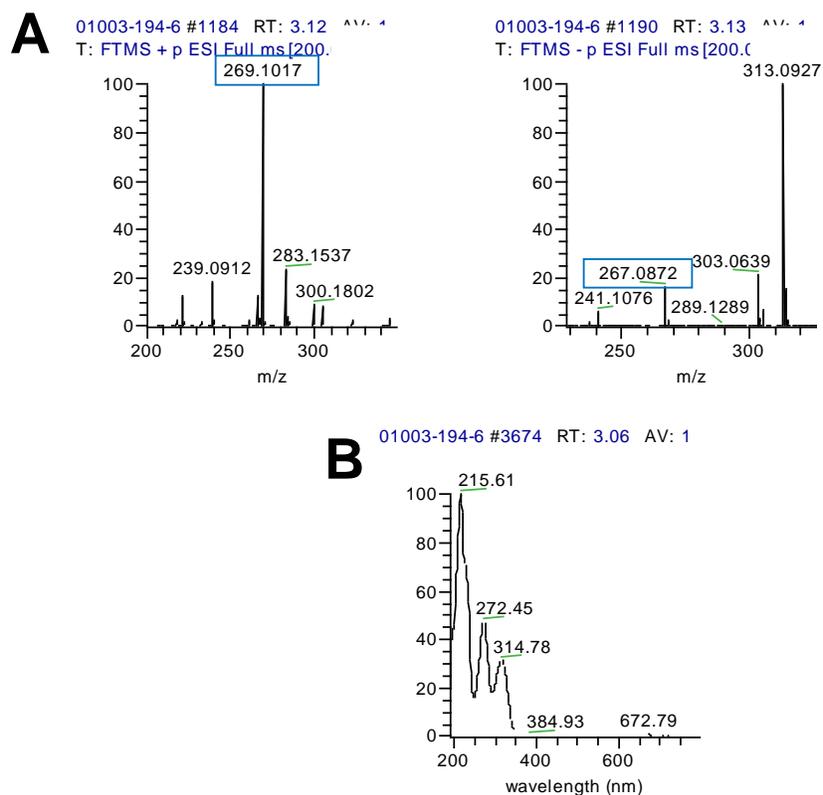


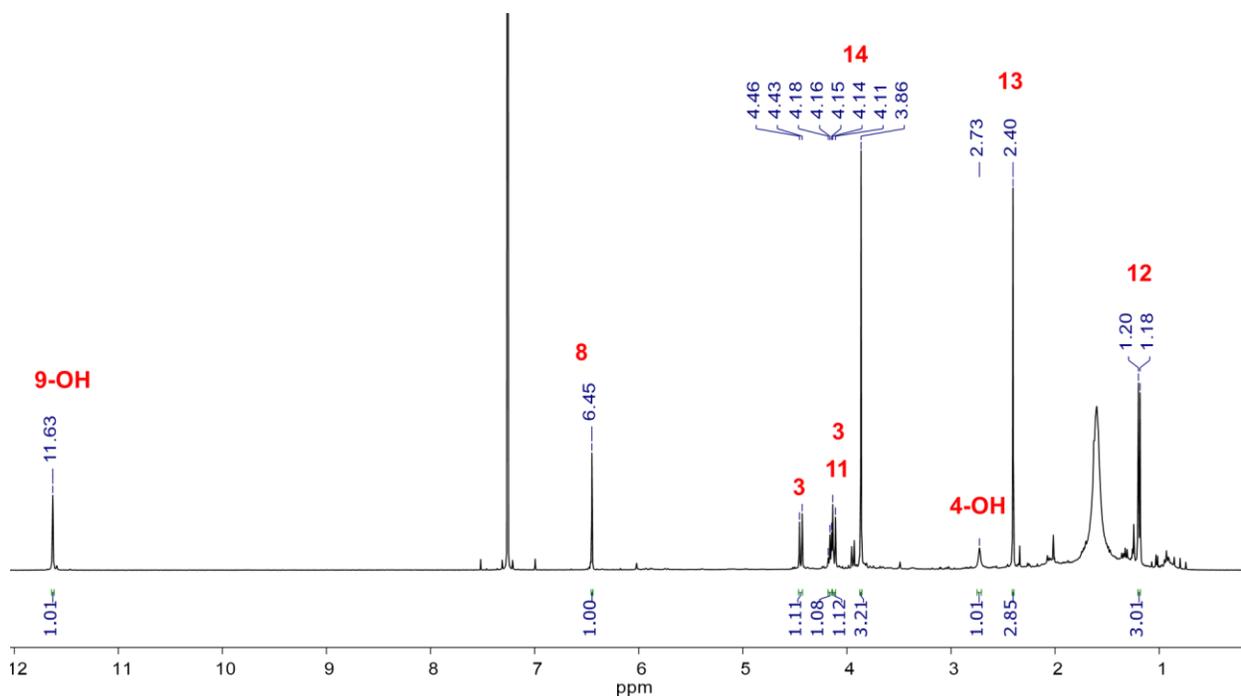
Figura 27. Estructura de la acremonona C (**4**).

El compuesto **5** se aisló como un sólido amorfo amarillo y su fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  269.1018  $[\text{M}+\text{H}]^+$  y 267.0871  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $\Delta = -0.6$  ppm), la cual permite 6 grados de insaturación (Figura 28).



**Figura 28.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y de UV (**B**) de **5**.

El análisis detallado del espectro de RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C (**Figura 29** y **Tabla 16**) reveló señales y desplazamientos similares a los de **4**, con la diferencia de que **5** presenta cambios en los sustituyentes de la posición 3 y 4. En **5** se observan hidrógenos de un grupo hidroximetileno en  $\delta_H$  4.44 (d,  $J=10.6$ ) y  $\delta_H$  4.12 (d,  $J=10.6$ ), mientras que **4** tiene un grupo metilo en C-3 y un grupo etoxilo en C-4 ( $\delta_H$  1.19, d,  $J=6.5$  Hz y 4.16, m). El análisis anterior junto con lo descrito en la literatura especializada permitió caracterizar al compuesto **5** como la acremonona D (**Figura 30**), un isómero estructural de **4** aislado también del hongo endófito *Acremonium* sp. PSU-MA70.<sup>67, 68</sup>

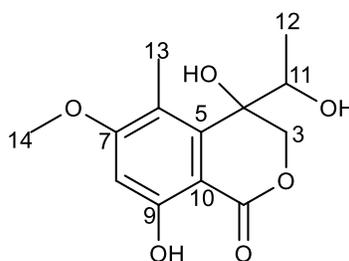


**Figura 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) del compuesto **5** en  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabla 16.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  del **5** en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).

Posición	<b>5</b>	<b>Acremonona D<sup>a</sup></b>
	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)
<b>3</b>	4.44, d (10.6)	4.46, d (10.5)
	4.12, d (10.6)	4.14, d (10.5)
<b>4-OH</b>	2.73, s	2.75, s
<b>8</b>	6.45, s	6.46, s
<b>9-OH</b>	11.63, s	11.64, s
<b>11</b>	4.16, m	4.17, q (6.5)
<b>12</b>	1.19, d (6.5)	1.20, d (6.5)
<b>13</b>	2.40, s	2.42, s
<b>14</b>	3.86, s	3.88, s

<sup>a</sup> Rukachaisirikul, V., et al., 2012.

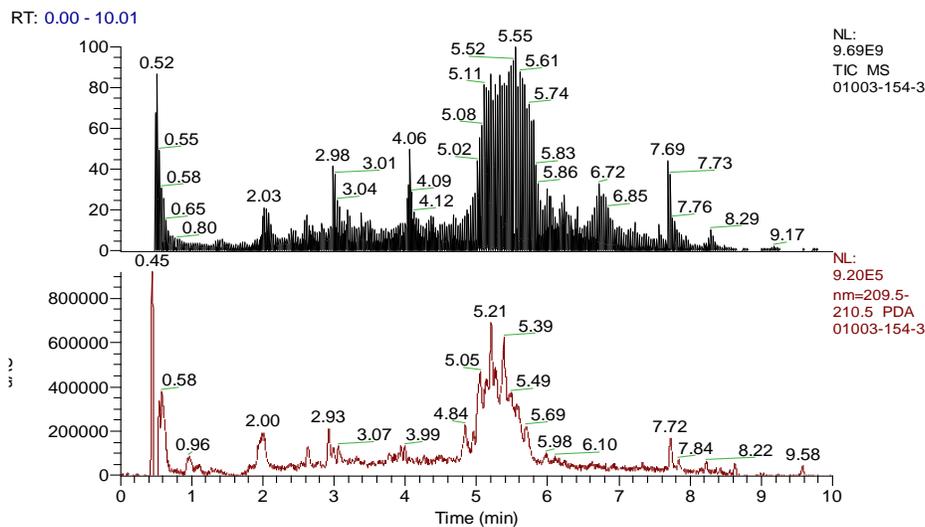


**Figura 30.** Estructura de la acremonona D (**5**).

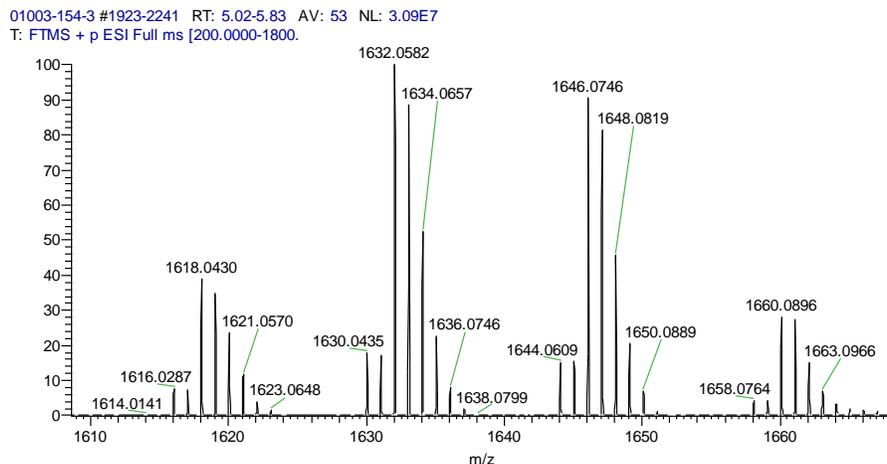
### 5.5.3 Identificación de 6-11 mediante el análisis metabolómico del extracto orgánico por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS

El análisis del extracto del hongo ORO2 mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS reveló la presencia de una serie de productos entre  $t_R$  5.02-5.80 min con peso molecular de 1618 y 1660 umas (**Figura 31**). A pesar de que estos productos no fueron detectados en las fracciones activas del hongo, se decidió realizar su caracterización mediante el estudio detallado de los patrones de fragmentación observados en sus espectros de masas y lo descrito en literatura.

**A**



**B**



**Figura 31.** Cromatogramas TIC y de UV del extracto del hongo ORO2 (**A**). Espectro de masas en el modo ESI<sup>+</sup> del  $t_R$  5.02-5.83 min (**B**).

Dicho análisis reveló que estos iones observados corresponden a una serie de peptabióticos conocidos como neofrapeptinas (**Tabla 17**), las cuales se componen de 15 aminoácidos con un residuo C-terminal inusual alquilado, el 1,5-diazabicyclo [4.3.0]non-5-eno (X). Estos compuestos fueron aislados del hongo *Geotrichum candidum* DSM 15068,<sup>69, 70</sup> sin embargo, años más tarde se encontró que esta cepa fue identificada de manera incorrecta, y que podría tratarse de una nueva especie perteneciente al orden de los *Hypocreales*.<sup>71</sup> Las neofrapeptinas presentan actividad insecticida contra las plagas masticatorias como *Heliothis virescens*, *Plutella xylostella* y *Spodoptera littoralis*.<sup>69</sup>

**Tabla 17.** HRESIMS [M]<sup>+</sup> y secuencia de aminoácidos de las neofrapeptinas **6-11**.<sup>a</sup>

<b>Neofrapeptina A (6), 1632.0580 [M]<sup>+</sup></b>
AcPip <sup>1</sup> -Aib <sup>2</sup> -L-Pip <sup>3</sup> -L-Iva <sup>4</sup> -Aib <sup>5</sup> -L-Leu <sup>6</sup> -β-Ala <sup>7</sup> -Gly <sup>8</sup> -Acc <sup>9</sup> -Aib <sup>10</sup> -L-Pip <sup>11</sup> -Aib <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -L-Leu <sup>14</sup> -L-Iva <sup>15</sup> -X <sup>16</sup>
<b>Neofrapeptina D (7), 1618.0431 [M]<sup>+</sup></b>
AcPip <sup>1</sup> -Aib <sup>2</sup> -L-Pip <sup>3</sup> -Aib <sup>4</sup> -Aib <sup>5</sup> -L-Leu <sup>6</sup> -β-Ala <sup>7</sup> -Gly <sup>8</sup> -Acc <sup>9</sup> -Aib <sup>10</sup> -L-Pip <sup>11</sup> -Aib <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -L-Leu <sup>14</sup> -L-Iva <sup>15</sup> -X <sup>16</sup>
<b>Neofrapeptina F (8), 1632.0585 [M]<sup>+</sup></b>
AcPip <sup>1</sup> -Aib <sup>2</sup> -L-Pip <sup>3</sup> -L-Iva <sup>4</sup> -Aib <sup>5</sup> -L-Leu <sup>6</sup> -β-Ala <sup>7</sup> -Gly <sup>8</sup> -Acc <sup>9</sup> -Aib <sup>10</sup> -3M-Pro <sup>11</sup> -Aib <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -L-Leu <sup>14</sup> -L-Iva <sup>15</sup> -X <sup>16</sup>
<b>Neofrapeptina B (9), 1646.0745 [M]<sup>+</sup></b>
AcPip <sup>1</sup> -Aib <sup>2</sup> -L-Pip <sup>3</sup> -L-Iva <sup>4</sup> -L-Iva <sup>5</sup> -L-Leu <sup>6</sup> -β-Ala <sup>7</sup> -Gly <sup>8</sup> -Acc <sup>9</sup> -Aib <sup>10</sup> -L-Pip <sup>11</sup> -Aib <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -L-Leu <sup>14</sup> -L-Iva <sup>15</sup> -X <sup>16</sup>
<b>Neofrapeptina C (10), 1646.0739 [M]<sup>+</sup></b>
AcPip <sup>1</sup> -Aib <sup>2</sup> -L-Pip <sup>3</sup> -L-Iva <sup>4</sup> -Aib <sup>5</sup> -L-Leu <sup>6</sup> -β-Ala <sup>7</sup> -Gly <sup>8</sup> -Acc <sup>9</sup> -L-Iva <sup>10</sup> -L-Pip <sup>11</sup> -Aib <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -L-Leu <sup>14</sup> -L-Iva <sup>15</sup> -X <sup>16</sup>
<b>Neofrapeptina E (11), 1660.0908 [M]<sup>+</sup></b>
AcPip <sup>1</sup> -Aib <sup>2</sup> -L-Pip <sup>3</sup> -L-Iva <sup>4</sup> -L-Iva <sup>5</sup> -L-Leu <sup>6</sup> -β-Ala <sup>7</sup> -Gly <sup>8</sup> -Acc <sup>9</sup> -L-Iva <sup>10</sup> -L-Pip <sup>11</sup> -Aib <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -L-Leu <sup>14</sup> -L-Iva <sup>15</sup> -X <sup>16</sup>

L-Pip, L-ácido piperídico; Aib, ácido α-aminoisobutírico, L-Iva, L-isovalina; L-Leu, L-leucina; βAla, β-alanina; Gly, glicina; Acc, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; 3M-Pro, 3-metilprolina; X, N-peptido-1-isobutil-2-(2,3,4,6,7,8-hexahidro-1-pirrolo-[1,2-α]-pirimidino) etilamina (PIHPPE). <sup>a</sup>Fredenhagen, A., et al., 2006.

La fórmula molecular de **6** (*t<sub>R</sub>* 5.11 min) se estableció como C<sub>82</sub>H<sub>139</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub> mediante el análisis de los espectros de masas por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (*m/z* 1632.0580 [M+H]<sup>+</sup> y Δ = -2.2 ppm) (**Figura 32**), además de los iones en *m/z* 943.5612 y 689.5078, que corresponden al extremo amino terminal acetilado y el carboxilo terminal del péptido. Por otra parte, el espectro de MS/MS del ion *m/z* 943.5612 reveló la presencia de los fragmentos en *m/z* 296.1966, 409.2808, 620.3779, 705.4324, asignables a las pérdidas del tercer al décimo aminoácido del péptido (**Figura 33**). El análisis anterior junto con lo descrito en la literatura permitió caracterizar a **6** como la neofrapeptina A (**Figura 34**).<sup>70</sup>

01003-154-3 #1964 RT: 5.11 AV: 1 SB: 1 5.13 NL: 1.41E9  
 T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1800.0000]

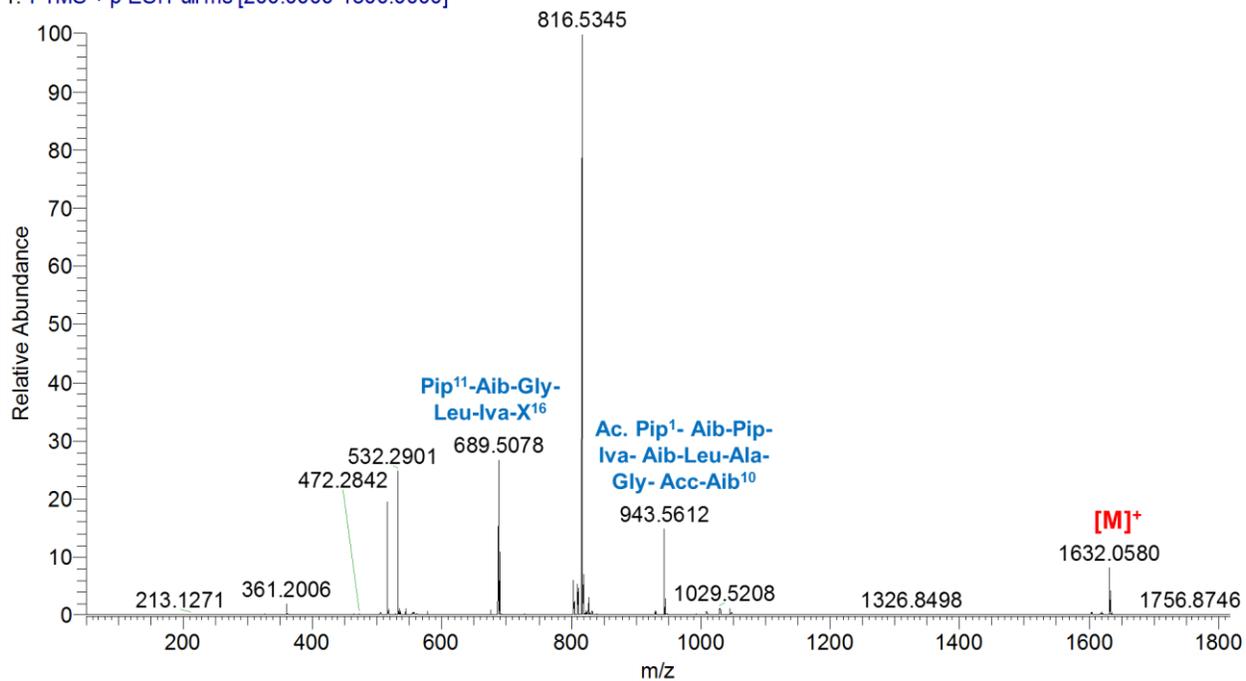


Figura 32. Espectro de masas en el modo ESI<sup>+</sup> de 6.

