



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Alcaloides del hongo *Malbranchea albolutea* Sigler & Carmichael (Myxotrichaceae)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Miriam Díaz Rojas

TUTORA:

Dra. Rachel Mata Essayag

Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Junio 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Patricia Guevara Fefer
VOCAL: Dra. Martha Patricia García Camacho
VOCAL: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
VOCAL: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
SECRETARIO: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 124, Edificio E, Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Congresos: 52° Congreso Mexicano de Química y el 53° Congreso Nacional de Educación Química Poster. Miriam Díaz R., Isabel Rivero C., Rachel Mata E., 26-29 de septiembre 2017, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Q. Miriam Díaz Rojas

Sustentante

Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Técnica Académica

Dra. Rachel Mata Essayag

Tutora

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Químicas, a la Facultad de Química y la UNAM, por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al CONACyT (CB-219765) por el financiamiento otorgado para la realización de trabajo (No. De Becario: 604010)

A la Dra. Rachel Mata por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por toda la ayuda, paciencia y consejos otorgados para el desarrollo del presente trabajo. Muchísimas Gracias.

A las doctoras Isabel Rivero y Berenice Ovalle, por brindarme sus conocimientos y su apoyo. Muchas gracias.

Al Dr. José Alberto Rivero Chávez por el registro de los espectros de RMN.

Al M. en C. Manuel Eduardo Rangel por el apoyo en la realización de los ensayos "in vitro" y los cálculos de modelado molecular.

Al Q.F.B Alejandro Camacho Cruz (Jefe del Cepario Departamento de Biología Laboratorio 1-C primer piso Edificio A, Facultad de Química) y Q.F.B. María Antonieta Silva Chávez (Téc. Acad. Asoc. "A", Cepario Facultad de Química, UNAM) por el apoyo para la obtención y preservación de las bacterias empleadas en los antimicrobianos.

A los miembros del jurado, por las revisiones y observaciones realizadas, las cuales enriquecieron el presente trabajo.

DEDICATORIAS

A mi padre por ser un ejemplo de perseverancia y dedicación al trabajo, por todo el apoyo que me has brindado a lo largo de mi vida académica.

A mis abuelitos Conchita y Víctor, por siempre creer en mí, por todo el apoyo brindado para poder seguir superándome y alcanzar mis sueños, mis logros son un reflejo de todo lo que me han dado.

A mis hermanos Víctor y Pilar, mis sobrinas Elisa y Paulina, por ser mi principal motivación para seguir adelante sin importar todas las adversidades.

A la familia Aparicio Trejo, por abrirme las puertas de su casa siempre que lo necesite.

A mi mejor amigo, pareja, el mejor hombre y científico del mundo, Emiliano, por todos estos años de apoyo y amor incondicional, sin ti a mi lado mi camino para llegar donde estoy hubiera sido más difícil y aburrido.

A todos mis compañeros del Laboratorio 124, por su invaluable ayuda y consejos, gracias. Con especial cariño para las demás integrantes del cuarteto “Cuatro fantásticas y Silver Surfer” Vale, Dany, Jenni e Ingrid, mis estimados Eric, Manuel, Arturo y Oscar, por su sincera y valiosa amistad.

ÍNDICE

Lista de Figuras	6
Lista de Tablas	8
Lista de Abreviaturas y Fórmulas	9
1. Antecedentes.....	12
1.1 Resistencia a los antimicrobianos	12
1.2 Antecedentes de <i>Malbranchea albolutea</i> Sigler & Carmichael.....	16
1.3 Ardeminas.....	24
2. Justificación y Objetivos.....	25
3. Hipótesis	26
4. Parte Experimental	27
4.1 Material Fúngico.....	27
4.2 Procedimientos generales	27
4.2.1 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas	27
4.2.1.1 Análisis cromatográfico	28
4.2.2 Cultivo en medio sólido de <i>M. albolutea</i>	29
4.3 Estudio químico de <i>M. albolutea</i>	29
4.3.1 Preparación del extracto orgánico.....	29
4.3.2 Fraccionamiento del extracto orgánico	30
4.3.3 Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios	31
4.3.3.1 Aislamiento y caracterización de la 5- <i>N</i> -acetil-8- β -isopropil-ardemina (33).....	31
4.3.3.2 Aislamiento y caracterización de 5- <i>N</i> -acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (34) 31	
4.3.3.3 Aislamiento y caracterización del 1- <i>H</i> -indol-3-carboxialdehído (35)	32
4.4 Actividad antimicrobiana	33
5. Resultados y Discusión.....	34
5.1 Estudio químico de la especie fúngica <i>M. albolutea</i>	34
5.1.1 5- <i>N</i> -acetil-8- β -isopropil-ardemina (33).....	35
5.1.2 5- <i>N</i> -acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (34)	40
5.1.3 1- <i>H</i> -indol-3-carboxialdehído (35).....	45
5.2 Actividad antimicrobiana	47
6. Conclusiones.....	48

7. Perspectivas.....	48
8. Bibliografía.....	49
9. Anexos	53

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Resistencia Antimicrobiana en la cadena alimenticia	13
2	Izquierda: <i>M. albolutea</i> . Colonia en medio PDA y PYG (A y B), hifas segmentadas para la formación de antroconidias (C, D y E), ascosporas (F y H), gimnotecia (G) imagen tomada de Sigler & Carmichel, 1976. Derecha: cultivos de <i>M. albolutea</i> en diferentes medios	17
3	Metabolitos aislados de <i>M. aurantiaca</i> . En la parte superior se muestran las Malbranqueamidas, en la inferior el ácido y sesquiterpeno.	18
4	Compuestos aislados de la especie <i>M. flavorosea</i>	10-20
5	<i>M. circinata</i> permitió el aislamiento de la xantona (14) y de la antraquinona (15)	20
6	Metabolitos aislados de <i>M. filamentosa</i>	21
7	Análogos de malbranqueamida obtenidos por la adición de sales de bromo en el medio de cultivo de <i>M. graminicola</i>	22
8	Malbrampirroles citotóxicos sobre diversas líneas celulares cancerígenas	22-23
9	Ardequinas reportadas por Hochlowski <i>et al.</i> , 1993	24
10	Preparación del extracto orgánico obtenido a partir de <i>M. albolutea</i> y fraccionamientos	30
11	Compuestos aislados del extracto CH ₃ CN:MeOH de <i>M. albolutea</i>	34-35
12	Estructuras parciales (A-F) mostrando las correlaciones relevantes observadas en los espectros NOESY y HMBC del compuesto (33)	36
13	Correlaciones relevantes encontradas en el espectro COSY para la elucidación estructural del compuesto (33)	37
14	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto (33), (175 MHz), acetona-d ₆	39
15	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto (33), (500 MHz), acetona-d ₆	39
16	Espectro de RMN- ¹ H con las señales más representativas del compuesto (33), (500 MHz), acetona-d ₆	40
17	Estructuras parciales mostrando las correlaciones relevantes observadas en los espectros NOESY y HMBC del compuesto (34)	41
18	Correlaciones encontradas en el espectro COSY para 5-N-acetil-15b-β-hidroxi-8-β-isopropil-ardemina	42

LISTA DE FIGURAS

19	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto (34), (175 MHz), acetona-d ₆	43
20	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto (34), (500 MHz), acetona-d ₆	44
21	Espectro de RMN- ¹ H con las señales más representativas del compuesto (34), (500 MHz), acetona-d ₆	44
22	Estructura cristalina 1- <i>H</i> -indol-3-carboxialdehído	46

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana	15
2	Sistema de elución empleado en la CCA para el fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>M. albolutea</i>	28
3	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para 5- <i>N</i> -acetil-8-β-isopropil-ardemina (33) en Acetona-d ₆ (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).	38
4	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para 5- <i>N</i> -acetil-15b-β-hidroxi-8-β-isopropil-ardemina (34) en Acetona-d ₆ (¹ H a 500 MHz y ¹³ C a 125 MHz).	42
5	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para 1- <i>H</i> -indol-3-carboxialdehído (35) en DMSO-d ₆ (¹ H a 400 MHz y ¹³ C a 23 MHz)	46
6	CMI determinado en la curva de control positivo, en el caso de <i>P. aeruginosa</i> se usó sulfato de gentamicina*, en las demás bacterias se usó ampicilina y nistatina** para <i>C. albicans</i>	47

Lista de Abreviaturas y Fórmulas

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
A459	Línea celular de cáncer de pulmón
CH ₃ CN	Acetonitrilo
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
PDA	Agar papa-dextrosa
H ₂ O	Agua
PDB	Caldo papa-dextrosa
PDA	Agar papa dextrosa
PYE	Agar peptona extracto de levadura
CaM	Calmodulina
DC	Dicroísmo circular
cm	Centímetro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HUVEC	Línea celular endotelial de venas umbilicales
HELA	Línea celular maligna epitelial de humano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia

CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DC	Dicroísmo circular
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
°C	Grados Celsius
GLASS	Global Antimicrobial Resistance Surveillance System
g	Gramos
Hex	Hexano
Hz	Hertz
HepG2	Línea de carcinoma hepatocelular
IR	Infrarrojo
L	Litros
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
MCF-7	Línea de adenocarcinoma de glándula mamaria
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón

Lista de abreviaturas y fórmulas

Abreviatura	Significado
PANC-1	Línea de carcinoma epiteloides de páncreas
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RO	Rotación óptica
UV	Espectroscopía en el ultravioleta

1. Antecedentes

1.1 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) de impedir que los antimicrobianos actúen contra ellos, en consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces, las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas, el fenómeno de resistencia aparece de forma natural, generalmente por modificaciones genéticas, sin embargo, el proceso se ve acelerado por el mal uso y abuso de los medicamentos antimicrobianos (OMS, 2017).

La mayoría de los microorganismos con RAM adoptan diferentes fenotipos en respuesta a diversos factores estresantes; esta respuesta se basa en la capacidad del microorganismo para detectar las condiciones ambientales locales y alterar sus genes a fin de lograr su supervivencia. Cuando los microorganismos se exponen a un antimicrobiano, los individuos más sensibles mueren, quedando sólo los más resistentes, que a su vez pueden transmitir esa resistencia a su descendencia (Melander *et al.*, 2014).

En la actualidad, las mayores causas de resistencia son el uso excesivo e indebido de antimicrobianos por parte del hombre (**Figura 1**). Además, cada vez aparecen nuevos mecanismos de resistencia, hecho que complica el tratamiento de las enfermedades infecciosas comunes; en consecuencia, una simple infección se convierte en una enfermedad prolongada que incluso puede ocasionar la muerte. Por otro lado, sin tratamientos eficaces para la prevención de infecciones, los procedimientos médicos como el trasplante de órganos, la quimioterapia, el control de la diabetes y la cirugía mayor se vuelven de alto riesgo. Asimismo, cuando hay RAM el costo de la atención médica se incrementa por la necesidad de estancias hospitalarias más largas (OMS, 2015).



Figura 1. Resistencia antimicrobiana en la cadena alimenticia, imagen tomada del comunicado de la OMS, 2017

Una forma para comprender mejor los patrones de resistencia a los antimicrobianos es recopilar información sobre la incidencia, la prevalencia y las tendencias de la resistencia a los antimicrobianos. Por esta razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó en octubre de 2015 el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés). El objetivo de este programa es apoyar la vigilancia e investigación a nivel mundial con el fin de formar una base de datos sobre el desarrollo y prevención de RAM, para ayudar a la toma de decisiones e impulsar las acciones nacionales, regionales y mundiales.

Con la información recopilada por GLASS en febrero del 2017, la OMS emitió una lista de los microorganismos resistentes a antibióticos y los agrupó en tres categorías (**Tabla 1**) de acuerdo con la necesidad de nuevos antimicrobianos para el tratamiento de las enfermedades que éstos ocasionan. Los criterios para seleccionar los patógenos de la lista fueron:

- Letalidad de las infecciones que causan
- Duración del tratamiento
- Frecuencia de resistencia a los antibióticos existentes
- Facilidad de propagación entre animales, desde animales hasta humanos y de persona a persona
- Posible prevención (por ejemplo, a través de una buena higiene y vacunación)
- Opciones de tratamiento alternativas
- Existencia de nuevos antibióticos en proceso de investigación y desarrollo

ANTECEDENTES

Tabla 1. Lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, tomada del comunicado de la OMS, 2017

Prioridad	Microorganismo patógeno	Resistencia	Enfermedades asociadas
Crítica ¹	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos	Infecciones graves y a menudo letales, por ejemplo, infecciones sistémicas y neumonías. Estas patologías son de importancia en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Enterobacteriáceas (<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , y <i>Proteus spp.</i>)	Carbapenémicos y Cefalosporinas	
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina	Enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por salmonela.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina y Vancomicina	
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina	
	<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolonas	
	<i>Salmonellae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolonas Cefalosporin y Fluoroquinolonas	
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina	
	<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolonas	

Las cefalosporinas mencionadas en la (Tabla 1), son los mejores antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por las bacterias multirresistentes. Por otro lado, las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los

tratamientos y pueden transmitir su material genético a otras bacterias, haciéndolas farmacorresistentes.

1.2 Antecedentes de *Malbranchea albolutea* Sigler & Carmichael

Este tipo de hongos multicelulares se caracteriza por la formación de hifas tubulares, (unidades estructurales de los hongos), que pueden ser curvas o derechas, contienen en su interior citoplasma; las hifas presentes en este género pueden presentar tabiques (hifas septadas) o no (hifas aseptadas) y es característico que formen micelio (conjunto de hifas entretrejidas). Las 21 especies del género *Malbranchea* forman artroconidias, generadas por la fragmentación de hifas fértiles (Marchisio *et al.*, 1994).

El primer estudio taxonómico descrito sobre el género *Malbranchea* fue realizado por Sigler & Carmichael en 1976, quienes dividieron al género en dos grupos: tipo A y tipo B. Las especies del primer grupo presentan hifas fértiles curvas, en contraste con las del tipo B, que poseen hifas fértiles derechas. Cabe mencionar que con base en la similitud de sus estadios sexuales y/o asexuales, las especies del género *Malbranchea* han sido clasificadas dentro de diversas familias como Myxotrichaceae, Orygenaceae o Gymnoascaceae. Dentro de las familias antes mencionadas hay dos géneros que se encuentran estrechamente relacionados con las especies *Malbranchea*, *Myxotrichum* y *Auxarthron*. Estos fueron los empleados por Sigler & Carmichael en su descripción taxonomica (Sigler *et al.*, 2002).

En la descripción taxonómica de la especie *M. albolutea* realizada en 1976 (**Figura 2**) se clasificó dentro de la familia *Orygenaceae* y se le relacionó con la especie *Auxarthron thaxteri* (Sugiyama *et al.*, 1999). De acuerdo con los autores la especie únicamente se ha aislado del suelo y estiércol en Utah, Colorado, California y Wyoming (EUA). Este hongo difiere de otras especies de *Malbranchea* por tener hifas fértiles curvas. En cultivo el ascomiceto presenta una forma sexual característica por la formación de ascosporas globosas y ligeramente rugosas (tipos de esporas de origen sexual), en estadios tempranos de crecimiento forma artroconidias.

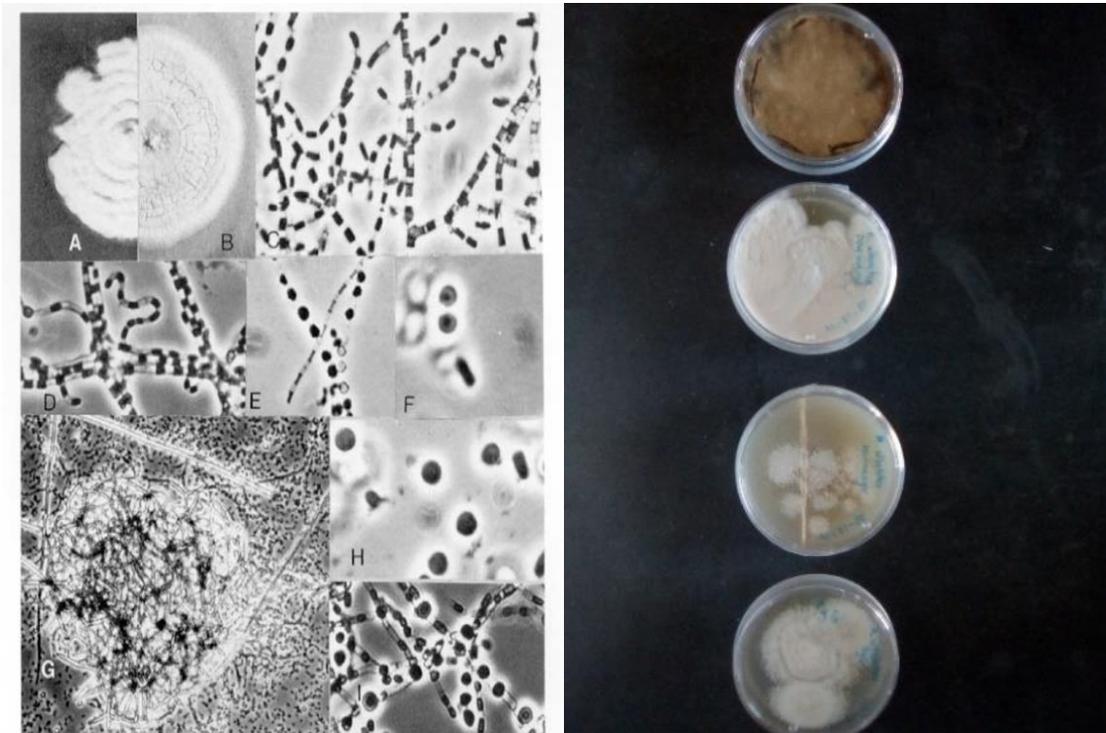


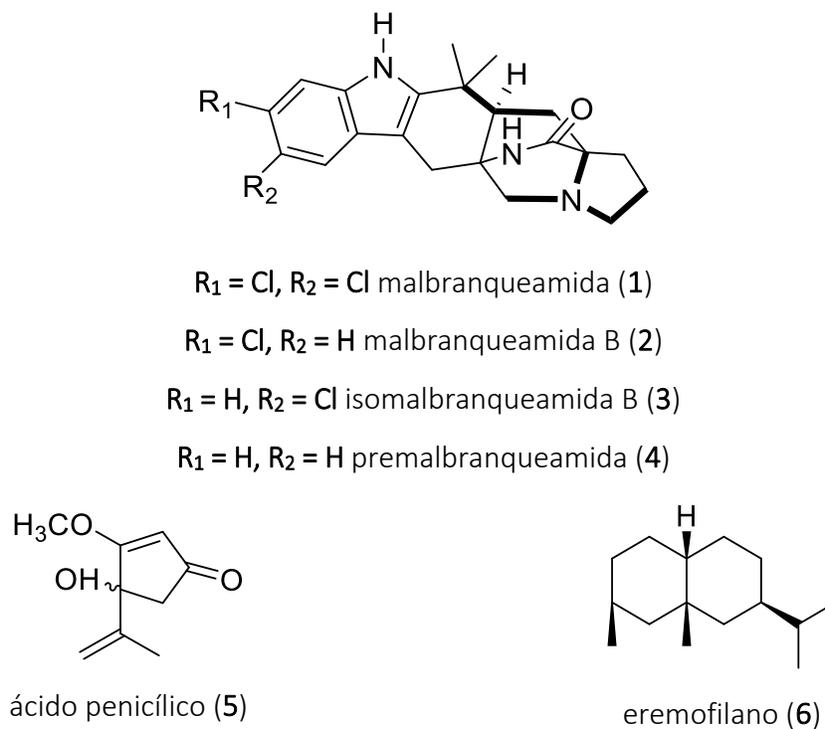
Figura 2. Izquierda: *M. albolutea* Sigler & Carmichael. Colonia en medio PDA y PYE (A y B), hifas segmentadas para la formación de antroconidias (C, D y E), ascosporas (F y H), gimnotecia (G), imagen tomada de (Sigler & Carmichael, 1976). Derecha: cultivos de *M. albolutea* en diferentes medios de cultivo.

A pesar de que la especie *M. albolutea* no cuenta con estudios químicos previos, otras especies del género, en particular *M. pullchella*, *M. graminicola*, *M. cinnamomea*, *M. filamentosa*, *M. aurantiaca*, *M. flavorosea* y *M. circinata*, han sido estudiadas y los metabolitos biodinámicos aislados y caracterizados de estas especies pertenecen a diversas categorías, como son xantonas, benzoquinonas (Chiung *et al.*, 1994), hidroquinonas (Schlegel *et al.*, 2003), benzofuranos (Hosoe *et al.*, 2005), esteroides (Martínez-Luis *et al.*, 2006), policétidos (Verastegui-Omaña *et al.*, 2017), alcaloides de tipo indol monoterpénoides (Martínez-Luis *et al.*, 2006; Watts *et al.*, 2011) y otros compuestos aromáticos por mencionar a los más importantes.

