



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIOS DE DERREPLICACIÓN Y
QUÍMICOS DE HONGOS SAPRÓFITOS DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. RAUL ENRIQUE CAMIÑA BLANDO

DR MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
LABORATORIO 125, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, DICIEMBRE 2018



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

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIOS DE
DERREPLICACIÓN Y QUÍMICOS DE HONGOS SAPRÓFITOS DE
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. RAUL ENRIQUE CAMIÑA BLANDO



Ciudad de México, diciembre 2018

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

VOCAL: DRA. VALERIA F. SOUZA SALDÍVAR

VOCAL: DR. RICARDO REYES CHILPA

VOCAL: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SECRETARIO: DR. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO DE TESIS:

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

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en la 14ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, realizada en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México, del 23 al 26 de mayo de 2018 (**Anexo**):

- *Raul E. Camiña Blando y Mario Figueroa.* Actividad antimicrobiana y estudios de derreplicación y químicos de hongos saprófitos de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por acogerme en sus instalaciones durante mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero otorgado durante mis estudios de posgrado en la FQ-UNAM, a través de la beca CONACyT (CVU/Becario: 770052), así como por el apoyo económico al grupo de investigación a través del financiamiento de los proyectos: CONACyT CB 236564, DGAPA PAPIT IA205017 y PAIP FQ 5000-9145.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así como a la Isabel Rivero Cruz por el apoyo y la asesoría brindada durante la realización de este proyecto.

A los Dres. Valeria Souza y Luis Eguiarte del Instituto de Ecología, UNAM por proporcionar la muestra para el aislamiento de los organismos fúngicos de estudio, y a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por el permiso otorgado a la Dra. Souza (oficio No. SGPA/DGVS/02002/16), para la recolección de muestras con fines académicos y de investigación.

A los Dres. Huzefa Raja y Nicholas H. Oberlies, de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU. por la identificación taxonómica de los organismos fúngicos, así como el registro de RMN y UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS.

Al Q.F.B. Alejandro Camacho (Ceparío de la FQ-UNAM), por proporcionar las cepas utilizadas en los ensayos antimicrobianos.

A los miembros del honorable jurado por sus valiosas aportaciones realizadas durante la revisión del presente manuscrito.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

	Página
Lista de figuras	1
Lista de cuadros	3
Lista de tablas	3
Lista de abreviaturas	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCION	7
1.1 La importancia de los productos naturales para la obtención de nuevas moléculas bioactivas	7
1.2 Compuesto antimicrobianos de origen natural en la terapéutica	8
1.3 Biodiversidad en México y nichos ecológicos inexplorados: Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila	10
1.4 Antecedentes del género <i>Epicoccum</i>	12
1.5 Antecedentes del género <i>Fusarium</i>	14
1.6 Antecedentes del género <i>Alternaria</i>	16
1.7 Antecedentes del orden Bortyosphaeriales	17
2. HIPOTESIS	20
3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	21
4. PARTE EXPERIMENTAL	22
4.1 Aislamiento de los organismos y preparación de los extractos en pequeña escala de los taxones fúngicos procedentes de la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila	22
4.2 Estudios de metabolómica	23
4.3 Preparación de los cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos	24
4.4 Identificación de los organismos fúngicos	24
4.5 Estudio químico	25
4.5.1 Procedimientos cromatográficos generales	25
4.5.2 Caracterización de los productos aislados	27
4.5.3 Aislamiento y purificación del compuesto 1	27
4.5.4 Aislamiento y purificación del alternariol monometil éter (2) y alternariol (3)	28
4.5.5 Aislamiento y purificación del epicoccólido B (4)	32
4.5.6 Aislamiento y purificación de la (<i>E</i>)-9-eteno-de- <i>O</i> -metil-lasiodiplodina (5) y su derivado epoxidado (6)	33
5. Resultados y discusión	36
5.1 Acondicionamiento de los taxones fúngicos	37
5.2 Estudios de metabolómica	39
5.3 Identificación taxonómica de los organismos fúngicos seleccionados.	40
5.4 Estudio químico de las especies fúngicas seleccionadas	40
5.4.1 Caracterización del compuesto 1	41
5.4.2 Caracterización del alternariol monometil éter (2) y alternariol (3)	45
5.4.3 Caracterización del epicoccólido B (4)	51
5.4.4 Caracterización del (<i>E</i>)-9-eteno-de- <i>O</i> -metil-lasiodiplodina (5)	54
5.4.5 Caracterización de la 9-epoxi-de- <i>O</i> -metil-lasiodiplodina (6).	58
6. Conclusiones	63
7. Perspectivas	64
8. Referencias	65

Lista de figuras

		Página
1	Ejemplos selectos de antibióticos de origen fúngico.	9
2	Metabolitos bioactivos aislados a partir del género <i>Epicoccum</i> .	13-14
3	Metabolitos bioactivos aislados a partir del género <i>Fusarium</i> .	15
4	Metabolitos bioactivos obtenidos a partir del género <i>Alternaria</i> .	17
5	Metabolitos bioactivos aislados a partir de especies fúngicas pertenecientes al orden Botryosphaerales.	18-19
6	Mapa de la ubicación de la cueva del Junco, Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila (26°49'41" N, 102°16'17" O).	23
7	Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-6. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELSD.	27
8	Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-13. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELSD.	28
9	Cromatogramas obtenidos a nivel analítico [(a) Detector UV/Vis $\lambda=254$ nm, (b) Detector ELSD] y preparativo [(c) Detector UV/Vis $\lambda=254$ nm] de la fracción 01002-124-3.	30
10	Perfil cromatográfico del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-65-6. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELSD.	30
11	Cromatogramas obtenidos a nivel analítico [(a) Detector UV/Vis $\lambda=254$ nm, (b) Detector ELSD] y preparativo [(c) Detector UV/Vis $\lambda=254$ nm] de la fracción 01002-127-5.	31
12	Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-11. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELSD.	32
13	Cromatogramas obtenidos a nivel analítico [(a) Detector UV/Vis $\lambda=192$ nm, (b) Detector ELSD] y preparativo [(c) Detector UV/Vis $\lambda=192$ nm] de la fracción 01002-064-5.	33
14	Perfil cromatográfico del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-70-3. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELSD.	34
15	Cromatogramas obtenidos a nivel analítico [(a) Detector UV/Vis $\lambda=254$ nm, (b) Detector ELSD] y preparativo [(c) Detector UV/Vis $\lambda=254$ nm] de la fracción 01002-134-3.	35
16	Estrategia experimental empleada para el desarrollo de la investigación.	36
17	Cepas selectas de los organismos fúngicos aislados.	37
18	Cultivos fúngicos en mediana escala en arroz.	40
19	Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto 1 : A) Cromatogramas de iones totales (TIC) arriba; Cromatogramas en el UV (abajo), B) ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.	41
20	Espectro de ^1H RMN del compuesto 1 (CD_3OD , 400 MHz.).	43
21	Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 1 (CD_3OD , 100 MHz.).	43
22	Espectro HSQC del compuesto 1 (CD_3OD).	44

23	Espectro HMBC del compuesto 1 (CD ₃ OD).	44
24	Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto 2 : A) cromatogramas de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). B) ESI (+) arriba; ESI (-) abajo.	46
25	Espectro de ¹ H RMN del compuesto 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	47
26	Espectro de ¹³ C RMN del compuesto 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).	47
27	Espectro HSQC del compuesto 2 (DMSO- <i>d</i> ₆).	48
28	Espectro HMBC del compuesto 2 (DMSO- <i>d</i> ₆).	48
29	Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto 3 : A) Cromatogramas de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). B) ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.	49
30	Espectro de ¹ H RMN del compuesto 3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	50
31	Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto 4 : A) Cromatograma de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). B) ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.	52
32	Espectro de ¹ H RMN del compuesto 4 (CD ₃ OD, 400 MHz).	53
33	Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto 5 : A) Cromatogramas de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). B) ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.	54
34	Espectro de ¹ H RMN del compuesto 5 (CD ₃ OD, 400 MHz).	55
35	Espectro de ¹³ C RMN del compuesto 5 (CD ₃ OD, 100 MHz).	56
36	Espectro HSQC del compuesto 5 (CD ₃ OD).	56
37	Espectro COSY del compuesto 5 (CD ₃ OD).	57
38	Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto 6 : A) Cromatograma de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). B) ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.	59
39	Espectro de ¹ H RMN del compuesto 6 (CD ₃ OD, 400 MHz).	60
40	Espectro de ¹³ C RMN del compuesto 6 (CD ₃ OD, 100 MHz).	60
41	Espectro HSQC del compuesto 6 (CD ₃ OD).	61
42	Espectro HMBC del compuesto 6 (CD ₃ OD).	61

Lista de cuadros

		Página
1	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico de la especie CC8-6.	28
2	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico de la especie CC8-13	29
3	Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-65-5.	29
4	Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-65-6.	31
5	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-11	32
6	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-19.	33
7	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-70-3.	34
8	Rendimiento de los extractos orgánicos en pequeña escala y resultados de actividad antimicrobiana de los hongos selectos de la serie CC8 aislados de Cuatro Ciénegas.	38
9	Metabolitos detectados en los estudios de metabolómica en los taxones CC8-6, CC8-11, CC8-13, CC8-15 y CC8-19.	39

Lista de tablas

		Página
1	Datos espectroscópicos del compuesto 1 en CD ₃ OD (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz).	45
2	Datos espectroscópicos de los compuestos 2 y 3 en DMSO- <i>d</i> ₆ (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz).	50
3	Datos espectroscópicos del compuesto 4 en CD ₃ OD (¹ H, 400 MHz) y DMSO- <i>d</i> ₆ (¹ H, 300 MHz; ¹³ C, 75 MHz).	53
4	Datos espectroscópicos del compuesto 5 en CD ₃ OD (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz).	57
5	Datos espectroscópicos del compuesto 6 en CD ₃ OD (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz).	62

Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius	HPLC	High performance liquid chromatography
µg	Microgramos	HRESIMS	High resolution electrospray ionization mass
µL	Microlitros	HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
µm	Micrómetros	CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
µM	Micromolar	IDH	Índice de deficiencia de hidrogeno
Abs	Absorbancia	ITS	Internal Transcribed Spacer
AcOEt	Acetato de etilo	kb	Kilobases
ADN	Ácido desoxirribonucleico	m/v	Masa/volumen
ATCC	American Type Culture Collection	m/z	Masa/carga
BaCl ₂	Cloruro de bario	MeCN	Acetonitrilo
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool nucleotide	MeOH	Metanol
CD ₃ OD	Metanol deuterado	mg	Miligramos
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	M-H	Müller Hinton
CHCl ₃	cloroformo	MHz	Mega Hertz
CMI	Concentración mínima inhibitoria	mL	Mililitro
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad	mm	Milímetro
COSY	Correlation spectroscopy	MS/MS	Masas/masas
DMSO	Dimetil sulfóxido	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado	nm	Nanómetros
DNP	Diccionario de productos naturales	PCR	Polymerase chain reaction
EE.UU.	Estados Unidos de Norte América	APD	Agar papa dextrosa
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	PDA	Photodiode array
EM	Espectrometría de masas	ppm	Partes por millón
ESI	Ionización por electrospray	ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
FDA	Food and Drug Administration	RMN	Resonancia magnética nuclear
g	Gramos	rpm	Revoluciones por minuto
GPS	Global positioning system	TIC	Total ion chromatogram
H ₂ O	Agua	UPLC	Ultra performance liquid chromatography
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	UV	Ultravioleta
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence	YESD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa

RESUMEN

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto enfocado en la obtención de moléculas bioactivas y/o novedosas a partir nichos ecológicos inexplorados de nuestro país. En primera instancia se realizó el acondicionamiento de cinco organismos fúngicos saprótrofos previamente aislados a partir de una muestra de placa microbiana, recolectada en la Cueva del Junco, en la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Una vez verificada la viabilidad y pureza de los organismos, se prepararon los cultivos en medio sólido y se obtuvieron sus correspondientes extractos orgánicos, mismos que fueron sometidos a un análisis de metabolómica y actividad antimicrobiana.

Los resultados de los análisis de metabolómica revelaron la presencia de las micotoxinas pirenocina M, arugosina F, *ent*-malettinina B, ácido 6,9-octadecadienoico y 1,4,8-trihidroxi-3-metilxantona en algunos de los extractos. Además, algunos extractos mostraron buena actividad antimicrobiana contra las cepas de prueba. A pesar de lo anterior, se realizó el escalamiento de los cultivos y su posterior estudio químico debido a que estos organismos fúngicos provienen de un nicho ecológico inexplorado. Así, los estudios químicos de los organismos permitieron el aislamiento y la caracterización de seis metabolitos secundarios: la epicoccamida A (**1**) a partir de la especie identificada como *Epicoccum* sp. (CC8-6); el alternariol (**3**) y el alternariol monometil éter (**2**) a partir de la especie identificada como *Alternaria* sp. (CC8-13); el epicoccolido B (**4**) a partir de la especie identificada como *Fusarium* sp. (CC8-11); y la (*E*)-9-eteno-de-O-metil-lasiodiplodina (**5**) y la 9-epoxi-de-O-metil-lasiodiplodina (**6**) a partir del taxón clasificado dentro del orden de Botryosphaerales (CC8-19). Cabe destacar que este último producto es un producto natural novedoso, y los productos **1** y **5**, y **4** representan el primer aislamiento a partir de organismos fúngicos saprótrofos, y de un hongo del género *Fusarium* sp., respectivamente. Finalmente, la presente investigación también representa una contribución al conocimiento de la biodiversidad fúngica que reside en nuestro país, en el caso particular, de la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

ABSTRACT

This research is part of a multidisciplinary project focused on the identification of bioactive and/or novel molecules from unexplored sources in Mexico. Here we report the chemical and biological study of five saprotrophic fungal strains previously isolated from a sample of microbial plaque on rocks collected in the Junco Cave, located in the Reserve of Cuatro Ciénegas, Coahuila. Once their viability and purity was confirmed, small scale solid-media cultures were prepared and their organic extracts obtained. All extracts were subjected to metabolomic analysis and antimicrobial testing. From the metabolomic analysis, a series of mycotoxins were detected: pirenocin M, arugosin F, *ent*-malettin B, 6,9-octadecadienoic acid and 1,4,8-trihydroxy-3-methylxanthone. However, since these fungal strains came from an unexplored ecological place, we decided to scale up the cultures and studied their secondary metabolite profiles.

The chemical study of the organic extracts yielded six secondary metabolites: epicoccamide A (**1**) from the species identified as *Epicoccum* sp. (CC8-6); alternariol (**3**) and its monomethylated derivative (**2**) from *Alternaria* sp. (CC8-13); epicoccolide B (**4**) from *Fusarium* sp. (CC8-11); and (*E*)-9-etheno-de-*O*-methyl-lasiodiplodin (**5**) and 9-epoxy-de-*O*-methyl-lasiodiplodin (**6**) from the taxon classified in the order of Botryosphaeraiales (CC8-19). Compound **6** represents a novel natural product, while **1** and **5**, and **4** are isolated for the first time from saprotrophic fungi, and from a *Fusarium* species, respectively. Finally, this investigation represents a contribution to the knowledge of the fungal biodiversity of our country, in particular of the Reserve of Cuatro Ciénegas, Coahuila.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La importancia de los productos naturales para la obtención de nuevas moléculas bioactivas

Históricamente, el uso de fuentes naturales para satisfacer las necesidades de los asentamientos humanos, como las plantas, los animales y algunos microorganismos, ha estado presente a través del tiempo. Algunos ejemplos de estas fuentes son las plantas medicinales intactas, los productos procedentes de procesos fermentativos, o ciertas toxinas obtenidas a partir de organismos tropicales¹. Cabe mencionar que estos recursos naturales representan una fuente de vital importancia para el aislamiento de moléculas bioactivas novedosas, debido a la capacidad biosintética y a la diversidad enzimática contenida en estos sistemas biológicos.

En este contexto, el reino Fungi representa el segundo grupo con mayor diversidad de organismos eucariontes (sólo por debajo de los insectos) y de distribución cosmopolita². Se estima que la diversidad fúngica oscila entre 2.2 a 3.8 millones de especies, de las cuales solo se tienen registros del estudio taxonómico de alrededor de 120.000, y una proporción aún menor, ha sido estudiada químicamente³. Así, el estudio sistemático de los organismos fúngicos para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos comenzó en 1922, bajo la dirección de Harold Raistrick, quien logró caracterizar más de 200 metabolitos de mohos. Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento de la penicilina por parte de Alexander Fleming en el año de 1929, y su posterior desarrollo como agente terapéutico en la segunda guerra mundial, que se centró la atención en este tipo de compuestos biodinámicos⁴.

De manera general, se ha observado que la mayoría de las especies fúngicas estudiadas producen múltiples tipos de metabolitos secundarios, bajo la premisa de que éstos son necesarios para colonizar diversos hábitats y mantener su existencia dentro de ellos⁵. En este sentido, y con base a la existencia de millones

de taxones aún sin ser estudiados químicamente, estos organismos representan una fuente de obtención particularmente prolífica de metabolitos secundarios bioactivos de interés para las industrias farmacéutica, alimentaria y agroquímica.

Por otra parte, entre los años 1981 y 2014, de las 1562 moléculas aprobadas por la FDA, el 16% (250) son macromoléculas de origen biológico, el 4% (67) productos naturales sin modificaciones estructurales, el 1% (9) extractos botánicos, el 21% (320) derivados semisintéticos de productos naturales, el 27% (420) moléculas de origen sintético, el 11% (172) moléculas sintéticas que mimetizan productos naturales, el 4% (61) moléculas de origen sintético inspiradas en productos naturales, el 10% (162) compuestos inspirados y que mimetizan productos naturales, y el 6% (101) vacunas⁶. Si se analizan de manera global todas estas cifras, se observa que los productos naturales continúan siendo un referente importante para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, con un enfoque principalmente hacia padecimientos infecciosos de diversas etiologías y el cáncer⁷.

1.2 Compuestos antimicrobianos de origen natural en la terapéutica

Existen numerosos ejemplos de metabolitos secundarios de origen natural que presentan actividad biológica en diversos bioensayos, así como una gran diversidad de enzimas de interés biotecnológico. Algunas actividades documentadas para estas moléculas son las antimicrobianas, antifúngicas, fitotóxicas, inmunomoduladoras, hipocolesterolemiantes, citotóxicas, por mencionar las de mayor relevancia⁵. En el caso particular de las moléculas de origen natural con actividad antimicrobiana, destacan aquellas que poseen en su núcleo base el anillo β -lactámico, los aminoglucósidos, las macrólidas, las tetraciclinas, las rifamicinas, los glicopéptidos, las estreptograminas y los lipopéptidos, principalmente⁸. Específicamente de organismos fúngicos, algunos ejemplos de productos naturales utilizados en la terapéutica para tratar distintas infecciones son la penicilina G obtenida de *Penicillium crysogenum*⁹, la cefalosporina C de *Cephalosporium acremonium*¹⁰, el ácido fusídico de *Fusidium*

*coccineum*¹¹, la griseofulvina de *P. griseofulvum*¹², y la pneumocandina B0 de *Glarea lozoyensis*, compuesto base para la semisíntesis de las equinocandinas como la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina¹³ (**Figura 1**).