01003-154-3 #1956 RT: 5.09 AV: 1 NL: 1.81E8  
 T: FTMS + p ESI d Full ms2 943.5611@hcd30.00 [65.3333-980.0000]

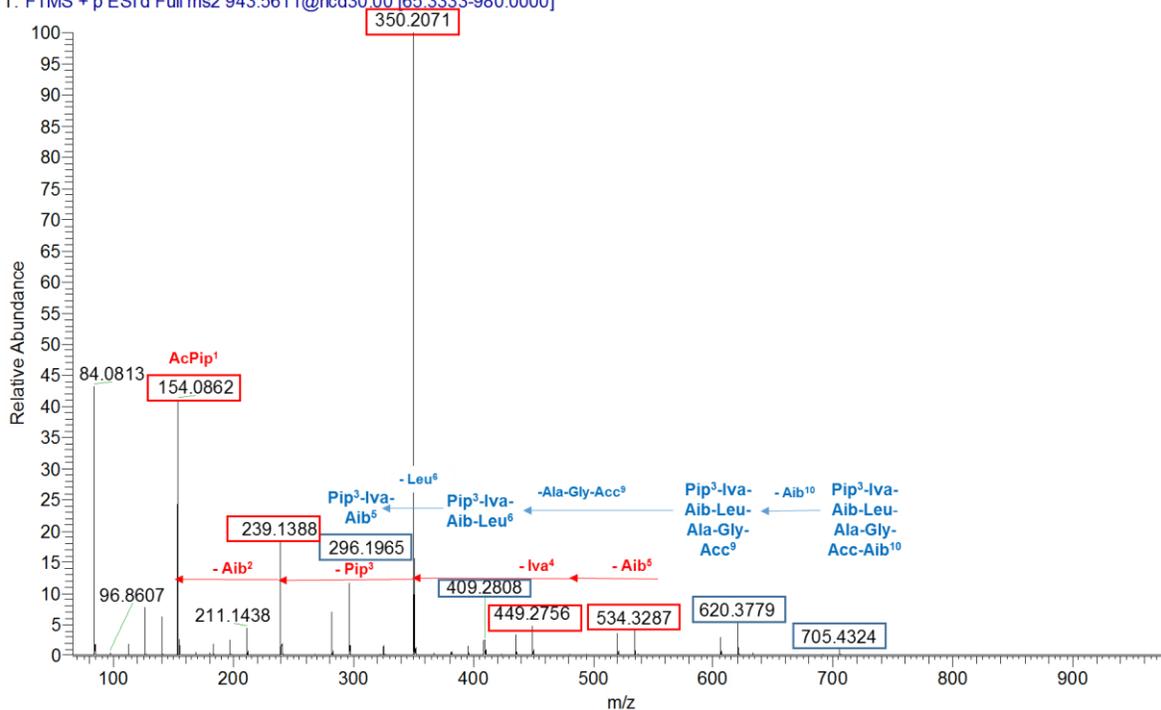
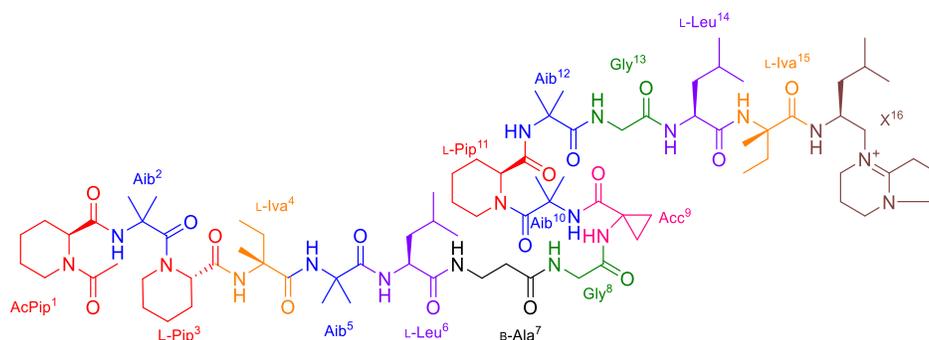
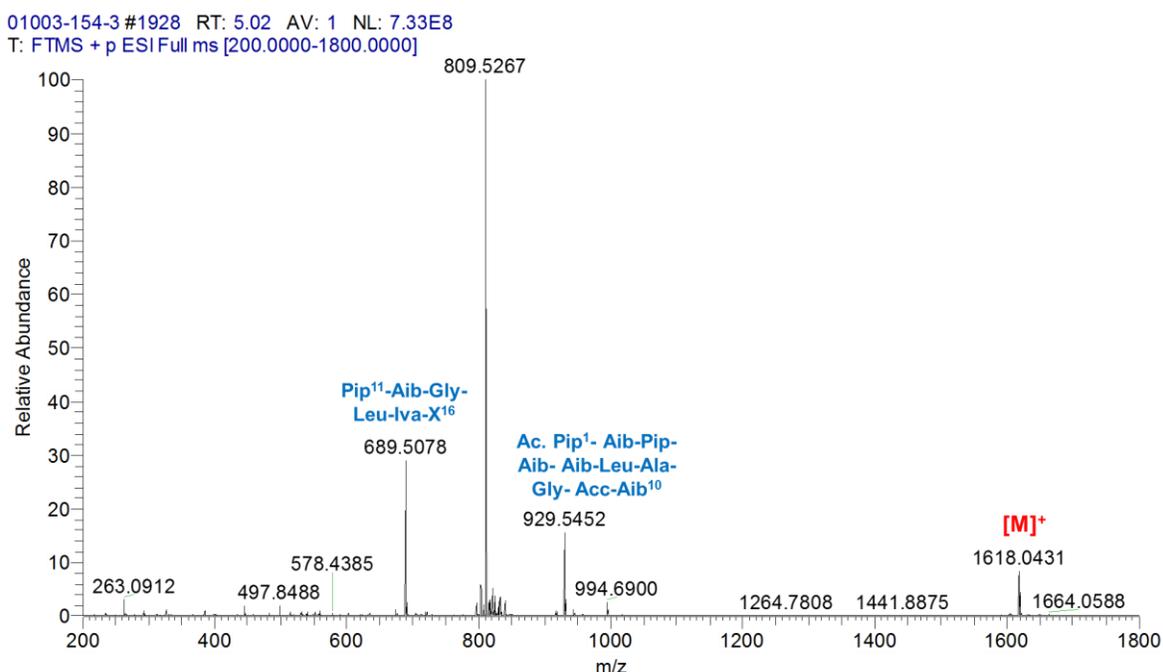


Figura 33. Espectro de MS/MS en el modo ESI<sup>+</sup> del ion  $m/z$  943.5611 de 6.



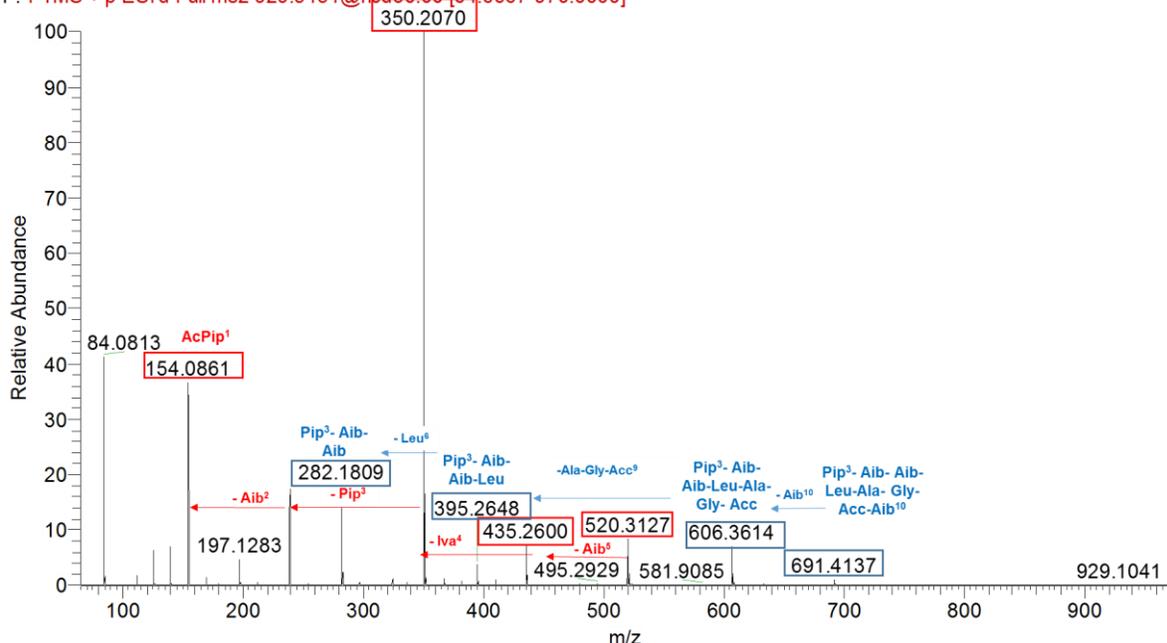
**Figura 34.** Estructura de la neofrapeptina A (**6**). L-Pip, L-ácido pipercolico; Aib, ácido  $\alpha$ -aminoisobutirico, L-Iva, L-isovalina; L-Leu, L-leucina;  $\beta$ Ala,  $\beta$ -alanina; Gly, glicina; Acc, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; X, N-péptido-1-isobutil-2-(2,3,4,6,7,8-hexahidro-1-pirrol-1,2- $\alpha$ )-pirimidino) etilamina (PIHPPE).

La fórmula molecular de **7** ( $t_R$  5.02 min) se estableció como  $C_{81}H_{137}N_{18}O_{16}$  con base en el análisis del espectro de masas obtenido por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  1618.0431  $[M+H]^+$  y  $\Delta = -1.8$  ppm) (**Figura 35**). Este compuesto tiene 14 umas menos que **6**, y que se atribuye al cambio del aminoácido Iva por Aib en la posición 4 de **7**. La diferencia de 14 umas se puede observar en todos los fragmentos en el espectro de MS/MS del ion en  $m/z$  929.5452 (**Figura 36**). Así, el análisis anterior junto con lo descrito en la literatura permitió caracterizar a **7** como la neofrapeptina D (**Figura 37**).<sup>70</sup>

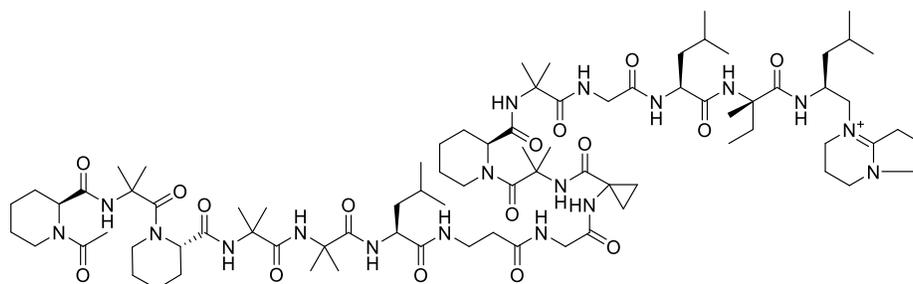


**Figura 35.** Espectro de masas en modo ESI<sup>+</sup> de **7**.

01003-154-3 #1932 RT: 5.02 AV: 1 NL: 1.38E8  
 F: FTMS + p ESI d Full ms2 929.5451@hcd30.00 [64.6667-970.0000]



**Figura 36.** Espectro de masas en modo ESI<sup>+</sup> del ion  $m/z$  929.5451 de **7**.



**Figura 37.** Estructura de la neofrapeptina D (**7**).

La fórmula molecular de **8** ( $t_r$  5.46 min) se estableció como  $C_{82}H_{139}N_{18}O_{16}$  con base en los espectros de masas por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  1632.0585  $[M]^+$  y  $\Delta=-1.9$  ppm) (**Figura 38**). Este compuesto tiene el mismo peso molecular y patrón de fragmentación en su secuencia del extremo N-terminal que **6**. Sin embargo, la falta del fragmento en  $m/z$  578.4395 (**Figura 39**) es indicativa de que **8** tiene el aminoácido 3M-Pro en la posición 11, en lugar de ácido piperólico como en **6**. El análisis anterior junto con lo descrito en la literatura permitió caracterizar a **8** como la neofrapeptina F (**Figura 40**).<sup>70</sup>

01003-154-3 #2096 RT: 5.46 AV: 1 NL: 1.90E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1800.0000]

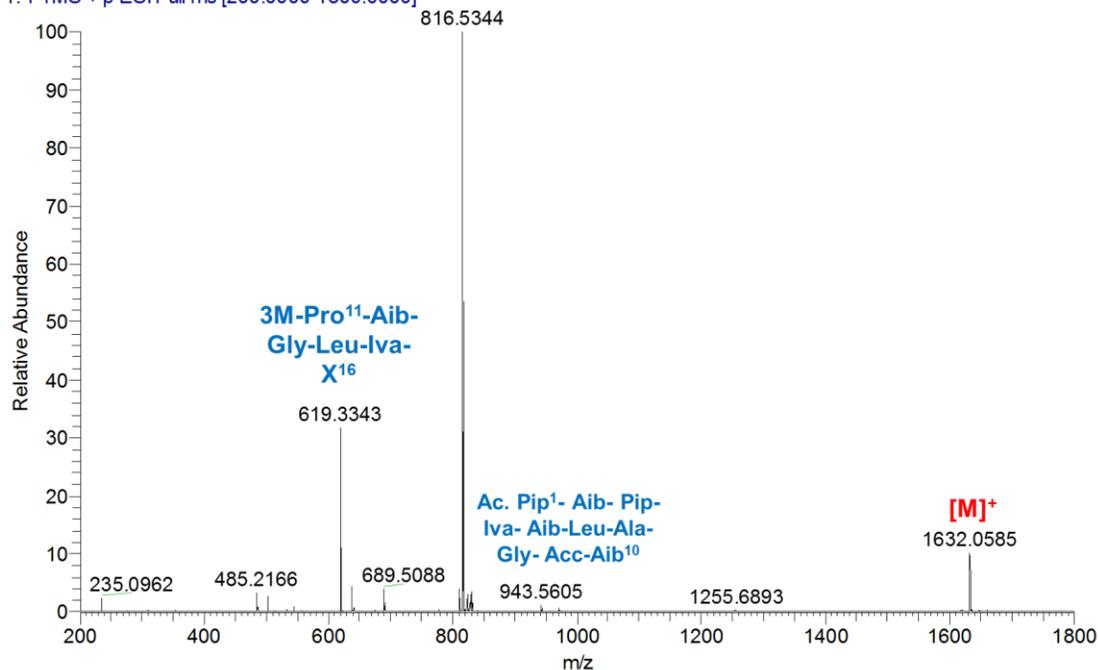


Figura 38. Espectro de masas en modo ESI<sup>+</sup> de 8.

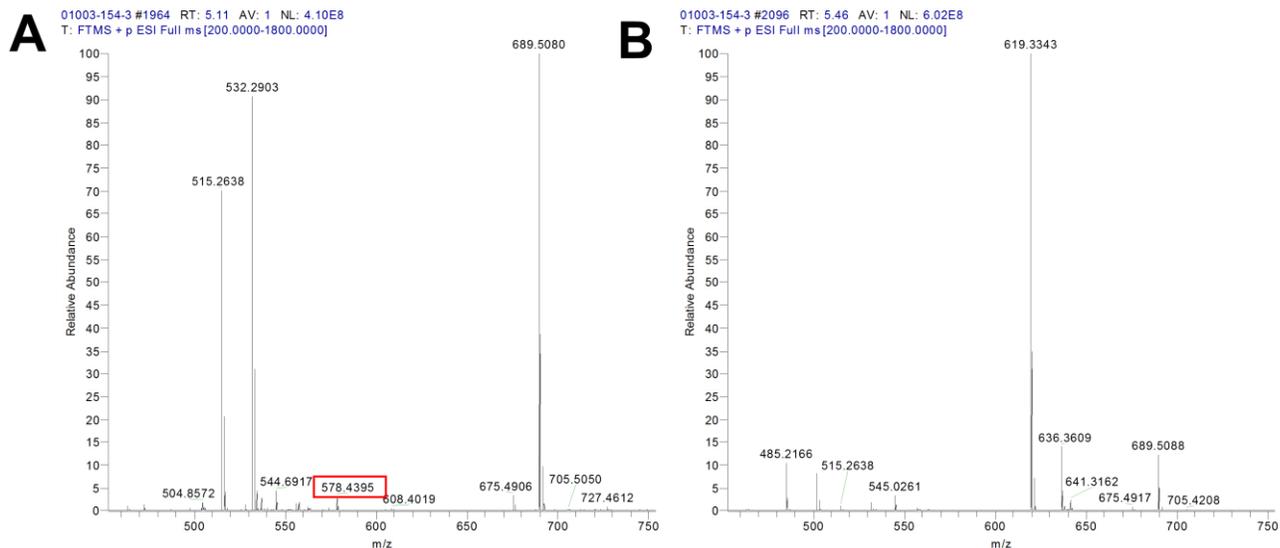


Figura 39. Ampliación de los espectros de masas en modo ESI<sup>+</sup> de 6 (A) y 8 (B) entre  $m/z$  450-750.

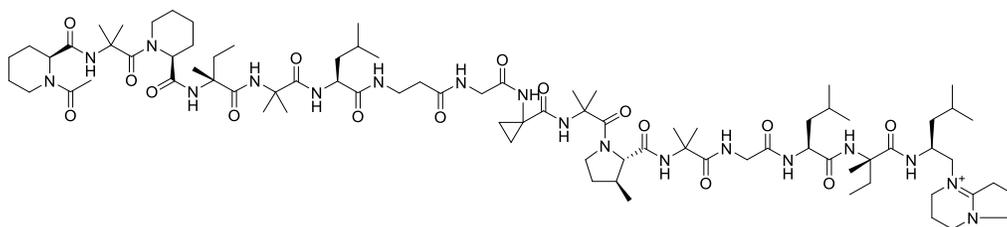
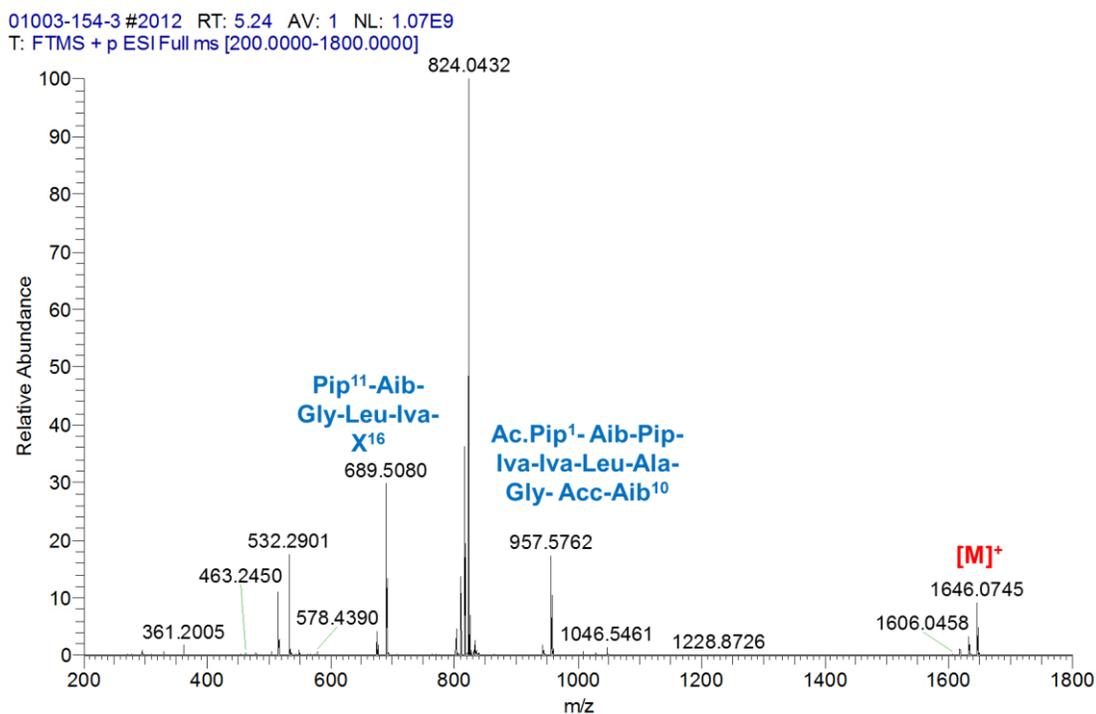


Figura 40. Estructura de la neofrapeptina F (8).

La fórmula molecular de **9** y **10** ( $t_R$  5.24 y 5.27 min) se estableció como  $C_{83}H_{141}N_{18}O_{16}$  con base en los espectros de masas por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  1646.0745  $[M]^+$ ,  $\Delta = -1.7$  ppm y 1646.0739  $[M]^+$ ,  $\Delta = -2.1$  ppm) (**Figuras 41** y **42**). El patrón de fragmentación de ambos compuestos reveló que la secuencia del extremo C-terminal es similar al de **6**, mientras que en la N-terminal tiene 14 umas más. Lo anterior se atribuye al cambio del aminoácido Aib por Iva en la posición 5 en **9**, y en la posición 10 en **10**. El análisis anterior junto con lo descrito en la literatura permitió caracterizar a **9** y **10** como las neofrapeptinas B y C (**Figuras 43** y **44**).<sup>70</sup>



**Figura 41.** Espectro de masas en modo ESI<sup>+</sup> de **9**.

01003-154-3 #2024 RT: 5.27 AV: 1 NL: 8.77E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1800.0000]

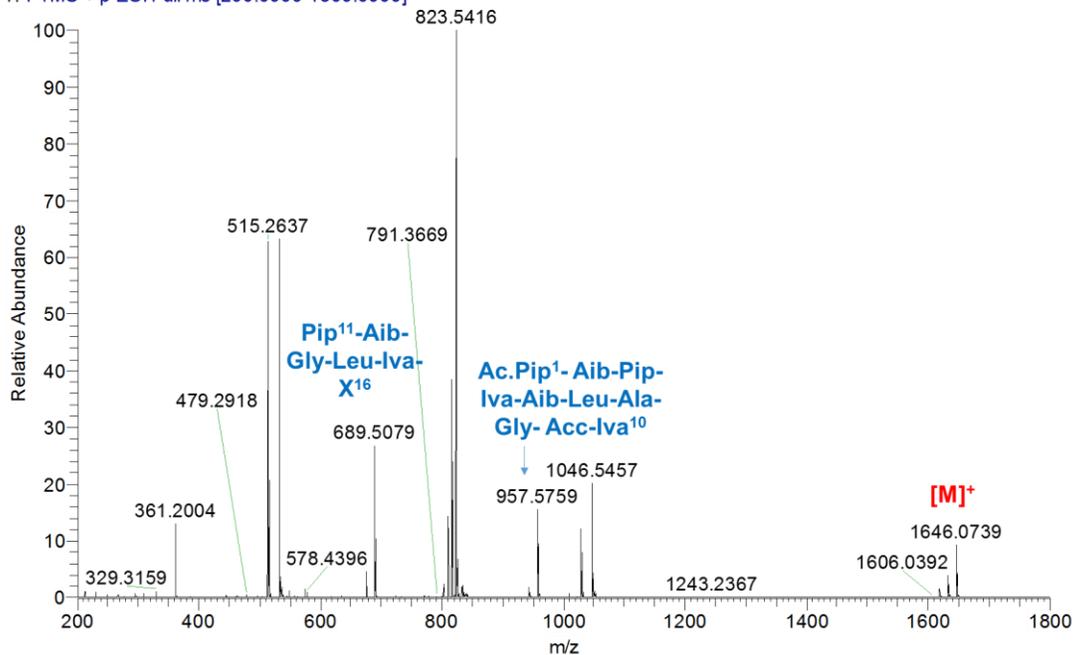


Figura 42. Espectro de masas en modo ESI<sup>+</sup> de **10**.