Como parte de un proyecto dirigido a descubrir nuevos agentes biodinámicos de origen fúngico, las especies *M. aurantiaca*, *M. flavorosea*, *M. circinata* y *M. chrysosporoidea* fueron recientemente investigadas en nuestro grupo de trabajo.

ANTECEDENTES

De la especie *M. aurantiaca* se aislaron cuatro alcaloides de tipo indol monoterpenoide con un núcleo biciclo [2.2.2] diazooctano (**Figura 3**), designados con los nombres triviales de malbranqueamida (**1**), malbranqueamida B (**2**), isomalbranqueamida (**3**), y la premalbranqueamida (**4**) (Martínez-Luis *et al.*; 2006; Figueroa *et al.*, 2011). También se caracterizaron en la especie ácido penicílico (**5**), el ergosterol, los ácidos linoléico y oléico y un derivado de eremofilano (**6**). El efecto de los compuestos **1**, **5** y **6** de *M. aurantiaca* sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de la maleza *Amaranthus hypochondriacus*, permitió evidenciar su potencial fitotóxico (Martínez-Luis *et al.*, 2006).

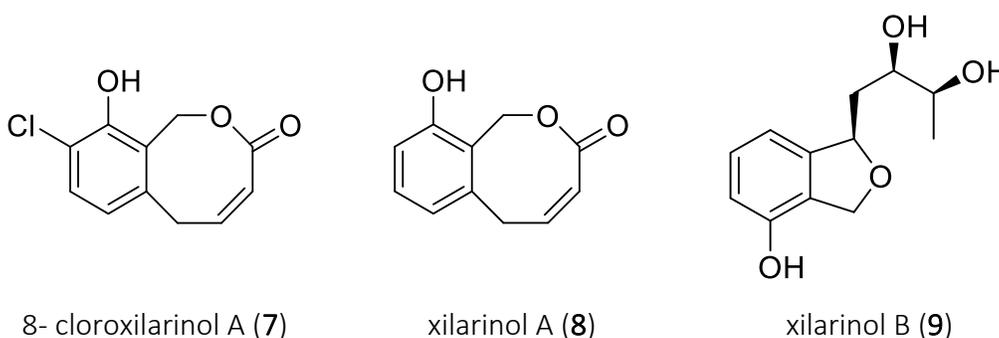


*Figura 3. Metabolitos aislados de *M. aurantiaca*. En la parte superior se muestran las Malbranqueamidas, en la inferior el ácido y sesquiterpeno*

La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua de 128 aminoácidos, puede interactuar con cerca de 100 diferentes enzimas para así regular numerosas funciones celulares tales como motilidad celular, arquitectura y función del citoesqueleto, proliferación celular, apoptosis, etc. (Mata *et al.*, 2015). Por esta razón se ha convertido en un blanco molecular de interés.

La evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos **1** y **6** sobre CaM permitió establecer el valor de la Cl_{50} de 3.65 y 10.2 μM , respectivamente, comparable a la de clorpromazina ($Cl_{50} = 2.75 \mu\text{M}$), utilizada como control positivo (Martínez-Luis *et al.*, 2006). González y colaboradores (2009) diseñaron un biosensor para identificar inhibidores clásicos de CaM, con esta técnica se realizó la evaluación de las malbranqueamidas permitiendo corroborar sus propiedades de inhibición; el compuesto con mayor afinidad fue el **1**, mientras que el **4** fue el de menor afinidad; por lo tanto, se concluyó que la presencia de halógenos es fundamental para mejorar la actividad inhibitoria de los compuestos. La unión de la malbranqueamida a la calmodulina se demostró también mediante experimentos de RMN. (Figuroa *et al.*, 2011). Por otra parte estudios farmacológicos permitieron establecer que los productos **1–3** inducen vasorrelajación significativa dependiente de la concentración, para esto se usó un modelo de anillo de aorta de rata (Madariaga-Mazón *et al.*, 2015). De nueva cuenta se estableció que la presencia del halógeno era indispensable para la actividad biológica. El estudio químico de *Malbranchea chryso sporoidea* reporto por tercera ocasión el aislamiento de malbranqueamidas (**1-4**) (Figura 3), lo que apoya la teoría de que estos productos podrían ser biogenéticamente comunes en el género (Campos, 2017).

En estudios recientes sobre la especie la especie *M. flavorosea* se obtuvieron dos nuevos policétidos denominados 8-cloroxilarinol A (**7**) y el flavorroseósido (**13**), y los compuestos conocidos xilarinol A (**8**), xilarinol B (**9**), masarigenina B (**11**) y C (**12**) y el clavatol (**10**) (Figura 4). Los compuestos **8, 9** y **11** presentan actividad inhibitoria de las α -glucosidasas por lo que constituyen agentes antidiabéticos potenciales (Verastegui-Omaña *et al.*, 2017).



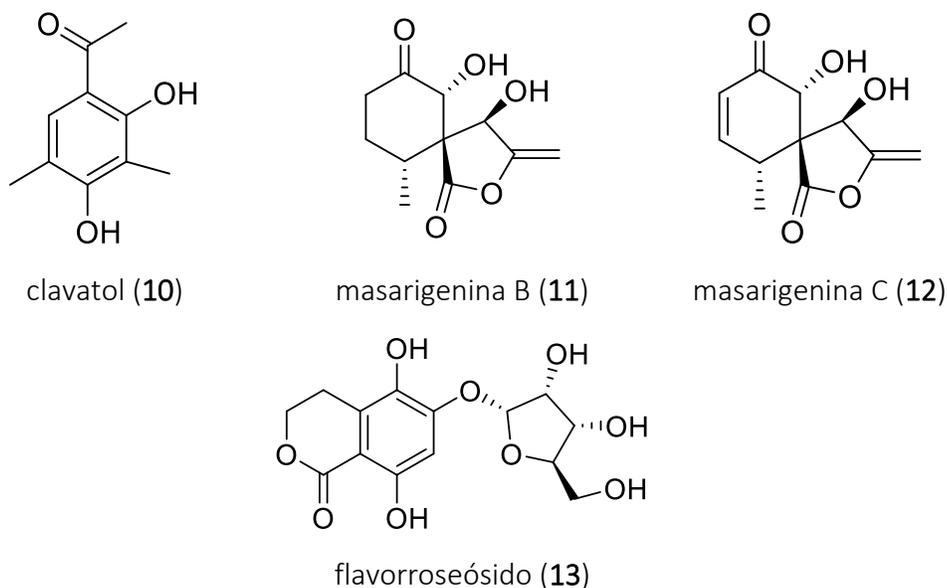


Figura 4. Compuestos aislados de la especie *M. flavorosea*

El estudio químico de *M. circinata* permitió el aislamiento de la xantona **14** y de la antraquinona **15** (Figura 5), ambos compuestos también resultaron inhibidores de las enzimas α -glusosidasas (Cedillo, 2016).

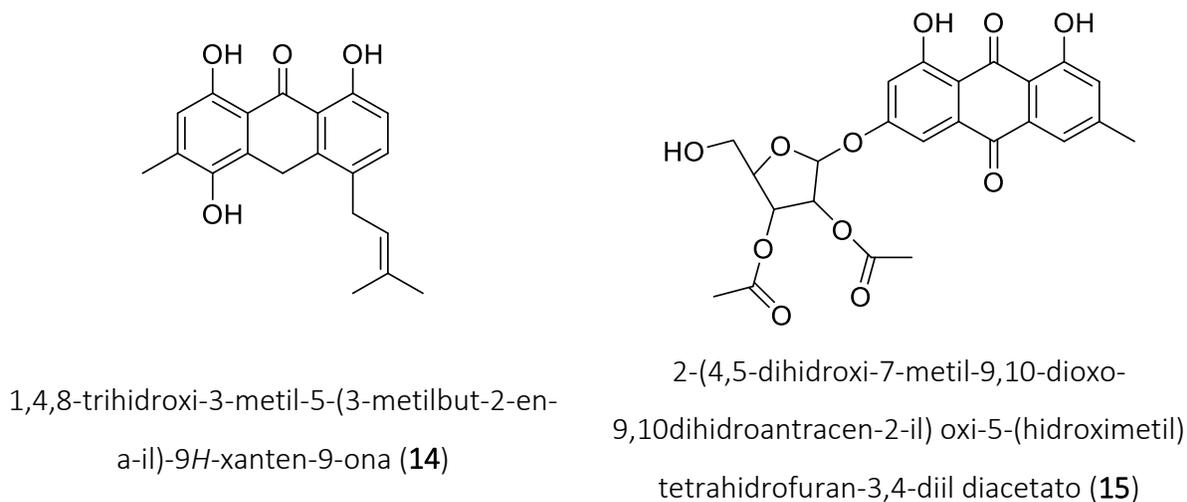


Figura 5. *M. circinata* permitió el aislamiento de la xantona (14) y de la antraquinona (15)

Los primeros compuestos aislados de *M. filamentosa* fueron el 4-bencil-3-fenil-5H-furan-2-ona (18), malfilamentósido A (16) y B (17) (Hosoe *et al.*, 2005; Wakana *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

En experimentos *in vitro* se demostró que el compuesto **18** era un potente vasodilatador, que interfiere con la entrada de Ca^{2+} a los canales dependientes de voltaje en la membrana de los vasos sanguíneos en aorta de rata, lo que permite la apertura de los canales de K^+ induciendo la relajación del músculo liso (Hosoe *et al.*, 2005). En estudios posteriores de la misma especie se aislaron el malfilanol A (**19**) y B (**20**) (**Figura 6**); ambos productos presentaron un importante efecto antifúngico contra *Cryptococcus neoformans* (Wakana *et al.*, 2009). En ensayos de citotoxicidad sobre las líneas celulares HUVEC y A459 empleando los productos **19** y **20**, mostraron una inhibición de la proliferación dichas células; únicamente la molécula **19** presentó una actividad inhibitoria sobre la proliferación de las línea celulares HELA, este estudio demuestra el potencial los metabolitos aislados de *M. filamentosa* como posibles anticancerígenos (Wakana *et al.*, 2009)

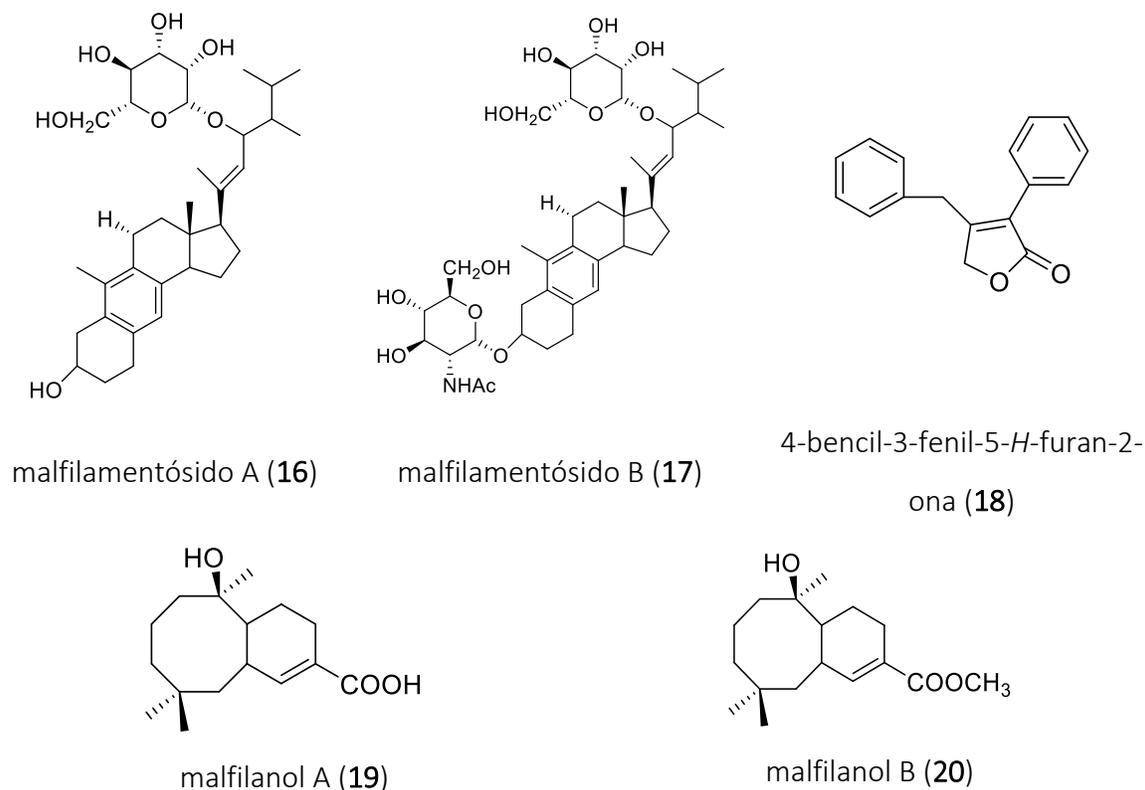
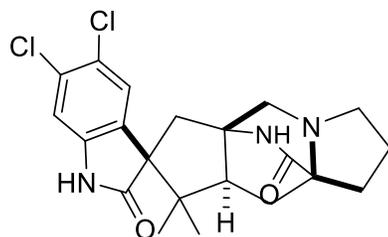
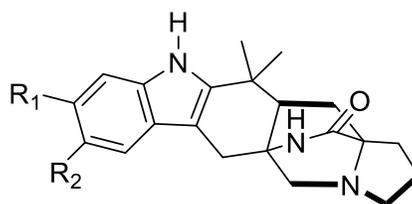


Figura 6. Metabolitos aislados de *M. filamentosa*

Estudios químicos de la especie *M. graminicola* permitieron detectar como metabolitos mayoritarios a los compuestos **1, 2** (Figura 3) y la espiomalbramida (**21**) (Figura 7); en este mismo trabajo se reportó que la adición de sales de bromo al medio de cultivo de *M. graminicola*, daba como resultado la biosíntesis de dos análogos de malbraqueamidas sustituidas con un átomo de bromo, a estas moléculas se les llamo malbranqueamida C (**22**) y isomalbranqueamida C (**23**) (Figura 7) (Watts *et al.*, 2011).



espiomalbramida (**21**)

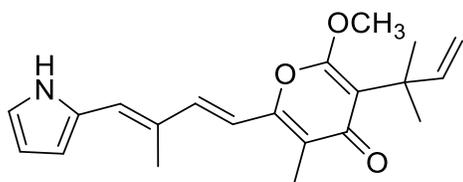


$R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{H}$ malbranqueamida C (**22**)

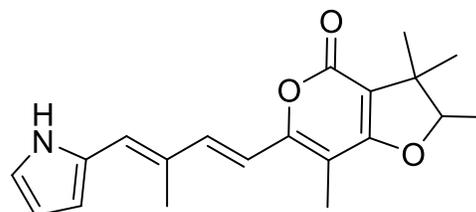
$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Br}$ isomalbranqueamida C (**23**)

Figura 7. Análogos de malbranqueamida obtenidos por la adición de sales de bromo en el medio de cultivo de *M. graminicola*

Finalmente, de la especie *M. sulfurea*, se aislaron los malbrampirroles C-F **24-29** (Figura 8) y se evaluó su actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares cancerígenas PANC-1 (carcinoma epiteloide de páncreas), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), sólo los compuestos **25-29** presentaron una actividad citotóxica importante (Yang *et al.*, 2009).



malbrampirrol A (**24**)



malbrampirrol B (**25**)

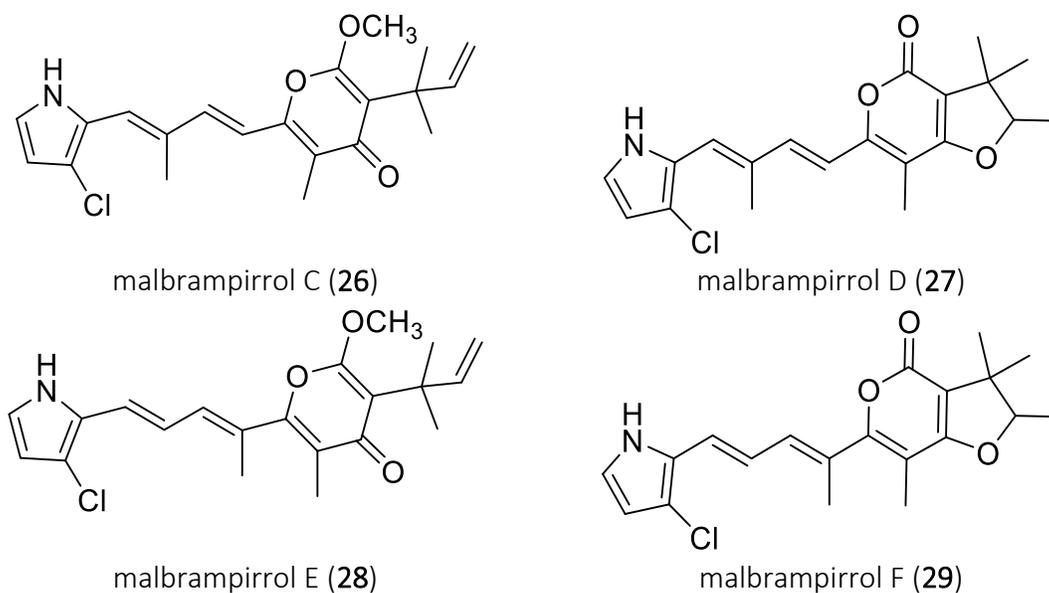
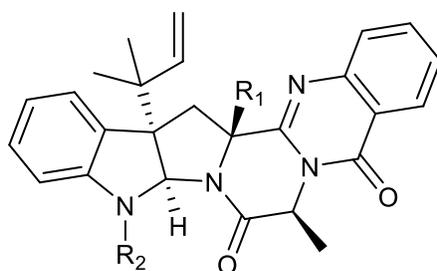


Figura 8. Malbrampirroles citotóxicos sobre diversas líneas celulares cancerígenas

De las especies estudiadas pertenecientes al género *Malbranchea* se han obtenido una gran variedad de compuestos activos, con propiedades farmacológicas muy variadas, sin embargo de *Malbranchea albolutea* sólo se encuentra reportada su actividad para degradar queratina (Marchisio *et al.*, 1994). Al contar con los antecedentes que corroboran la capacidad de estos hongos para biosintetizar compuestos con actividades biológicas relevantes, se plantea la posibilidad de que *M. albolutea* tenga la misma capacidad de producir metabolitos novedosos como los demás miembros pertenecientes a este género. Una de las razones por las que se buscan compuestos con potencial antimicrobiano provenientes de hongos es debido a la capacidad que tienen estos microorganismos para biosintetizar compuestos con estructuras novedosas y mecanismos de acción más efectivos, con la finalidad de contrarrestar la resistencia que día a día desarrollan los hongos y bacterias patógenos (Hillman *et al.*, 2017); un ejemplo de fármaco de reciente desarrollo y continuo estudio es el Plectasin, un potente antimicrobiano tipo peptídico asilado de *Pseudoplectania nigrella* (Mygind *et al.*, 2005).

1.3 Ardeminas

Las ardeminas son consideradas una familia nueva de metabolitos secundarios, producidos por hongos del género *Aspergillus*; estos compuestos (**Figura 9**) son alcaloides de origen peptídico, tipo dicetopiperazina considerados híbridos de la reacción entre difosfatos prenilados y el triptófano o alguno de sus precursores. Los primeros compuestos de este tipo fueron la 5-*N*-acetilardemina (**31**) y la 15b-β-hidroxi-5-*N*-acetilardemina (**32**), fueron aislados del extracto del acetona- acetato de etilo obtenido del medio de cultivo de *Aspergillus fischeri* (Hochlowski *et al.*, 1993); la 5-*N*-acetilardemina ha mostrado una importante citotoxicidad en combinación con medicamentos anticancerígenos como la vinblastina, es capaz de reducir el eflujo de los fármacos; de esta manera disminuye el fenómeno de resistencia (Chou *et al.*, 1998). El nombre de ardeminas proviene de la capacidad de estos compuestos para revertir la resistencia a los fármacos anticancerígenos (the ability to reverse drug insensitivity) (Haynes *et al.*, 2013).