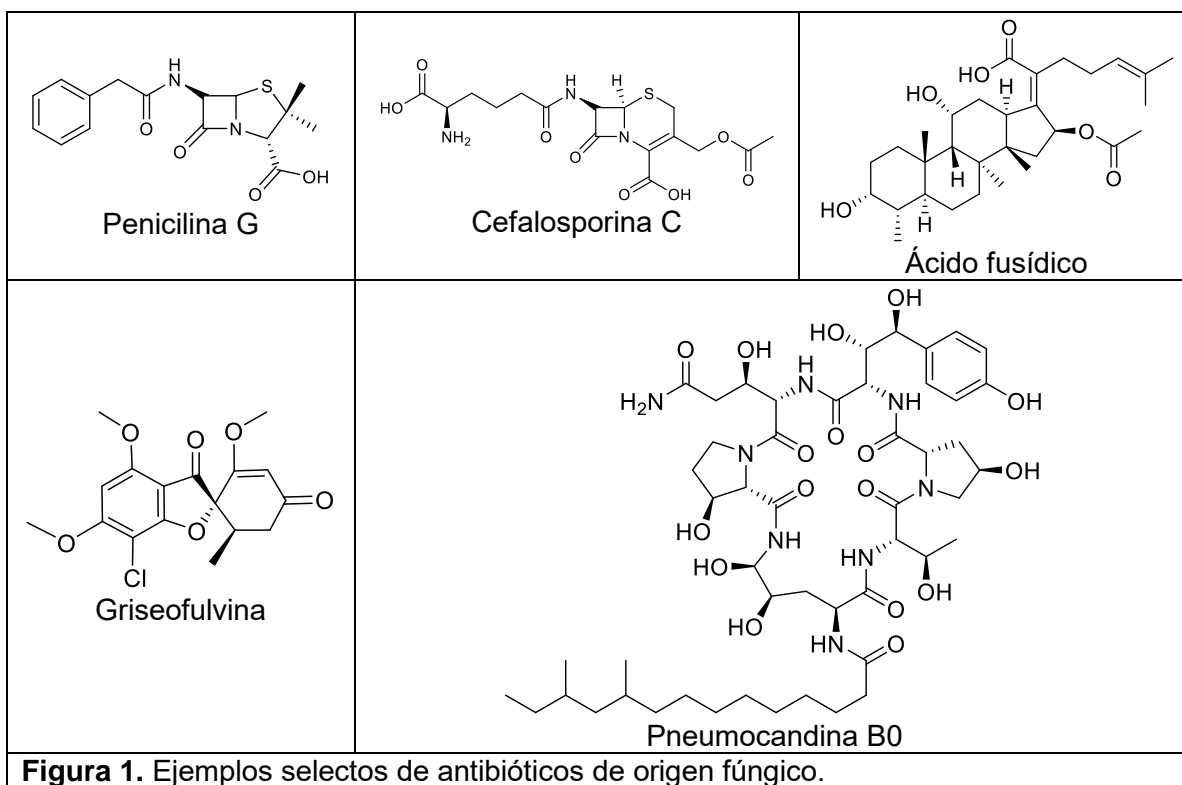


Figura 1. Ejemplos selectos de antibióticos de origen fúngico.

De manera general, fue a partir de la década de 1980 que comenzó a incrementarse la incidencia de diversos padecimientos infecciosos intrahospitalarios por microorganismos resistentes a los agentes terapéuticos de primera elección para su tratamiento¹. Se infiere que entre las principales causas del surgimiento de estos patógenos resistentes se encuentra la automedicación y la administración incompleta del tratamiento, así como fenómenos de resistencia adquirida mediante la regulación en la expresión de genes por los organismos patógenos, mediante mecanismos de transferencia horizontal de material genético, la expresión de proteínas de membrana expulsoras de fármacos y la formación de películas microbianas. Estos factores, en conjunto con la reducción de la investigación y el desarrollo hacia el descubrimiento de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica, han impulsado el surgimiento de

poblaciones bacterianas resistentes a antibióticos en todo el mundo y que prevalecen en la actualidad¹⁴.

Existe un grupo de patógenos que han sido denominados con el término “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies de *Enterobacter*), el cual genera gran interés en la actualidad, debido a que han incrementado su resistencia a los agentes antimicrobianos convencionales¹⁵. En este sentido, los productos naturales de origen fúngico representan una fuente potencial para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos debido a la diversidad de nuevos esqueletos químicos, y representan una alternativa para abordar el desafío clínico aún sin resolver de los fenómenos de resistencia¹⁶.

1.3 Biodiversidad en México y nichos ecológicos inexplorados: Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila

Debido a su ubicación geográfica, México cuenta con numerosas regiones con climas variados, que van desde zonas desérticas hasta selváticas, lo cual genera un mosaico de condiciones ambientales que lo posicionan en un lugar privilegiado a nivel mundial en cuanto a diversidad biológica¹⁷. En este sentido, la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) publicó en 2017 que México forma parte de los 5 países denominados como “megadiversos”, junto con China, la India, Colombia y Perú en materia de biodiversidad, estimando que en el territorio nacional se encuentra el 12% de la diversidad terrestre conocida¹⁸. En este sentido, los nichos ecológicos que poseen características climáticas excepcionales y una ubicación geográfica singular, pueden conducir a la aparición y multiplicidad de adaptaciones tanto fisiológicas como de comportamiento por parte de las especies que los habitan¹⁶. De manera general, muchas de estas regiones se localizan lejos de las áreas urbanas y representan una fuente valiosa para el estudio y la caracterización de recursos

naturales silvestres, siendo un ejemplo de estas la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Esta región localizada en el estado de Coahuila en el Desierto Chihuahuense, es un valle que se encuentra naturalmente aislado por sistemas montañosos. El clima durante el año es caliente y árido, con dos estaciones bien delimitadas: la primera comprendida entre los meses de noviembre y abril, es fría y seca, y con un promedio de precipitación pluvial de 51 mm. La segunda estación está comprendida entre los meses de mayo y octubre, y es cálida, húmeda y con un promedio de precipitación de 155 mm, lo cual representa el 60% de humedad total anual¹⁹. Este ecosistema es un humedal, en donde se encuentran numerosos estanques permanentes (pozas), lagunas, ríos y pozas de desecación, así como una región rica en mineral de yeso²⁰. Además de sus singularidades geográficas, esta región es única en su tipo en cuanto a biodiversidad, encontrándose organismos endémicos tanto macroscópicos (plantas, reptiles, peces, insectos)^{21,22}, como microscópicos (bacterias, virus y hongos)^{23,24}. Esta diversidad es debida principalmente a las condiciones de extrema oligotrofia²⁵, así como al aislamiento geográfico del valle con el surgimiento de la plataforma continental y el levantamiento de la sierra madre oriental²⁶. Por lo tanto, las asociaciones entre los organismos que habitan en Cuatro Ciénegas han coevolucionado a través del tiempo. Estos microorganismos son de suma importancia debido a que poseen características genéticas ancestrales, es decir, que son análogos a los microorganismos que habitaron el mar hace cientos de millones de años²⁷. Debido a factores tales como la ubicación geográfica, la composición de oligonutrientes presentes en el suelo, bajos niveles de N y P, altos niveles de sales minerales y a la incidencia de radiación solar durante el año, estos microorganismos tienden a competir con extraños y cooperar con su comunidad²³. Por lo tanto, se tiene la premisa que pueden producir moléculas bioactivas que les permitan inhibir el crecimiento y desarrollo de otras especies microbianas que no cohabiten con ellos. En este sentido, el estudio biológico de estas comunidades microbianas es de gran interés científico no solamente para la obtención de moléculas bioactivas,

sino también para la búsqueda de vida en otros cuerpos celestes que podrían presentar similitudes en las condiciones ambientales de oligotrofia.

1.4 Antecedentes del género *Epicoccum*

Epicoccum es un género de hongos filamentosos anamórficos (asexuales) pertenecientes al orden de los Pleosporales, del filo Ascomycota. Dichos organismos fúngicos presentan una ecología diversa ya que se han aislado a partir de múltiples muestras de distintos orígenes como suelo, animales, tejidos vegetales terrestres y marinos, entre otros. Algunas de las principales características morfológicas de los organismos pertenecientes a este género son la formación de colonias rojas, naranjas, cafés y amarillas, la producción de esporas globosas oscuras (debido a la producción de melanina) y septadas por ambos extremos y apreciables a simple vista en la superficie de la colonia, así como la producción de pigmentos difusibles al medio de cultivo²⁸. Las especies pertenecientes al género *Epicoccum* han sido objeto de numerosos estudios biológicos y químicos, y se han aislado metabolitos secundarios bioactivos con una amplia diversidad estructural, como se indica a continuación (**Figura 2**)²⁹.

- *Dicetopiperazinas*: presentan en su estructura al menos dos átomos de nitrógeno que forman parte de un anillo de seis miembros de tipo piperazina, y separados por enlaces de tipo amida. En la literatura especializada se han reportado diversas actividades biológicas para estos metabolitos, como agentes antimicrobianos, antivirales, antitumorales e inmunosupresores³⁰. Algunos ejemplos de esta categoría son las epicorazinas A y B, la triomicina e isotriomicina, las epicoccinas A-D y difenilalazinas²⁸.

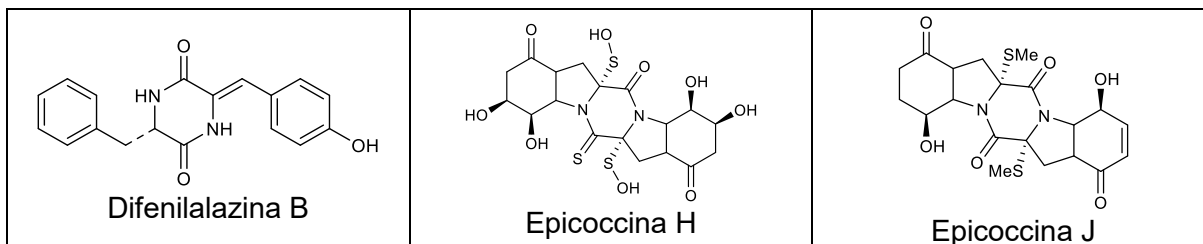
- *Alcaloides derivados del ácido tetrámico y piridínicos*: este tipo de metabolitos secundarios provienen también de aminoácidos, y se les han atribuido diversas propiedades farmacológicas. Las moléculas de tipo epicoccamida (A-D) poseen además cadenas de ácidos grasos y de glicósidos en su estructura. La epicoccamida D ha sido evaluada contra líneas celulares de fibroblastos de ratón