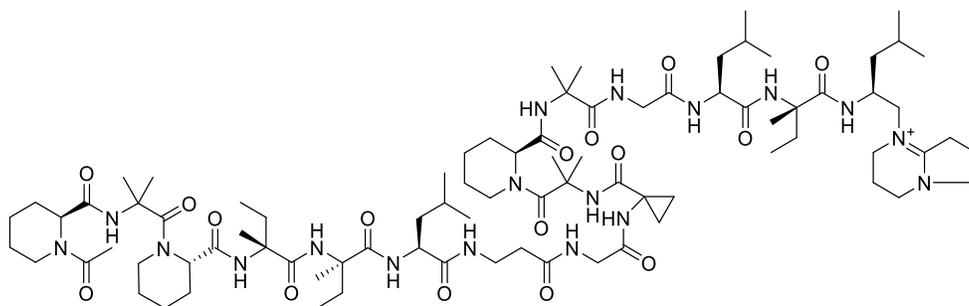


Figura 43. Estructura de la neofrapeptina B (**9**).

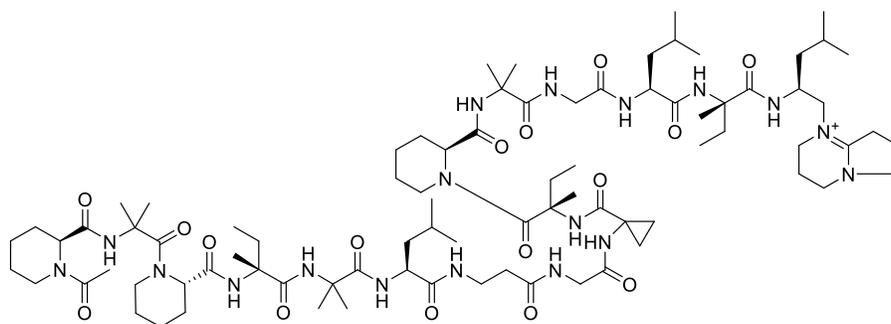
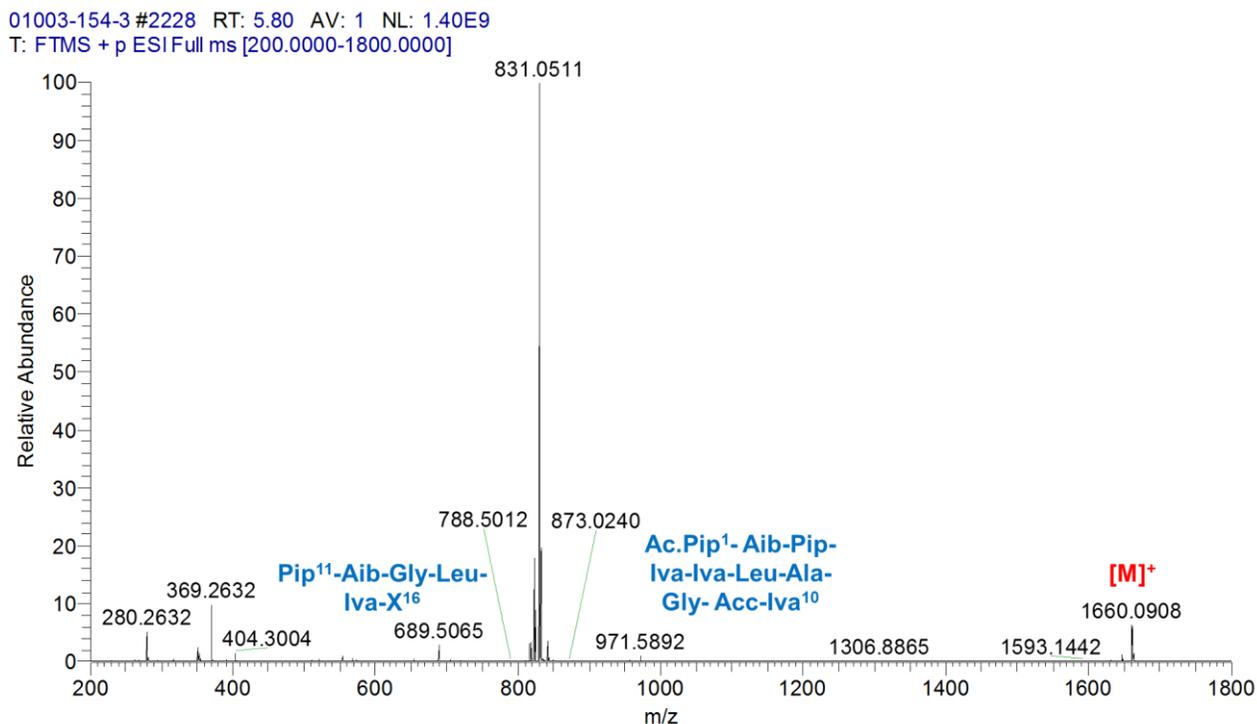


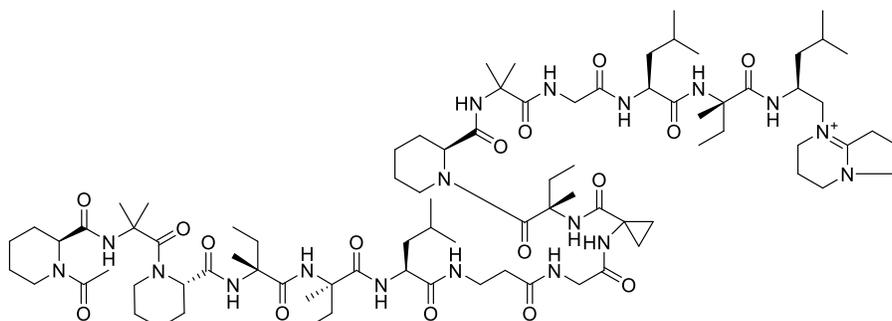
Figura 44. Estructura de la neofrapeptina C (**10**).

Finalmente, la fórmula molecular de **11** ( $t_R$  5.80 min) se estableció como  $C_{84}H_{143}N_{18}O_{16}$  con base en los espectros de masas por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  1660.0908  $[M]^+$ ,  $\Delta = -1.3$  ppm) (Figura 45). Este producto tiene 28 umas más que **6** en el extremo N-terminal, lo que se atribuye al cambio del aminoácido Aib por Iva en las posiciones 5 y 10 de la secuencia.

El análisis anterior junto con descrito en la literatura permitió caracterizar al compuesto **11** como la neofrapeptina E (**Figura 46**).<sup>70</sup>



**Figura 45.** Espectro de masas en modo ESI<sup>+</sup> de **11**.



**Figura 46.** Estructura de la neofrapeptina E (**11**).

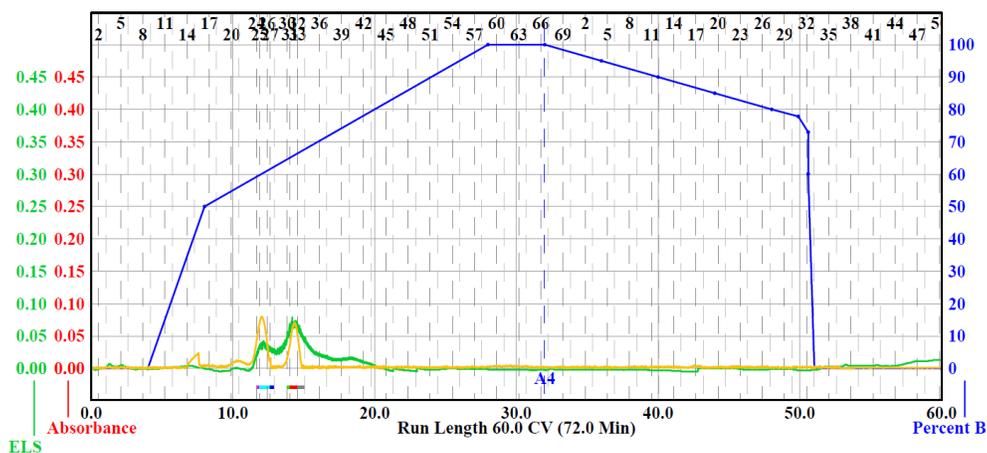
## 5.6 Estudio químico y biológico del hongo ORO3

El hongo ORO3 pertenece al género *Alfaria*, con base en los resultados obtenidos de la identificación taxonómica a partir del ITS. Este género fue establecido por Crous *et al.* (2014) para acomodar un nuevo patógeno vegetal, *A. cyperiesculenti* Crous, asociado con la muerte regresiva de la punta de la hoja y la pudrición del tubérculo de chufa (*Cyperus esculentus*) en España.<sup>72</sup> En un estudio posterior, Lombard *et al.* (2016) agregaron varias especies a este

género: *A. ossiformis*, *A. putrefolia*, entre otras.<sup>73</sup> A la fecha, no se han realizado estudios químicos a partir de especies de este género, por lo que este proyecto representa el primer estudio químico de una especie del género *Alfaria*.

### 5.6.1 Estudio químico de las fracciones activas seleccionadas

Como se mencionó anteriormente, los resultados de la actividad biológica de las fracciones primarias del extracto del hongo ORO3 (**Tabla 10**) permitieron seleccionar a la fracción F7 para la separación de los responsables de dicha actividad. Debido a la complejidad observada en el análisis por HPLC a nivel analítico de dicha fracción, además del buen rendimiento obtenido en el fraccionamiento primario del extracto (931.4 mg), se decidió realizar un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna tipo Flash siguiendo la metodología descrita en 4.5.2.1. De este proceso se obtuvieron 8 conjuntos de fracciones reunidos con base en los perfiles en el UV y ELSD (**Figura 47** y **Tabla 18**).



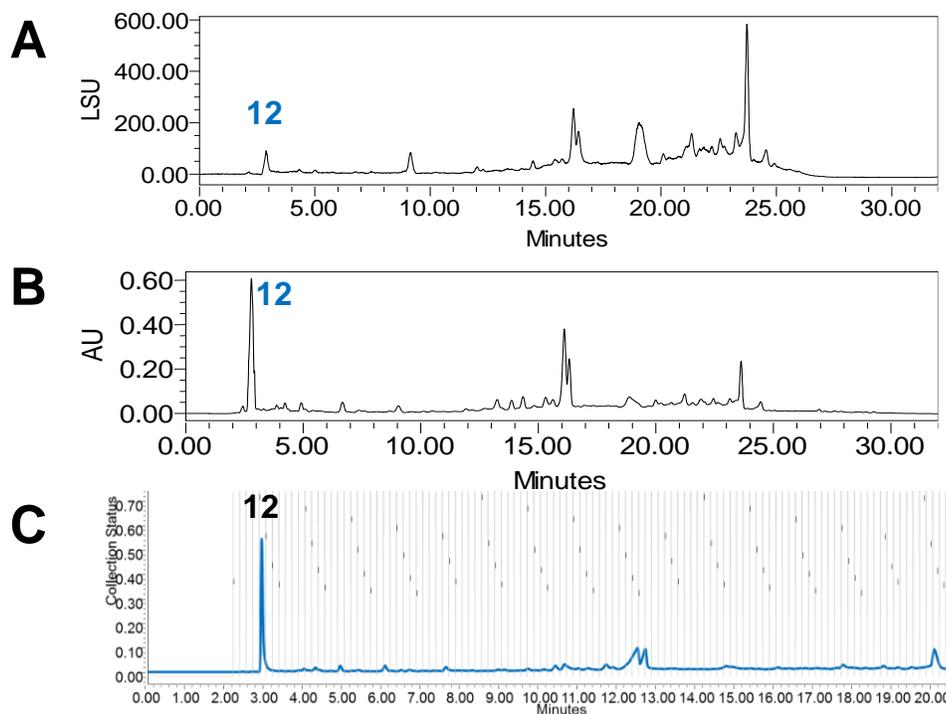
**Figura 47.** Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo Flash de la fracción F7. Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELSD y PDA, y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH).

**Tabla 18.** Fraccionamiento secundario de la fracción F7 del extracto del hongo ORO3.

Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
1 (1-13)	8.4	5 (22-27)	117.8
2 (14-15)	3.5	6 (28-37)	322.5
3 (16-18)	3.4	7 (38-42)	104.3
4 (19-21)	15.8	8 (43-fin)	162.3
<b>Recuperado (mg)</b>			<b>738</b>
<b>Recobro (%)</b>			<b>102</b>

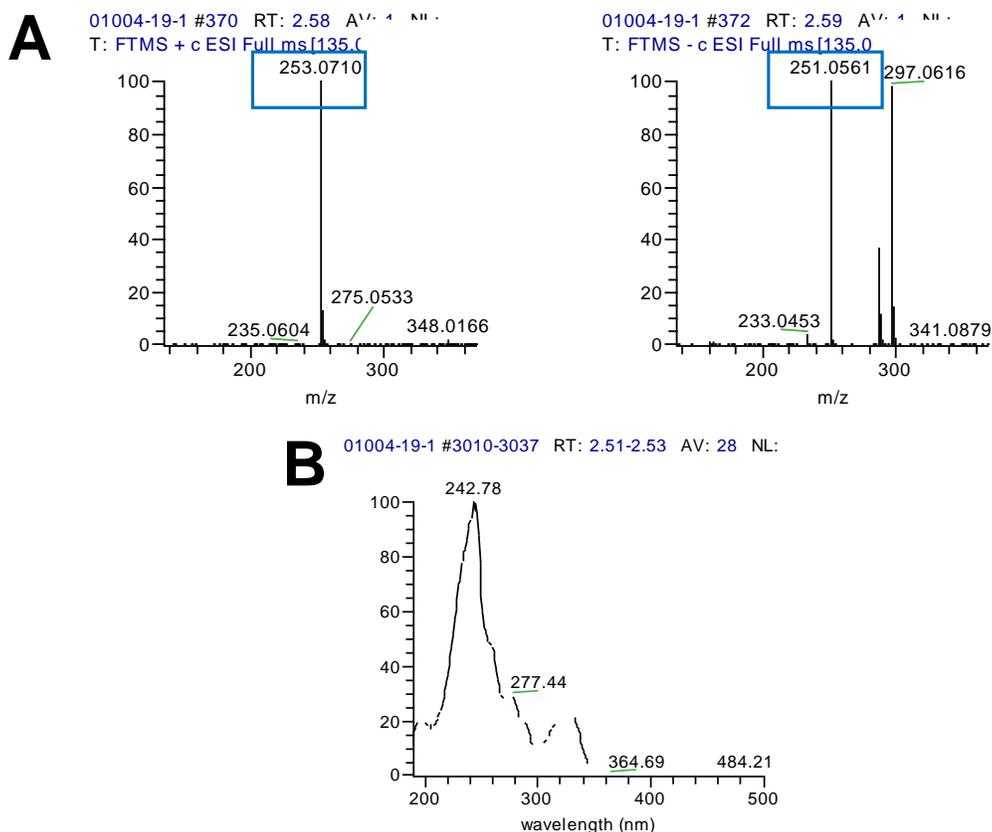
## 5.6.2 Aislamiento y caracterización de **12** a partir de la fracción F7-6

La separación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción secundaria F7-6 se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.5.2.3**. Este procedimiento permitió la obtención de 1.9 mg del compuesto **12** ( $t_R$  2.78 min) (**Figura 48**).



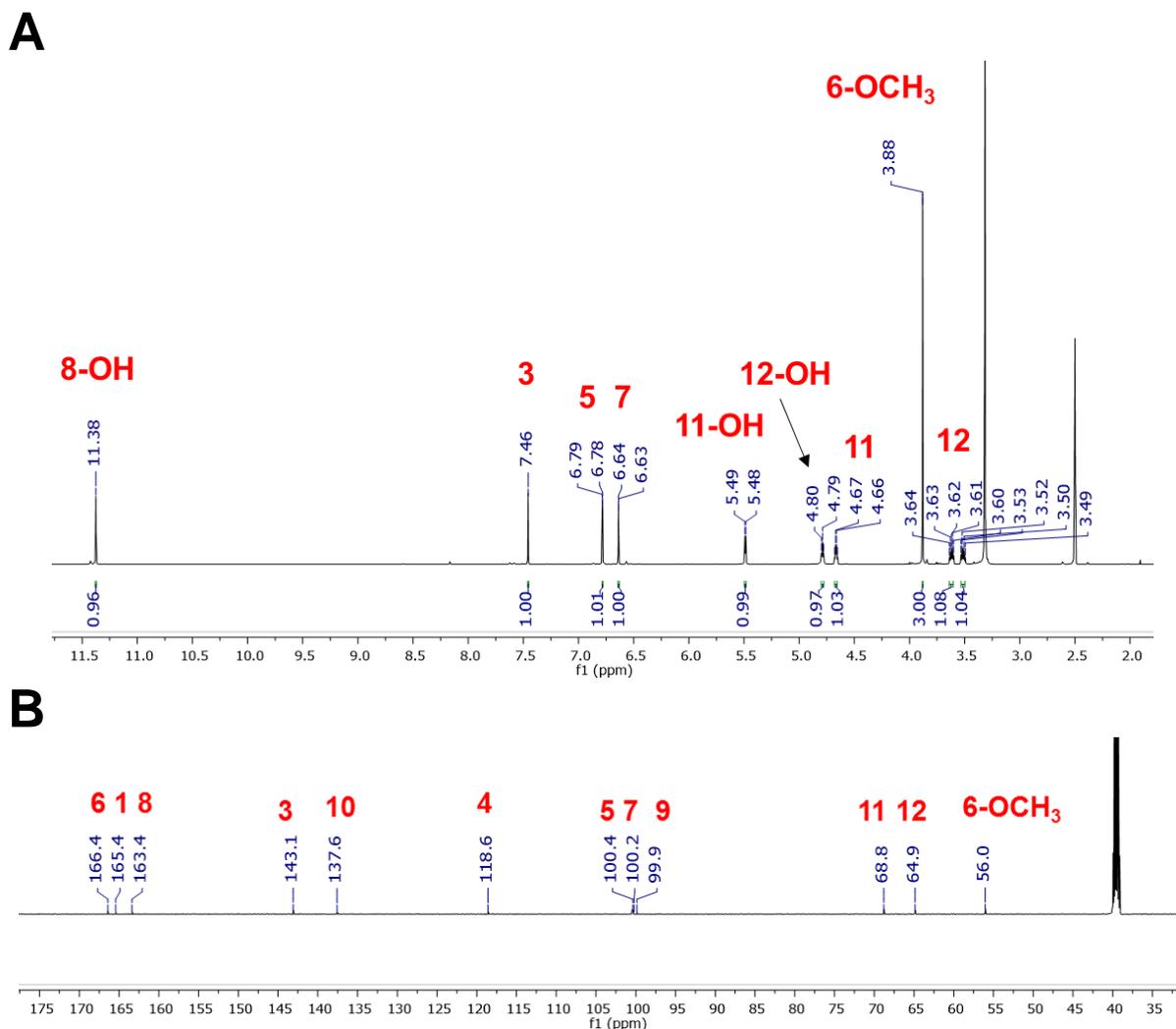
**Figura 48.** Cromatogramas por HPLC de la fracción F7-6: **(A)** ELSD a nivel analítico. **(B)** PDA 254 nm. **(C)** Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

El compuesto **12** se aisló como un sólido cristalino y su fórmula molecular se estableció como  $C_{12}H_{12}O_6$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  253.0710  $[M+H]^+$  y 251.0561  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = 1.3$  ppm), la cual permite 7 grados de insaturación (**Figura 49**).



**Figura 49.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (A) y de UV (B) de **12**.

El análisis detallado de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Figura 50A** y **Tabla 19**) permitió identificar los siguientes grupos de señales: en  $\delta_{\text{H}}$  3.52, (dd,  $J=11.6, 6.0, 5.5$  Hz) y 3.62 (dd,  $J=10.9, 5.5, 5.3$  Hz) se observan los hidrógenos de un oximetileno; en  $\delta_{\text{H}}$  3.88 se observa una señal simple correspondiente a un grupo metilo base de oxígeno; en  $\delta_{\text{H}}$  4.67 (dd,  $J=10.1, 5.1$  Hz), se observa la señal de un hidroximetino; en  $\delta_{\text{H}}$  6.64 (d,  $J=2.3$  Hz) y 6.79 (d,  $J=2.3$  Hz), se observan dos hidrógenos aromáticos correspondientes a un sistema tetrasustituido; en  $\delta_{\text{H}}$  7.46 se observa una señal simple de un hidrógeno olefínico; en  $\delta_{\text{H}}$  11.38 se observa una señal simple de un hidrógeno fenólico quelatado; y en  $\delta_{\text{H}}$  5.51 (d,  $J=4.6$  Hz) y en 4.80 (t,  $J=5.9$  Hz), se observan los hidrógenos de dos hidroxilos alifáticos. Por otra parte, en el espectro de RMN <sup>13</sup>C (**Figura 50B** y **Tabla 19**), se observan 12 señales que corresponden a seis carbonos no protonados con hibridación  $sp^2$  ( $\delta_{\text{C}}$  166.4, 165.4, 163.4, 137.6, 118.6 y 99.9), cuatro metinos ( $\delta_{\text{C}}$  143.1, 100.4, 100.2 y 68.8), un metileno ( $\delta_{\text{C}}$  64.9), y un metoxilo ( $\delta_{\text{C}}$  56.0).



**Figura 50.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) (A) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) (B) de **12** en  $\text{DMSO-}d_6$ .