Nombre	Sustituyentes	Rotación Óptica experimental $[\alpha]_D^{25}$
Ardemina	$R_1 = H, R_2 = H$ (30)	-92° (c = 0.24, MeOH)
5- <i>N</i> -acetil-ardemina	$R_1 = H, R_2 = Ac$ (31)	-33° (c = 0.78, MeOH)
5- <i>N</i> -acetil-15b-β-hidroxi-ardemina	$R_1 = OH, R_2 = Ac$ (32)	-245° (c = 0.21, MeOH)

Figura 9. Ardeminas reportadas por Hochlowski *et al.*, 1993

2. Justificación y Objetivos

Como se señaló en la sección de antecedentes, existe una necesidad urgente de descubrir nuevos productos antimicrobianos eficientes para combatir los numerosos agentes causales de enfermedades que han desarrollado resistencia a los tratamientos existentes. La resistencia a los antibióticos incrementa los costos médicos, prolonga las estancias hospitalarias e incrementa la mortalidad. Además, este problema sigue creciendo en todo el mundo a niveles peligrosos y día tras día aparecen y se propagan en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes.

Los microorganismos fúngicos biosintetizan productos bioactivos de amplio uso en la terapéutica, los ejemplos más conocidos son las penicilinas y las cefalosporinas, utilizados como antibióticos desde hace décadas. A partir de una gran variedad de hongos se obtienen fármacos de gran relevancia; un ejemplo reciente es el desarrollo de la equinocandinas, una clase de lipopéptidos antimicóticos (Emri *et al.*, 2013). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la 1,3- β -glucanosintetasa, enzima responsable de formar polímeros de glucano, esenciales para la estructura de la pared fúngica. De tal forma que el estudio de otras especies fúngicas podría conducir al hallazgo de moléculas prometedoras desde el punto de vista terapéutico.

En este contexto el objetivo primordial del presente trabajo es caracterizar nuevos compuestos biodinámicos a partir de la especie fúngica *Malbranchea albolutea* con la finalidad de contribuir al descubrimiento de nuevos fármacos antibacterianos potenciales.

Para el cumplimiento del objetivo principal se formularon los siguientes objetivos específicos:

- Establecer las condiciones para el cultivo a mediana escala del microorganismo fúngico, que permitan la obtención de la mayor cantidad de extracto orgánico.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto orgánico con diferentes tipos microorganismos patógenos (bacterias y una levadura).

- Fraccionamiento del extracto orgánico mediante la aplicación de los procedimientos cromatográficos convencionales con la finalidad de obtener los productos naturales bioactivos.
- Determinar la estructura molecular de los compuestos obtenidos del fraccionamiento del extracto orgánico, mediante el uso de técnicas espectroscópicas, espectrométricas y quirópticas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos caracterizados con diferentes tipos microorganismos patógenos (bacterias y una levadura).

3. Hipótesis

Considerando que los hongos del género *Malbranchea* biosintetizan metabolitos secundarios con diversas propiedades farmacológicas, es factible que *M. albolutea*, produzca también compuestos biodinámicos inéditos.

4. Parte Experimental

4.1 Material Fúngico

La cepa de *Malbranchea albolutea* Sigler & Carmichael (ATCC® 34522™) fue adquirida comercialmente en ATCC. El microorganismo fue activado siguiendo las instrucciones descritas por el proveedor, el procedimiento se describe brevemente: las esporas liofilizadas se activaron agregando 1 mL de agua estéril desionizada y una posterior incubación a 37°C, por 24 horas, todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

4.2 Procedimientos generales

4.2.1 Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en un equipo Bruker Avance III HD-500, a 500 (^1H) y 125 (^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al disolvente utilizando: acetona- d_6 , DMSO- d_6 o CDCl_3 .

Los análisis por espectrometría de masas se registraron en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (CLUE), marca Waters Acquity UPLC H-Class, acoplado a un detector de masas SQD2 (marca Waters), empleando la técnica de ionización por electrospray en los modos positivo y negativo (ESI^+ y ESI^-).

Todos los análisis se realizaron en una columna Waters Acquity BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), utilizando como fase móvil gradiente ácido fórmico al 0.1% (**A**) y CH_3CN (**B**), el flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen de inyección de 3 μL . Las condiciones de análisis en el detector de masas fueron: voltaje capilar de 2.0 kV (ESI^-) y 2.5 kV (ESI^+), voltaje de cono 30 V, temperatura de solvatación 400° C, gas de solvatación nitrógeno a 650 L/h, gas cono 10 L/h.

4.2.1.1 Análisis cromatográfico

Para los análisis por CCD se emplearon placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄, 10-12 μM, Merck) con un espesor de 0.25 mm. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV a las longitudes de onda (λ) de 254 y 365 nm. Como agentes cromógenos se utilizaron soluciones de sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄, H₂SO₄ al 10% y los reactivos de Dragendorff y Ehrlich.

Los análisis CCA se realizaron usando gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.20 μM) y una mezcla binaria de disolventes orgánicos para aumentar de manera gradual la polaridad de la columna, los diferentes sistemas de elución se presentan en la (Tabla 2). La cromatografía de exclusión molecular también en CCA se realizó empleando 150 g de fase estacionaria Sephadex, LH20 Pharmacia, (tamaño de partícula 25-100 μM) y un sistema isocrático de elución de MeOH.

Sistema de Eluyentes	Composición	Proporción
A	Hex-AcOEt	9:1 hasta 1:9
B	AcOEt	10
C	AcOEt -MeOH	9:1 hasta 5:5

Tabla 2. Sistema de elución empleado en la CCA para el fraccionamiento primario del extracto orgánico de *M. albolutea*

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), se realizó empleando un cromatógrafo marca Waters equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA) y otro de dispersión de luz evaporativo (ELSD). Las condiciones de análisis del detector de ELSD fueron: presión de gas nebulizador 40 psi, ganancia 100, en modo de calentamiento y temperatura del tubo (70 ± 25) °C.

En todos los casos se usó la misma columna analítica y preparativa, con diferentes gradientes de elución: columna analítica marca Phenomenex Gemini C18 (5 μm, 250 × 4.6 mm), con un gradiente de elución de ácido fórmico al 0.1% (A) y CH₃CN (B), flujo de 1 mL/min, y con dos longitudes de onda de detección de 254 y 365 nm; columna preparativa Phenomenex Gemini C18 (5 μm, 250 × 21.2 mm), con el mismo gradiente de elución establecido en la columna analítica, entre ácido fórmico al 0.1% (A) y CH₃CN (B), un flujo de

21.24 mL/min y con una longitud de onda de detección de 254 nm. En CLAE analítico y preparativo el control del equipo, la adquisición de datos y el procesamiento de la información se realizaron en el programa Empower versión 3.0 (Waters® Software).

4.2.2 Cultivo en medio sólido de *M. albolutea*

Para la elaboración del inóculo de *M. albolutea* primero se cultivó el hongo en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA, Difco®) por 15 días a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó el inóculo correspondiente en 200 mL de caldo papa dextrosa (PDB; Difco®) durante 8 días a temperatura ambiente, con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas y agitación constante a 100 rpm, con la finalidad de incrementar la biomasa.

Posteriormente, se realizó la preparación del cultivo a mediana escala de *M. albolutea* vertiendo los 200 mL de caldo PDB sobre un sustrato semisólido de arroz, compuesto por 200 g de arroz en 400 mL de agua. El cultivo en sustrato semisólido se dejó en condiciones estáticas, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, durante 40 días; en total se usaron seis matraces con la cantidad señalada de arroz, el total de arroz empleado fue 1200 g.

4.3 Estudio químico de *M. albolutea*

4.3.1 Preparación del extracto orgánico

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación a cada matraz se le adicionó una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (8:2) para iniciar un proceso de maceración exhaustiva a temperatura ambiente con la finalidad de obtener la mayor cantidad extracto orgánico. Al término del proceso de extracción, se filtró y posteriormente la mezcla obtenida se trasvaso a un embudo de separación de las fases obtenidas la fase acuosa se desechó y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. Este procedimiento se repitió en seis ocasiones y cada uno de los extractos obtenidos mediante el procedimiento

descrito se analizó por CCD para comprobar su homogeneidad cromatográfica. Este proceso permitió la obtención de 5.32 g de extracto seco, el rendimiento en g/g_{arroz} fue 0.44.

4.3.2 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto obtenido en el inciso anterior (4.3.1) se resuspendió en una mezcla de CH₃CN-MeOH (1:1), para posteriormente realizar una serie de repartos con hexano. Las fracciones de hexano (F_{Hex}) se guardaron y la fracción orgánica desgrasada (F_{Org}) se evaporó a sequedad a presión reducida, obteniéndose 2.103 g, el rendimiento en g/g_{arroz} fue 0.18.

Enseguida la fracción desgrasada (F_{Org}) se sometió a un fraccionamiento primario mediante una CCA, empleando una columna empacada con 500 g de gel de sílice, las dimensiones de la columna fueron (800 × 9) cm, utilizando un gradiente de elución de Hex-AcOEt-MeOH con incrementos en orden creciente de polaridad. Este proceso se obtuvieron 18 fracciones (**Figura 10**).

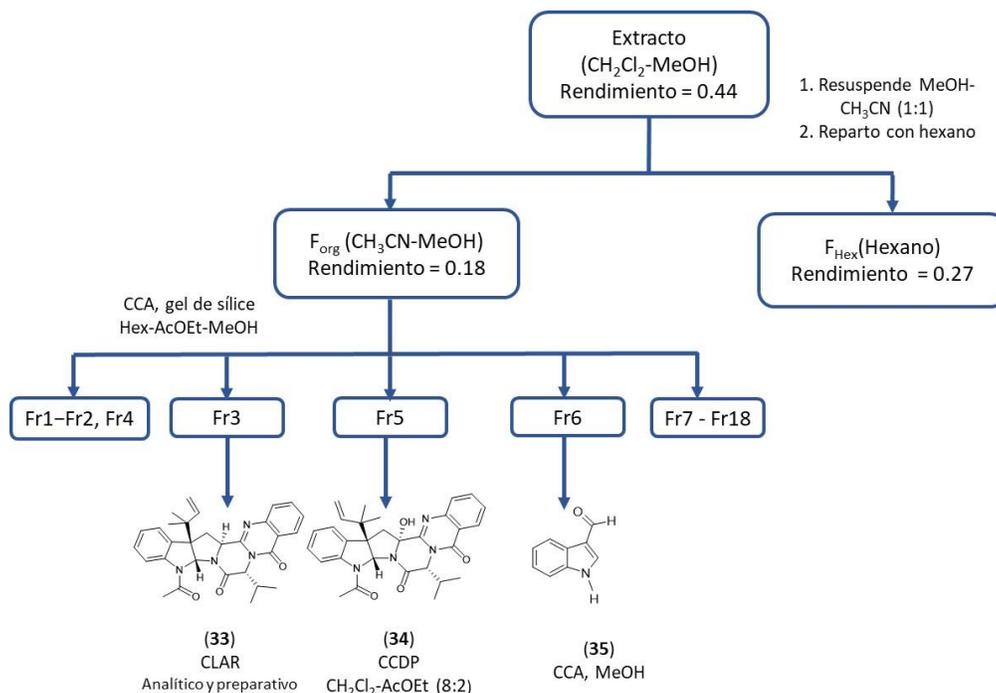


Figura 10. Preparación del extracto orgánico obtenido a partir de *M. albolutea* y fraccionamientos

4.3.3 Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios

4.3.3.1 Aislamiento y caracterización de la 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**)

La separación del compuesto mayoritario presente en la fracción primaria Fr3 (39.5 mg) se realizó empleando a la CLAE analítica y un posterior escalamiento a la CLAE preparativa, la razón principal para emplear esta técnica cromatográfica fue que se encontraron las condiciones óptimas de separación (buena resolución entre los picos que constituían la fracción) y la cantidad de muestra. Las columnas empleadas se encuentran descritas en la sección de análisis cromatográfico: fase móvil ácido fórmico al 0.1% (**A**) y CH₃CN (**C**), gradiente: 0 min 30% **A**, 2 min 30% **A**, 15 min 0% **A**, 15.1 min 30% **A**, 22 min 30% **A**. Estas condiciones permitieron el aislamiento de 7.5 mg de la 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**). El compuesto **33** se aisló como un sólido amorfo de color blanco con una m/z 497.90 [M+H]⁺, el t_R de este compuesto al inyectarse en CLUE fue de 5.86 min, con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 223.66 nm, las condiciones cromatográficas del equipo se describen en la sección **4.2.1**, la fase móvil fue un gradiente ácido fórmico al 0.1% (**A**) y CH₃CN (**B**): 0 min 85% **A**, 8 min 0% **A**, 9.5 min 0% **A**, 10 min 85% **A**, 12 min 85% **A**. El dicroísmo circular experimental fue ($c = 0.01$ mg/mL, MeOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\Delta\epsilon$) 212 (+4.27), 224 (-6.64) nm, 251 (+7.21) nm, el espectro de DC se muestra en los anexos.

4.3.3.2 Aislamiento y caracterización de 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**)

La separación de los dos constituyentes mayoritarios presentes en la fracción primaria Fr5 (28.4 mg) se realizó empleando una CCDP, la elección de esta técnica cromatográfica se hizo por la poca cantidad de muestra limitando su separación en CLAE, por otro lado, en las pruebas preliminares al emplear CCD se logró una buena separación de los compuestos que constituían esta fracción. La fase móvil empleada para la elución de las placas preparativas fue una mezcla de CH₂Cl₂-AcOEt (8:2), obteniéndose 4.2 mg de la 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**) en forma de sólido amorfo amarillo con una

m/z 513.90 $[M+H]^+$, su t_R al inyectarse en CLUE fue de 5.19 min, con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 214.09 y 227.25 nm, las condiciones cromatográficas empleadas en este caso fueron: fase móvil gradiente ácido fórmico al 0.1% (A) y CH_3CN (B): 0 min 85% A, 8 min 0% A, 9.5 min 0% A, 10 min 85% A, 12 min 85% A; la columna y demás condiciones de análisis se describen la sección **4.2.1**. DC ($c = 0.01$ mg/mL, MeOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\Delta\epsilon$) 213 (+7.37), 226 (-1.45) nm, 251 (+3.17) nm; el espectro de DC se presenta en los anexos.

El segundo compuesto mayoritario presente en la Fr5 se aisló como un sólido blanco (3.6 mg) con un ion molecular en una relación m/z 487.77 $[M+H]^+$ y 485.89 $[M-H]^-$, al inyectarse en CLUE presento un t_R de 5.33 min y una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 223.66 nm, este compuesto continúa en proceso de caracterización.

4.3.3.3 Aislamiento y caracterización del 1-*H*-indol-3-carboxialdehido (35)

Con la finalidad de simplificar la fracción primaria Fr6 (113.1 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante CCA, utilizando como fase estacionaria Sephadex (LH20, Pharmacia) y como fase móvil MeOH grado reactivo. Este procedimiento permitió la obtención de 6 fracciones secundarias (Fr A-F). De la fracción FrC precipitó de manera espontánea el 1-*H*-indol-3-carboxialdehido C_9H_7NO (35), al final se obtuvieron 56.3 mg de este compuesto. Su t_R al inyectarse en CLUE fue de 3.14 min, con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 255.1 nm, condiciones cromatográficas empleadas se describen en la parte de análisis cromatográfico (tipo de columna y detectores empleados): fase móvil gradiente ácido fórmico al 0.1% (A) y CH_3CN (B): 0 min 85% A, 8 min 0% A, 9.5 min 0% A, 10 min 85% A, 12 min 85% A; flujo 0.3 mL/min, volumen de inyección 5 μ L. Temperatura de fusión 295°C.

4.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del extracto y los compuestos aislados de *M. albolutea* se determinó empleando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil trazolio (MTT) (Appendino *et al.*, 2008) contra bacterias Gram positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633) y Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhi* ATCC 9992) y *Candida albicans* ATCC 90028. Todos los microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Como medio de cultivo se utilizó caldo Mueller-Hilton (MH) para las bacterias y caldo papa dextrosa (CPD) para la levadura. Los caldos fueron esterilizados en una autoclave a 121°C y 15 lb/cm², durante 20 minutos.

Los ensayos correspondientes se efectuaron en placas de Elisa de 96 pozos. Cada pozo contenía 100 µL de medio de cultivo MH o CPD y 75 µL de una suspensión del microorganismo de prueba en una solución de agua desionizada esterilizada, ajustada al 0.5% (1×10^8 células/mL) del estándar turbidimétrico de McFarland. Los pozos de las filas A-J contenían además 75 µL de las muestras a evaluar a las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 y 7.8 µg/mL disueltas en DMSO (12.5%). Las últimas filas de los pozos (K-L) fueron utilizados como controles de esterilidad y/o de crecimiento. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

La concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico empleado (CMI) fue determinada como la menor concentración en la que no se observó crecimiento del microorganismo ensayado. Se determinó el CIM empleado como control positivo ampicilina para *S. typhi*, *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*. En el caso de *P. aeruginosa* se utilizó sulfato de gentamicina y Nistatina para *C. albicans*, en todos los casos los fármacos se emplearon en el siguiente intervalo de concentraciones 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 µg/mL.

5. Resultados y Discusión

5.1 Estudio químico de la especie fúngica *M. albolutea*

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado al estudio sistemático de las especies fúngicas pertenecientes al género *Malbranchea* como fuentes potenciales de principios biodinámicos. En este caso, se realizó el estudio de la especie *Malbranchea albolutea* considerando que el extracto CH₃CN-MeOH (1:1) obtenido a partir del extracto orgánico del microorganismo presentó actividad antimicrobiana (CMI= 1000 µg/m) contra *Pseudomonas aeruginosa*.

El extracto orgánico inicial (5.32 g) obtenido a partir de la maceración del medio de cultivo, se sometió a un proceso de reparto con hexano. Posteriormente se extrajo con una mezcla de metanol-acetonitrilo (1:1). La fracción de CH₃CN-MeOH se estudió aplicando diversas técnicas cromatográficas, con lo que fue posible el aislamiento y purificación de tres productos: la 5-*N*-acetil-8-β-isopropil-ardemina (**33**), la 5-*N*-acetil-15b-β-hidroxi-8-β-isopropil-ardemina (**34**) y el 1-*H*-indol-3-carboxialdehído (**35**) (Figura 12). Cabe destacar que el producto (**34**) es un análogo novedoso derivado de la ardemina (Figura 11), y ninguno de estos metabolitos había sido descrito anteriormente en el género *Malbranchea*. A continuación, se describe la elucidación estructural de los productos aislados.

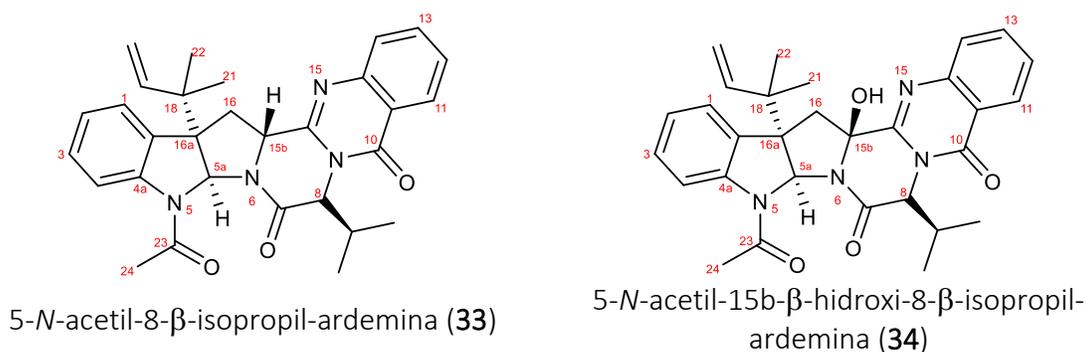


Figura 11. Compuestos aislados del extracto CH₃CN-MeOH de *M. albolutea*

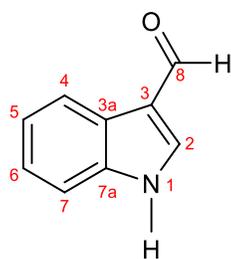
1-*H*-indol-3-carboxialdehído (**35**)

Figura 12. (Continuación) Compuestos aislados del extracto $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ de *M. albolutea*

5.1.1 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**)

El metabolito secundario 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**) se obtuvo como un sólido amorfo blanco, ópticamente activo. A partir del análisis de los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) y el espectro de masas generado por la técnica de ionización en electrospray se obtuvo la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3$ que permite 17 insaturaciones.; el ion pseudomolecular se observó en una relación m/z 497.90 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Las señales correspondientes a los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C se muestran en la **Tabla 3**. En el espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 15**) se observaron señales para 30 carbonos. Mediante la ayuda del experimento HSQC se determinó la presencia de 20 carbonos protonados: cinco metilos ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 18.8/0.87, 20.2/0.86, 22.9/1.22, 23.7/1.05, 23.9/1.16); dos metilenos: uno vinílico terminal de un residuo de isopreno ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 114.3/5.07/5.16), y el otro de tipo alifático ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 37.5/2.86/3.04); trece metinos, de los cuales cuatro son alifáticos ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 80.2/6.13, 63.1/5.04, 59.8/4.59, 32.1/2.09), ocho aromáticos ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 123.8/7.59, 125.1/7.22, 129.6/7.35, 119.6/7.98), y uno sobre doble ligadura y que se atribuye a un residuo de isopreno ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 144.7/5.95); finalmente se apreció la presencia de diez carbonos cuaternarios, cuatro aromáticos (δ_{C} 144.3, 148.3, 133.9, 121.4), dos alifáticos (δ_{C} 61.8, 41.1), tres carbonilos de amida (δ_{C} 165.3, 161.0, 169.9) y uno asignable a una imina (δ_{C} 152.8).