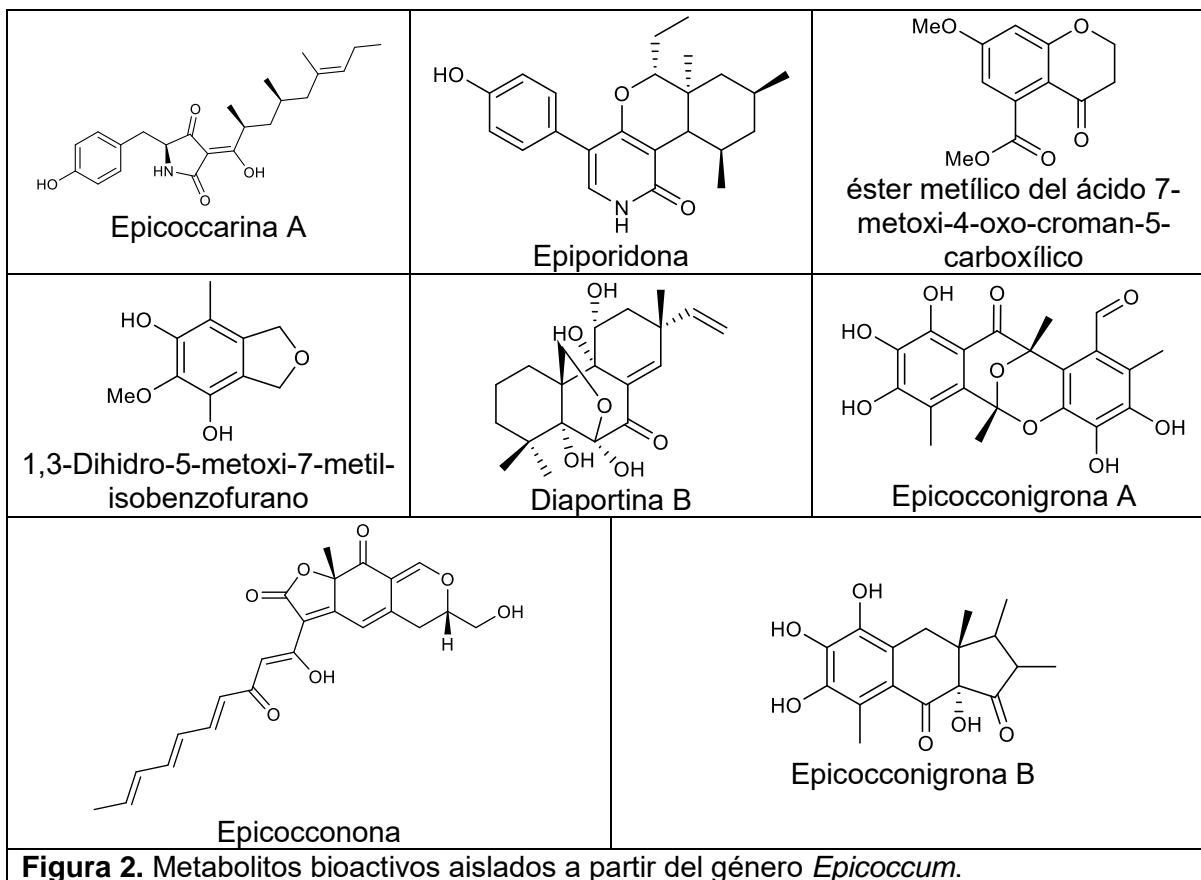
(L-929), leucemia humana (K-562) y HeLa³¹. Otros metabolitos derivados del ácido tetrámico como las epicoccarinas A y B, así como el alcaloide epiporidona, tienen actividad antibacteriana³².

- *Derivados de cromanonas e isobenzofuranos*: las cromanonas son derivados de benzopirano como el éster metílico del ácido 7-metoxi-4-oxo-croman-5-carboxílico y las epicocconigrinas A y B, que presentan diversas propiedades biológicas, entre ellas, la antiinflamatoria³³. Por otra parte, los isobenzofuranos como el 1,3-Dihidro-5-metoxi-7-metil-isobenzofurano presentan una amplia gama de propiedades como antibacteriana, antidiabética, analgésica, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante y antiviral²⁸.

- *Terpenos*: estos metabolitos tienen su origen biosintético a partir de la ruta del ácido mevalónico y/o DOXP en organismos fúngicos, y algunos ejemplos de estos productos son el pimarano y la diaportina B, compuestos citotóxicos contra líneas celulares de carcinoma epidermoide KB y KBv200³⁴.

- *Otros compuestos*: las epirodinas A-B tienen en su estructura grupos octano y carbonilo, los cuales presentan una similitud estructural y de actividad con algunos macrólidos obtenidos del género *Streptomyces*³⁵, así como otros compuestos de tipo carotenoide y flavonoide con propiedades antioxidantes³⁶. También se han aislado la flavipina³⁷ y el orevactaeno³⁸, con actividad antifúngica y anti-VIH respectivamente; la epicolactona y los epicoccolidos A y B, policétidos polisustituidos con propiedades antibacteriales y antifúngicas³⁹; la epicoccona y algunos derivados de la mulleina con esqueletos de carbono inusuales³⁸.





1.5 Antecedentes del género *Fusarium*

Fusarium es un género perteneciente al orden Hypocreales, dentro del Filo Ascomycota. Este género de fenotipo filamentoso y con conidios en forma de canoa o plátano, fue descrito por primera vez en el año de 1809 por Link. Sin embargo, diversas especies presentan características morfológicas, fisiológicas y ecológicas inusuales, por lo que su taxonomía aún se considera compleja⁴⁰. Los hongos de este género se les encuentra frecuentemente en el suelo, presentando asociaciones tanto con las raíces como con las partes aéreas de las plantas, así como también se han encontrado presentes en ecosistemas acuáticos. Esta distribución cosmopolita les confiere la capacidad de actuar tanto como patógenos vegetales en hortalizas y cereales, causando enormes pérdidas económicas a la industria agrícola, así como patógenos oportunistas en humanos, originando una amplia gama de infecciones superficiales y sistémicas principalmente en pacientes inmunocomprometidos⁴¹. Las especies pertenecientes al género *Fusarium*

producen metabolitos secundarios diversos, algunos de ellos micotoxinas, por lo que pueden repercutir en la salud humana y animal como se mencionó anteriormente. Además de la producción de micotoxinas, algunas especies producen otros metabolitos secundarios de interés en el campo alimentario, farmacéutico y biotecnológico, con propiedades antibacterianas, antifúngicas, citotóxicas, antiparasitarias, por mencionar algunas⁴⁰ (**Figura 3**).

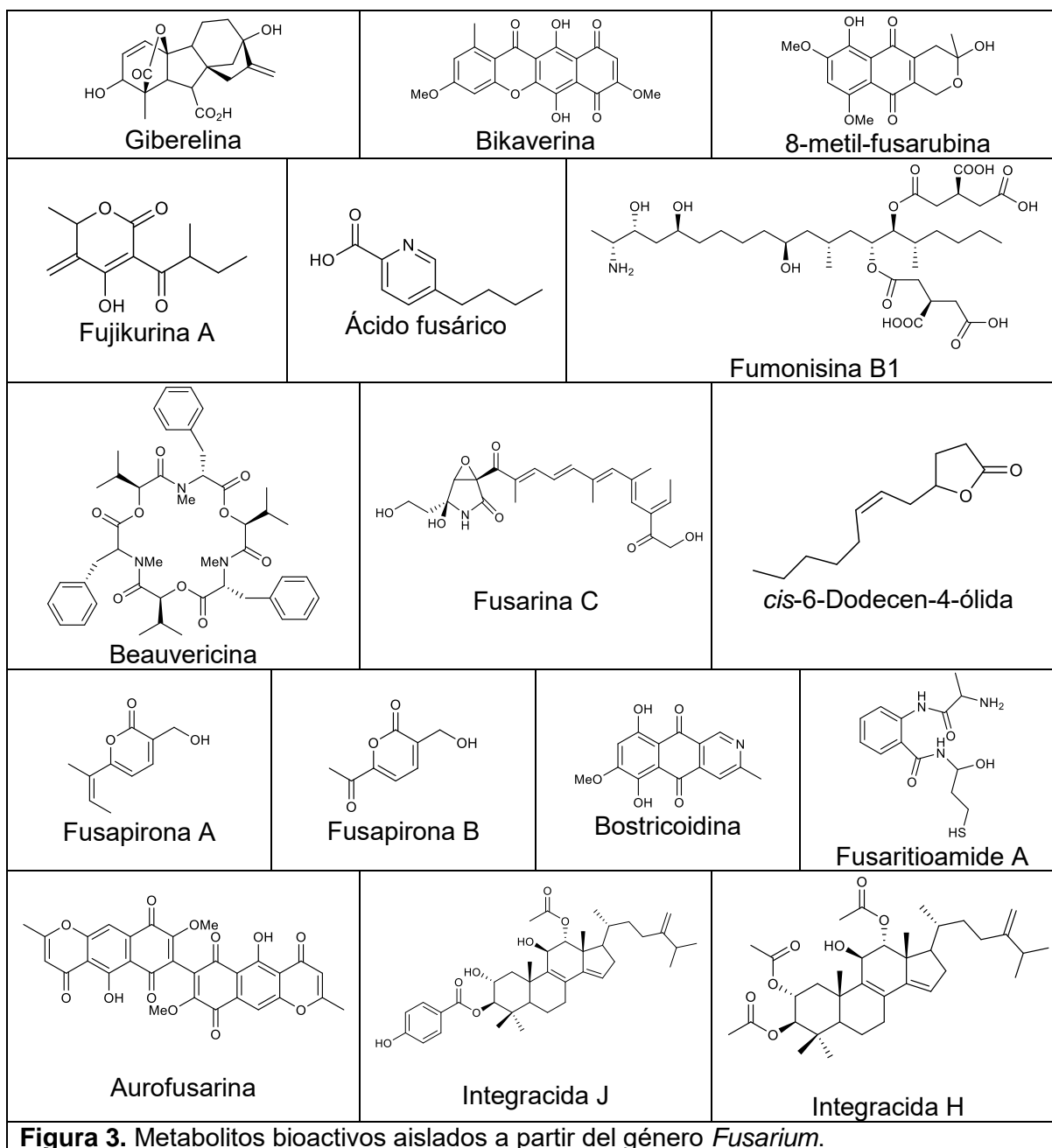


Figura 3. Metabolitos bioactivos aislados a partir del género *Fusarium*.

1.6 Antecedentes del género *Alternaria*

Alternaria es un género del orden de los Pleosporales y perteneciente al filo Ascomycota, que incluye alrededor de 300 especies saprófitas, endófitas y patógenas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en su forma sexual como asexual⁴². Estas especies se pueden encontrar en diversos hábitats, entre ellos el suelo y una amplia variedad de plantas (principalmente en las partes aéreas), incluidas cosechas de interés para el hombre y los animales, como algunos cereales, semillas, tomates, manzanas, cítricos, frutas y hortalizas⁴³. El estudio químico especies del género *Alternaria* han permitido el aislamiento de una gran diversidad de compuestos (**Figura 4**).