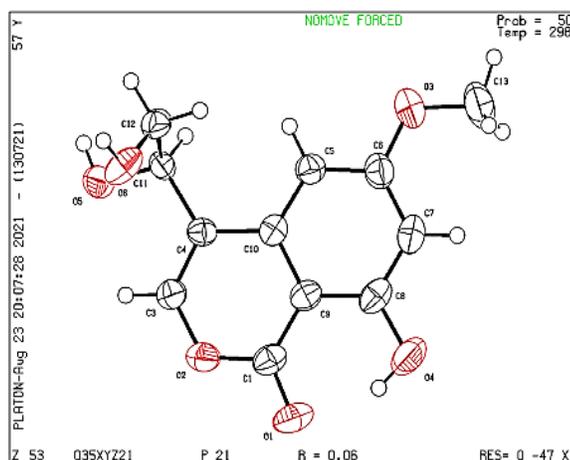
**Tabla 19.** Datos de RMN de **12** en  $\text{DMSO-}d_6$  (600 y 150 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente).

Posición	<b>12</b>		<b>Myrotelactona A<sup>b</sup></b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)
1	165.4, C	-	165.4, C	-
3	143.1, CH	7.46, s	143.1, CH	7.45, s
4	118.5, C	-	118.6, C	-
5	100.4, CH	6.79, d (2.3)	100.5, CH	6.78, d (2.2)
6	166.4, C	-	166.4, C	-
7	100.2, CH	6.64, d (2.3)	100.4, CH	6.63, d (2.2)
8	163.4, C	-	163.4, C	-
9	99.9, C	-	99.9, C	-
10	137.6, C	-	137.6, C	-
11	68.7, CH	4.67, dd (10.1, 5.1)	68.8, CH	4.66, td (5.2, 5.2)
12	64.8, $\text{CH}_2$	3.62, dd (10.9, 5.5, 5.3)	64.8, $\text{CH}_2$	3.62, ddd (11.3, 5.3, 5.3)

		3.52, dd, (11.6, 6.0, 5.5)		3.51, ddd, (11.3, 5.3, 5.3)
6-OCH <sub>3</sub>	56.0, CH <sub>3</sub>	3.88, s	56.0, CH <sub>3</sub>	3.87, s
8-OH	-	11.38, s	-	11.37, s
11-OH	-	5.49, d (4.7)	-	5.50, d (4.6)
12-OH	-	4.79, t, (6.0)	-	4.81, t, (5.9)

<sup>a</sup>Xu, Y., et al, 2018.

El análisis anterior y lo descrito en la literatura permitió caracterizar al compuesto **12** como la myrotelactona A.<sup>74</sup> La estructura de este compuesto se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X (**Figura 51**). Sin embargo, la configuración absoluta de la molécula no pudo establecerse por esta técnica ya que el valor del parámetro de Flack [0.2 (4)] no fue concluyente. A pesar de esto, el valor de la rotación óptica experimental obtenido para este compuesto fue el opuesto en signo y magnitud al reportado en la literatura para la myrotelactona A (**Tabla 20**), lo que permite concluir que **12** tiene una configuración de S en C-11, contrario a la myrotelactona A que presenta la configuración R (**Figura 52**). En este contexto, se estableció a **12** como un nuevo producto natural con el nombre trivial de myrotelactona E.



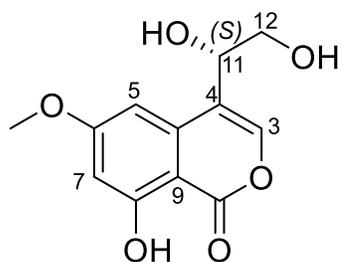
**Figura 51.** Estructura de rayos X de **12**.

**Tabla 20.** Valores experimentales y reportados de rotación óptica de **12**.

<b>12</b> <sup>a</sup>	<b>Myrotelactona A</b> <sup>b</sup>
$[\alpha]^{25} = +29.7$	$[\alpha]^{20} = -36.0$

<sup>a</sup>c 0.01, MeOH; <sup>b</sup>c 0.1, MeOH (Xu, Y., et al, 2018).

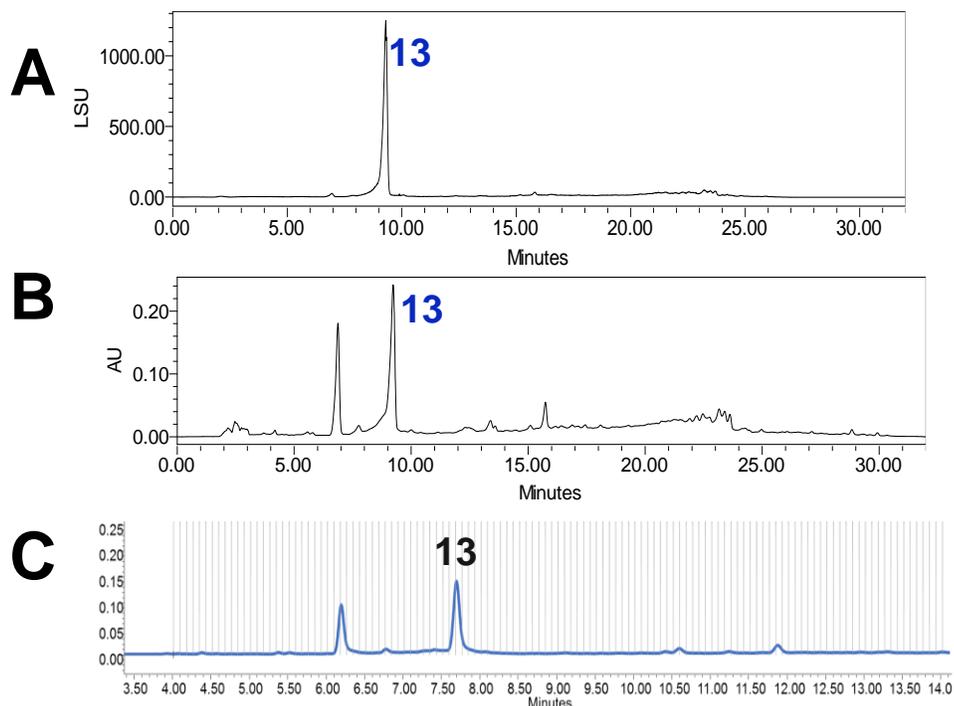
c= concentración (g/100 mL)



**Figura 52.** Estructura de la myrotelactona E (**12**).

### 5.6.3 Aislamiento y caracterización de **13** a partir de la fracción F7-5

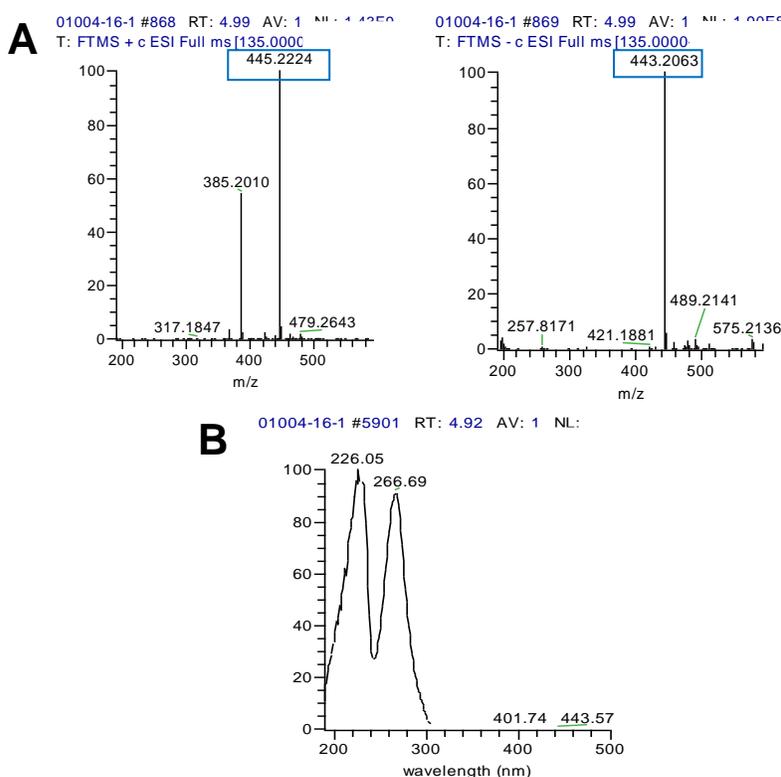
La separación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción secundaria F7-5 se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.5.2.2**. Este procedimiento permitió la obtención de 5.4 mg de compuesto **13** ( $t_R$  7.70 min) (**Figura 53**).



**Figura 53.** Cromatogramas por HPLC de la fracción F7-5: **(A)** ELSD a nivel analítico. **(B)** PDA 254 nm. **(C)** Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

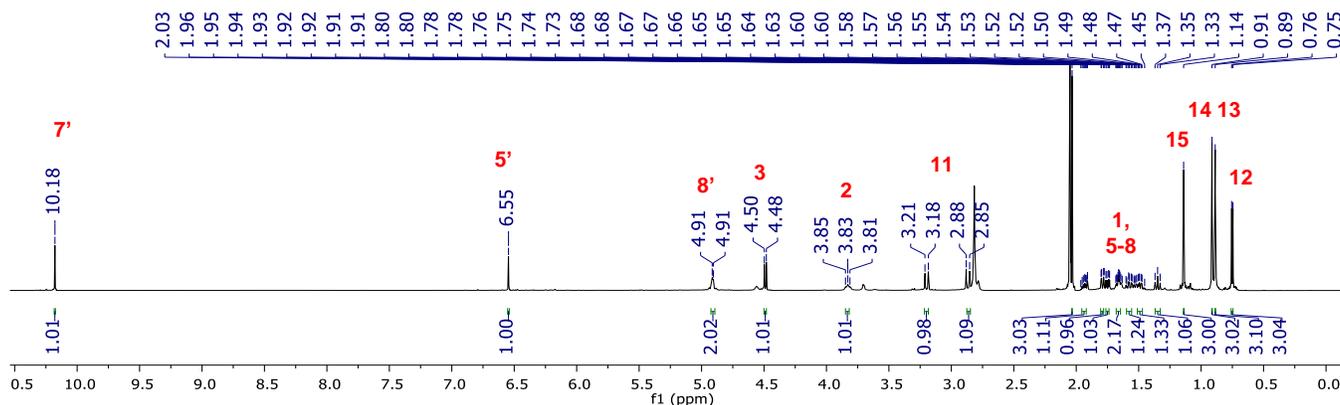
Este producto se aisló como un aceite amarillo y su fórmula molecular se estableció como  $C_{25}H_{34}O_7$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  447.2376  $[M+H]^+$  y 445.2229  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = -0.3$  ppm), la cual permite 9 grados de insaturación (**Figura 54**). El análisis del espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 55A** y **Tabla 21**) de **13** permitió identificar los siguientes grupos de señales: en  $\delta_H$  10.18 (s) y 6.55 (s) se observan dos hidrógenos, uno de

un grupo aldehído y otro aromático; en  $\delta_H$  4.91 (d,  $J=5.5$ ) una señal atribuible a dos hidrógenos de un oximetileno, y en  $\delta_H$  4.49 (d,  $J=9.9$  Hz) y 3.82, (m), dos más de hidrógenos de tipo oximetino;  $\delta_H$  3.20 (d,  $J=16.5$  Hz) y 2.87 (d,  $J=16.5$  Hz) se observan las señales de un metileno diasterotópico y entre  $\delta_H$  1.35-1.93 señales múltiples que integran para 8 hidrógenos de metilenos y metinos; en  $\delta_H$  2.03 se observa una señal simple de un metilo de acetato; y en  $\delta_H$  1.14 (s), 0.91 (s), 0.89 (s) y .75 (d,  $J=6.5$  Hz) se observan señales asignables a metilos. Por otra parte en el espectro de RMN  $^{13}C$  (**Figura 55B** y **Tabla 21**) se observaron 25 señales correspondientes a 5 metilos en  $\delta_C$  15.6, 17.4, 18.0, 21.0 y 29.0; 5 metilenos en  $\delta_C$  21.6, 31.2, 31.6, 39.7 y 62.1, este último unido a oxígeno; 6 metinos en  $\delta_C$  37.2, 43.8, 66.3, 84.4, 102.8 y 194.9, incluyendo los correspondientes a grupo aldehído, un carbono aromático protonado y 2 de carbonos oxigenados; 5 carbonos de tipo  $sp^2$  en  $\delta_C$  112.6, 113.3, 149.9, 161.6 y 168.8, los últimos dos oxigenados; un carbono de un carbonilo del acetato en  $\delta_C$  171.1, una señal correspondiente al grupo carbonilo del acetato; un carbono del tipo espiro en  $\delta_C$  99.9; y dos cuaternarios en  $\delta_C$  39.6 y 43.8.

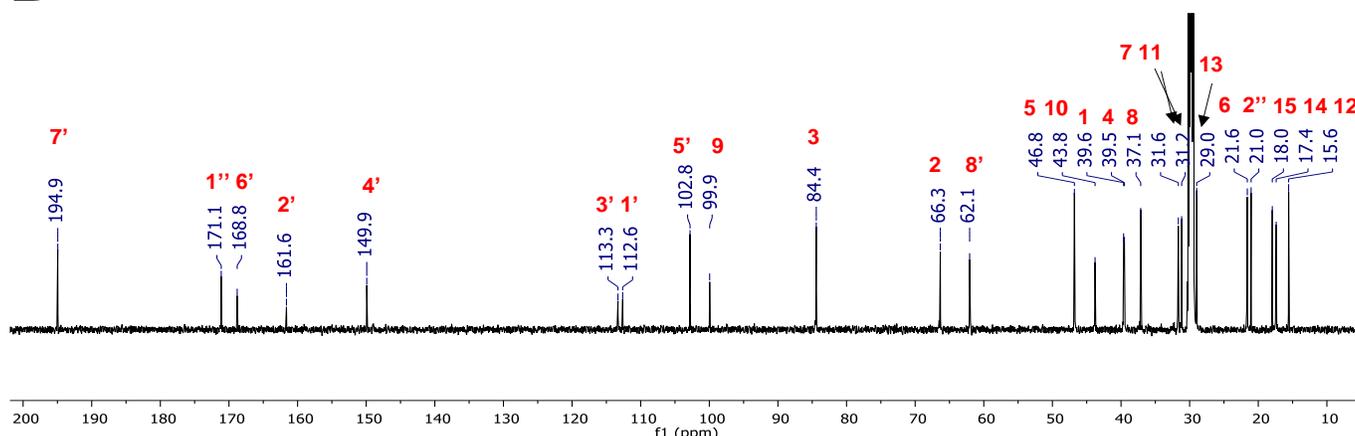


**Figura 54.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y de UV (PDA) (**B**) de **13**.

**A**



**B**



**Figura 55.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) (A) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) (B) del **13** en acetona- $d_6$ .

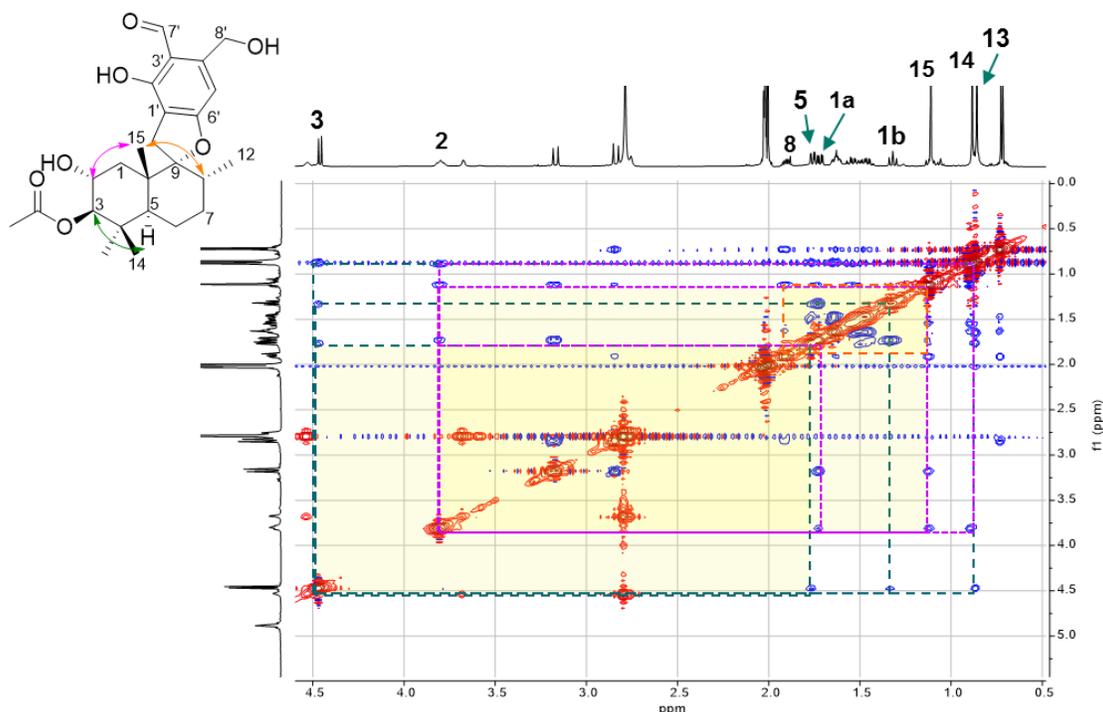
**Tabla 21.** Datos de RMN de **13** en acetona- $d_6$  (600 y 150 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente).

Posición	<b>13</b>		<b>Myrotecisina B<sup>a</sup></b>	
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	39.6, CH <sub>2</sub>	1.35, t (12.1) 1.75, dd (12.6, 4.6)	38.4, CH <sub>2</sub>	1.17 m 1.57, m
2	66.3, CH	3.82, m	64.4, CH	3.65, m
3	84.4, CH	4.49, d (9.9)	83.3, CH	4.29, d (9.9)
4	39.5, C	-	39.0, C	-
5	46.8, CH	1.79, dd (12.3, 2.7)	45.5, CH	1.63, m
6	21.6, CH <sub>2</sub>	1.66, m 1.58 m	20.4, CH <sub>2</sub>	1.56, m 1.48, m
7	31.6, CH <sub>2</sub>	1.66, m 1.50, m	30.5, CH <sub>2</sub>	1.57 m 1.38, m
8	37.1, CH	1.93, m	35.6, CH	1.85, m
9	99.9, C	-	98.8, C	-
10	43.8, C	-	42.5, C	-
11	31.2, CH <sub>2</sub>	3.20, d (16.5) 2.87, d (16.5)	30.2, CH <sub>2</sub>	3.11, d (16.5) 2.89, d (16.5)

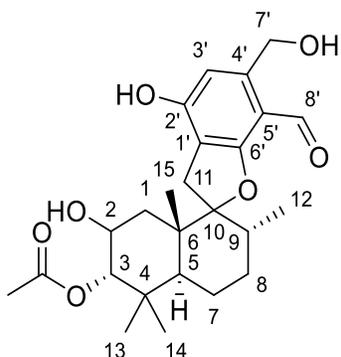
12	15.6, CH <sub>3</sub>	0.75, d (6.5)	15.1, CH <sub>3</sub>	0.68, d (6.3)
13	29.0, CH <sub>3</sub>	0.89, s	28.4, CH <sub>3</sub>	0.79, s
14	18.0, CH <sub>3</sub>	0.91, s	17.5, CH <sub>3</sub>	0.81, s
15	17.4, CH <sub>3</sub>	1.14, s	16.6, CH <sub>3</sub>	1.03, s
1'	112.6, C	-	112.5, C	-
2'	161.6, C	-	159.8, C	-
3'	113.6, C	-	112.2, C	-
4'	149.9, C	-	149.4, C	-
5'	102.8, CH	6.55, s	101.6, CH	6.61, s
6'	168.8, C	-	167.3, C	-
7'	194.9, CHO	10.18, s	193.8, CHO	10.07, s
8'	62.1, CH <sub>2</sub>	4.91, d (5.5)	60.4, CH <sub>2</sub>	4.74, s
1''	171.1, C	-	170.3, C	-
2''	21.0, CH <sub>3</sub>	2.03, s	21.0, CH <sub>3</sub>	2.02, s

<sup>a</sup>Xu, Y., et al, 2018.

La configuración relativa de este producto se estableció mediante el análisis de las correlaciones H-H observadas en el espectro NOESY (**Figura 56**). Así, los resultados antes mencionados y lo descrito en la literatura permitieron caracterizar a este producto como la myrotecisina B (**Figura 57**).<sup>73</sup> Este fenilespirodrimano fue aislado a partir del hongo *Myrothecium* sp. OUCMDZ-2784 asociado con la planta medicinal *Apocynum venetum* resistente a condiciones de salinidad elevada, y mostró actividad como inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (CI<sub>50</sub>=0.66 mM).<sup>73</sup>



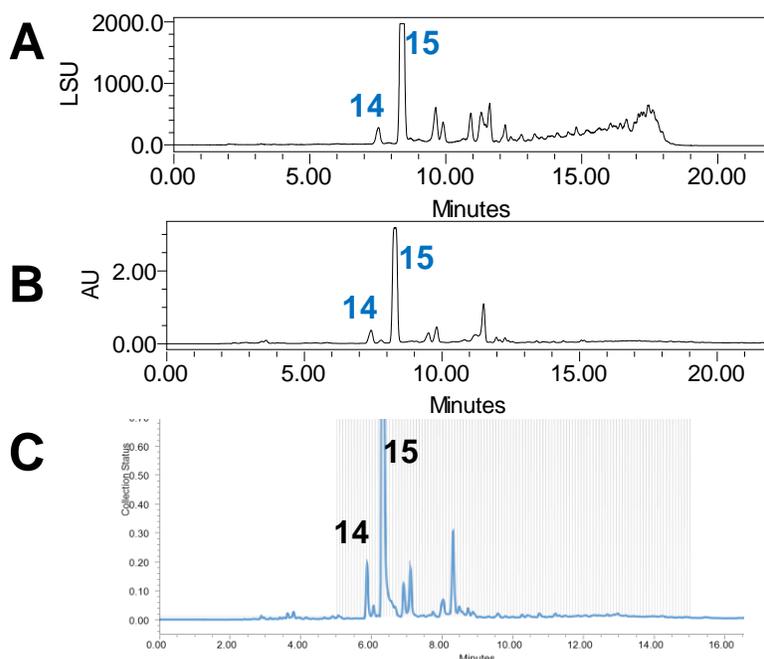
**Figura 56.** Espectro NOESY y estructura de **13** mostrando las correlaciones clave.