En el espectro de RMN- ^1H (**Figura 16**) se observan en la región aromática dos sistemas AA'BB' (δ_{H} 7.59, 7.22, 7.53, 7.98 y 8.19, 7.54, 7.84, 7.67) correspondientes a ocho protones

de dos anillos aromáticos disustituidos. En δ_H 2.64 se aprecia la señal de un metilo de acetilamida, otras de un metileno que conforman un sistema AB apreciables en δ_H 2.86 y 3.04 (dd, $J= 10.0, 5.0$ Hz), y las de dos metinos a campos bajos en δ_H 6.13 y 4.59. También se observan las señales de un residuo de isopreno con un metileno terminal en δ_H 5.07 y 5.16 (dd, $J= 10.0, 20.0$ Hz), y para un grupo isopropilo en δ_H 2.09; 0.86, y 0.87.

El conjunto de señales recién descritas indica que la molécula posee dos anillos aromáticos *orto*-disustituidos, tres carbonilos de amida, una imina, un residuo isopropilo y otro de tipo isopreno. Estos elementos estructurales satisfacen trece de las 17 insaturaciones requeridas por la fórmula molecular. Entonces, considerando las insaturaciones presentes en los dos sistemas aromáticos, la molécula debe tener cuatro ciclos adicionales para completar las insaturaciones totales. Por otro lado, el número de nitrógenos, carbonos e hidrógenos detectados en los espectros de RMN están en armonía con la fórmula establecida. Las correlaciones observadas en el experimento HMBC se indican en la **Tabla 3** permitieron proponer las estructuras parciales A-F que se indican en las **Figuras 13 y 14**.

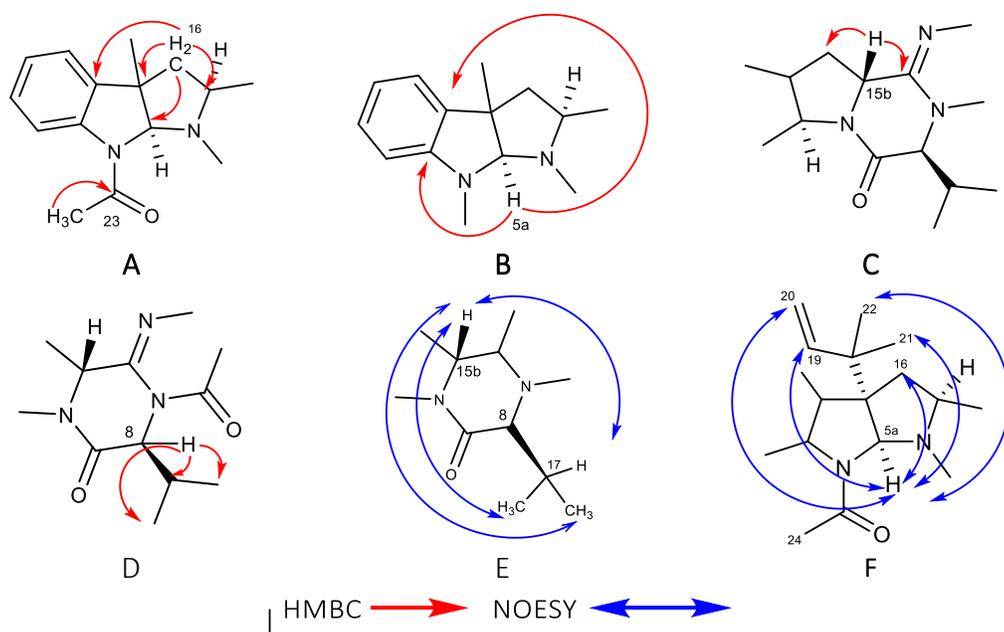


Figura 12. Estructuras parciales (A-F) mostrando las correlaciones relevantes observadas en los espectros NOESY y HMBC del compuesto (33)

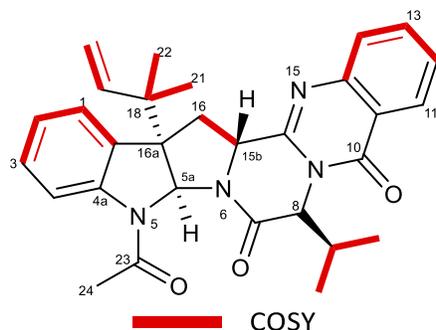


Figura 13. Correlaciones relevantes encontradas en el espectro COSY para la elucidación estructural del compuesto (**33**)

La integración de las estructuras parciales A-F permitió proponer que el producto (**33**) es un derivado de la ardemina, con un grupo acetilo en N-5 y un grupo isopropilo en C-8. La disposición relativa de los sustituyentes en el espacio se estableció mediante los cuadros de conectividad observados en el espectro NOESY. Así la señal asignada a H-5a correlaciona con los protones de los grupos metilos del residuo de isopreno sobre el carbono C-16a, lo cual indica que estos grupos se encuentran del mismo lado de la molécula. Por otro lado, los protones de los metilos del grupo isopropilo en C-8 correlacionan el protón H-15b en congruencia con su disposición en la misma cara de la molécula.

Con base en estas evidencias el producto se identificó como la 5-*N*-acetil-8- β -isopropil ardemina, previamente aislada del hongo *Aspergillus felis* (Mendes et al., 2016). El valor negativo de la rotación óptica obtenido experimentalmente para (**33**), $[\alpha]_D^{25} = -16$ ($c = 0.9$ mg/mL, MeOH), sugiere que la configuración de los centros estereogénicos de la molécula es igual a los de la 5-*N*-acetil ardemina y análogos (**Figura 10**), cuya estructura total se estableció por difracción de rayos X (Hochlowski et al., 1993). Para confirmar la propuesta se determinó el dicroísmo circular experimental de (**33**), para su futura comparación con los espectros calculados para los diferentes estereoisómeros de (**33**) que tengan la misma configuración relativa establecida en este estudio mediante modelado molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para 5-N-acetil-8-β-isopropilardemina (33) en Acetona-d₆ (¹H a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz).

Posición	δ _c , tipo	δ _H (J en Hz)	¹ H- ¹³ C HMBC	COSY
1	125.8(C-1)	7.59 (1H, dd, 7.5 Hz, H-1)		2, 3, 14
2	125.1 (C-2)	7.22 (1H, td, 7.5 Hz, H-2)		3, 1
3	129.6 (C-3)	7.35 (1H, td, 7.5 Hz, H-3)		2, 1
4	119.6 (C-4)	7.98 (1H, d, 10 Hz, H-4)		3
4a	144.3 (C-4a)		1, 3, 2	
5a	80.2 (C-5a)	6.13 (1H, s, H-5a)		
7	165.3 (C-7)			
8	63.1 (C-8)	5.04 (1H, d, 5 Hz, H-8)		19, 20β
10	161.0 (C-10)		8, 11	
10a	148.3 (C-10a)		11, 13	
11	127.5 (C-11)	8.19 (1H, dd, 7.5 Hz, H-11)		12, 13
12	127.8 (C-12)	7.54 (1H, td, 7.1 Hz, H-12)		13, 11
13	135.4 (C-13)	7.84 (1H, td, 7.5 Hz, H-13)		11, 12, 14
14	128.1 (C-14)	7.67 (1H, d, 10 Hz, H-14)		1, 13
14a	121.4 (C-14a)		11, 12, 14	
15a	152.8 (C-15a)		8, 15b, 16 α	
15b	59.7 (C-15b)	4.59 (1H, q, H-15b)		16 α, 16 β
16	37.5 (C-16)	2.86 (1H, d, 10 Hz, H-16 α) 3.04 (1H, q, 10 Hz/5 Hz, H-16 β)		16 β, 15b 16 α, 15b
16a	61.8 (C-16a)		16 α, 16 β	
16b	133.9 (C-16b)		12, 14	
17	32.1 (C-17)	2.09 (1H, dddd, H-17)		17a
17a	18.8 (C-17a)	0.87 (3H, t, H-17a)		
17b	20.2 (C-17b)	0.86 (3H, t, H-17b)		
18	41.1 (C-18)		19, 20α, 20β	
19	144.7 (C-19)	5.95 (1H, dd, H-19)		20α, 20β
20	114.3 (C-20)	5.07 (1H, d, 10 Hz, H-20 α) 5.16 (1H, d, 20 Hz, H-20 β)		20β, 19 20α, 19
21	23.7 (C-21)	1.05 (3H, s, H-21)		22
22	22.9 (C-22)	1.22 (3H, s, H-22)		21
23	169.9 (C-23)		24	
24	23.9 (C-24)	1.16 (3H, s, H-24)		

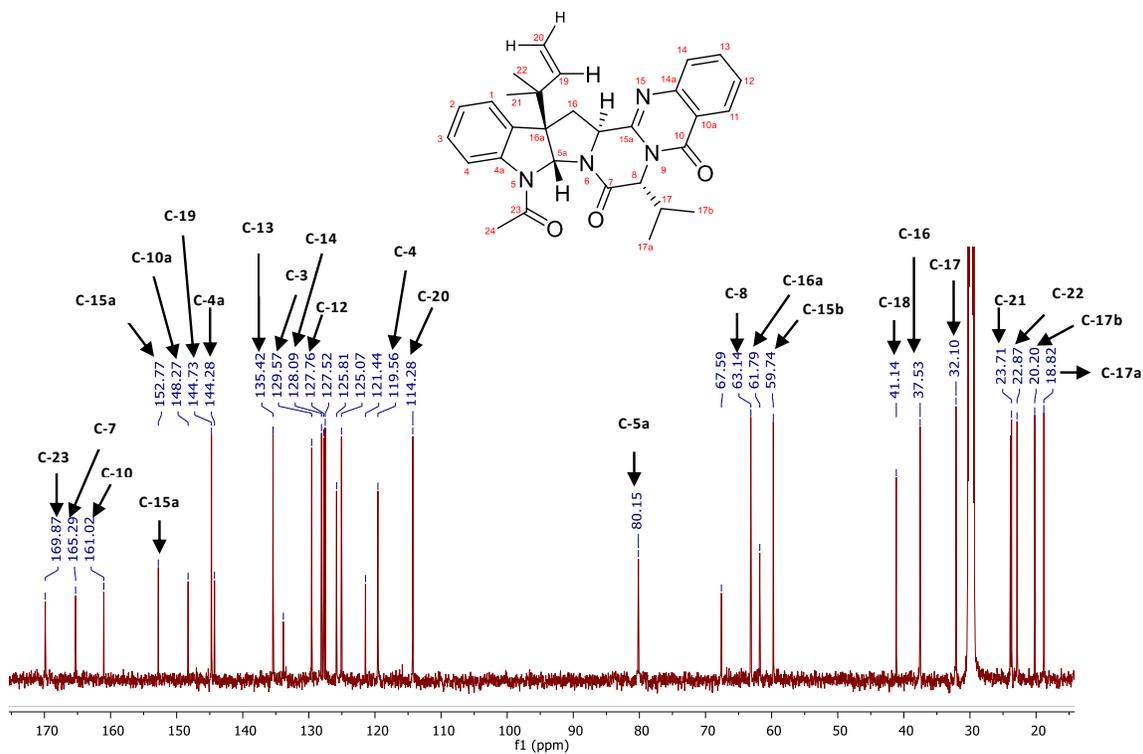
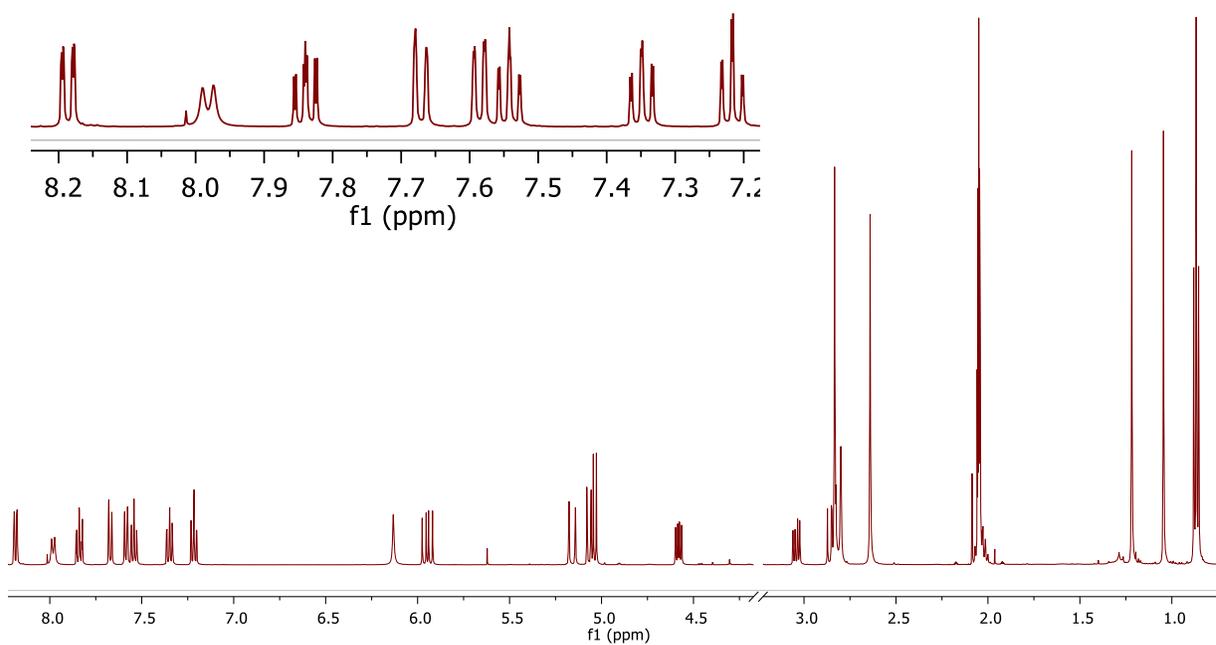


Figura 14. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto (**33**), (175 MHz), acetona- d_6



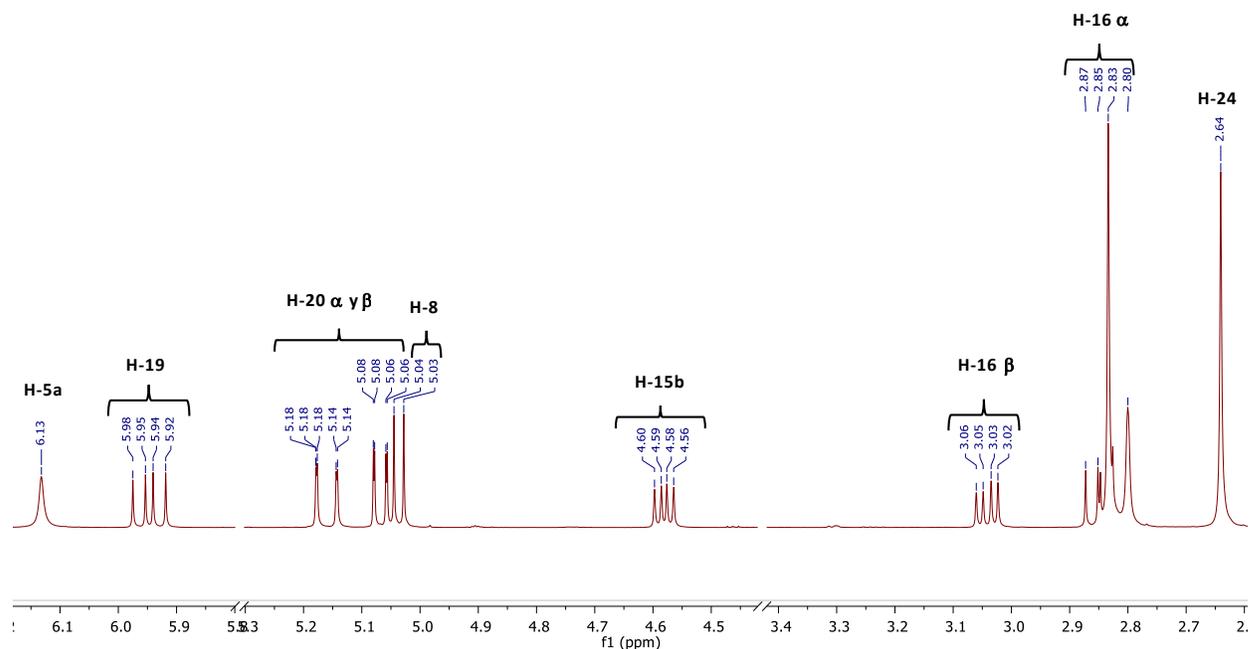


Figura 16. Espectro de RMN- ^1H con las señales más representativas del compuesto (**33**), (500 MHz), acetona- d_6

5.1.2 5-N-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**)

El segundo producto aislado de *M. albolutea* se obtuvo como un sólido amorfo amarillo. Su fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ a partir del análisis de los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C y de espectrometría de masas. El espectro de masas obtenido por ESI $^+$ muestra el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ en una relación m/z de 511.19, mientras que el ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ apareció en una relación m/z de 513.24. La fórmula permite 17 insaturaciones.

Los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C se muestran en la **Tabla 4**, y resultaron muy similares a los del compuesto (**34**). En el espectro de RMN- ^{13}C también se observaron 30 señales (**Figura 13**), pero una diferencia clave durante el análisis de éstas fue la presencia de una señal correspondiente a un carbono cuaternario unido a oxígeno (δ_{C} 90.1) en lugar de la señal para el metino en C-15b ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 59.7/4.59) de (**33**). Esta observación es congruente con la presencia de un átomo de oxígeno

más en la fórmula molecular. Las correlaciones observadas en el experimento HMBC se indican en la **Tabla 4**, y permitieron detectar las estructuras parciales A-F que se indican en las **Figuras 18 y 19**. La integración de las mismas permitió proponer que el compuesto **33** tiene la estructura 5-*N*-acetil-15b-β-hidroxi-8-β-isopropil-ardemina. Cabe señalar que la configuración relativa de los centros estereogénicos se determinó mediante el espectro NOESY como en el caso anterior (Hua-Wei *et al.*, 2010, Mendes *et al.*, 2016). El valor negativo de la rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -24$ ($c = 1.8$ mg/mL, MeOH), sugiere que la configuración de los centros estereogénicos de la molécula sea igual a la del compuesto (**33**). De igual forma se determinó el diroísmo circular experimental para su comparación con los de los diferentes estereoisómeros del producto (**34**) calculados teóricamente.