- *Compuestos nitrogenados*: se encuentran compuestos de tipo amida, amina y ciclopéptidos con actividad fitotóxica selectiva en función del huésped vegetal parasitado. Algunos de los metabolitos más importantes de este grupo son el ácido tenuazonico, la tentoxina, y algunas dicetopiperazinas con potencial antimicrobiano y herbicida, como la ciclo-(L-fenilalanina-*trans*-4-hidroxi-L-prolina)⁴⁴.

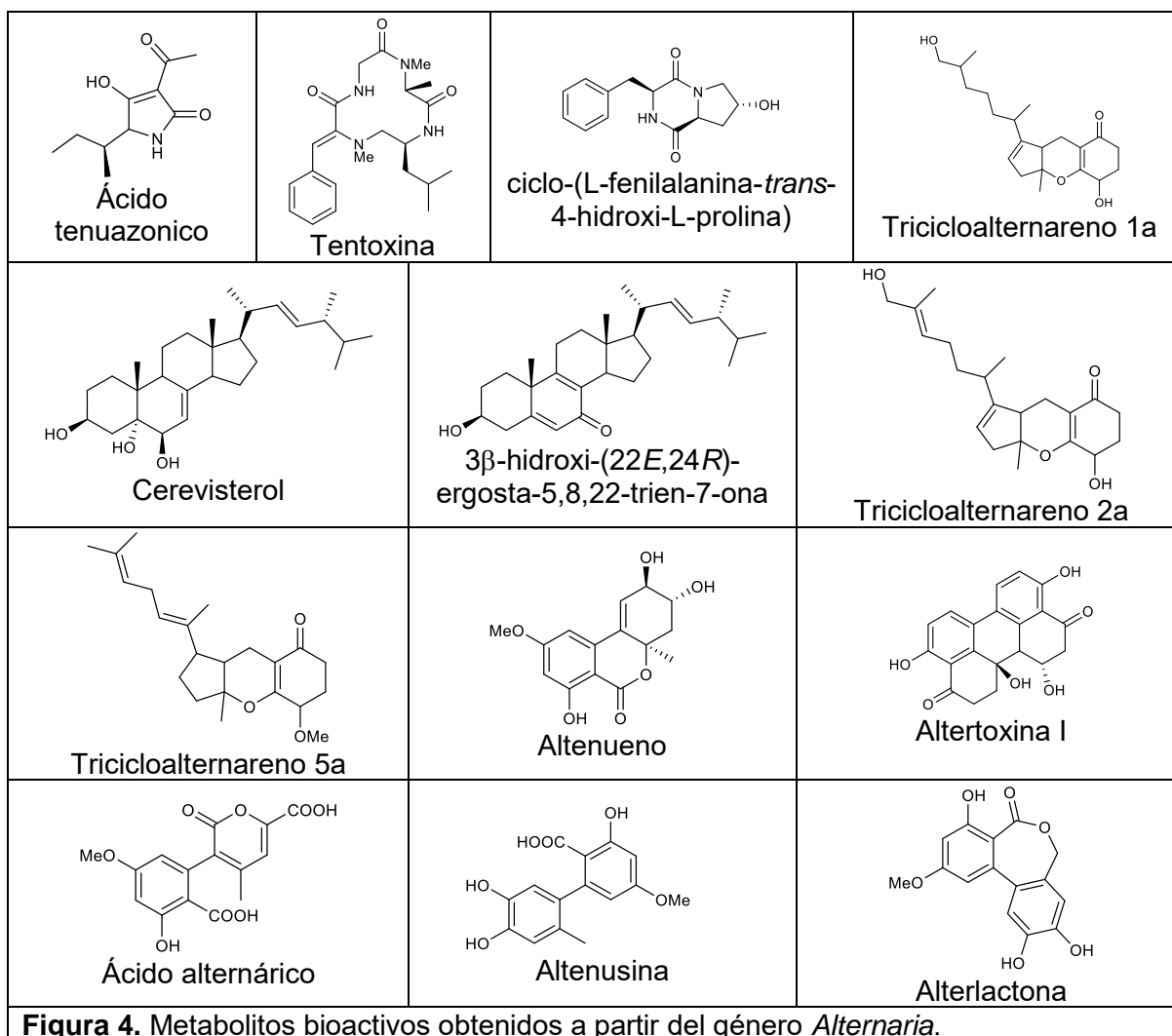
- *Esteroides*: se han aislado de estas especies el ergosterol, el cerevisterol y otros derivados. Wen Guen y colaboradores (2009) aislaron y caracterizaron los compuestos cerevisterol y la 3 β -hidroxi-(22*E*,24*R*)-ergosta-(5,8,22)-trien-7-ona. A pesar de no haber presentado actividad , antimicrobiana, antifúngica o inhibitoria de la enzima xantina oxidasa, este trabajo representó el primer reporte de la obtención de estos metabolitos a partir de un hongo del género *Alternaria*⁴⁵.

- *Terpenoides*: entre los terpenoides aislados de *Alternaria* resaltan los tricicloalternarenos, caracterizados por primera vez en el año de 1997 por Liebermann y colaboradores⁴⁶ a partir de un taxón fúngico fitopatógeno de la planta *Citrus tangerina* identificado como *Alternaria alternata*. Estos compuestos son considerados como toxinas específicas de la planta huésped⁴⁷.

- *Piranonas y quinonas*: las α -piranonas como el altenueno y las antraquinonas como la altertoxina I son los metabolitos de este grupo que han sido reportados en el

género con mayor frecuencia. Estos metabolitos secundarios, a pesar de que presentan resultados positivos en diversos bioensayos, no se les considera como compuestos líderes debido a que son micotoxinas⁴².

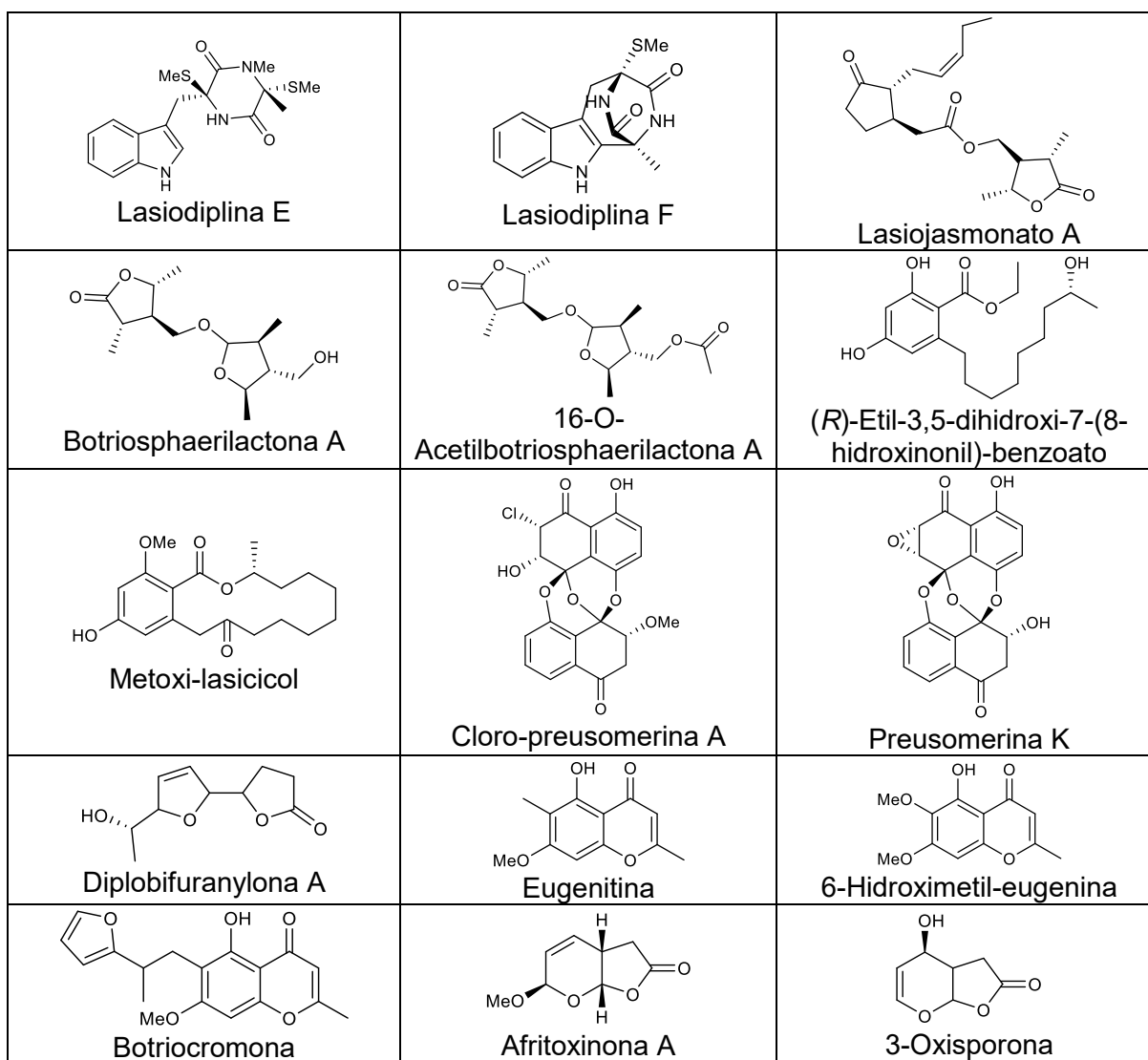
- *Compuestos fenólicos*: el ácido alternárico, la altenusina y la alterlactona son los metabolitos aislados con mayor frecuencia de este grupo. Al igual que las pironas y quinonas, son considerados micotoxinas para el hombre⁴².