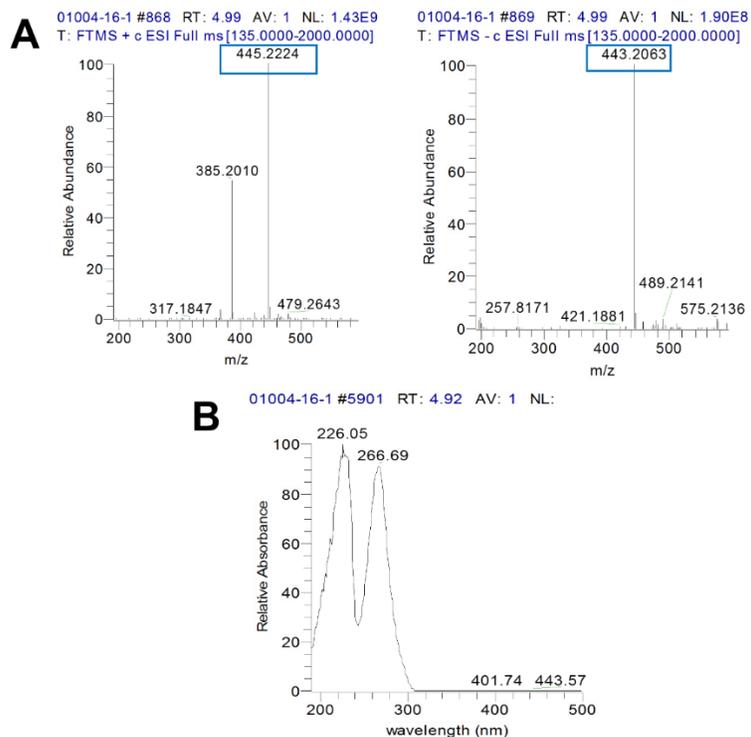
**Figura 57.** Estructura de la myrotecisin B (**13**).

#### 5.6.4 Aislamiento y caracterización de **14** y **15** a partir de la fracción F4

La separación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción primaria F4 se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.5.2.5**. Este procedimiento permitió la obtención de 1.2 mg del compuesto **14** ( $t_R$  5.90 min) y 7.3 mg de **15** ( $t_R$  6.34 min) (**Figura 58**). Ambos compuestos se aislaron como polvos blancos con fórmula molecular de  $C_{25}H_{32}O_7$ , establecida mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  445.2224  $[M+H]^+$  y 443.2063  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = 0.7$  ppm), la cual permite 10 grados de insaturación (**Figura 59**).

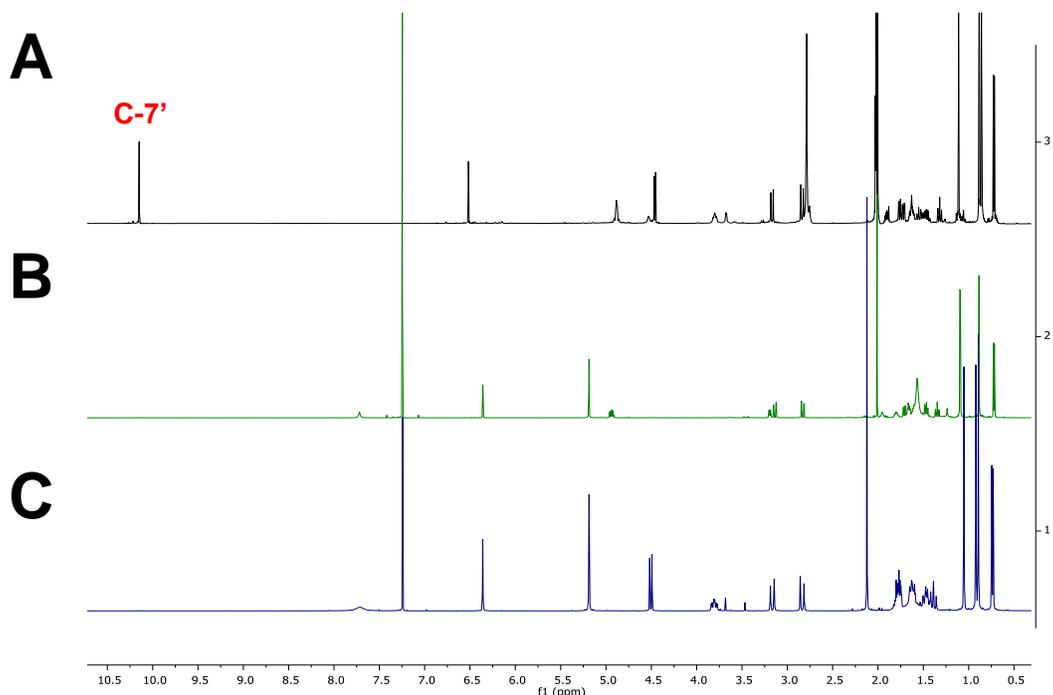


**Figura 58.** Cromatogramas por HPLC de la fracción F4: **(A)** ELSD a nivel analítico. **(B)** PDA 254 nm. **(C)** Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

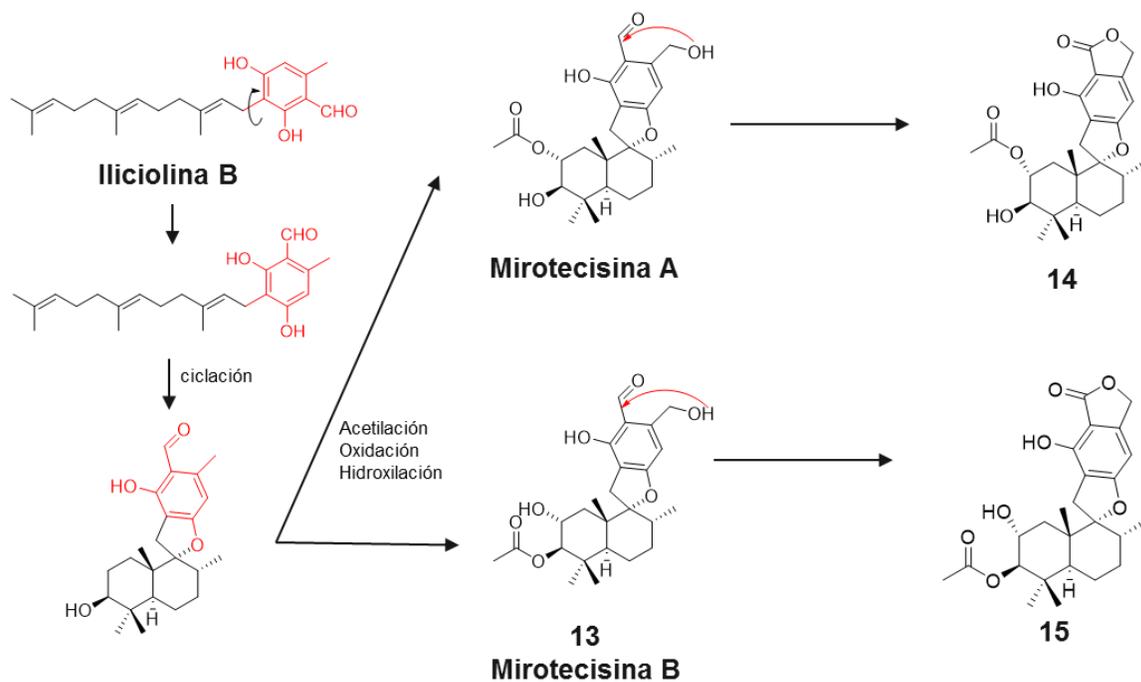


**Figura 59.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (A) y de UV (PDA) (B) de **14**.

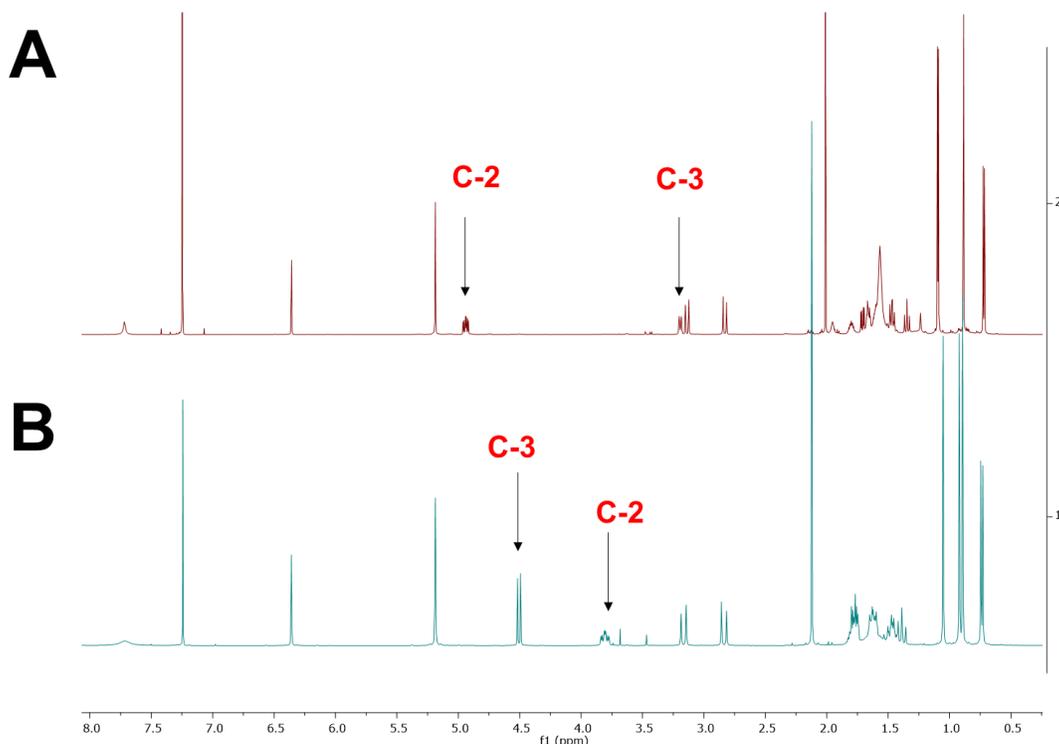
El análisis detallado de los espectros de RMN de estos compuestos reveló una importante similitud entre sí y con la myrotecisina B (**13**), la cual tiene una 2 umas más. En los espectros de RMN <sup>1</sup>H de **13**, **14** y **15** (Figura 60) se evidenció la ausencia de una señal en  $\delta_H$  10.18 correspondiente al hidrógeno del aldehído en C-7' en **14** y **15**. Esta diferencia es indicativa de la formación de un anillo de lactona en estos compuestos mediante la reacción entre el hidroxilo del C-8' y el carbonilo del C-7' (Figura 61). Por otra parte, las diferencias observadas en los desplazamientos de los hidrógenos en las posiciones C-2 y C-3 de **14** y **15**, se atribuyeron a un cambio en la posición de los sustituyentes hidroxilo y acetilo en estos carbonos (Figura 62 y Tabla 22). Así, las estructuras planteadas para **14** y **15** se muestran en la Figura 63, donde se confirma que el precursor **14** es la myrotecisina A y el de **15**, la myrotecisina B (**13**). Por último, el análisis de sus espectros NOESY permitió establecer que ambos productos poseen la misma configuración relativa que **13** (Figura 64). La búsqueda en la literatura especializada de las estructuras de **14** y **15** no arrojó coincidencias, por lo que se infiere que estos productos son novedosos.



**Figura 60.** Análisis comparativo de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **13** (A, 600 MHz, acetona- $d_6$ ), **14** (B, 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), y **15** (C, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 61.** Propuesta de la formación de **14** y **15** a partir de las myrotectinas A y B (**13**).



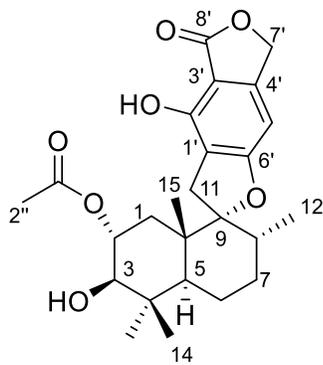
**Figura 62.** Comparación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **14** (A, 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), y **15** (B, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabla 22.** Datos de RMN de **14** y **15** en  $\text{CDCl}_3$  (600 y 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 150 y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , respectivamente).

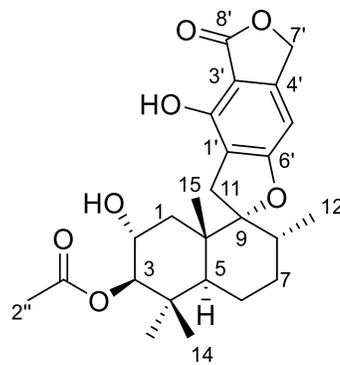
Posición	14		15	
	$\delta_{\text{C}}$ , tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , tipo	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)
1	35.3, $\text{CH}_2$	1.72 dd (12.2, 4.5) 1.36 t (12.0)	39.2, $\text{CH}_2$	1.42, t (12.3) 1.78, m
2	72.8, CH	4.95, ddd (11.8, 10.2, 4.5)	67.4, CH	3.83, td (12.0, 4.0)
3	80.3 CH	3.21, d (10.1)	84.3, CH	4.53, d (10.2)
4	39.7, C	-	39.2, C	-
5	46.0, CH	1.69, m	45.8, CH	1.78, m
6	21.1, $\text{CH}_2$	1.48, m 1.69, m	21.0, $\text{CH}_2$	1.48, m 1.65, m
7	30.8, $\text{CH}_2$	1.49, m 1.62, m	30.8, $\text{CH}_2$	1.48, m 1.65, m
8	37.0, CH	1.81, m	36.8, CH	1.80, m
9	99.3, C	-	99.2, C	-
10	43.4, C	-	43.3, C	-
11	30.6, $\text{CH}_2$	3.15, d (16.6) 2.84, d (16.7)	30.6, $\text{CH}_2$	3.19, d (16.4) 2.86, d (16.8)
12	15.4, $\text{CH}_3$	0.74, d (6.5)	15.4, $\text{CH}_3$	0.77, d (6.7)
13	28.6, $\text{CH}_3$	1.10, s	28.6, $\text{CH}_3$	0.95, s
14	16.7, $\text{CH}_3$	0.90, s	17.7, $\text{CH}_3$	0.92, s
15	17.1, $\text{CH}_3$	1.11, s	17.2, $\text{CH}_3$	1.08, s
1'	113.0, C	-	112.1, C	-
2'	152.6, C	-	152.5, C	-

5'	95.2, CH	6.37, s	95.3, CH	6.39, s
4'	149.0, C	-	149.1, C	-
3'	104.2, C	-	104.1, C	-
6'	169.0 C	-	166.9, C	-
7'	70.4, CH <sub>2</sub>	5.20, s	70.5, CH <sub>2</sub>	5.21, s
8'	172.6, C	-	172.5, C	-
1''	171.6, C	-	172.6, C	-
2''	21.5, CH <sub>3</sub>	2.02, s	21.3, CH <sub>3</sub>	2.15, s

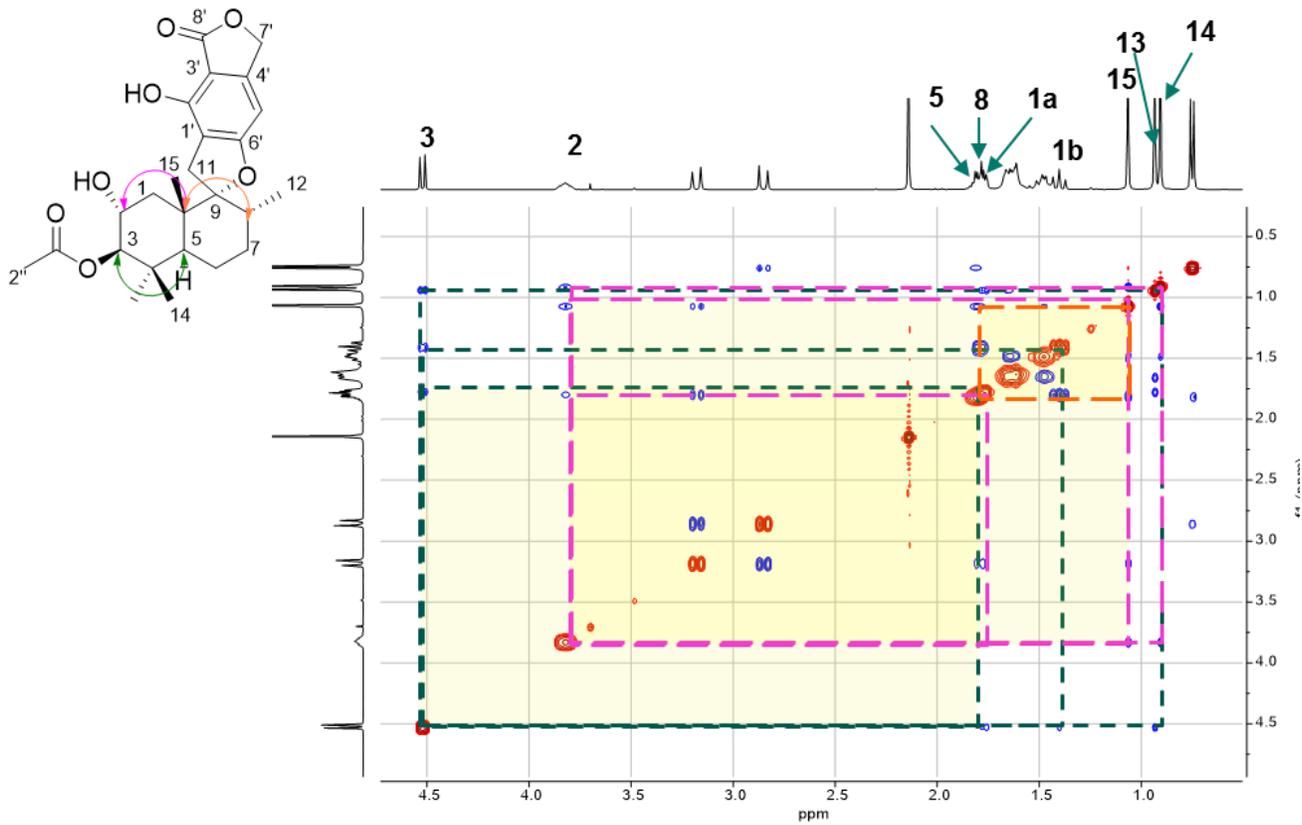
**A**



**B**



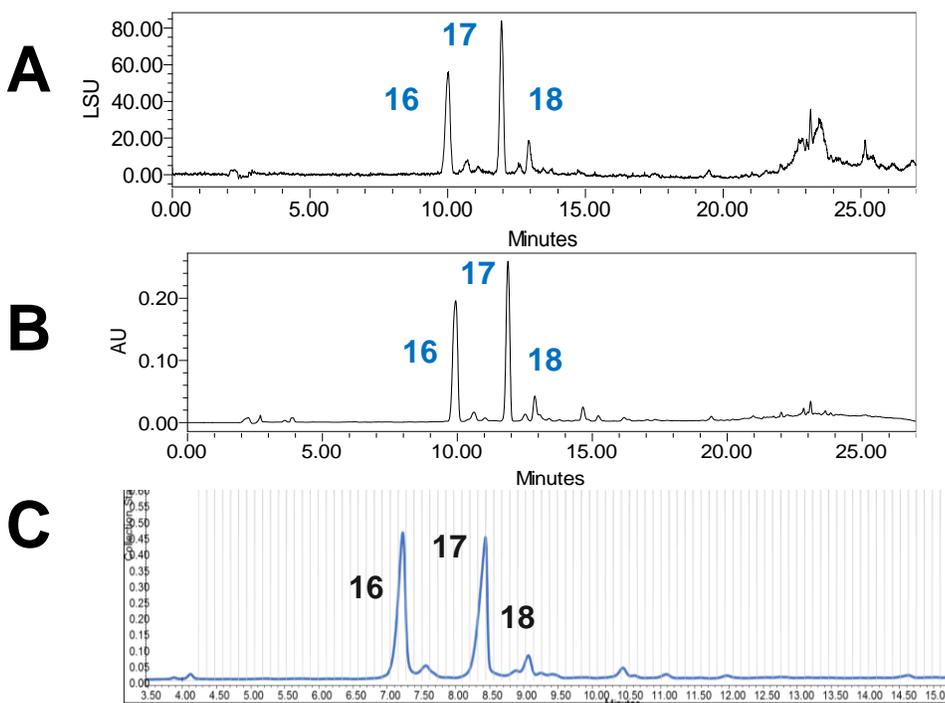
**Figura 63.** Estructura de **14** (A) y **15** (B).