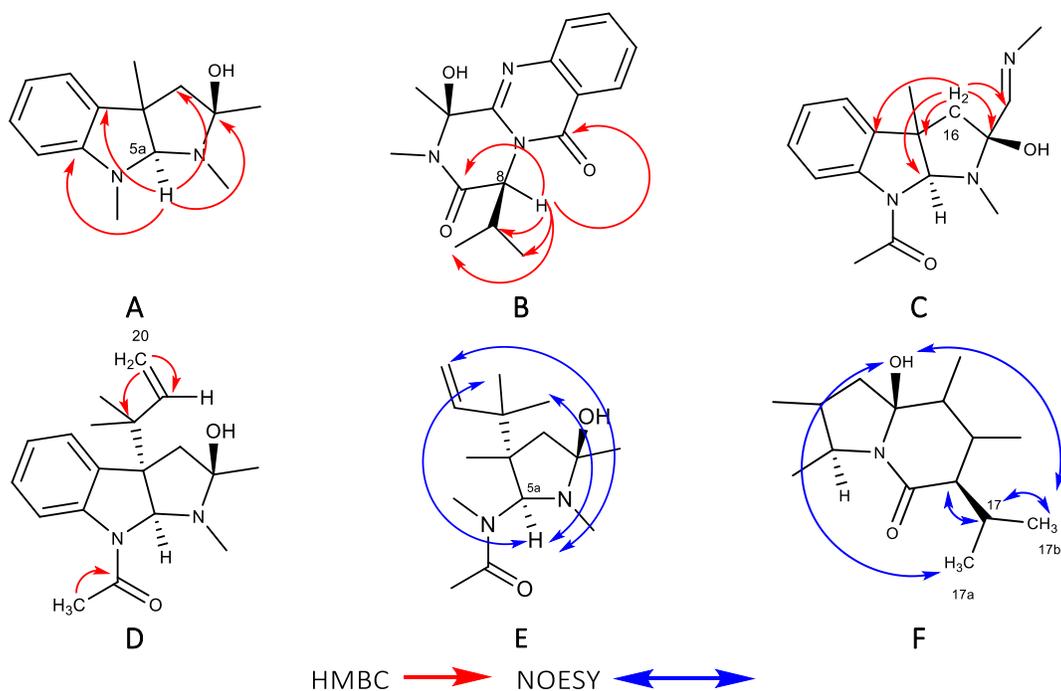


Figura 17. Estructuras parciales mostrando las correlaciones relevantes observadas en los espectros NOESY y HMBC del compuesto (**34**)

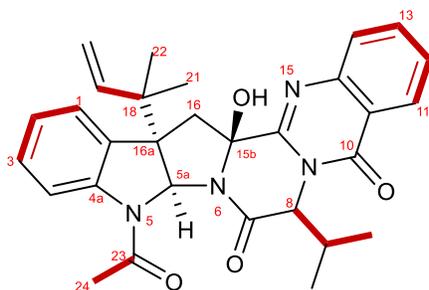


Figura 138. Correlaciones encontradas en el espectro COSY para 5-N-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para 5-N-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (34) en Acetona- d_6 (^1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz).

Posición	δ_c , tipo	δ_H (J en Hz)	^1H - ^{13}C HMBC	COSY
1	124.6(C-1)	7.15 (1H, td, 7.5 Hz, H-1)		2,3
2	128.8 (C-2)	7.29 (1H, td, 7.5 Hz, H-2)		1, 3, 13
3	126.0 (C-3)	7.51 (1H, dd, 5 Hz, H-3)		1, 2, 12
4	119.7 (C-4)	7.96 (1H, d, 10 Hz, H-4)		2
4a	144.0 (C-4a)		2, 3	
5a	81.5 (C-5a)	6.22 (1H, s, H-5a)	4a, 16a, 16b, 18	
7	167.9 (C-7)		8	
8	63.3 (C-8)	5.01 (1H, d, H-8)		17
10	161.5 (C-10)		11, 8	
10a	148.1 (C-10a)		12, 14	
11	127.6 (C-11)	8.19 (1H, dd, 7.5 Hz, H-11)		
12	128.1 (C-12)	7.57 (1H, td, 7.5 Hz, H-12)		3, 13, 11
13	135.5 (C-13)	7.87 (1H, td, 7.5 Hz, H-13)		11, 12, 14
14	128.3 (C-14)	7.71 (1H, d, 10 Hz, H-14)		13
14a	121.5 (C-14a)		11, 13	
15a	153.7 (C-15a)		8, 16 α , 16 β	
15b	90.2 (C-15b)	2.84 (1H, s, OH-15b)	5a, 16 α , 16 β	
16	45.5 (C-16)	3.15 (1H, d, 15 Hz, H-16 α) 3.30 (1H, 15 Hz, H-16 β)		16 β 16 α
16a	60.0 (C-16a)		3, 5a, 16 α , 16 β , 21	
16b	135.8 (C-16b)		1	
17	33.7 (C-17)	2.48 (1H, dddd, H-17)		17a, 17b
17a	19.7 (C-17a)	0.81 (3H, d, H-17a)		17, 17b
17b	20.3 (C-17b)	1.04 (3H, d, H-17b)		17, 17a
18	41.5 (C-18)		5a, 19, 20 α , 20 β	
19	144.8 (C-19)	5.91 (1H, c, H-19)		20a, 20b
20	114.4 (C-20)	5.05 (1H, dd, 12.5 Hz, H-20 α) 5.14 (1H, dd, 17.5 Hz, H-20 β)		8, 19, 20 β 19, 20 α
21	23.6 (C-21)	1.0 (3H, s, H-21)		22

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. (Continuación) Datos espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C para 5-N-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (34) en Acetona- d_6 (^1H a 500 MHz y ^{13}C a 125 MHz).

Posición	δ_c , tipo	δ_H (J en Hz)	^1H - ^{13}C HMBC	COSY
22	22.8 (C-22)	1.16 (3H, s, H-22)		21
23	170.4 (C-23)		24	
24	24.0 (C-24)	2.65 (3H, s, H-24)		

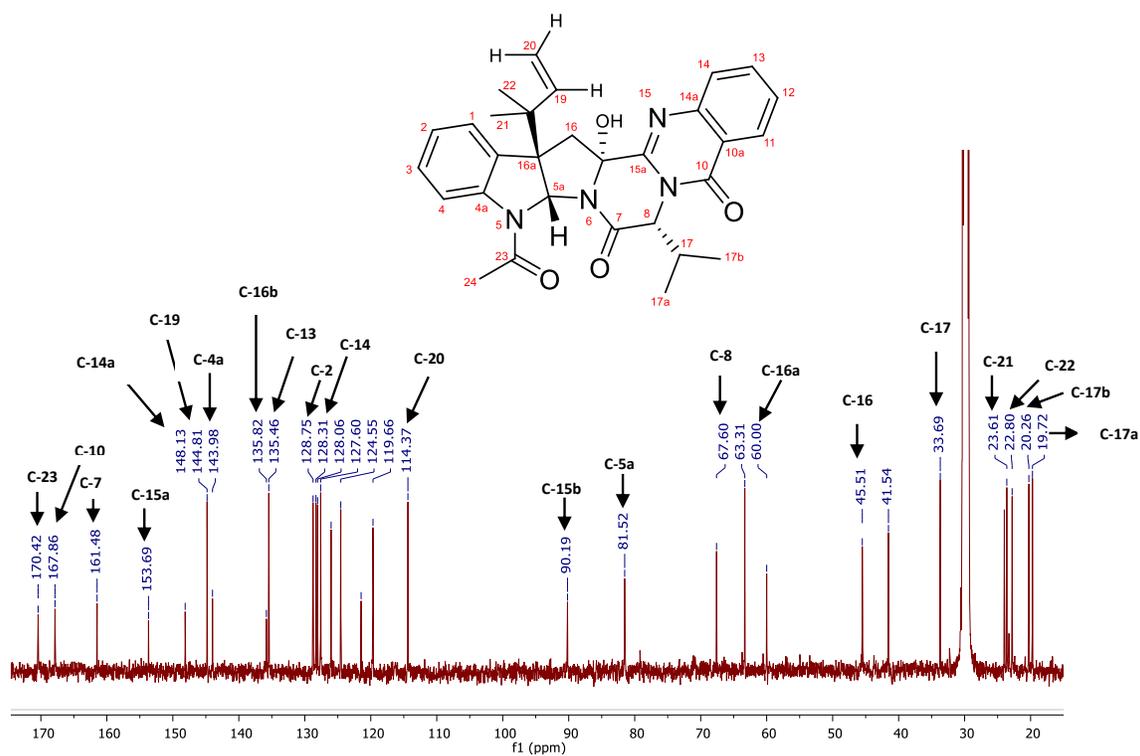


Figura 19. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto (34), (175 MHz), acetona- d_6

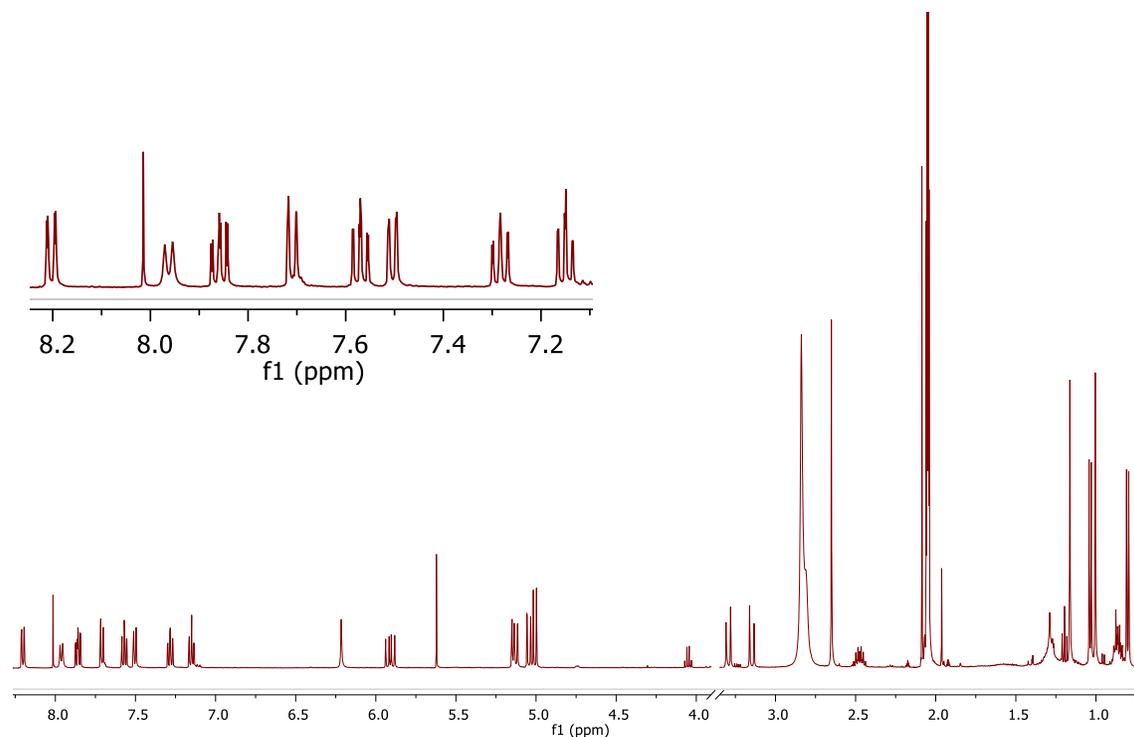


Figura 20. Espectro de RMN-¹H del compuesto (34), (500 MHz), acetona-d₆

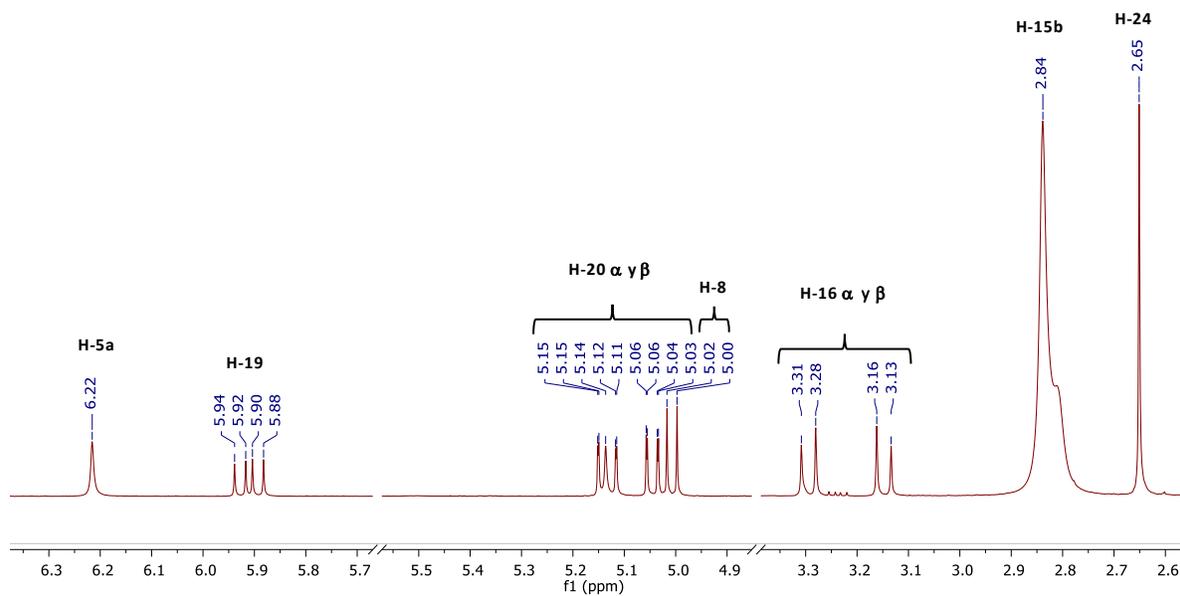


Figura 21. Espectro de RMN-¹H con las señales más representativas del compuesto (34), (500 MHz), acetona-d₆

5.1.3 1-*H*-indol-3-carboxialdehído (35)

Este compuesto se aisló como un sólido cristalino de color anaranjado con una masa molecular de 145.15 g/mol y ion pseudomolecular en una relación m/z 147.16 $[M+H]^+$, con estos datos se propuso la siguiente fórmula molecular C_9H_7NO , que permite la presencia de siete insaturaciones.

En el espectro de RMN- ^{13}C se observaron señales para 9 carbonos, las señales presentes en la región aromática sugieren la presencia de un sistema aromático *orto*-disustituido (δ_C 124.2, 120.8, 122.1, 123.4, 112.4 y 137.1), un grupo carbonilo de tipo aldehído (δ_C 184.9) y dos señales con desplazamientos atribuibles a un doble enlace (δ_C 138.2 y 118.2).

Del análisis en el espectro de RMN- 1H se observa en la región aromática un sistema ABCD (δ_H 8.16, 7.26, 7.29 y 7.55) correspondiente a cuatro protones de un anillo aromático disustituidos. También se observa la señal de un metino α a un heteroátomo (δ_H 8.32), en δ_H 9.98 se aprecia la señal de un protón de aldehído y por último se distingue la señal para un grupo amina (δ_H 12.2) a campo bajo. Los datos obtenidos en los espectros de RMN- 1H y RMN- ^{13}C se muestran en la **Tabla 5**.

El conjunto de señales descritas indica que la molécula posee un anillo aromático *orto*-disustituido, un carbonilo de aldehído, una amina y la presencia de un doble enlace. Estos elementos estructurales satisfacen cinco de las insaturaciones requeridas por la fórmula molecular, por lo tanto, la molécula posee dos ciclos más para completar las insaturaciones totales. Los máximos de absorción observados en el UV ($\lambda_{m\acute{a}x}$, MeOH): 206, 243, 255 y 298 nm) permitieron proponer que el biciclo correspondía a un núcleo indol. Así el número de nitrógenos, carbonos e hidrógenos detectados en los espectros de RMN están en armonía con la fórmula establecida. La estructura propuesta se confirmó con el análisis de difracción de rayos X (**Figura 23**), celda unitaria ortorrómbica ($a = 13.95$, $b = 5.86$, $c = 8.61$).

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para 1-H-indol-3-carboxialdehído (35) en DMSO-d₆ (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz)

Posición	δ _c , tipo	δ _H
1		12.2
2	138.2 (C-2)	8.32 (1H, s)
3	118.2 (C-3)	
3a	124.2 (C-3a)	
4	120.8 (C-4)	8.16 (1H, d, J= 7.4 Hz)
5	122.0 (C-5a)	7.26 (1H, dt, J= 1.2, 7.4 Hz)
6	123.4 (C-7)	7.29 (1H, dt, J= 1.3, 7.4 Hz)
7	112.4 (C-8)	7.55 (1H, d, J= 7.4 Hz)
7a	137.1 (C-7a)	
8	184.9 (C-8)	9.98 (1H, s)

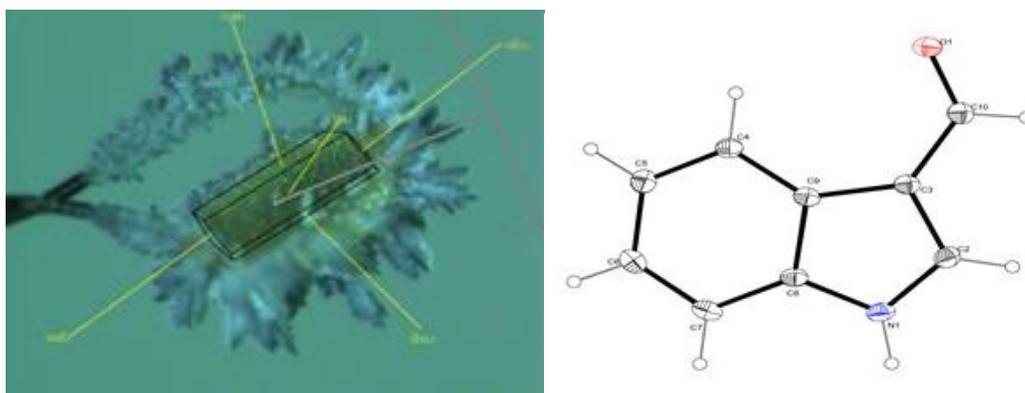


Figura 22. Estructura cristalina 1H-indol-3-carboxialdehído

5.2 Actividad antimicrobiana

Se realizaron curvas de control positivo con la finalidad de obtener el CMI de cada bacteria, los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 7. CMI determinado en la curva de control positivo, en el caso de *P. aeruginosa* se usó sulfato de gentamicina*, en las demás bacterias se usó ampicilina y nistatina** para *C. albicans*

Microorganismo	CMI (µg/mL)
<i>S. typhi</i>	10
<i>E. coli</i>	10
<i>S. aureus</i>	10
<i>B. subtilis</i>	100
<i>P. aeruginosa</i>	1000*
<i>C. albicans</i>	1000**

Con el intervalo de concentraciones empleadas para la evaluación antimicrobiana del extracto CH₃CN-MeOH de *M. albolutea*, este resultado activo para *P. aeruginosa* con un CMI de 1000 µg/mL, en el caso de las demás bacterias el extracto no presentó actividad a ninguna de las concentraciones evaluadas. De los compuestos aislados sólo fue posible evaluar la 5-*N*-acetil-8-β-isopropil-ardemina (**33**) y el 1*H*-indol-3-carboxialdehído (**35**), ninguno de los compuestos presentó actividad a las concentraciones empleadas. Por lo tanto, aún no se asila el principio activo.

6. Conclusiones

Como parte de un estudio sistemático del género *Malbranchea* se realizó el estudio químico y biológico preliminar de *M. albolutea*, lo que representa una aportación inédita a la química del género. En este trabajo se encontró por vez primera la presencia de alcaloides peptídicos análogos a la ardemina, previamente detectados en dos especies del género *Aspergillus*. Uno de los productos representa un nuevo análogo de la ardemina caracterizado como 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**). De manera adicional se identificaron la 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**) y el 1-*H*-indol-3-carboxialdehído (**35**), siendo este el primer reporte de estos compuestos en esta especie.

El presente estudio demostró el potencial antimicrobiano de *M. albolutea* mediante la evaluación del extracto CH₃CN-MeOH (1:1) sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* con un CMI de 1000 μ g/mL. Por lo tanto, el extracto contiene moléculas con potencial antibacteriano que no se aislaron en el presente estudio.

7. Perspectivas

Continuar con el estudio químico de extracto CH₃CN-MeOH (1:1) para continuar con la obtención de los metabolitos secundarios con posible actividad antimicrobiana de la especie fúngica *M. albolutea*.

Optimizar las condiciones de crecimiento de la especie fúngica con la finalidad de obtener mayor cantidad extracto orgánico para continuar con el aislamiento y caracterización de compuestos minoritarios como potenciales antimicrobianos contra *P. aeruginosa*.

8. Bibliografía

- Campos, D. (2017). *Malbranchea chrysosporoidea Singler & Carmichael como fuente de inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas.*
- Cedillo, F. (2016). *Dos nuevos compuestos aislados de malbranchea circinata Sigler & Carmichael como inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas.*
- Chou, T.-C., Depew, K. M., Zheng, Y.-H., Safer, M. L., Chan, D., Helfrich, B., Danishefsky, S. J. (1998). Reversal of anticancer multidrug resistance by the ardeemins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 8369–8374. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8369>
- Emri, T., Majoros, L., Tóth, V., & Pócsi, I. (2013). Echinocandins: Production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3267–3284. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-4761-9>
- Figueroa, M., González-Andrade, M., Sosa-Peinado, A., Madariaga-Mazón, A., Del Río-Portilla, F., Del Carmen González, M., & Mata, R. (2011). Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(3), 378–385. <http://doi.org/10.3109/14756366.2010.518964>
- Haynes, S. W., Gao, X., Tang, Y., & Walsh, C. T. (2013). Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: A two-enzyme pathway to the hexacyclic MDR export pump inhibitor ardeemin. *ACS Chemical Biology*, 8(4), 741–748. <http://doi.org/10.1021/cb3006787>
- Hillman, E. T., Readnour, L. R., & Solomon, K. V. (2017). Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. *Current Opinion in Systems Biology*, 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.010>
- Hochlowski, J. E., Mullally, M. M., Spanton, S. G., Whittern, D. N., Hill, P., & Mcalpine, J. B. (1993). 5-N-acetylardeemin, a novel heterocyclic compound which reverses multiple

drug resistance in tumor cells II. *The Journal of Antibiotics*, 380–386.

Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S. I., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Kawai, K. I. (2005). 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry*, 66(23), 2776–2779. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.014>

Hua-Wei Zhang, Jie Zhang, Sha Hu, Zun-Jian Zhang, Cheng-Jian Zhu, SeikWeng Ng, R.-X. T. (2010). Ardeemins and Cytochalasins from *Aspergillus terreus* Residing in *Artemisia annua*. *Planta Medica*, 1616–1621.

Madariaga-Mazón, A., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., & Mata, R. (2015). Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), 551–558. <http://doi.org/10.1111/jphp.12346>

Marchisio, V. F., Fusconi, A., & Rigo, S. (1994). Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia*, 127(2), 103–115. <http://doi.org/10.1007/BF01103066>

Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M. C., Lira-Rocha, A., & Mata, R. (2006). Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron*, 62(8), 1817–1822. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2005.11.047>

Mata, R., Figueroa, M., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J. A., Madariaga-Mazón, A., & Del Valle, P. (2015). Calmodulin inhibitors from natural sources: An update. *Journal of Natural Products*, 78(3), 576–586. <http://doi.org/10.1021/np500954x>

Melander, R. J., Minvielle, M. J., & Melander, C. (2014). Controlling bacterial behavior with indole-containing natural products and derivatives. *Tetrahedron*, 70(37), 6363–6372. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2014.05.089>

Mendes, G., De Menezes Oliveira, D., Kohlhoff, M., Rosa, C. A., De Almeida Alves, T. M., Zani, C. L., ... Barros Cota, B. (2016). Alkaloidal metabolites from *Aspergillus felis* and their activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Phytochemistry Letters*, 17(5), 28–35.

<http://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.06.006>

Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., ... Kristensen, H. H. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, *437*(7061), 975–980. <http://doi.org/10.1038/nature04051>

OMS. (2015). Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey. *WHO Press*, 1–51. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/194460/1/9789241509817_eng.pdf?ua=1

OMS. (2017). Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana (Lista OMS de AIC). Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017es.pdf>

Sigler L., Hambleton S., Flis L., P. J. (2002). Auxarthron teleomorphs for Malbranchea filamentosa and Malbranchea albolutea and relationships within Auxarthron. *Studies in Mycology*, *2002*(47), 111–122.

Sigler L., C. W. (1976). Taxonomy of Malbranchea and some other Hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon*, *4*(2), 349–488.

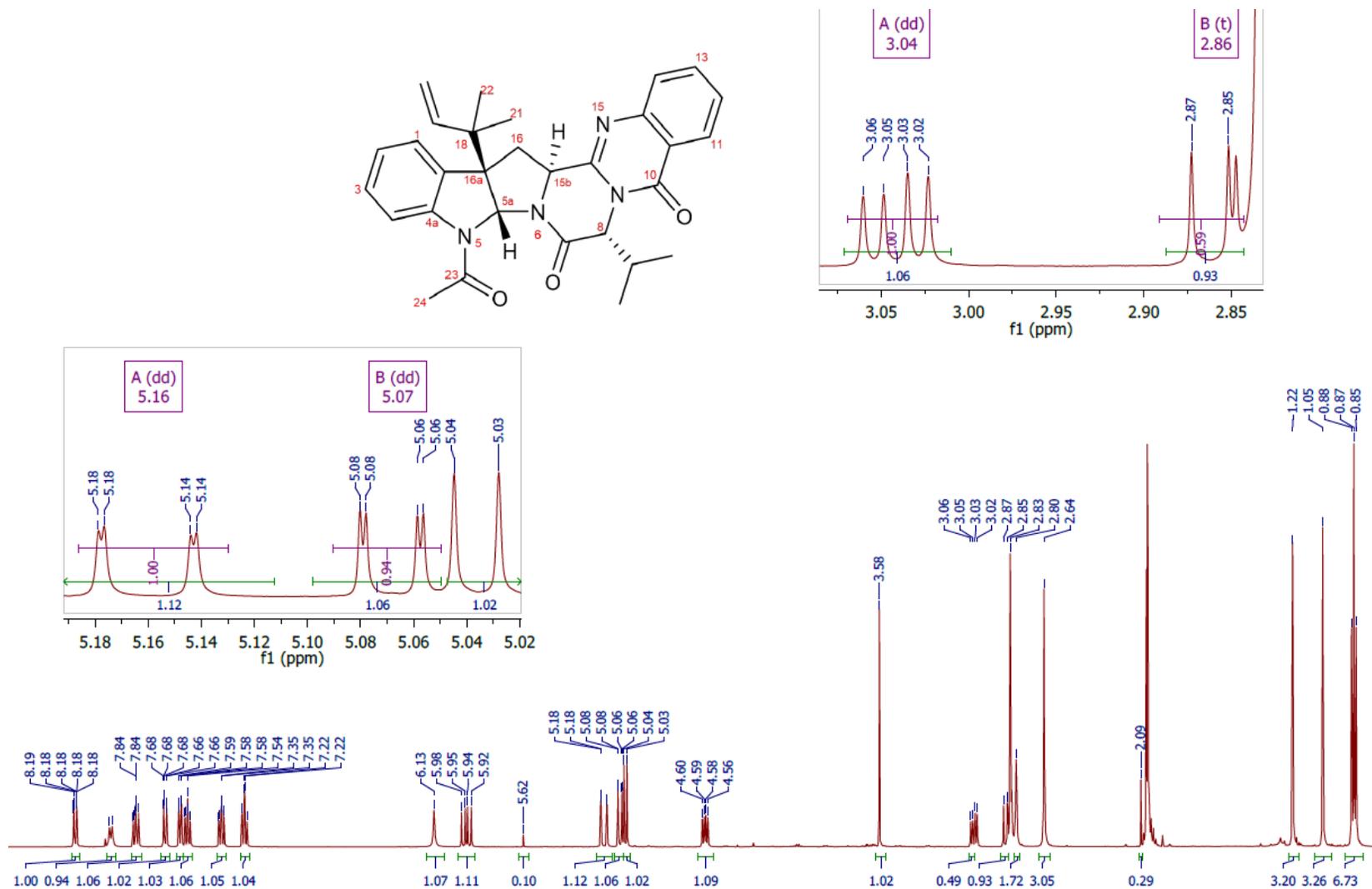
Sugiyama, M., Ohara, A., & Mikawa, T. (1999). Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequences. *Mycos*, *40*, 251–258. <http://doi.org/10.1007/BF02463962>

Verastegui-Omaña, B., Rebollar-Ramos, D., Pérez-Vásquez, A., Martínez, A. L., Madariaga-Mazón, A., Flores-Bocanegra, L., & Mata, R. (2017). α -Glucosidase inhibitors from Malbranchea flavorosea. *Journal of Natural Products*, *80*(1), 190–195. <http://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00977>

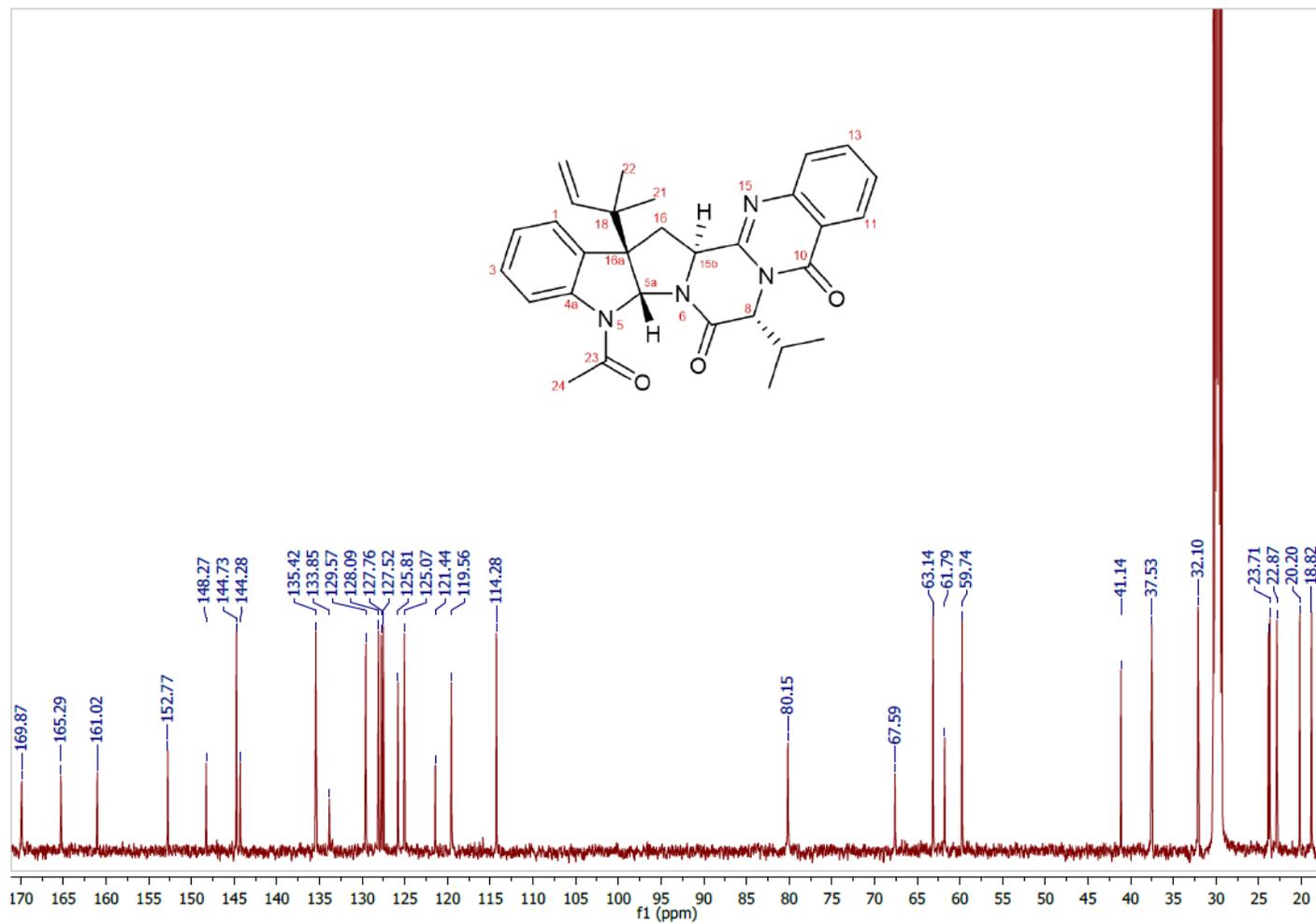
Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Fukushima, K., & KAWAI, K. (2008). Two new furanone glycosides, malfilamentosides A and B, from Malbranchea filamentosa. *Mycotoxines*, *58*(1), 1–6.

- Wakana, D., Hosoe, T., Wachi, H., Itabashi, T., Fukushima, K., Yaguchi, T., & Kawai, K. I. (2009). The cytotoxic and antifungal activities of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*. *Journal of Antibiotics*, *62*(4), 217–219. <http://doi.org/10.1038/ja.2009.9>
- Watts, K. R., Loveridge, S. T., Tenney, K., Media, J., Valeriote, F. A., & Crews, P. (2011). Utilizing DART mass spectrometry to pinpoint halogenated metabolites from a marine invertebrate-derived fungus. *Journal of Organic Chemistry*, *76*(15), 6201–6208. <http://doi.org/10.1021/jo2009593>
- Yang, Y. L., Liao, W. Y., Liu, W. Y., Liaw, C. C., Shen, C. N., Huang, Z. Y., & Wu, S. H. (2009). Discovery of new natural products by intact-cell mass spectrometry and lc-spe-nmr: malbranpyrroles, novel polyketides from thermophilic fungus *malbranchea sulfurea*. *Chemistry - A European Journal*, *15*(43), 11573–11580. <http://doi.org/10.1002/chem.200901556>

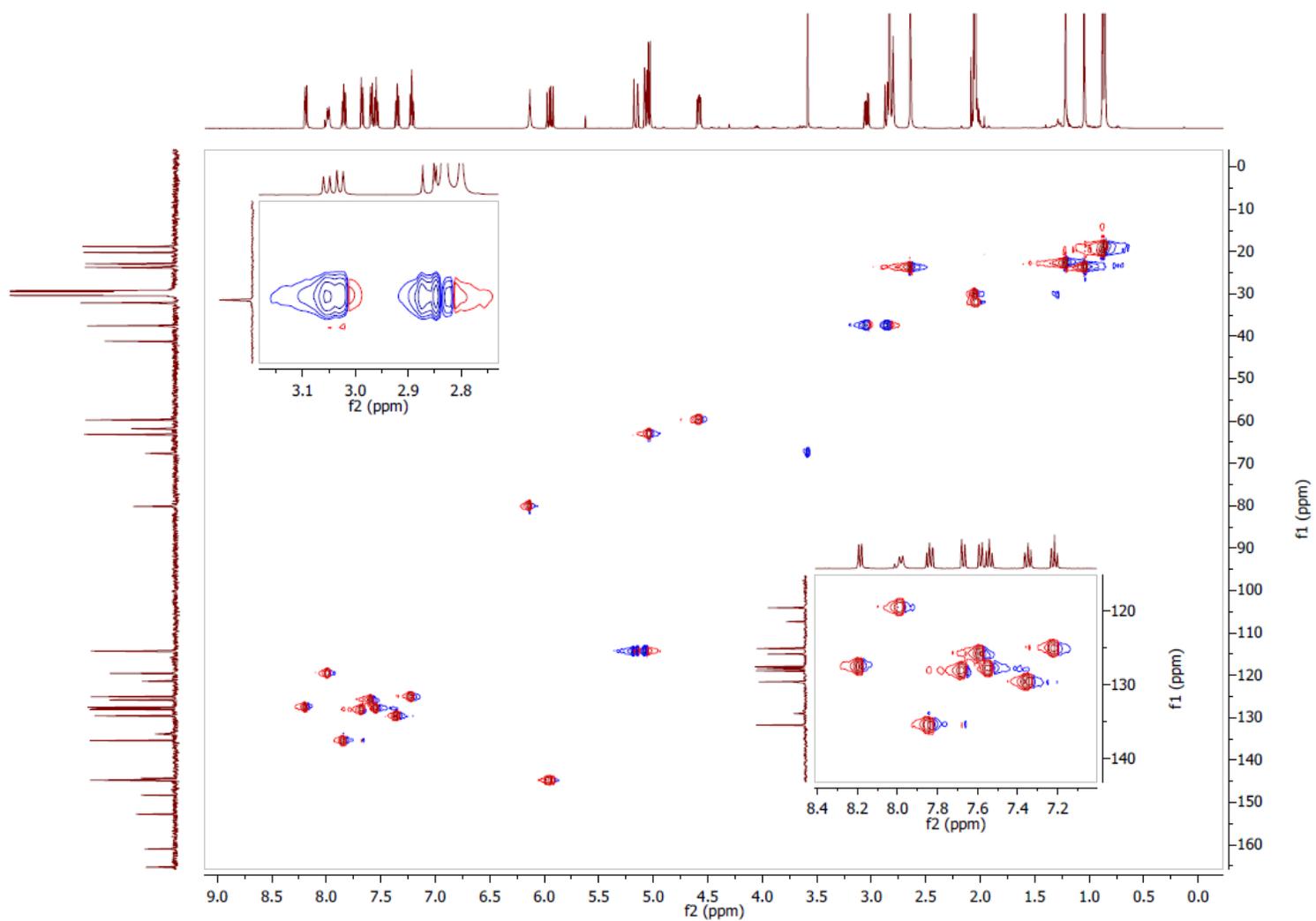
9. Anexos



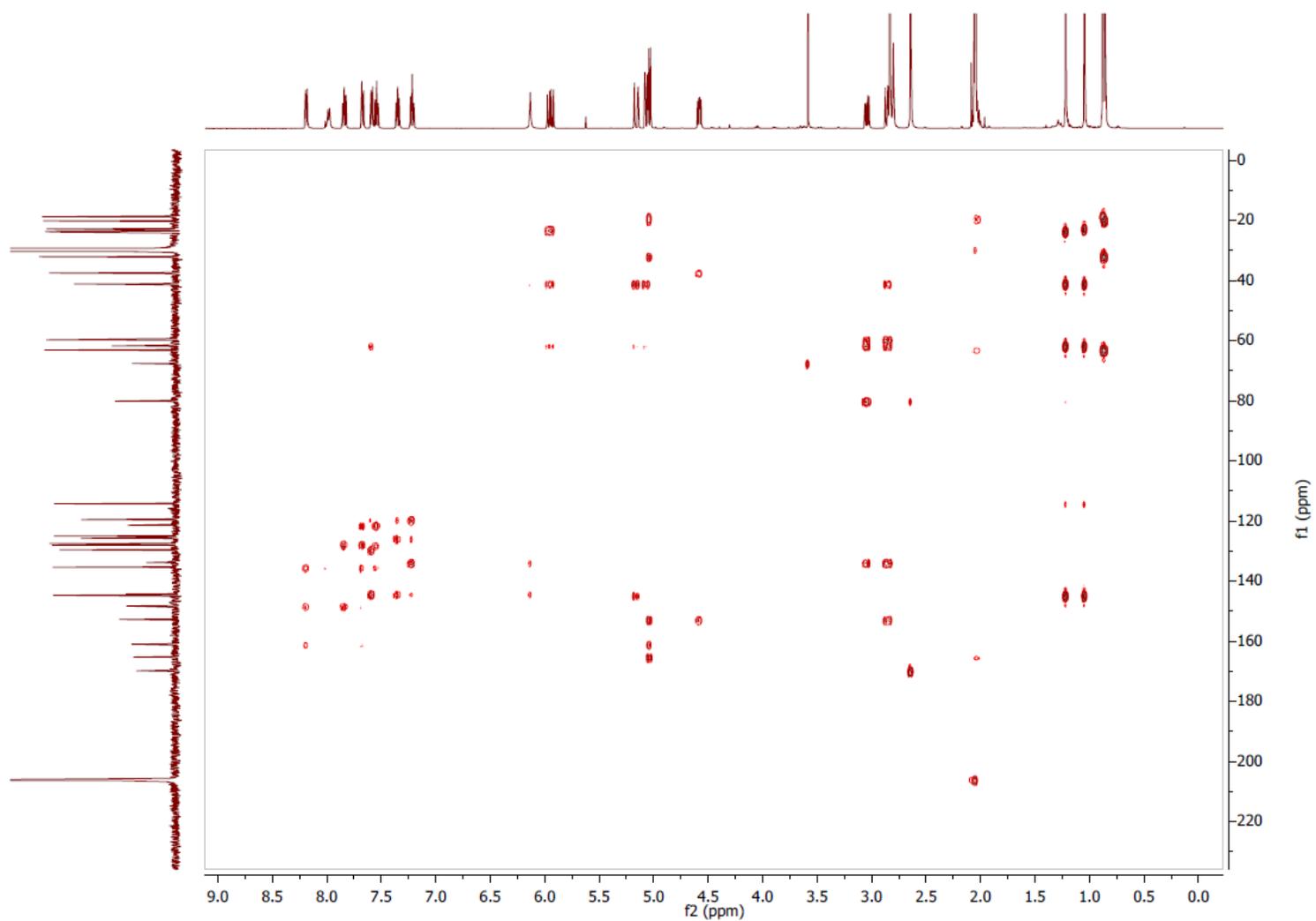
Espectro 1. Espectro de RMN- ^1H de 5-N-acetil-8-β-isopropil-ardemina (33) (500 MHz), $\text{acetona-}d_6$