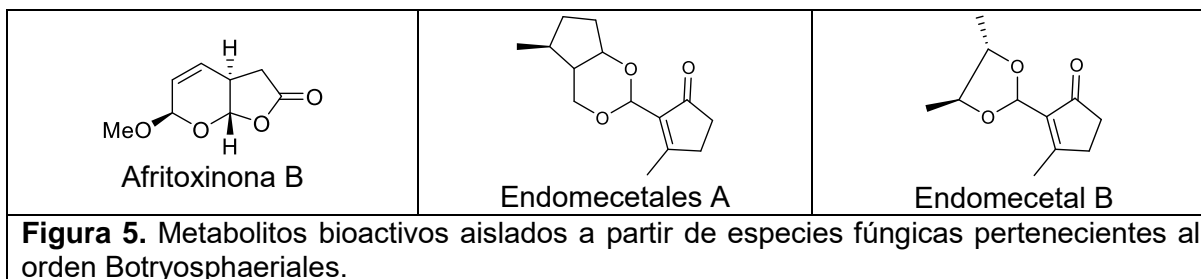


1.7 Antecedentes del orden Botryosphaerales

Botryosphaerales fue establecido como orden en el año 2006 por Schoch y colaboradores⁴⁸ con base en la caracterización de la especie *Botryosphaeria*

dothidea, patógeno causante de chancros en plantas leñosas. Numerosas especies de este orden habitan en tejidos vegetales leñosos como organismos endófitos o fitopatógenos, esto en función de las condiciones de estrés ambientales a los que estén sometidos⁴⁹. Los primeros estudios químicos que se realizaron sobre las especies *Diplodia vitícola* y *Lasiodiplodia theobromae* (Botriosphaeriaceae) permitieron la identificación de enzimas proteolíticas de tipo xilanasas, celulasas y pectinasas⁵⁰. En estudios recientes, se han logrado aislar y caracterizar moléculas de una amplia diversidad estructural y que se ilustran en la **Figura 5**⁵¹⁻⁵².





Cabe mencionar que la taxonomía del orden Botryosphaerales sigue siendo compleja y a la fecha se siguen reposicionando familias y especies que se consideran dentro de este orden⁴⁸.

2. HIPÓTESIS

Se ha descrito en estudios biológicos previos una fuerte cohesión a nivel comunidad de los microorganismos endémicos de Cuatro Ciénegas, así como un fuerte rechazo a la migración de organismos ajenos al ecosistema; entonces éstos representan una fuente valiosa para la obtención de moléculas bioactivas, estructuralmente interesantes y/o novedosas.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se mencionó en la introducción del presente manuscrito, el surgimiento de microorganismos patógenos resistentes a los agentes terapéuticos de primera elección para su tratamiento representa un grave problema de salud. Por ello, la búsqueda de productos naturales bioactivos y/o novedosos a partir de fuentes naturales como los microorganismos aislados de nichos ecológicos inexplorados de nuestro país, y que ayuden a combatir los patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, se encuentra plenamente justificada. En el caso particular de los organismos fúngicos aislados de la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila, representan fuentes naturales invaluable para la obtención de metabolitos secundarios novedosos. En este sentido, para la realización de la presente investigación se planteó como objetivo general el estudio químico de hongos aislados a partir de una muestra de placa microbiana sobre rocas recolectada en la Cueva del Junco, con la finalidad de obtener nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Para cumplir con el objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos particulares:

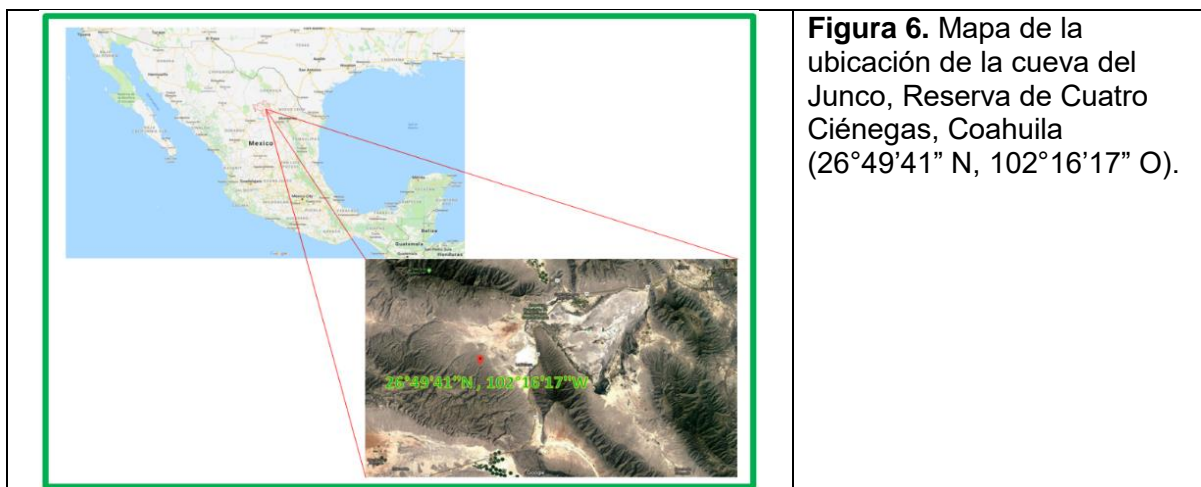
- Acondicionar un grupo de los organismos fúngicos obtenidos de una placa microbiana (serie CC8).
- Preparar los extractos orgánicos en pequeña escala y realizar los estudios de metabolómica mediante técnicas cromatográficas y espectrométricas de vanguardia.
- Seleccionar los organismos objeto de estudio con base los resultados de actividad antimicrobiana y estudios de metabolómica, y preparar los cultivos en mediana escala.
- Obtener los extractos en mediana escala de las especies selectas y realizar su estudio químico mediante técnicas cromatográficas convencionales.
- Caracterizar los metabolitos mayoritarios aislados mediante técnicas espectroscópicas (RMN 1D y 2D) y espectrométricas (HRESIMS-MS/MS).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Aislamiento de los organismos fúngicos y preparación de los extractos en pequeña escala de los taxones fúngicos procedentes de la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila

La muestra de placa microbiana depositada sobre piedras fue recolectada en la Cueva del Junco, en la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila (**Figura 6**) siguiendo el protocolo de Nagoya⁵³ y con el permiso emitido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) para su bioprospección con fines académicos y de investigación, otorgado a la Dra. Valeria F. Souza (oficio No. SGPA/DGVS/02002/16). A partir de esta muestra, se aislaron 20 taxones fúngicos identificados con el código interno CC8-1-CC8-9 y CC8-11-CC8-21, siguiendo la metodología previamente descrita por Bautista⁵⁴. Posteriormente, se inocularon en medio líquido YESD, los cuales se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital durante 5 días a 100 rpm, con fotoperiodos luz-oscuridad 12/12 h y a temperatura ambiente. Enseguida, cada inóculo líquido fue vertido sobre un sustrato sólido compuesto por arroz húmedo (20g arroz y 40 mL de H₂O), se dejaron crecer por 21 días a temperatura ambiente y ciclos de luz/oscuridad 12-12 h⁵⁴. Una vez terminado este periodo, se obtuvieron los extractos orgánicos mediante la maceración y fragmentación del micelio, empleando 90 mL de una mezcla de disolventes orgánicos compuesta por CHCl₃-MeOH (1:1), y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm en un agitador orbital por 12 h. Luego, los cultivos se filtraron para retirar la biomasa y al extracto resultante se le adicionaron CHCl₃ y H₂O hasta una proporción equivalente para realizar un proceso de reparto adecuado. La fase orgánica se llevó a sequedad a presión reducida, se resuspendió en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1), y se sometió a un segundo proceso de reparto con hexano. Finalmente, la fase de MeCN-MeOH se llevó a sequedad a presión reducida. Posteriormente los extractos orgánicos secos se sometieron a los ensayos de actividad antimicrobiana y de metabolómica por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución por electroespray (UPLC-

PDA-HRESIMS-MS/MS). Cabe mencionar que la evaluación del potencial antimicrobiano fueron realizados por los M. en C. Osmaly Villedas Hernández y Carlos Fajardo Hernández en el grupo de trabajo^{55,56}. Finalmente, todos los organismos aislados fueron resembrados en tubos Eppendorf con medio agar papa dextrosa (APD) para su posterior caracterización taxonómica y almacenamiento.



4.2 Estudios de metabolómica

Los estudios de metabolómica de los extractos orgánicos se realizaron siguiendo la metodología descrita por El-Elimat y colaboradores⁵⁷. Brevemente, los análisis por cromatografía de líquidos se efectuaron en un cromatógrafo marca Waters equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA). Para el control del equipo, la adquisición, el procesamiento y la manipulación de los datos se empleó el software Empower 2.0 (Waters). En todos los análisis se utilizó una columna Acquity BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 × 10 mm) y un sistema de elución entre ácido fórmico acuoso al 0.1% (A) y MeCN (B). El gradiente lineal utilizado inició con 15% de (B), incrementando la composición de (B) hasta un 100% en 8 minutos, y manteniendo esta composición durante 1.5 minutos, para posteriormente volver a las condiciones iniciales en 0.5 minutos. La detección en el UV se realizó en el intervalo comprendido entre 200-400 nm y todas las muestras se analizaron a la concentración de 2 mg/mL.

Por otra parte, los espectros de masas se generaron en un espectrómetro Thermo Q-Exactive de alta resolución (HRESIMS-MS/MS), mediante la técnica de electrospray en los modos positivo [ESI (+)] y negativo [ESI (-)] y utilizando nitrógeno como gas acarreador. El control del instrumento y el análisis de datos se llevaron a cabo en el software Xcalibur 2.1 (Thermo). Una vez obtenidos los perfiles cromatográficos, se realizó el análisis comparativo de los tiempos de retención, máximos en el UV y los patrones de fragmentación observados para todos los metabolitos detectados en las muestras, contra aquellos reportados en una base de datos con aproximadamente 300 micotoxinas. Con base en los resultados obtenidos a partir de este estudio y aquellos de la evaluación biológica previa, se seleccionaron los organismos candidatos para su posterior estudio químico: taxones CC8-6, CC8-11, CC8-13, CC8-15 y CC8-19.

4.3 Preparación de los cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos

Se prepararon inóculos líquidos en medio YESD de cada organismo y después de cinco días de cultivo a temperatura ambiente y agitación, fueron vertidos sobre arroz húmedo (200 g de arroz y 400 mL de H₂O), para su posterior fermentación durante 21 días. Una vez concluido el periodo de fermentación, se realizó un registro digital de los fermentados y posteriormente se realizó la preparación de los extractos orgánicos mediante procesos de maceración y reparto como se describe en el inciso 4.1 pero ajustando las cantidades empleadas de disolventes orgánicos.