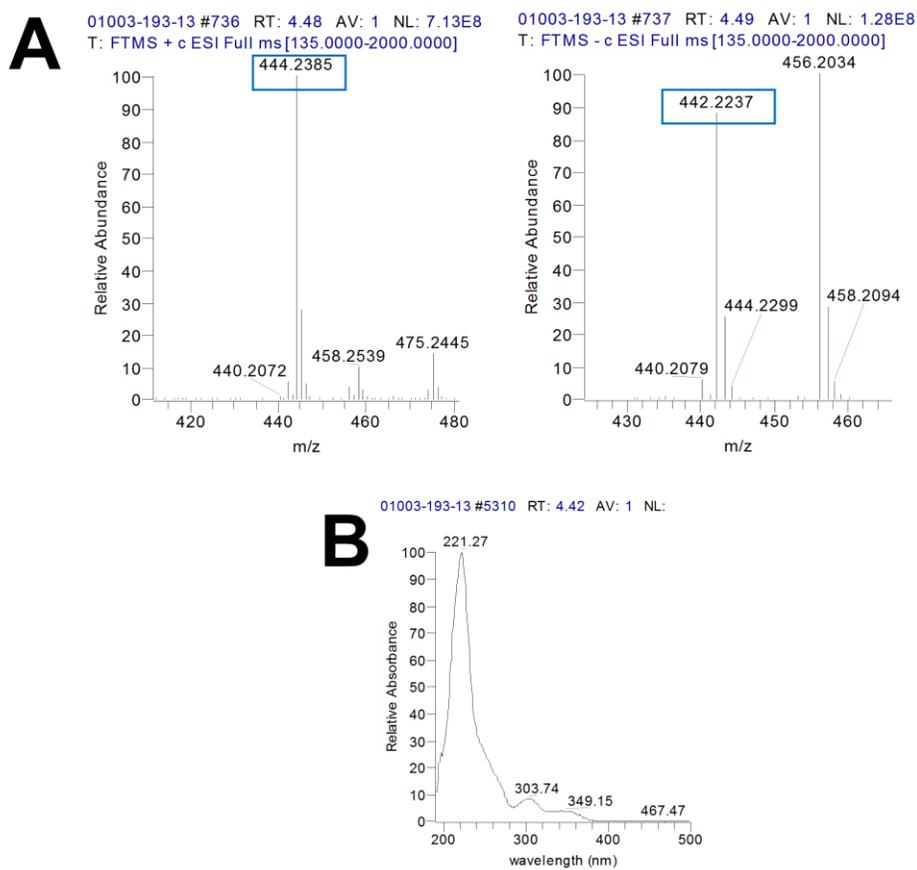
**Figura 64.** Espectro NOESY y estructura de **15** mostrando las correlaciones clave.

### 5.6.5 Aislamiento y caracterización de 16-18 a partir de la fracción F13

La separación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción F13 se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.5.2.6. Este procedimiento permitió la obtención de 5.5 mg de **16** ( $t_R$  7.16 min), 5.7 mg de **17** ( $t_R$  8.41 min) y 1.6 mg de **18** ( $t_R$  9.02 min) (**Figura 65**). Estos tres compuestos se aislaron como polvos blancos con fórmula molecular de  $C_{25}H_{33}NO_6$  calculada mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  444.3830  $[M+H]^+$  y 442. 2237  $[M-H]^-$ ,  $\Delta= 1.0$  ppm), la cual permite 10 grados de insaturación (**Figura 66**). Cabe destacar la presencia de nitrógeno en estos compuestos debido a su peso molecular impar observado.



**Figura 65.** Cromatogramas por HPLC de la fracción F13: (A) ELSD a nivel analítico. (B) PDA 254 nm. (C) Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).



**Figura 66.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y de UV (PDA) (**B**) de **16**.

El análisis de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de estos compuestos revelaron una gran similitud entre sí y con los de **14** y **15** (**Figura 67**). La diferencia principal se atribuyó a la presencia de un anillo de lactama en **16-18**, mientras que **14** y **15**, tienen una lactona. Por otra parte, también se observó el cambio en los desplazamientos de los hidrógenos en las posiciones C-2 y C-3 al igual que **14** y **15** (**Figura 68** y **Tabla 23**), correspondientes a un cambio en las posiciones de los sustituyentes hidroxilo y acetilo en estos carbonos. Así, las estructuras planteadas para **16** y **17** se muestran en la **Figura 69**, y el análisis de sus espectros NOESY permitió establecer que ambos productos poseen la misma configuración relativa que **13** (**Figura 70**). Finalmente, la búsqueda en la literatura especializada de las estructuras de **16** y **17** no arrojó coincidencias, por lo que se infiere que estos productos son novedosos.

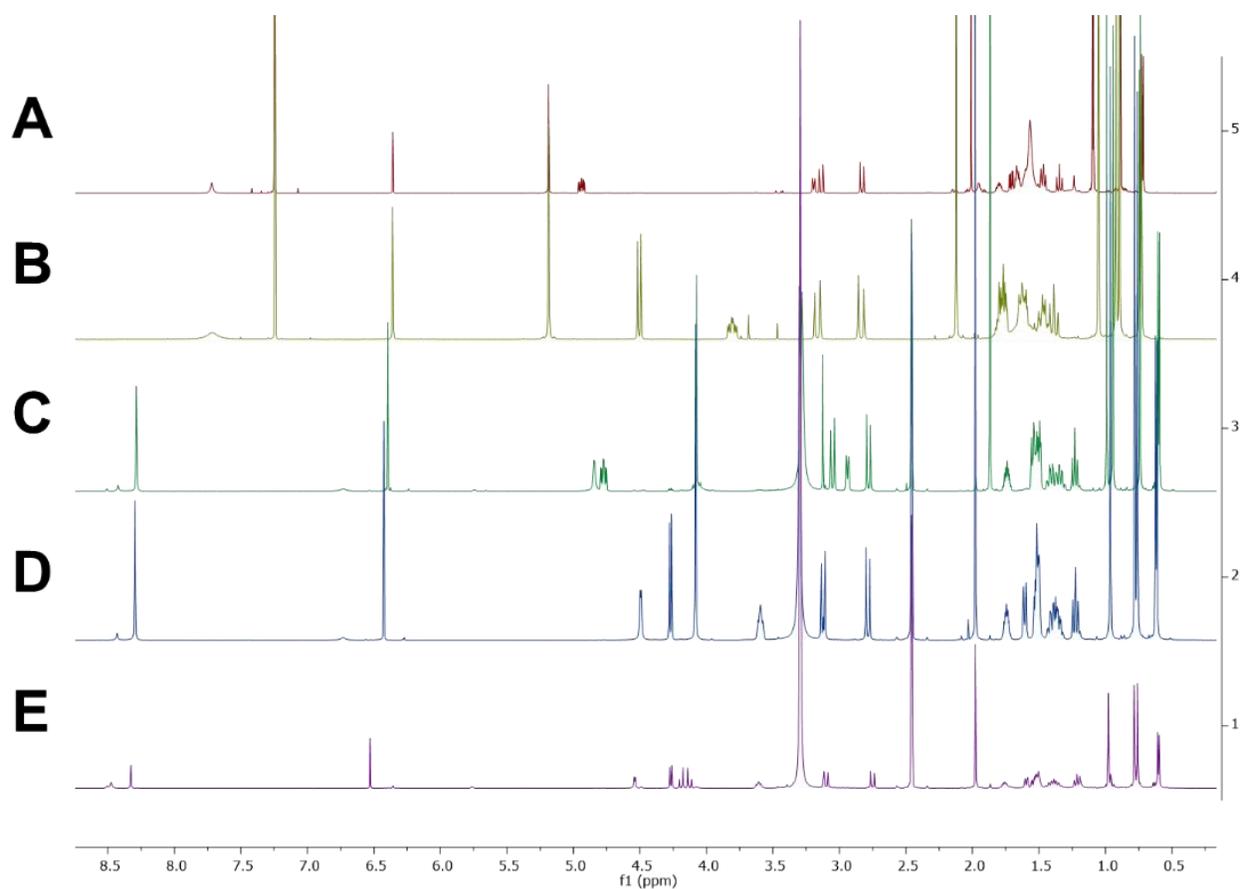


Figura 67. Comparación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **14** (A, 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), **15** (B, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y **16-18** (C-E, 600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

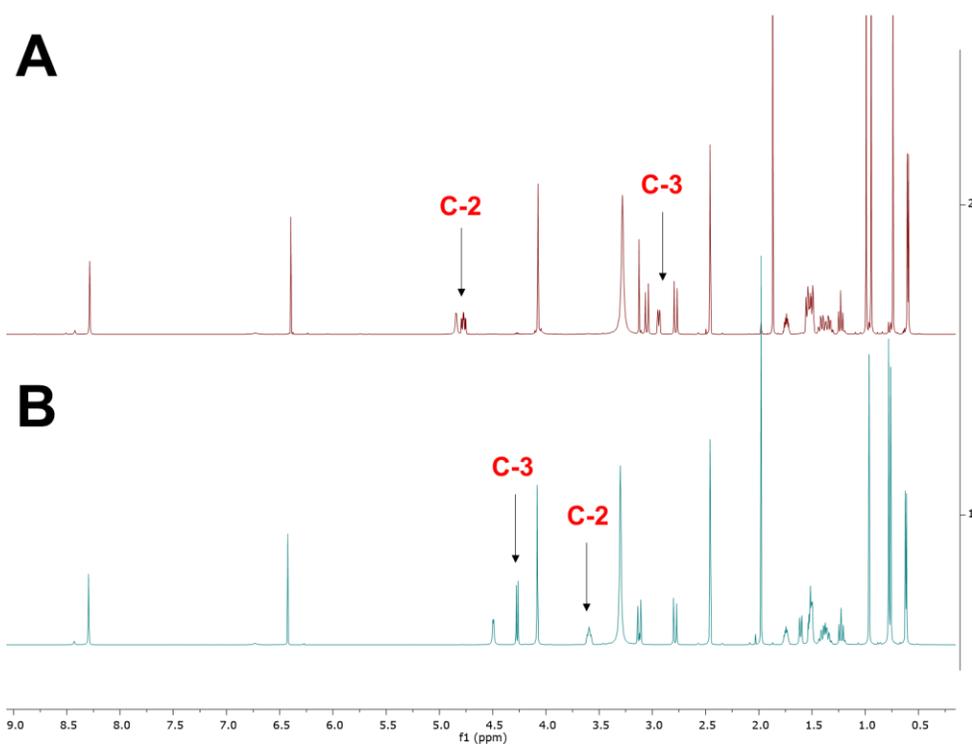
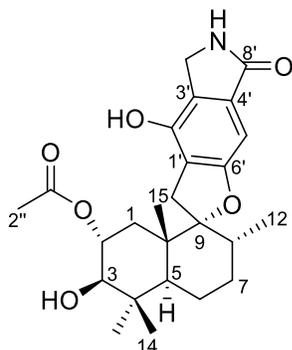
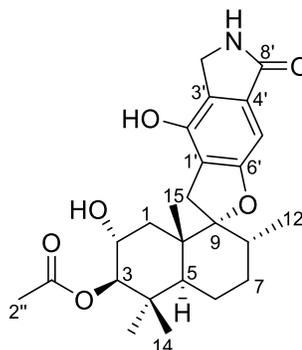
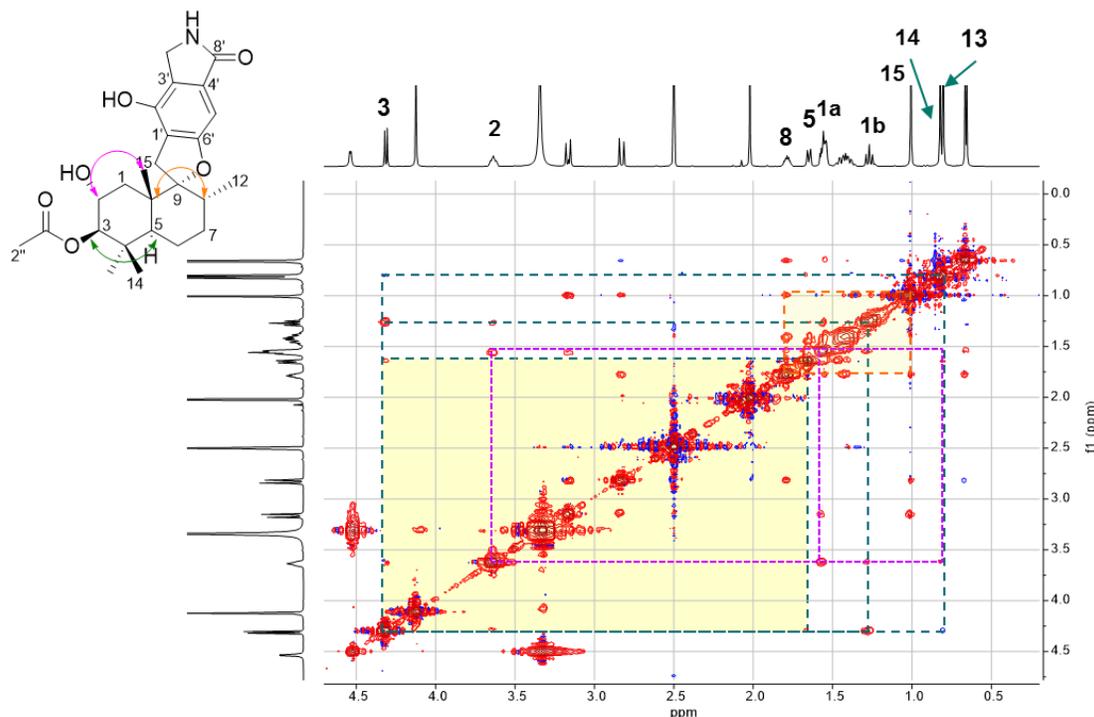


Figura 68. Comparación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **16** (A) y **17** (B) en 600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .

**A****B****Figura 69.** Estructura de **16 (A)** y **17 (B)**.**Tabla 23.** Datos de RMN de **16** y **17** en DMSO-*d*<sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente).

Posición	16		17	
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	35.1, CH <sub>2</sub>	1.56, m 1.27, t (12.0)	38.6, CH <sub>2</sub>	1.56, m 1.27, t (12.2)
2	71.5, CH	4.81, ddd (11.8, 10.2, 4.5)	64.5, CH	3.64, m
3	78.0, CH	2.98 (9.7)	83.4, CH	4.31, d (9.9)
4	40.1, C	-	38.5, C	-
5	45.3, CH	1.56, m	45.3, CH	1.65 m
6	20.6, CH <sub>2</sub>	1.41, m 1.56, m	20.4, CH <sub>2</sub>	1.42, m 1.56, m
7	30.5, CH <sub>2</sub>	1.41, m 1.56, m	30.5, CH <sub>2</sub>	1.42, m 1.56, m
8	36.1, CH	1.78, m	35.9, CH	1.79, m
9	95.9, C	-	96.0, C	-
10	42.6, C	-	42.5, C	-
11	31.8, CH <sub>2</sub>	3.09, d (17.2) 2.82, d (17.2)	31.8, CH <sub>2</sub>	3.17, d (17.1) 2.83, d (17.2)
12	15.3, CH <sub>3</sub>	0.64, d (6.5)	15.3, CH <sub>3</sub>	0.66, d (6.5)
13	28.6, CH <sub>3</sub>	0.99, s	28.4, CH <sub>3</sub>	0.80, s
14	16.9, CH <sub>3</sub>	0.78, s	17.5, CH <sub>3</sub>	0.82, s
15	16.6, CH <sub>3</sub>	1.03, s	16.7, CH <sub>3</sub>	1.01, s
1'	122.9, C	-	116.7, C	-
2'	148.3, C	-	148.4, C	-
3'	116.6, C	-	122.8, C	-
4'	134.1, C	-	134.1, C	-
5'	93.2 C	6.43 s	93.2, CH	6.47 s
6'	161.9, C	-	162.0, C	-
7'	42.7, CH <sub>2</sub>	4.11, s	42.6, CH <sub>2</sub>	4.12, s
8'	170.1, C	-	170.3	-
1''	170.1, C	-	170.1, C	-
2''	21.1, CH <sub>3</sub>	1.91, s	21.0, CH <sub>3</sub>	2.02, s
NH	-	8.33, s	-	8.34, s



**Figura 70.** Espectro NOESY y estructura de **17** mostrando las correlaciones clave.

El compuesto **18** se aisló como un isómero estructural de **16** y **17**. Las diferencias más importantes entre estos productos se concentraron en los desplazamientos químicos de los Hs y Cs del anillo aromático y la lactama (**Tabla 24**). La revisión detallada de la literatura reveló que este producto podría tratarse de un isómero de la chartalactama K, pero con la posición del hidrógeno en C-3 en alfa.<sup>75</sup> Dichas diferencias fueron confirmadas mediante el análisis del espectro NOESY de este compuesto (**Figuras 71** y **72**). Finalmente, la búsqueda en la literatura especializada de la estructura de **18** no arrojó coincidencias, por lo que se infiere que este producto es novedoso.

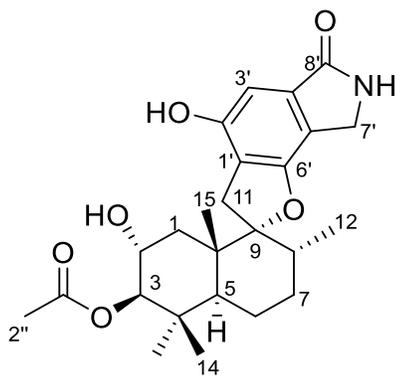
**Tabla 24.** Datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de **18** en DMSO-*d*<sub>6</sub> (600 y 150 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente).

Posición	<b>18</b>		Chartalactama K <sup>a</sup>	
	δ <sub>C</sub> , tipo	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)	δ <sub>C</sub> , tipo	δ <sub>H</sub> , mult. (J en Hz)
1	39.0, CH <sub>2</sub>	1.56, m 1.26, t (12.2)	34.1, CH <sub>2</sub>	1.21, m 1.57, m
2	65.1, CH	3.65, m	63.6, CH	3.89, m
3	84.0, CH	4.31, d (9.8)	80.1, CH	4.69, sa
4	39.0, C		38.2, C	-
5	45.9, CH	1.64, m	40.3, CH	1.91, da (8.9)
6	21.0, CH <sub>2</sub>	1.43, m 1.58, m	20.3 CH <sub>2</sub>	1.44, m 1.50, m

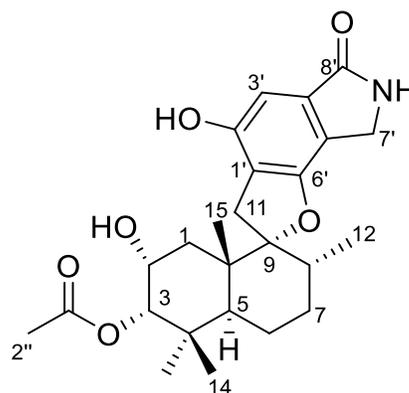
7	30.9, CH <sub>2</sub>	1.43, m 1.58, m	31.0, CH <sub>2</sub>	1.38, m 1.56, m
8	36.5, CH	1.80, m	36.3, CH	1.82, m
9	97.6, C		97.8, C	-
10	42.9, C		43.4, C	-
11	32.4, CH <sub>2</sub>	3.14 (17.2) 2.79 (17.0)	32.1, CH <sub>2</sub>	3.13, d (17.4) 2.81, d (17.4)
12	15.8, CH <sub>3</sub>	0.65, d(6.4)	15.8, CH <sub>3</sub>	0.68, d (6.2)
13	29.1, CH <sub>3</sub>	0.80, s	28.3, CH <sub>3</sub>	1.0, s
14	18.2, CH <sub>3</sub>	0.83, s	21.9, CH <sub>3</sub>	0.81, s
15	17.3, CH <sub>3</sub>	1.02, s	17.0, CH <sub>3</sub>	0.91, s
1'	116.7, C		116.8, C	-
2'	154.3, C		154.3, C	-
3'	101.5, C	6.57, s	101.3, CH	6.58, s
4'	135.0, C		134.9, C	-
5'	114.8, CH		114.7, C	-
6'	156.3, C		156.4, C	-
7'	42.4, CH <sub>2</sub>	4.23, (16.5) 4.17, d (16.6)	42.3, CH <sub>2</sub>	4.27, d (16.4) 4.05, d (16.4)
8'	170.6, C		170.5, C	-
1''	170.8, C		170.6, C	
2''	21.6, CH <sub>3</sub>	2.02, s	21.4, CH <sub>3</sub>	1.99, s
NH	-	8.37, s	-	8.34