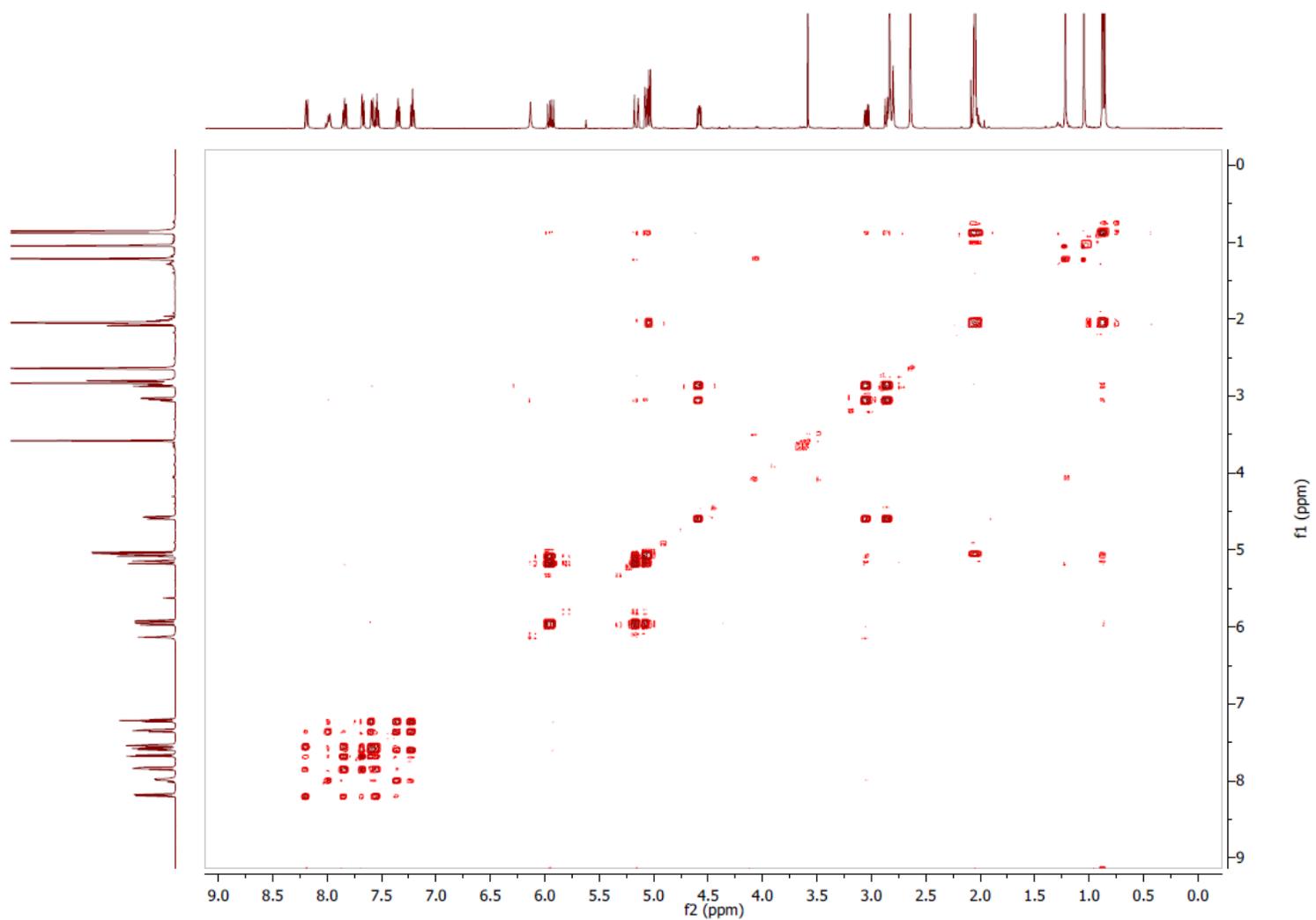
Espectro 2. Espectro de RMN- ^{13}C de 5-N-acetil-8- β -isopropil-ardemina (33) (125 MHz), $\text{acetona-}d_6$



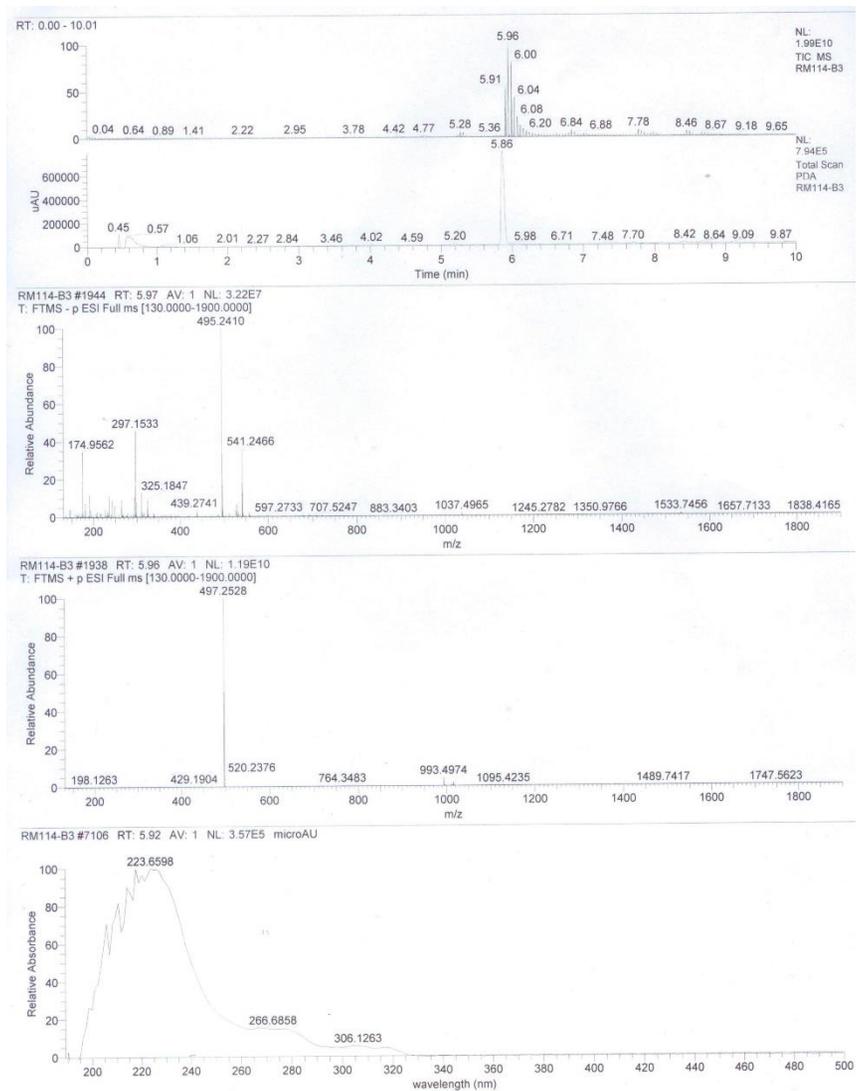
Espectro 3. Espectro HSQC de 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**) en *acetona-d*₆



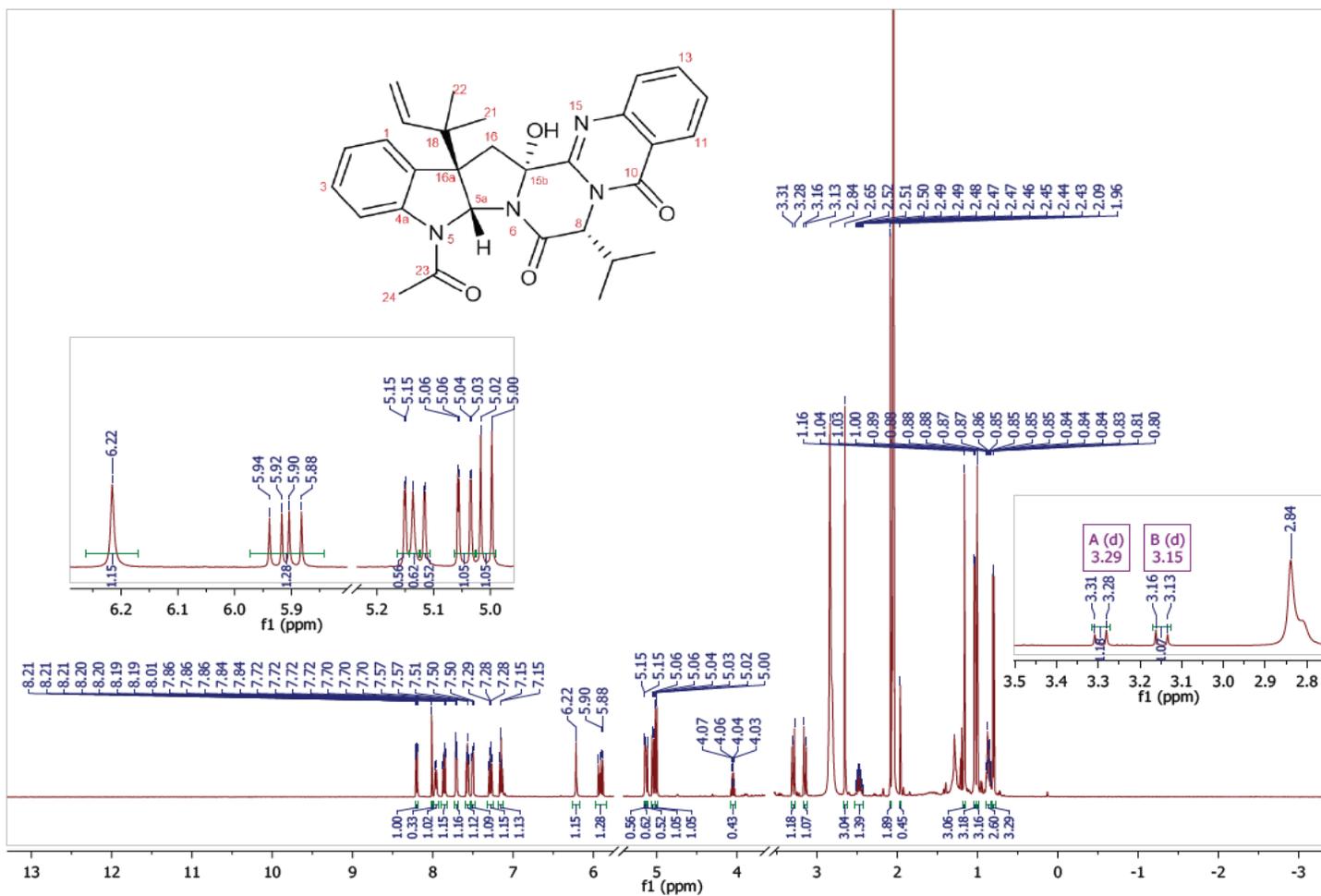
Espectro 4. Espectro HMBC de 5-N-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**) en *acetona-d₆*



Espectro 5. Espectro COSY de 5-N-acetil-8-β-isopropil-ardemina (**33**) en *acetona-d₆*

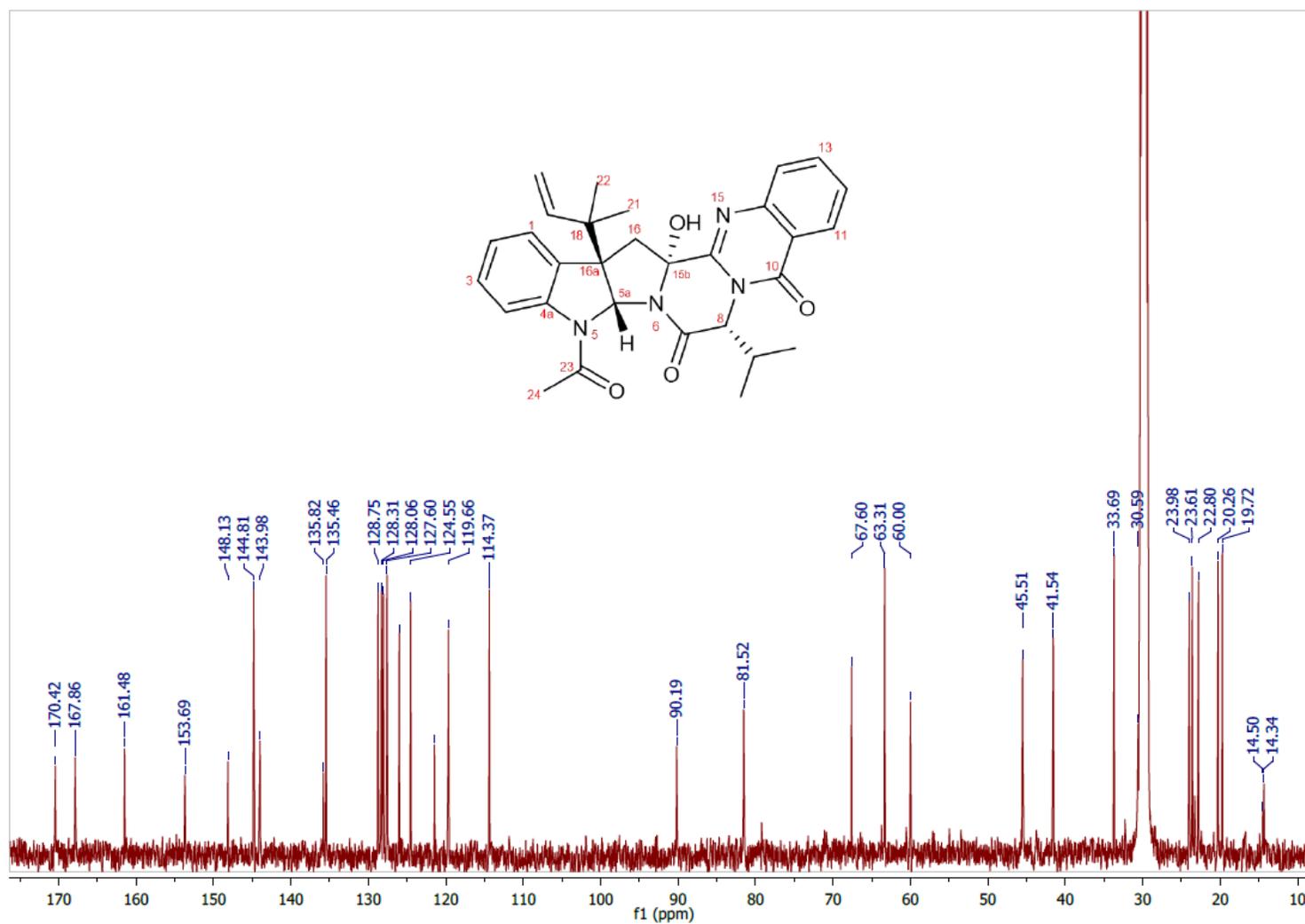


Espectro de masas. Espectro de masas de 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (33)

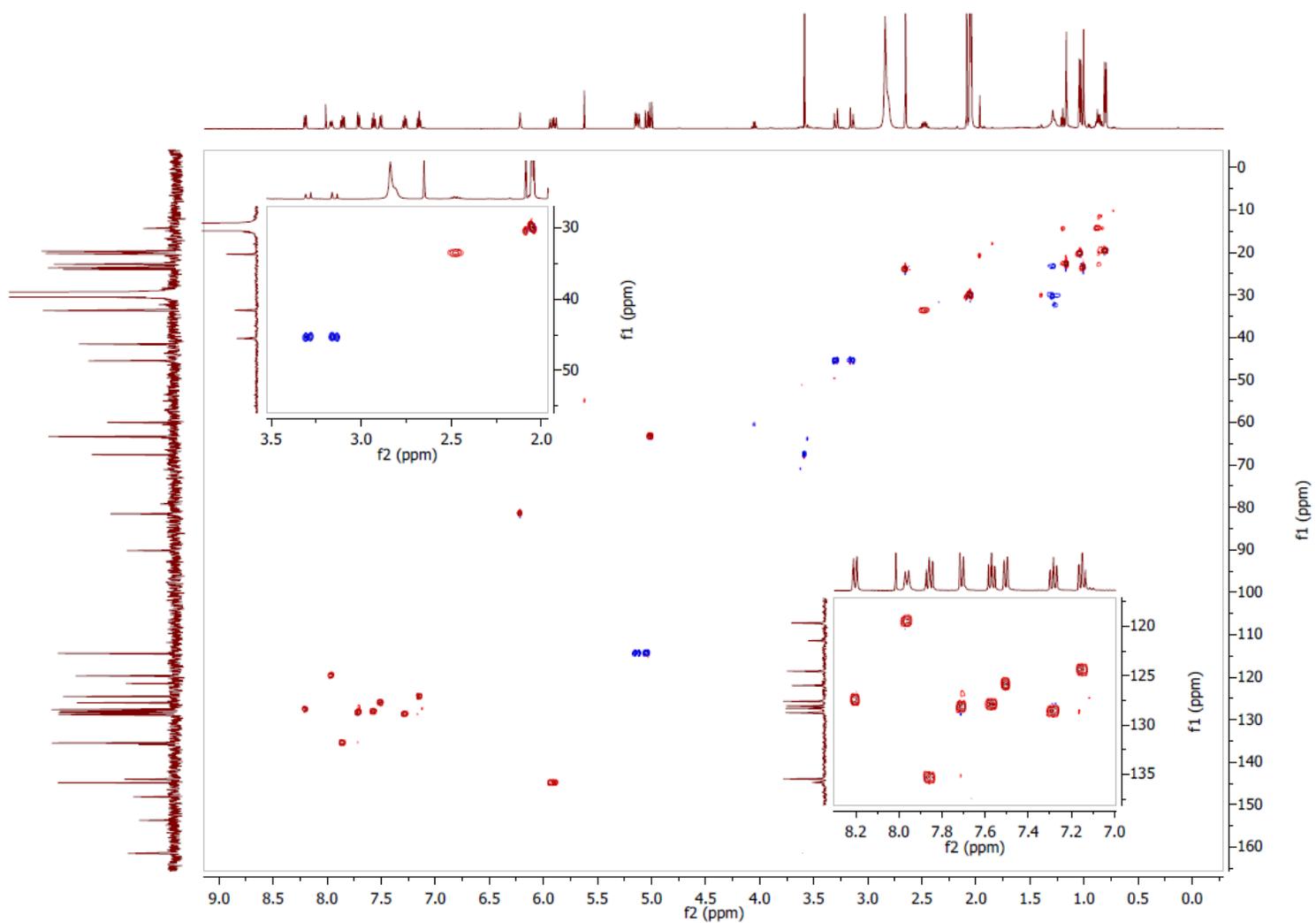


Espectro 6. Espectro de RMN- ^1H de 5-N-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina

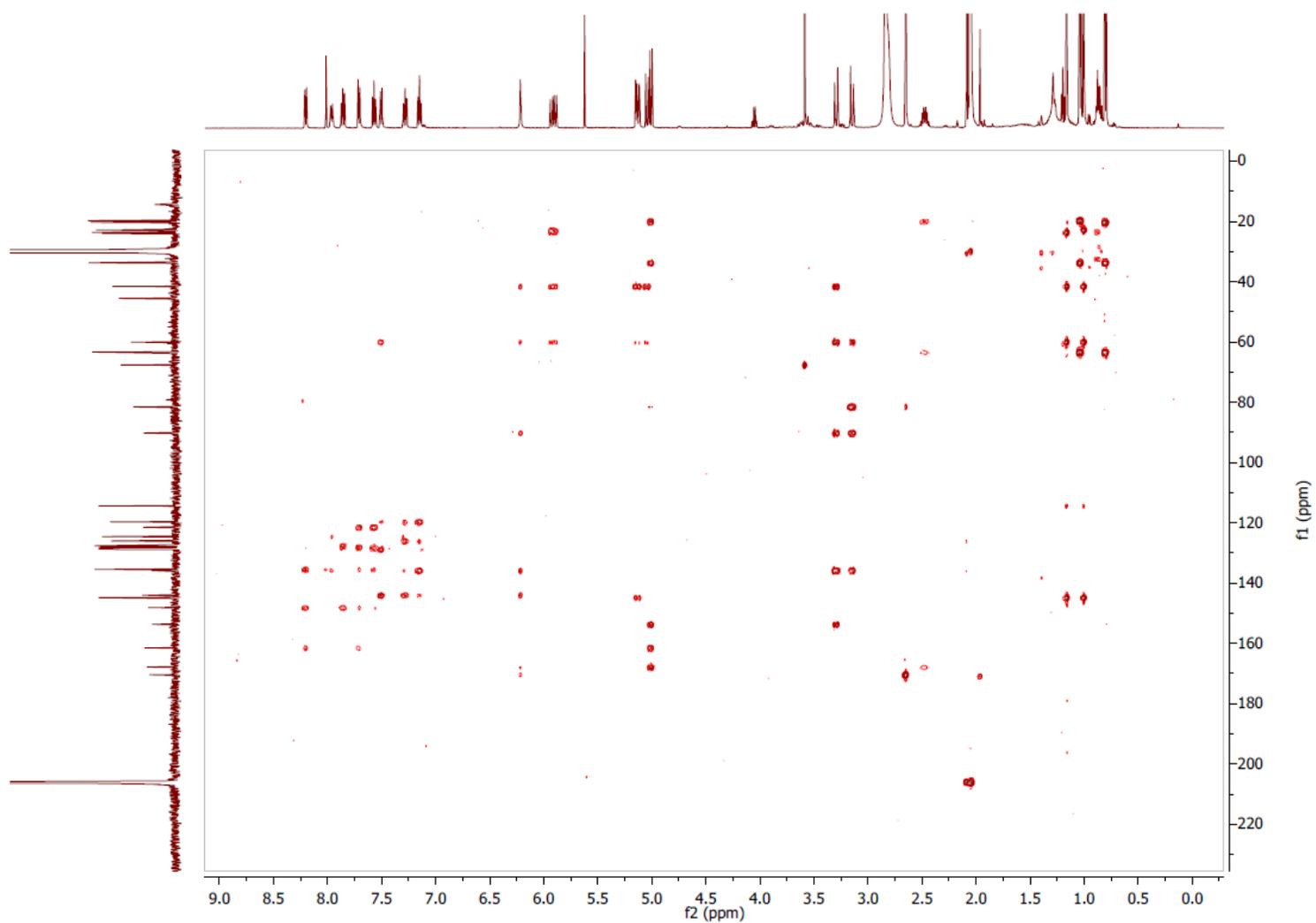
(34) (500 MHz), $\text{acetona-}d_6$



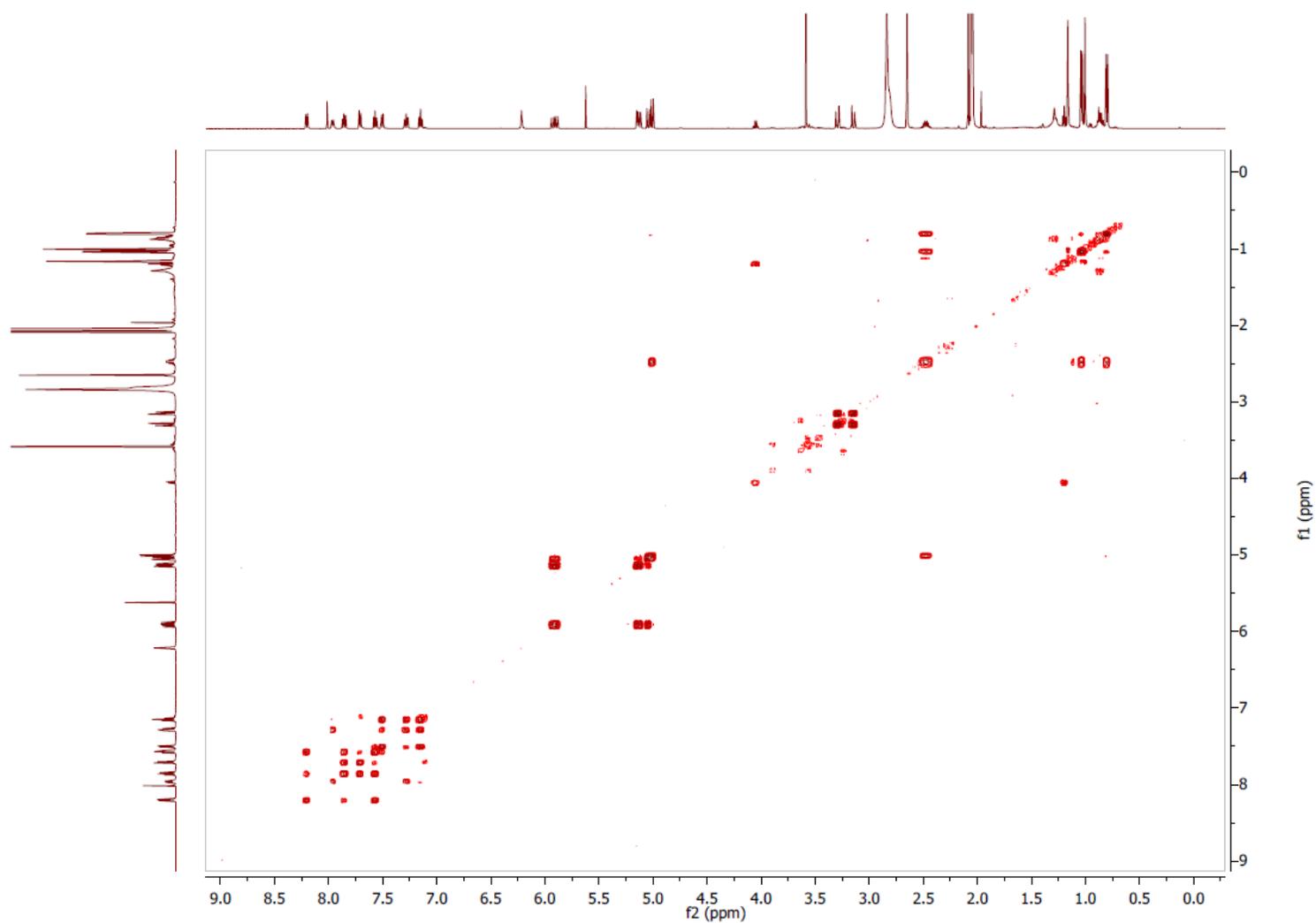
Espectro 7. Espectro de RMN- ^{13}C de 5-N-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**) (125 MHz), acetona- d_6



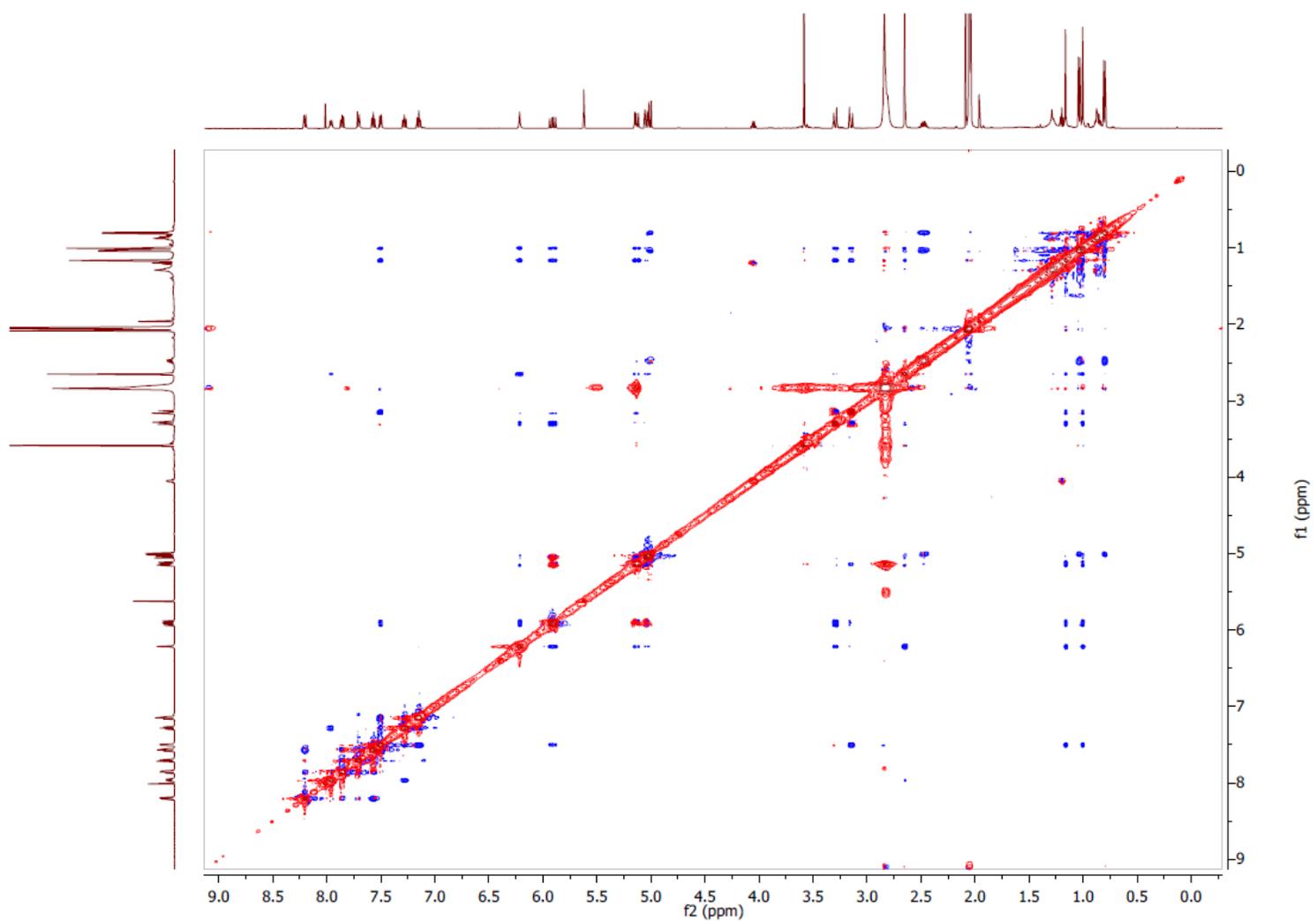
Espectro 8. Espectro HSQC de 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**) en *acetona-d*₆



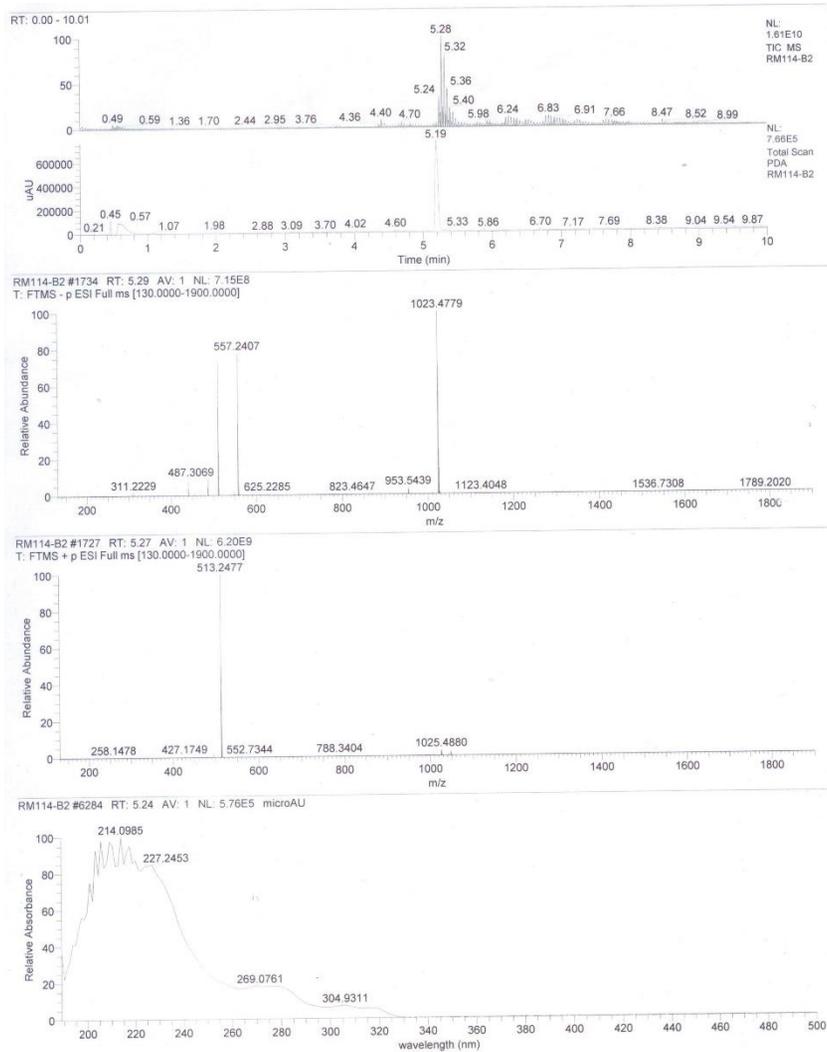
Espectro 9. Espectro HMBC de 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**) en *acetona-d*₆



Espectro 10. Espectro COSY de 5-*N*-acetil-15 β -hidroxi-8 β -isopropilardemina (**34**) en *acetona-d*₆



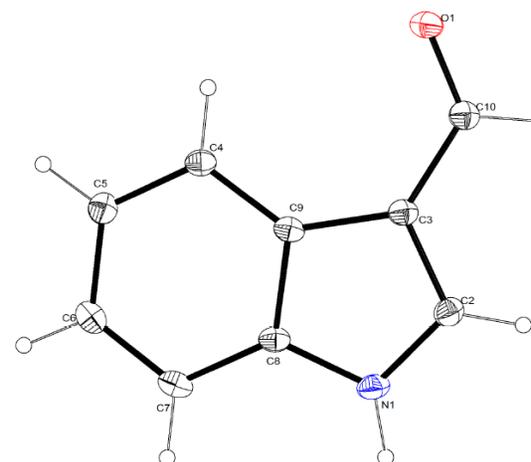
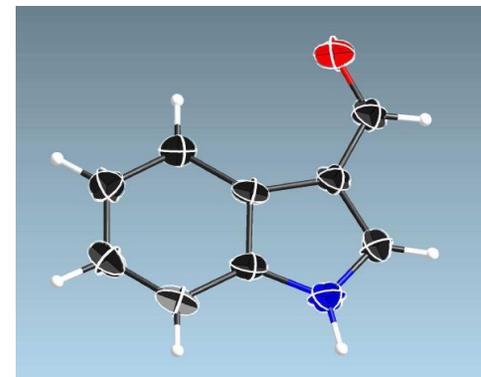
Espectro 11. Espectro NOESY de 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (**34**) en *acetona-d*₆



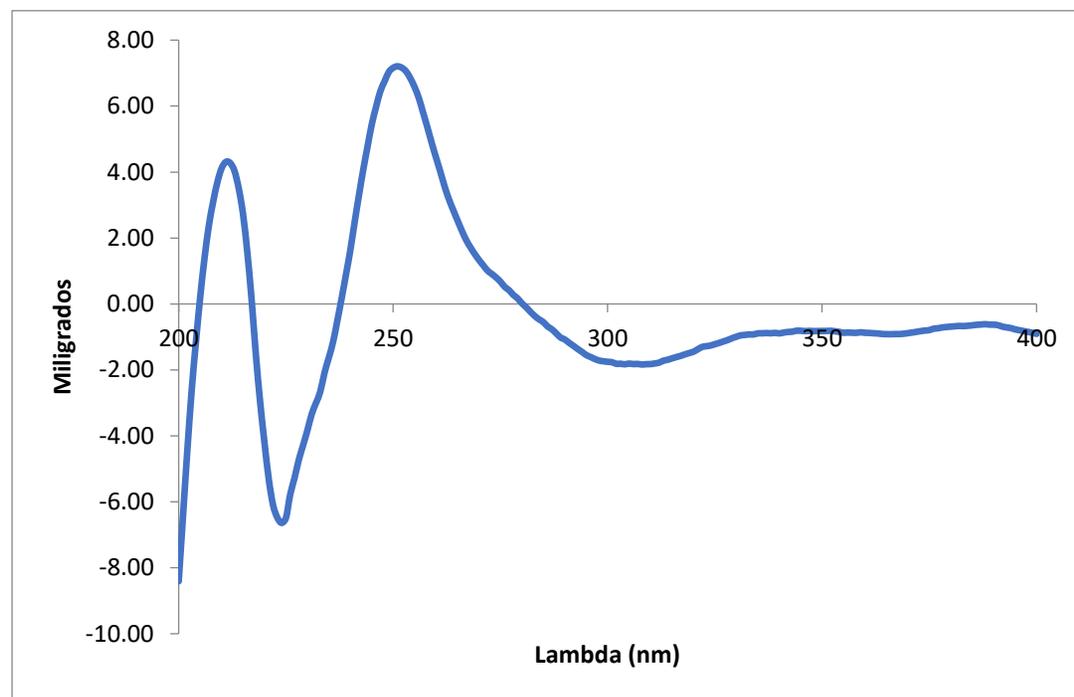
Espectro de masas. Espectro de masas de 5-*N*-acetil-15b- β -hidroxi-8- β -isopropil-ardemina (34)

Table 1. Crystal data and structure refinement for RM114-125A.A.

Identification code	202XYZ17	
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	
Formula weight	290.31	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	Pca2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 13.9497(16) Å	α = 90°.
	b = 5.8583(7) Å	β = 90°.
	c = 8.6140(10) Å	γ = 90°.
Volume	703.95(14) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.370 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.733 mm ⁻¹	
F(000)	304	
Crystal size	0.414 x 0.121 x 0.108 mm ³	
Theta range for data collection	6.346 to 68.348°.	
Index ranges	-16 ≤ h ≤ 14, -5 ≤ k ≤ 7, -10 ≤ l ≤ 10	
Reflections collected	5097	
Independent reflections	1249 [R(int) = 0.1052]	
Completeness to theta = 67.679°	100.0 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1249 / 1 / 104	
Goodness-of-fit on F ²	1.094	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0412, wR2 = 0.1151	
R indices (all data)	R1 = 0.0420, wR2 = 0.1164	
Absolute structure parameter	0.0(5)	
Extinction coefficient	0.012(3)	
Largest diff. peak and hole	0.153 and -0.166 e.Å ⁻³	
S.W.Ng (2007) <i>Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online</i> , 63, o2732		
1H-Indole-3-carbaldehyde CCDC COMW0Q, COMW0Q01		

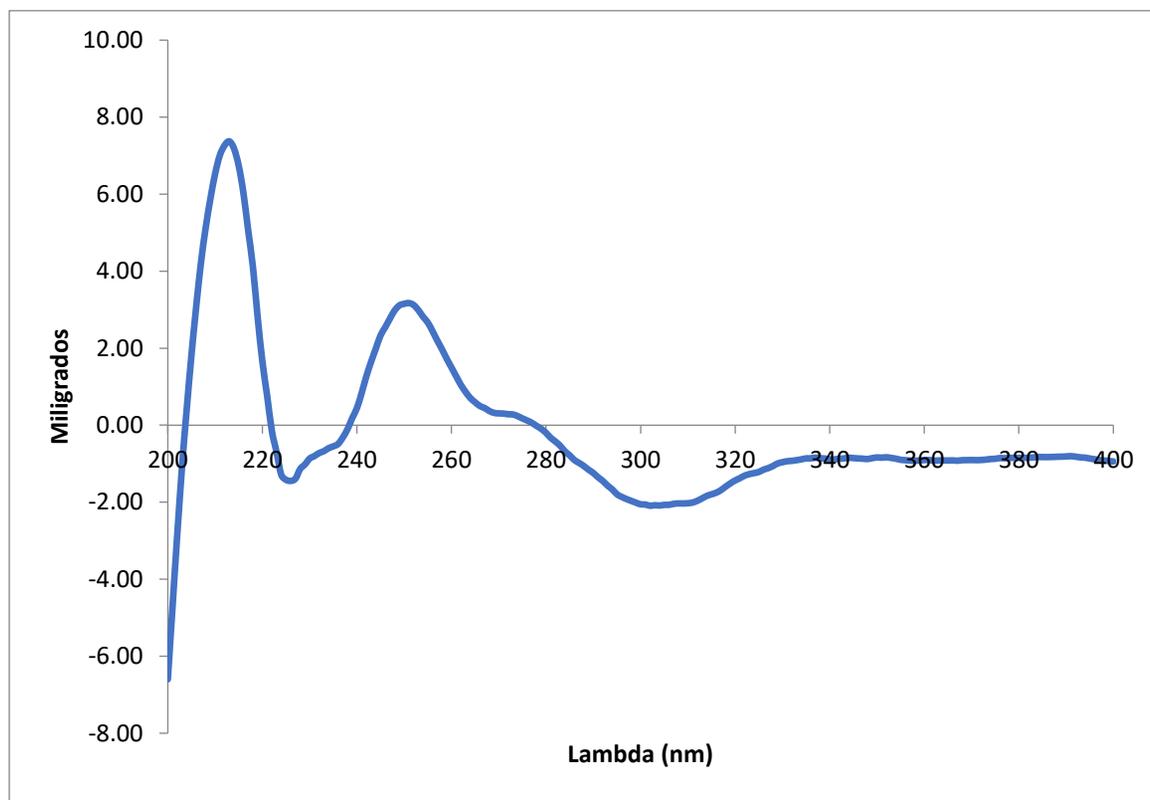


Parámetros cristalográficos. Parámetros y estructura reportados para del 1-*H*-indol-3-carboxialdehído



Espectro de DC de 5-*N*-acetil-8- β -isopropil-ardemina (**33**).

Datos: ($c = 0.01$ mg/mL, MeOH), $\lambda_{\text{máx}}$ ($\Delta\epsilon$) 212 (+4.27), 224 (-6.64) nm, 251 (+7.21) nm



Espectro de DC de 5-*N*-acetil-15b-β-hidroxi-8-β-isopropil-ardemina (**34**)

Datos: ($c = 0.01$ mg/mL, MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ ($\Delta\epsilon$) 213 (+7.37), 226 (-1.45) nm, 251 (+3.17) nm