4.4 Identificación de los organismos fúngicos

La identificación de los organismos fúngicos se realizó mediante la secuenciación y análisis del código de barras de las regiones ITS. Brevemente, en primer lugar se realizó el aislamiento del ADN genómico a partir de una muestra de micelio proveniente de un cultivo en medio APD, la cual se transfirió en un tubo Eppendorf con buffer de lisis de ADN. La mezcla anterior se agitó vigorosamente

en un mezclador tipo vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, el ADN se extrajo siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante del kit comercial (ADN Zymo Research). Posterior a la obtención del ADN, se realizó la amplificación de la región ITS mediante el uso de los cebadores directo (ITS1F) e inverso (ITS4), utilizando el sistema PCR Redy to Go PureTaq (Ge Healthcare), BSA (New England BioLabs Inc.) y agua. La reacción se llevó a cabo utilizando los siguientes parámetros: desnaturalización inicial (95°C) durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, para concluir con una extensión final de 8 min. a 72°C. Los productos finales de PCR se procesaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como revelador. Una vez establecido el tamaño del fragmento amplificado, se purificó utilizando geles Wizard SV y un sistema de limpieza de PCR (Promega), para su posterior secuenciación. Todas las secuencias fueron generadas en un equipo de secuenciación capilar de alto rendimiento 3730XL (Applied Biosystems) y una vez obtenidas, se realizó el análisis comparativo de homología de tipo BLAST de cada una, con aquellas secuencias reportadas en la base de datos del GenBank. Para poder identificar de manera inequívoca a una especie de microorganismo, es necesario que el porcentaje de homología sea $\geq 97\%$ (considerando solo un 3% de divergencia)².

4.5 Estudio químico

4.5.1 Procedimientos cromatográficos generales

Los análisis por cromatografía de líquidos tipo flash se realizaron en un cromatógrafo de mediana presión equipado con los detectores de arreglo de fotodiodos (PDA) y de dispersión de luz evaporativo (ELSD). El control del equipo, adquisición, procesamiento y manipulación de los datos fueron realizados con el software interno PeakTrak del equipo. Todos los análisis se realizaron utilizando gel de sílice como fase estacionaria en columnas de diferentes dimensiones; como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad entre hexano y mezclas en orden creciente de polaridad entre hexano-CHCl₃, CHCl₃-MeOH y MeOH. En el caso de

los fraccionamientos secundarios realizados por esta misma técnica, se empleó un gradiente de elución entre hexano y diferentes mezclas entre hexano-CHCl₃, CHCl₃-AcOEt, AcOEt-MeOH y MeOH.

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) a nivel analítico se realizaron en un equipo marca Waters equipado con los detectores de PDA y ELSD, una bomba de gradiente cuaternaria y un inyector automático. Todos los análisis se realizaron en una columna tipo C₁₈ con un tamaño de partícula de 5 µm, con un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 250 mm. El control del equipo, la adquisición, procesamiento y manipulación de los datos fueron realizados a través del software Empower 2.0. La concentración de las muestras utilizada en estos análisis fue de 3 mg/mL inyectado en un volumen de 25 µL. La elución se realizó en un sistema gradiente lineal formado por la mezcla binaria de ácido fórmico acuoso (0.1%; A) y MeCN (B) como a continuación se indica: 15% B (0-5 minutos); 100% B (5-20 minutos); 100% B (20-25 minutos); y finalmente 15% B (25-32 minutos). La velocidad de flujo fue de 1 mL/min, y las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos estuvieron comprendidas en un intervalo de detección entre 200-400 nm.

Una vez determinadas las condiciones analíticas se realizó el escalamiento a una columna preparativa lo que permitió la separación y purificación de los constituyentes de las fracciones primarias y/o secundarias. Estos análisis se realizaron en una columna preparativa C₁₈ con un tamaño de partícula de 5 µm, con un diámetro interno de 21.2 mm y una longitud de 250 mm, utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas en el párrafo anterior. La concentración de todas las muestras analizadas fue de 20 mg/150 µL.

4.5.2 Caracterización de los productos aislados

La caracterización de los productos aislados se realizó mediante el uso de métodos espectroscópicos por resonancia magnética nuclear (RMN) mono- (^1H y ^{13}C) y bi-dimensionales (COSY, HSQC, HMBC) y espectrométricos (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS). Los espectros de RMN se registraron en el equipo JEOL-ECS-400 (^1H , 400 MHz y ^{13}C 100 MHz), empleándose como disolventes CDCl_3 , CD_3OD y/o $\text{DMSO}-d_6$. Los espectros de masas fueron generados mediante la técnica de ionización de electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo, en un espectrómetro Q-Exactive empleando las mismas condiciones de análisis descritas en el inciso 4.5.1. Todos los análisis de RMN y EM se registraron en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

4.5.3 Aislamiento y purificación del compuesto 1

El extracto orgánico (403.8 mg) de la especie CC8-6 se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante una cromatografía en columna tipo flash (**Figura 7**). De este proceso cromatográfico se obtuvieron nueve fracciones primarias (**Cuadro 1**).

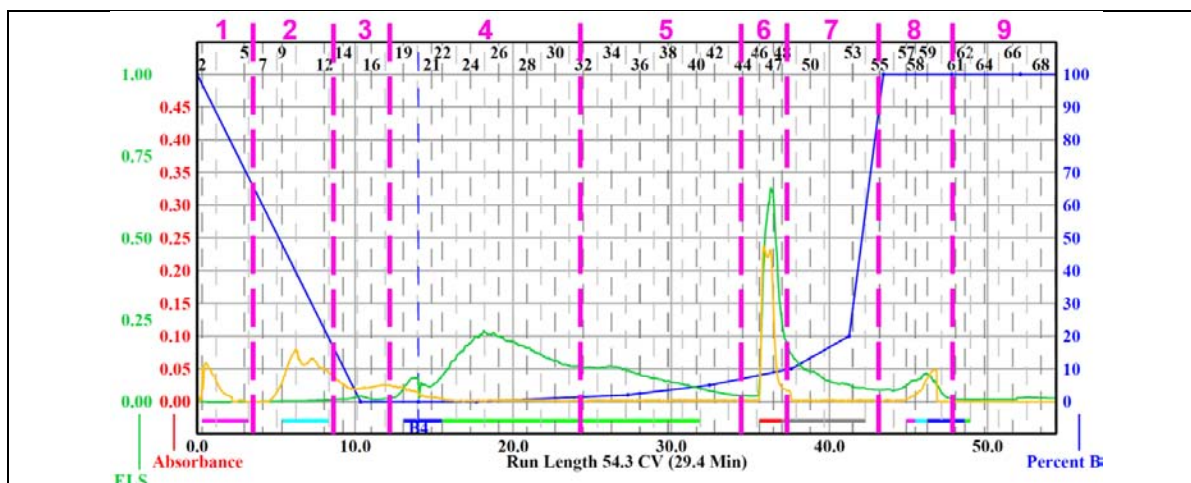


Figura 7. Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-6. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELS.

Cuadro 1. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico de la especie CC8-6.		
Fracción	Clave	Peso (mg)
1-6	01002-63-1	0.9
7-13	01002-63-2	0.9
14-17	01002-63-3	4.7
18-31	01002-63-4	163.6
32-44	01002-63-5	60.9
45-48	01002-63-6	91.3
49-55	01002-63-7	31.7
56-60	01002-63-8	29.1
61-69	01002-63-9	7.0
Total recuperado (mg)		390.1
Rendimiento (%)		96.6

La resolución de la fracción primaria 01002-63-8 (29.1 mg) mejoró al modificar la composición del gradiente como se describe a continuación: 60-100% B (0-10 minutos); 100% B (10-15 minutos); y finalmente 60% B (15-22 minutos). La purificación a nivel preparativo de esta fracción permitió el aislamiento de 3.6 mg del compuesto **1**.

4.5.4 Aislamiento y purificación del alternariol monometil éter (**2**) y alternariol (**3**)

El extracto orgánico de la especie CC8-13 se sometió a un fraccionamiento primario utilizando una cromatografía en columna tipo flash (1.33 g) (**Figura 8**; **Cuadro 2**).

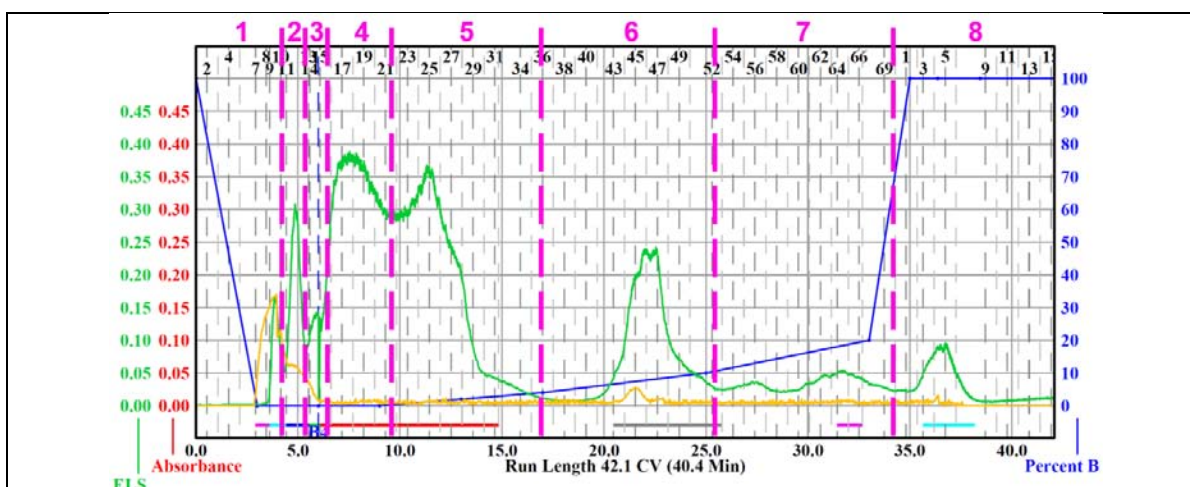


Figura 8. Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-13. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELS.