<sup>a</sup>Li, Y., et al, 2014

**A**



**B**



**Figura 71.** Estructura de **18 (A)** y la chartalactama **K (B)**.

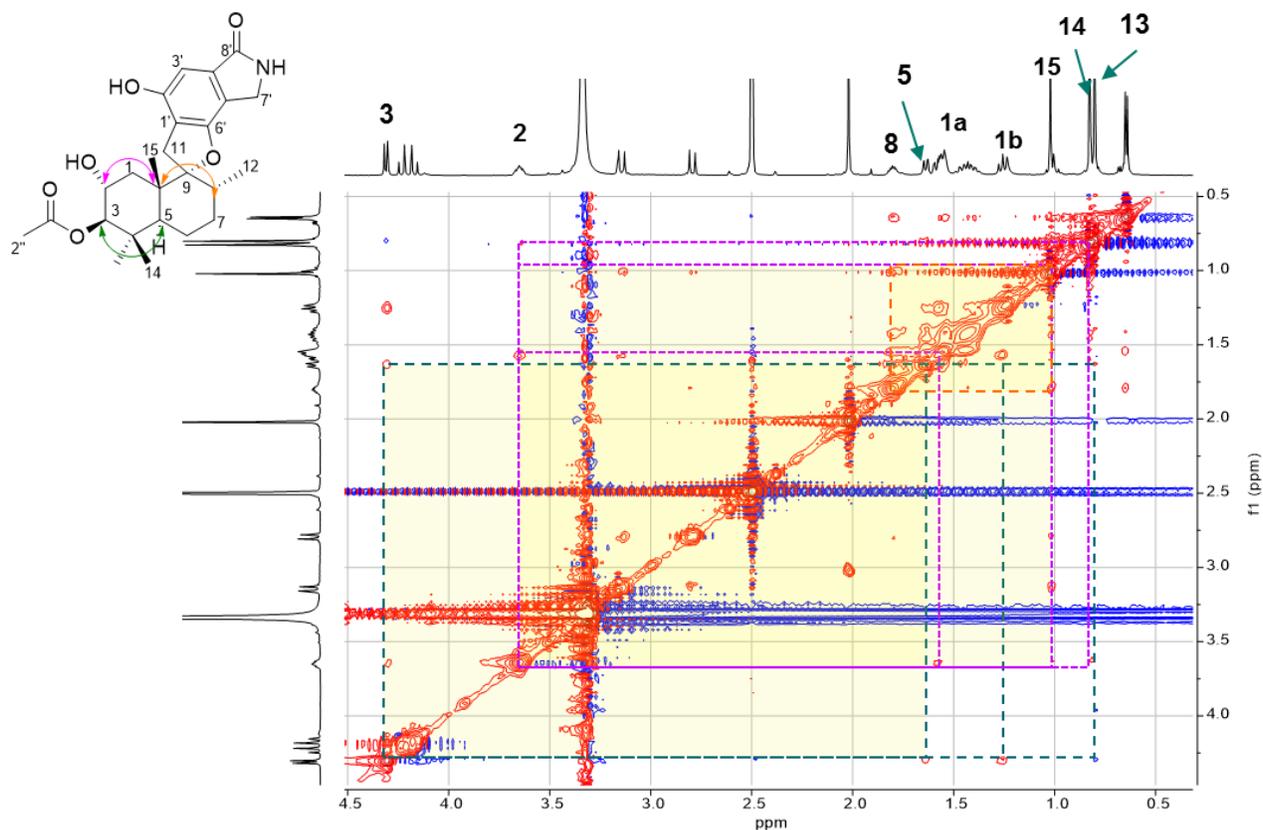
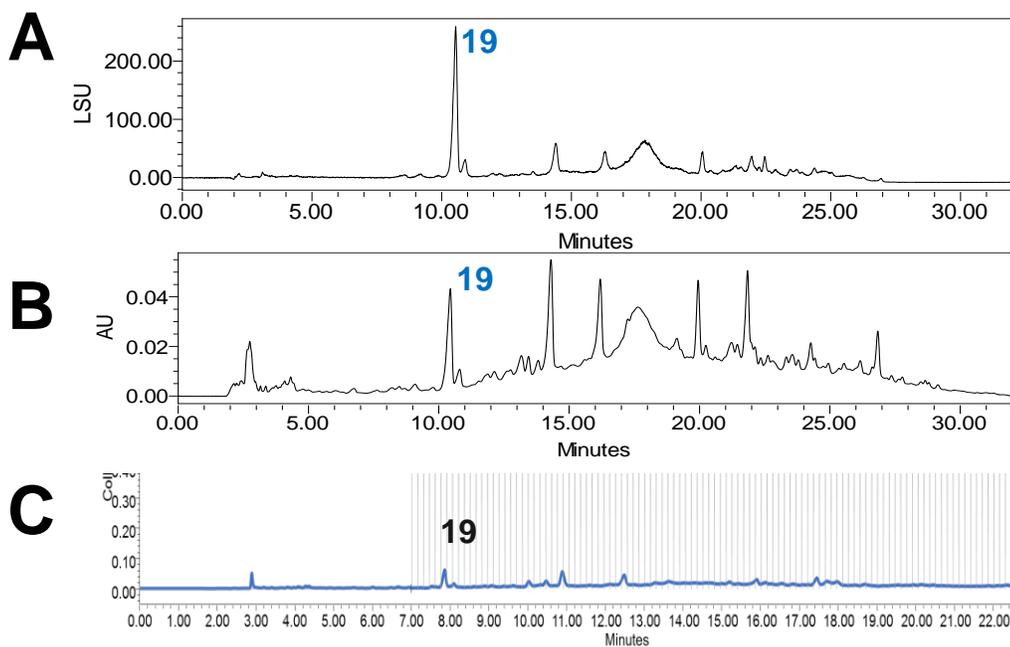


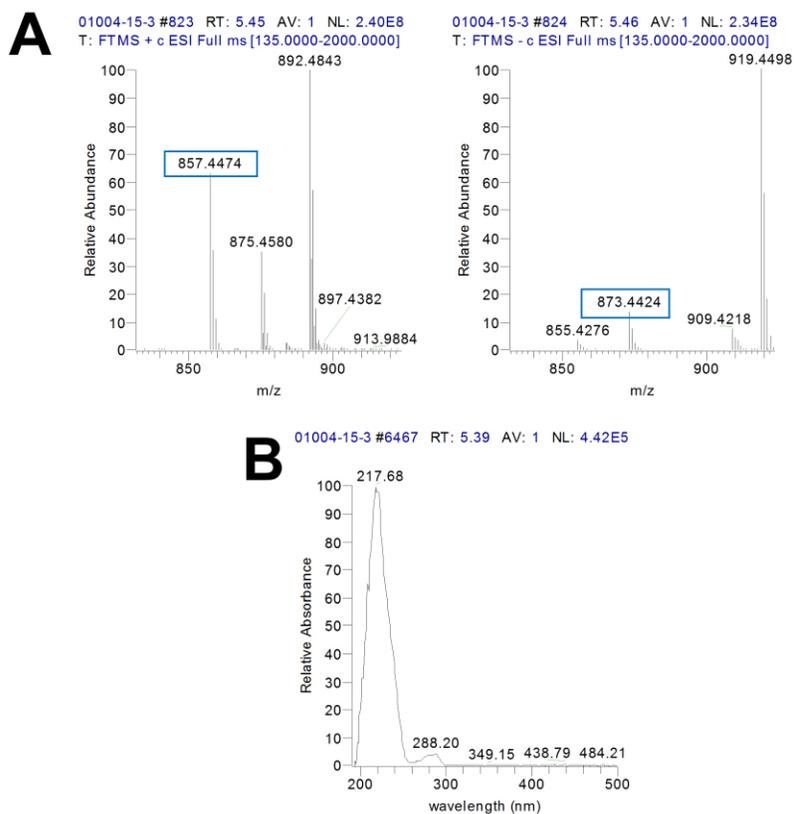
Figura 72. Espectro NOESY y estructura de **18** mostrando las correlaciones clave.

### 5.6.6 Aislamiento y caracterización de **19** a partir de la fracción F7-7

La separación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción secundaria F7-7 se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.5.2.1**. Este procedimiento permitió la obtención de 4.6 mg de **19** ( $t_R$  7.85 min) (**Figura 73**). Este compuesto se aisló como un polvo blanco y su fórmula molecular se estableció como  $C_{50}H_{66}O_{13}$  mediante los análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS ( $m/z$  875.4580  $[M+H]^+$  y 873.4424  $[M-H]^-$ ,  $\Delta = 0.4$  ppm), la cual permite 18 grados de insaturación (**Figura 74**).

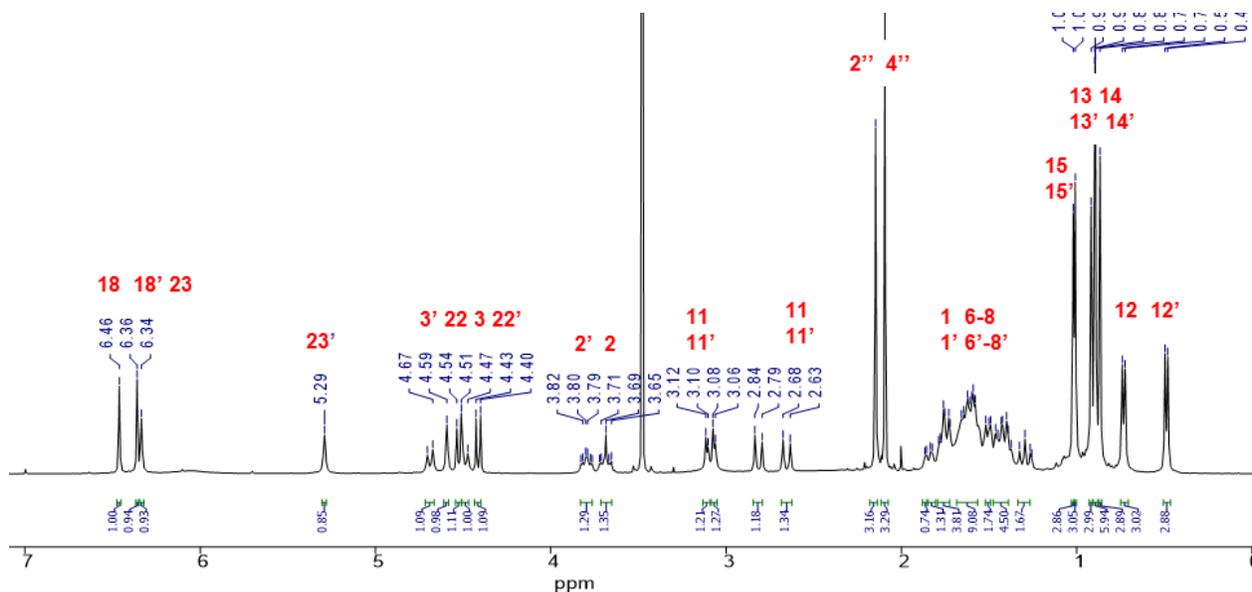


**Figura 73.** Cromatogramas por HPLC de la fracción F7-7: **(A)** ELSD. **(B)** PDA 254 nm. **(C)** Separación a nivel preparativo (PDA 254 nm).

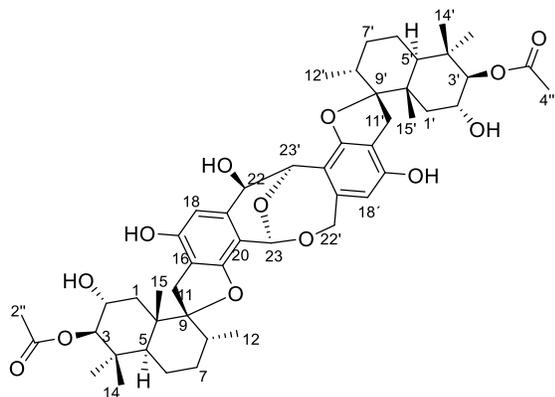
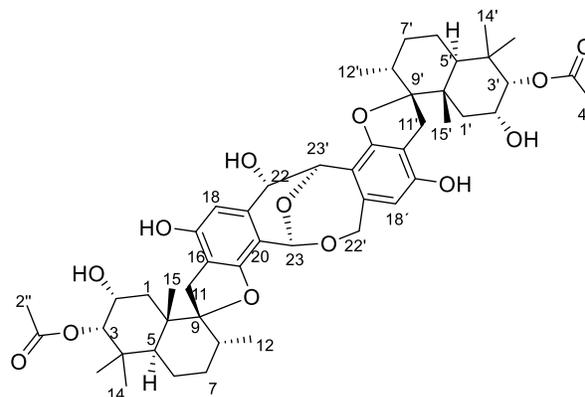


**Figura 74.** Espectros en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> **(A)** y de UV (PDA) **(B)** de **19**.

El análisis detallado de los espectros de RMN permitió establecer a este producto como un isómero de la bistachybotrisina Y, un dímero de dos fenilespirodrimanos (**Figuras 75 y 76 y Tabla 25**)<sup>76</sup>. La primera diferencia entre **19** y la bistachybotrisina Y radica en la configuración de los hidrógenos del C-3 en ambos monómeros del dímero: **19** los tiene orientados en alfa mientras que la bistachybotrisina Y, en beta. Lo anterior se dedujo con base en lo observado en el espectro NOESY de **19** (**Figura 77**). La segunda diferencia se encuentra en la configuración de la conectividad de los monómeros, ya que a pesar a pesar que el hidrógeno en C-22 tiene una correlación en el COSY con el hidrógeno de C-23', en el espectro NOESY no se observa dicha correlación, lo que es indicativo de que **19** presenta una configuración inversa en el C-22 (*R*) a la bistachybotrisina Y C-22 (*S*) (**Figuras 78 y 79**). Finalmente, la búsqueda en la literatura especializada de la estructura de **19** no arrojó coincidencias, por lo que se infiere que este producto es novedoso.



**Figura 75.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) de **19** en acetona-*d*<sub>6</sub>.

**A****B**

**Figura 76.** Estructura de **19** (A) y la bistachybotrysin Y (B).

<b>Tabla 25.</b> Datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de <b>19</b> en $\text{DMSO-}d_6$ (600 y 150 MHz para $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ ).				
<b>Posición</b>	<b>19</b>		<b>Bistachybotrysin Y<sup>a</sup></b>	
	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$ , tipo	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	39.5, CH <sub>2</sub>	1.33, t (12.2) 1.60, m	34.9, CH <sub>2</sub>	1.40, dd (12.0, 4.2) 1.85, m
2	66.6, CH	3.71, m	65.3, CH	4.04, m
3	84.5, CH	4.43, d (9.9)	80.6, CH	4.87, d, (2.3)
4	39.5, C	-	39.0, C	-
5	46.7, CH	1.75, m	41.4, CH	2.10 m
6	21.7, CH <sub>2</sub>	1.50, m 1.60, m	21.5, CH <sub>2</sub>	1.50, m 1.58, m
7	31.8, CH <sub>2</sub>	1.50, m 1.60, m	31.8, CH <sub>2</sub>	1.52, m 1.61, m
8	37.4, CH	1.8, m	37.7, CH	1.87, m
9	97.0, C	-	97.8, C	-
10	43.8, C	-	44.2, C	-
11	32.7, CH	3.22, d (16.6) 2.92, d (16.5)	32.6, CH	3.22, d (16.3) 2.86, m
12	15.8, CH <sub>3</sub>	0.74, d (6.5)	16.1, CH <sub>3</sub>	0.73, d (6.4)
13	29.0, CH <sub>3</sub>	0.84, s	28.4, CH <sub>3</sub>	0.91, s
14	17.9, CH <sub>3</sub>	0.87, s	22.1, CH <sub>3</sub>	0.99, s
15	17.5, CH <sub>3</sub>	1.07, s	17.3, CH <sub>3</sub>	1.10, s
16	113.5, C	-	112.5, C	-
17	150.6, C	-	154.4, C	-
18	101.6, CH	6.27, s	106.7, CH	6.55, s
19	136.6, C	-	138.5, C	-
20	113.1, C	-	107.6, C	-
21	163.2, C	-	159.1, C	-
22	69.9, CH	4.61, sa	70.8, CH	4.62, m
23	89.9, CH	6.45, sa	93.7, CH	6.08, s
1''	171.1, C	-	171.2, C	-
2''	21.1, CH <sub>3</sub>	2.00, s	21.0, CH <sub>3</sub>	2.12, s
1'	39.6, CH <sub>2</sub>	1.41 t (12.2) 1.69, dd (12.8, 4.5)	35.3, CH <sub>2</sub>	1.49, m 1.79, dd (12.3, 12.3)
2'	66.5, CH	3.80, td (11.4, 4.5)	65.1, CH	4.08, m

3'	84.5, CH	4.48, d (9.9)	80.3, CH	4.93, d (2.6)
4'	39.7, C	-	38.8, C	-
5'	46.8, CH	1.75, m	42.1, CH	2.03, m
6'	21.7, CH <sub>2</sub>	1.50, m 1.60, m	21.3, CH <sub>2</sub>	1.49, m 1.55, m
7'	31.7, CH <sub>2</sub>	1.50, m 1.41, m	31.8, CH <sub>2</sub>	1.52, m 1.61, m
8'	37.0 CH	1.75, m	37.8, CH	1.86, m
9'	96.9, C	-	97.8, C	-
10'	43.9, C	-	43.4, C	-
11'	32.4, CH	3.11, d (16.6) 2.62, d (16.5)	32.7, CH	3.28, d (16.2) 2.83, m
12'	16.1, CH <sub>3</sub>	0.50, d (6.5)	15.9, CH <sub>3</sub>	0.75, d (6.4)
13'	29.0, CH <sub>3</sub>	0.86, s	28.3, CH <sub>3</sub>	0.94, s
14'	18.0, CH <sub>3</sub>	0.89, s	22.4, CH <sub>3</sub>	1.01, s
15'	17.4, CH <sub>3</sub>	1.08, s	17.5, CH <sub>3</sub>	1.12, s
16'	112.7, C	-	111.4, C	-
17'	150.7, C	-	152.6, C	-
18'	101.7, CH	6.45, s	106.4, CH	6.11, s
19'	140.3, C	-	141.5, C	-
20'	111.6, C	-	115.7, C	-
21'	162.4, C	-	160.2, C	-
22'	61.8, CH <sub>2</sub>	4.66, d (13.0) 4.57, d (13.0)	69.3, CH <sub>2</sub>	4.72, d (14.9) 4.49, d (14.9)
23'	74.2, CH	5.29, sa	77.2, CH	5.31, d (3.1)
3''	171.2, C	-	171.9, C	-
4''	21.0, CH <sub>3</sub>	2.02, s	21.5, CH <sub>3</sub>	2.31, s

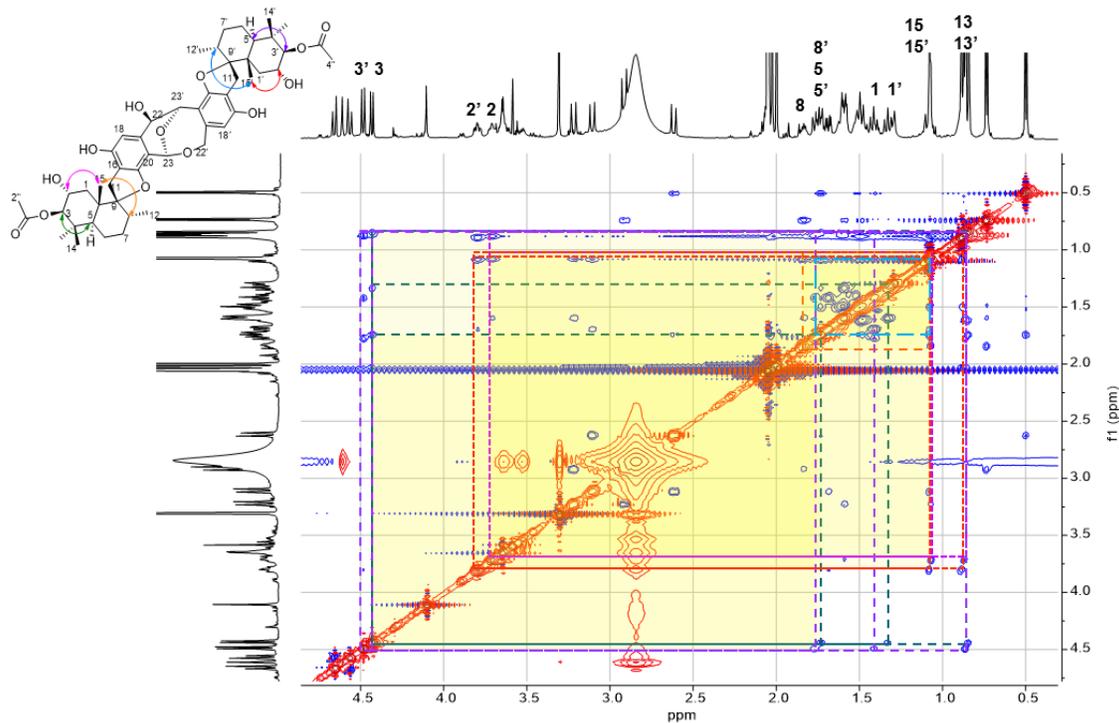
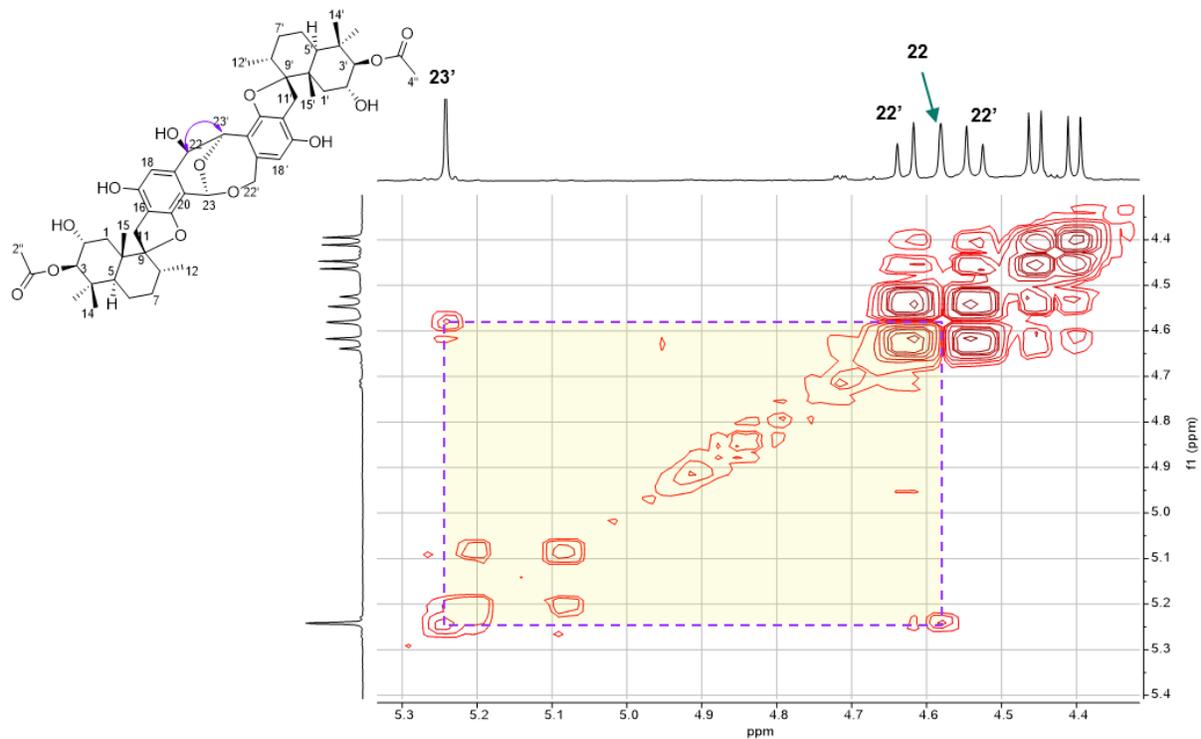
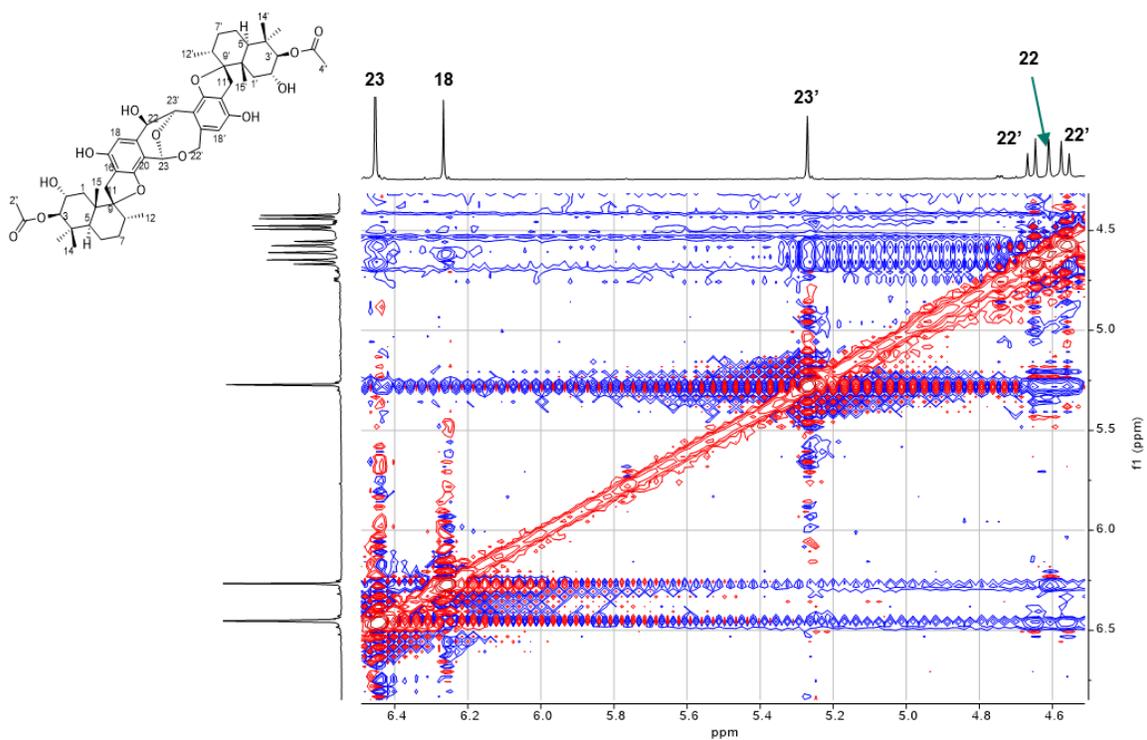


Figura 77. Espectro NOESY y estructura de **19** mostrando las correlaciones clave.



**Figura 78.** Espectro COSY y estructura de **19** mostrando las correlaciones clave entre C-22 y C-23'.



**Figura 79.** Espectro NOESY y estructura de **19** mostrando las correlaciones clave en la conectividad del dímero.

### 5.6.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados a partir del hongo ORO3

Los compuestos **12-17** y **19** fueron evaluados en el ensayo de actividad antimicrobiana en placa de 96 pozos siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.3**. Los resultados de esta evaluación se resumen en la **Tabla 26**. Cabe mencionar que **18** no fue evaluado debido a la limitada cantidad obtenida de este producto. Todos los productos evaluados inhibieron el 100% del crecimiento de *MRSA* y *MSSA* a la concentración de 100 µg/mL, y en particular, **13-17** y **19** también mostraron una inhibición >80% de *MRSA* a la concentración de 50 µg/mL.

**Tabla 26.** Resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados del hongo ORO3.

Compuesto	% de inhibición		Compuesto	% de inhibición	
	<i>MSSA</i>	<i>MRSA</i>		<i>MSSA</i>	<i>MRSA</i>
<b>12</b> Myrotelactona E	0.0	0.0	<b>16</b> NPN	0.0	0.0
	100.0	14.5		100.0	100.0
		100.0			100.0
<b>13</b> Myrotecisina B	0.0	0.0	<b>17</b> NPN	0.0	0.0
	100.0	100.0		100.0	100.0
		100.0			100.0
<b>14</b> NPN	0.0	0.0	<b>19</b> NPN	0.0	0.0
	100.0	86.1		100.0	96.3
		100.0			100.0
<b>15</b> NPN	0.0	0.0			
	100.0	87.9			
		100.0			
CIM (µg/mL) control positivo	400	1.25	CIM (µg/mL) control positivo	400	1.25
<b>Concentración de prueba</b>					
	10 µg/mL				
	50 µg/mL				
	100 µg/mL				
<b>Controles</b>					
	Ampicilina				
	Vancomicina				

NPN, nuevo producto natural

En resumen, los organismos fúngicos estudiados en este proyecto de investigación, especialmente los hongos ORO-2 y ORO-3, resultaron ser buenos candidatos para la obtención de moléculas con actividad antimicrobiana contra bacterias del grupo ESKAPE, las cuales podrían servir como farmacóforo en el diseño de nuevos agentes antimicrobianos.

Además, este trabajo contribuye al conocimiento de la biodiversidad fúngica de nuestro país, además de ser el primer estudio químico y biológico de un organismo del género *Alfaria*.

## 6. CONCLUSIONES

1. Se realizó el acondicionamiento y cultivo en medio sólido en mediana escala de 15 taxones fúngicos provenientes de diversos hábitats de México. La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de estos cultivos permitió seleccionar a los hongos con claves ORO2 y ORO3 para su estudio químico biodirigido. Cabe destacar que ambas especies fueron aisladas de la playa de Oro, en Colima, México, y se identificaron taxonómicamente como una pertenece al orden de los *Hypocreales* (ORO2) y la otra como *Alfaria* sp. (ORO3). Es importante mencionar que, a la fecha, este trabajo representa el primer estudio químico de un hongo perteneciente este género.
2. A partir de las fracciones activas del hongo ORO2 se aislaron 5 compuestos mayoritarios: la isororidina E (1), la roridina E (2), la verrucarina J (3), la acremonona C (4) y la acremonona D (5). De éstos, 1-3 mostraron actividad contra *MRSA* y *MSSA*. Adicionalmente, se caracterizaron mediante el análisis de los resultados de HRESIMS-MS/MS de una fracción inactiva del extracto este hongo, una serie de peptabióticos conocidos como neofrapeptinas (6-11). De igual forma, estos compuestos no han sido descrito en ninguna especie fúngica aislada de playas.
3. A partir de las fracciones activas estudiadas del hongo ORO3 se aislaron 8 compuestos mayoritarios: una isocumarina novedosa (12), la myrotecisina B (13), y seis compuestos novedosos del tipo fenilespirodrimano (14-19). Los compuestos 12-17 y 19 mostraron actividad significativa contra *MRSA* y *MSSA* a las concentraciones de prueba.
4. Finalmente, los productos obtenidos en este proyecto contribuyen significativamente al conocimiento sobre la química y actividad biológica de especies fúngicas obtenidas de ambientes varios de nuestro país, además de que las moléculas aisladas pueden servir de base para el desarrollo de potenciales agentes antibacterianos contra patógenos del grupo ESKAPE, lo cual valida la hipótesis planteada en este proyecto.

## 7. PERSPECTIVAS

1. Establecer la configuración absoluta de los productos novedosos mediante el empleo de técnicas químicas, espectroscópicas, computacionales o la combinación de éstas.
2. Calcular la CIM de los productos activos contra *MRSA* y *MSSA*, y establecer el posible mecanismo de acción en los ensayos pertinentes para este fin.
3. Continuar con el estudio químico de las fracciones menos activas de estos organismos y los extractos de aquellos que por falta de tiempo no pudieron ser analizados en esta disertación.
4. Proponer el papel ecológico de los metabolitos biodinámicos identificados.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barreto, M. L., Teixeira, M. G., y Carmo, E. H. (2006). Infectious diseases epidemiology. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 60(3), 192-195.
2. National Cancer Institute. *Infection*. Dictionary of cancer terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/infection>. Consultado el 6 de octubre del 2021.
3. Tripathi, L. P., Chen, Y. A., Mizuguchi, K., y Morita, E. (2019). Network-based analysis of host-pathogen interactions. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 3, 932-937.
4. World Health Organization (2020). The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Consultado el 6 de octubre del 2021.
5. [INEGI \(2021\)](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pre_07.pdf). Características de las defunciones registradas en México durante 2020, preliminar. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020\\_Pre\\_07.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pre_07.pdf). Consultado el 6 de octubre del 2021.
6. Secretaria de Salud, Estados Unidos Mexicanos. (2019) Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad. [https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/principales/nacional/grupo\\_edad.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/principales/nacional/grupo_edad.pdf). Consultado el 6 de octubre del 2021.
7. Lindahl, J. F., y Grace, D. (2015). The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infection Ecology and Epidemiology*, 5(1), 30048.
8. Fonkwo, P. N. (2008). Pricing infectious disease: The economic and health implications of infectious diseases. *EMBO Reports*, 9(S1), S13-S17.
9. Doron, S., y Gorbach, S. L. (2008). Bacterial infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health*, 273–282.
10. World Health Organization (2021). Tuberculosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>. Consultado el 21 de octubre del 2021
11. Von Mollendorf, C., Tempia, S., Von Gottberg, A., Meiring, S., Quan, V., Feldman, C., Cloete, J., Madhi, S. A., O'Brien, K. L., Klugman, K. P., Whitney, C. G., y Cohen, C. (2017). Estimated severe pneumococcal disease cases and deaths before and after pneumococcal conjugate vaccine introduction in children younger than 5 years of age in South Africa. *PLoS One*, 12(7), e0179905.
12. Aditi Sriram, Erta Kalanxhi, Geetanjali Kapoor, Jessica Craig, Ruchita Balasubramanian, Sehr Brar, Nicola Criscuolo, Alisa Hamilton, Eili Klein, Katie Tseng, Thomas Van Boeckel y Ramanan Laxminarayan. (2021). State of the world's antibiotics 2021: A global analysis of antimicrobial resistance and its drivers. <https://www.anpario.com/wp-content/uploads/2021/03/cddep-antibiotics-2021.pdf>. Consultado el 21 de octubre del 2021.
13. Center for Disease Dynamics, Economics and Policy. (2015). State of the world's antibiotics, 2015. [https://www.cddep.org/wp-content/uploads/2017/06/swa\\_executive\\_summary\\_edits\\_2016.pdf](https://www.cddep.org/wp-content/uploads/2017/06/swa_executive_summary_edits_2016.pdf). Consultado el 21 de octubre del 2021.
14. Clardy, J., Fischbach, M. A., y Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current Biology*, 19(11), R437-R441.
15. Zaffiri, L., Gardner, J., y Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25(2), 67-77.

16. CDC. (2019) Antibiotic resistance threats in the United States. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Consultado el 21 de octubre del 2021.
17. Kostyanov, T., y Can, F. (2017). The global crisis of antimicrobial resistance. In *Antimicrobial Stewardship*. Academic Press, 3-12.
18. Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482.
19. Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., y Van Dongen, M. (2022). Antibiotic discovery and resistance: the chase and the race. *Antibiotics*, 11(2), 182.
20. O'Neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf). Consultado el 21 de octubre del 2021.
21. Cecchini, M., Langer, J., y Slawomirski, L. (2015). Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: economic issues, policies and options for action. *Paris: Organization for Economic Co-operation and Development*, 1-75.
22. FEMEBA. Uso racional de antibióticos. [http://www.femeba.org.ar/documentos/download/3049?utm\\_medium](http://www.femeba.org.ar/documentos/download/3049?utm_medium). Consultado el 27 de octubre del 2021.
23. Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903.
24. De Oliveira, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., y Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00181-19.
25. Najafi, A., (2016). There is no escape from the ESKAPE pathogens. <https://emerypharma.com/blog/eskape-pathogens-explained/>. Consultado el 27 de octubre del 2021.
26. Benkő, R., Gajdács, M., Matuz, M., Bodó, G., Lázár, A., Hajdú, E., y Pető, Z. (2020). Prevalence and antibiotic resistance of ESKAPE pathogens isolated in the emergency department of a tertiary care teaching hospital in Hungary: a 5-year retrospective survey. *Antibiotics*, 9(9), 624.
27. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., y Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539.
28. Sorokina, M., and Steinbeck, C. (2020). Review on natural products databases: Where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*, 12(1), 1-51.
29. Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., y Yoon, Y. J. (2019). A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1404.
30. Dias, D. A., Urban, S., y Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
31. Abdel-Razek, A. S., El-Naggat, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., y Othman, S. I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, 8(4), 470.
32. Newman, D. J., y Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803.
33. Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., y Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204-207.

34. Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. How to overcome the antibiotic crisis, 237-272.
35. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277.
36. Hutchings, M. I., Truman, A. W., y Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
37. Davies, J. (2006). Where have all the antibiotics gone? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 287-290.
38. Xu, J. (2020). Fungal species concepts in the genomics era. *Genome*, 63(9), 459-468.
39. Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., y Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, 10(3), 127-140.
40. Walker, C. (2021). State of the world's plants and fungi. *CactusWorld*, 39(2), 161-162.
41. Shin, H. J. (2020). Natural products from marine fungi. *Marine Drugs*, 18(5), 230.
42. Daley, D. K., Brown, K. J., y Badal, S. (2017). Fungal metabolites. In *Pharmacognosy* (pp. 413-421). Academic Press.
43. Miyamoto, K. T., Komatsu, M., y Ikeda, H. (2014). Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from *Actinomycetales* microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16), 5028-5036.
44. Wright, G. D. (2017). Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports*, 34(7), 694-701.
45. Sayed, A. M., Hassan, M. H., Alhadrami, H. A., Hassan, H. M., Goodfellow, M., y Rateb, M. E. (2020). Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 630-657.
46. Giordano, D. (2020). Bioactive Molecules from Extreme Environments. *Marine Drugs*, 18(12), 640.
47. Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R. O., y Vaca, I. (2015). Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 6, 903.
48. Silber, J., Kramer, A., Labes, A., y Tasdemir, D. (2016). From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. *Marine drugs*, 14(7), 137.
49. Gobierno de México. México país megadiverso (2016). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/mexico-pais-megadiverso-31976>. Consultado el 9 de diciembre del 2021.
50. Gobierno de México. Expertos evalúan y enlistan hongos en riesgo de extinción de los bosques templados de México (2019). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <https://www.gob.mx/conabio/prensa/expertos-evaluan-y-enlistan-hongos-en-riesgo-de-extincion-de-los-bosques-templados-de-mexico?idiom=es>. Consultado el 9 de diciembre del 2021.
51. Mata, R., Figueroa, M., Rivero-Cruz, I., y Macías-Rubalcava, M. L. (2018). Insights in fungal bioprospecting in Mexico. *Planta Medica*, 84(09/10), 594-605.
52. Aparicio-Cuevas, M. A., Rivero-Cruz, I., Sánchez-Castellanos, M., Menéndez, D., Raja, H. A., Joseph-Nathan, P., y Figueroa, M. (2017). Dioxomorpholines and derivatives from a marine-facultative *Aspergillus* species. *Journal of Natural Products*, 80(8), 2311-2318.
53. Villanueva-Silva, R., Velez, P., Riquelme, M., Fajardo-Hernández, C. A., Martínez-Cárdenas, A., Arista-Romero, A., y Figueroa, M. (2021). Chemical diversity and antimicrobial

- potential of cultivable fungi from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico. *Molecules*, 26(23), 7328.
54. Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
55. Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., y Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756-770.
56. Catalogue of Life. Hypocreales. (2021) Catalogue of Life Checklist. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/3DF>. Consultado el 15 de diciembre del 2021.
57. Raymundo, T., Escudero-Leyva, E., Soto-Agudelo, R., García-Jiménez, J., Romero-Bautista, L., y Valenzuela, R. (2017). New records of Hypocreales (Sordariomycetes, Ascomycota) of the cloud forest from the Sierra Alta Hidalguense in Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, (120), 39-57.
58. Zhang, L., Fasoyin, O. E., Molnár, I., y Xu, Y. (2020). Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: Novel bioactive compounds. *Natural Product Reports*, 37(9), 1181-1206.
59. Matsumoto, M., Minato, H., Tori, K., y Ueyama, M. (1977). Structures of isororidin E, epoxyisororidin E, and epoxy-and diepoxyroridin H, new metabolites isolated from *Cylindrocarpon* species determined by carbon-13 and hydrogen-1 NMR spectroscopy. Revision of C-2': C-3' double bond configuration of the roridin group. *Tetrahedron Letters*, 18(47), 4093-4096.
60. Shank, R. A., Foroud, N. A., Hazendonk, P., Eudes, F., y Blackwell, B. A. (2011). Current and future experimental strategies for structural analysis of trichothecene mycotoxins-a prospectus. *Toxins*, 3(12), 1518-1553.
61. Jarvis, B. B., y Wang, S. (1999). Stereochemistry of the roridins. Diastereomers of roridin E. *Journal of Natural Products*, 62(9), 1284-1289.
62. Peres de Carvalho, M. (2014). *Use of comatuslactone to modulate microbial biofilms* (Doctoral dissertation).
63. Zhao, L., Liu, L., Wang, N., Wang, S. J., Hu, J. C., y Gao, J. M. (2011). Potent toxic macrocyclic trichothecenes from the marine-derived fungus *Myrothecium verrucaria* Hmp-F73. *Natural Product Communications*, 6(12), 1915-1916.
64. Udoh, K., Parte, S., Carter, K., Mack, A., y Kakar, S. S. (2019). Targeting of lung cancer stem cell self-renewal pathway by a small molecule verrucarín J. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(4), 601-611.
65. Garcia, C. C., Rosso, M. L., Bertoni, M. D., Maier, M. S., y Damonte, E. B. (2002). Evaluation of the antiviral activity against Junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of *Baccharis coridifolia*. *Planta Medica*, 68(03), 209-212.
66. Carter, K., Rameshwar, P., Ratajczak, M. Z., y Kakar, S. S. (2017). Verrucarín J inhibits ovarian cancer and targets cancer stem cells. *Oncotarget*, 8(54), 92743.
67. Rukachaisirikul, V., Rodglin, A., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Buatong, J., y Sakayaroj, J. (2012). Phthalide and isocoumarin derivatives produced by an *Acremonium* sp. isolated from a mangrove *Rhizophora apiculata*. *Journal of Natural Products*, 75(5), 853-858.
68. Chagas, F. O., Caraballo-Rodríguez, A. M., y Pupo, M. T. (2015). Endophytic fungi as a source of novel metabolites. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, 2(123-176).
69. Molleyres, L. P. (2004). Production of neofrapeptins for use as insecticides. *DE 10361201 A1*.

70. Fredenhagen, A., Molleyres, L. P., Böhlendorf, B., y Laue, G. (2006). Structure determination of neofrapeptins A to N: peptides with insecticidal activity produced by the fungus *Geotrichum candidum*. *Journal of Antibiotics*, 59(5), 267-280.
71. Brückner, H., Fox, S., y Degenkolb, T. (2019). Sequences of acretocins, peptaibiotics containing the rare 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, from *Acremonium crotoicinigenum* CBS 217.70. *Chemistry and Biodiversity*, 16, e1900276.
72. Lin, C. G., Dai, D. Q., Bhat, D. J., Hyde, K. D., Tang, L. Z., Lumyong, S., y Bahkali, A. H. (2017). *Alfaria avenellae* sp. nov. from Italy. *Phytotaxa*, 332(1), 67-74.
73. Crous, P. W., Wingfield, M. J., Burgess, T. I., Carnegie, A. J., Hardy, G. S. J., Smith, D., y Groenewald, J. Z. (2017). Fungal planet description sheets: 625-715. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39, 270.
74. Xu, Y., Wang, C., Liu, H., Zhu, G., Fu, P., Wang, L., y Zhu, W. (2018). Meroterpenoids and isocoumarinoids from a *Myrothecium* fungus associated with *Apocynum venetum*. *Marine Drugs*, 16(10), 363.
75. Li, Y., Wu, C., Liu, D., Proksch, P., Guo, P., y Lin, W. (2014). Chartarlactams A–P, phenylspirodrimanes from the sponge-associated fungus *Stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities. *Journal of Natural Products*, 77(1), 138-147.
76. Liu, J., Feng, J., Jia, X., Zhao, J., Chen, R., Xie, K. y Dai, J. (2020). Bistachybotryns WY, three new phenylspirodrimane dimers with a 6/7 oxygen heterocycle from *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry Letters*, 35, 73-77.