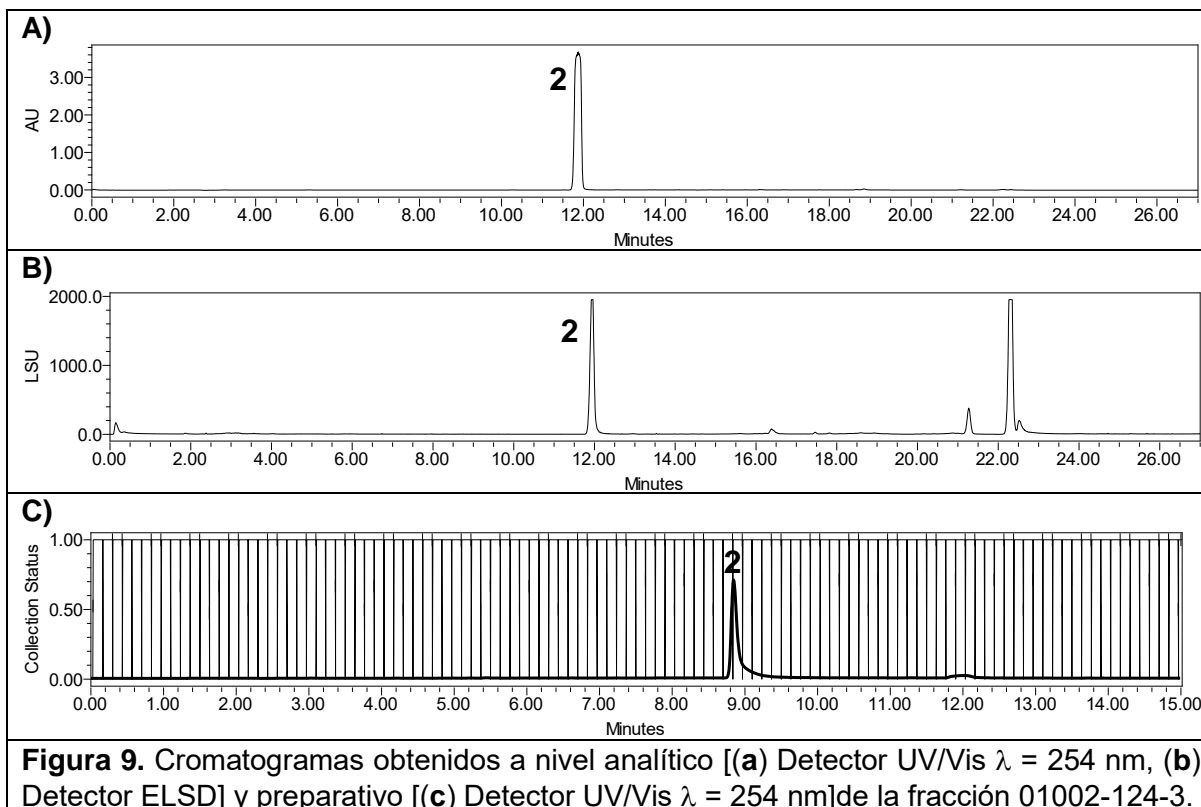
Cuadro 2. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico de la especie CC8-13

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-10	01002-65-1	12.0
11-12	01002-65-2	37.9
13-14	01002-65-3	16.9
15-21	01002-65-4	310.1
22-35	01002-65-5	258.8
36-52	01002-65-6	139.5
53-70	01002-65-7	79.0
71-85	01002-65-8	163.4
Total recuperado (mg)		390.1
Rendimiento (%)		96.6

La fracción primaria 01002-65-5 (258.8 mg) se sometió a un segundo fraccionamiento en una columna tipo flash (**Cuadro 3**). El proceso de elución se llevó a cabo utilizando hexano, hexano-CHCl₃ (diferentes proporciones), CHCl₃-MeOH (diferentes proporciones) y MeOH. La resolución de la fracción secundaria 01002-124-3 por HPLC analítico y preparativo fue optimizada utilizando el gradiente: 40-100% B (0-10 minutos); 100% B (10-15 minutos); y finalmente 40% B (15-22 minutos), y permitió la obtención de 1.6 mg del derivado mono metil éter del alternariol (**2**) (**Figura 9**)^{45,58-59}.

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-65-5.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-26	01002-124-1	8.1
27-36	01002-124-2	56.0
37-54	01002-124-3	17.4
55-63	01002-124-4	12.3
64-84	01002-124-5	47.3
85-100	01002-124-6	42.6
101-109	01002-124-7	10.7
110-130	01002-124-8	13.2
Total recuperado (mg)		207.6
Rendimiento (%)		80.21



Por otra parte, la fracción primaria 01002-65-6 (139.5 mg; **Figura 10**) también se sometió a un segundo fraccionamiento en una columna tipo flash, utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas para la fracción 01002-65-5, obteniéndose un conjunto de ocho fracciones secundarias (**Cuadro 4**).

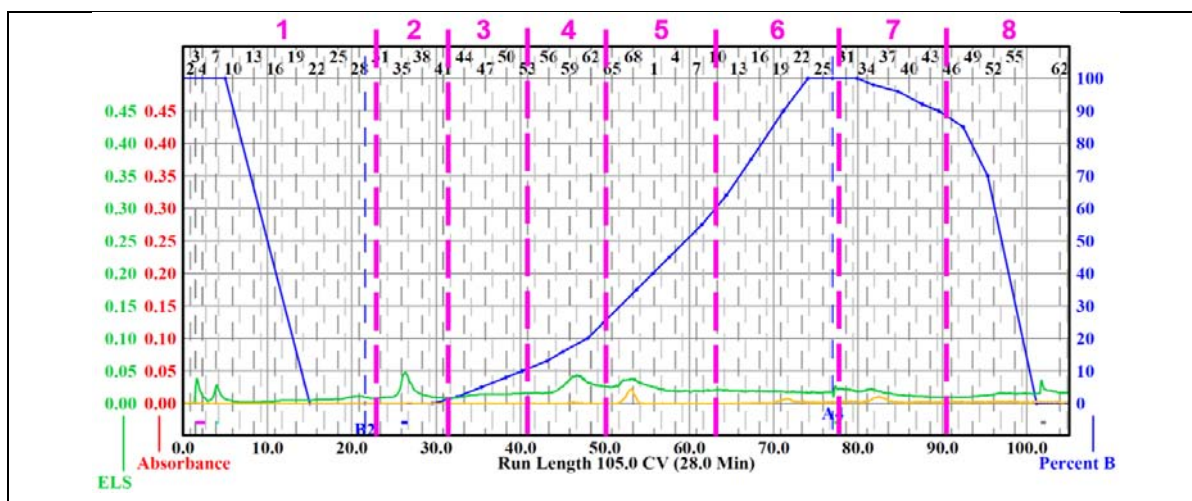
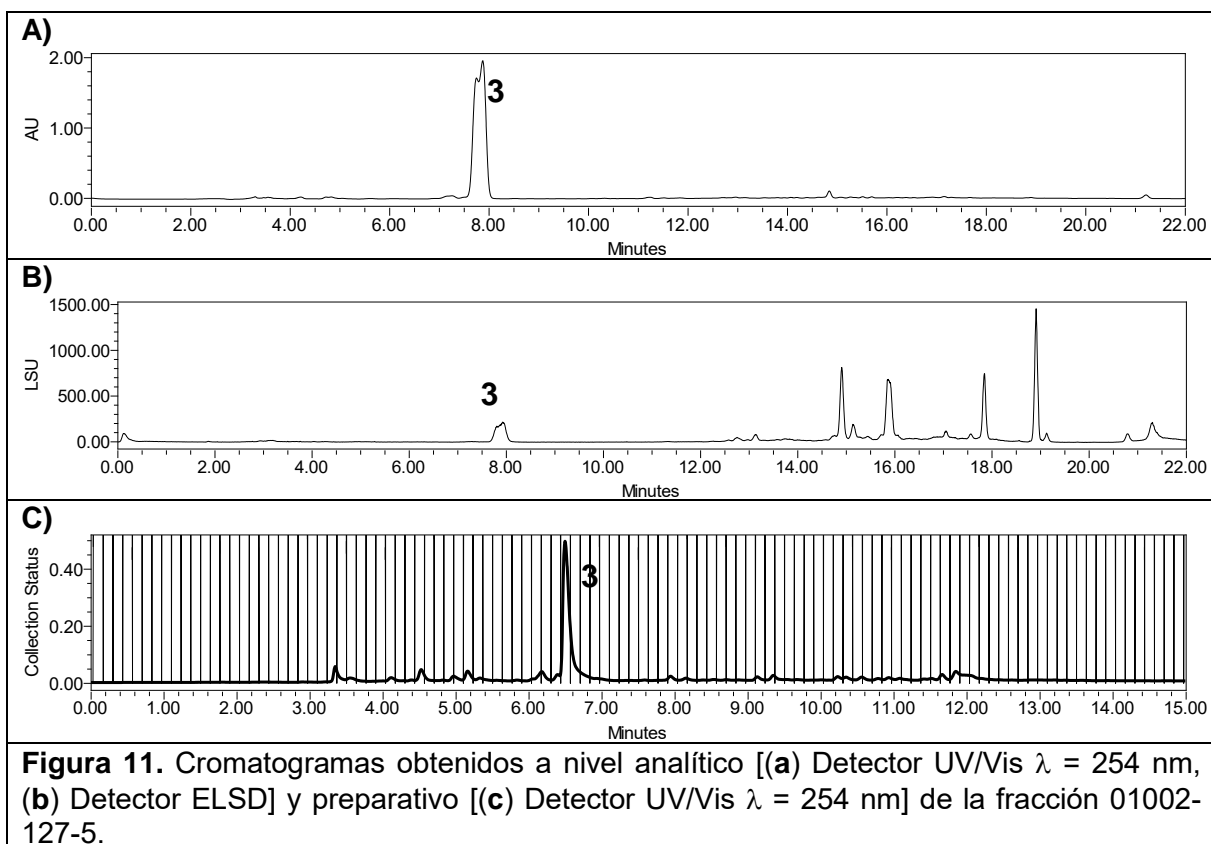


Figura 10. Perfil cromatográfico del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-65-6. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELSD.

Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-65-6.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-31	01002-127-1	1.6
32-41	01002-127-2	2.6
42-54	01002-127-3	3.9
55-64	01002-127-4	9.7
65-79	01002-127-5	23.2
80-100	01002-127-6	32.3
101-115	01002-127-7	17.0
116-132	01002-127-8	11.6
Total recuperado (mg)		101.9
Rendimiento (%)		73.04

La resolución de la fracción secundaria 01002-127-5 (23.2 mg) por HPLC analítico y preparativo mejoró utilizando como sistema de elución al gradiente lineal constituido por ácido fórmico acuoso al 0.1% (A) y MeCN (B) en las siguientes proporciones: 40-100% B (0-10 minutos); 100% B (10-15 minutos); y finalmente 40% B (15-22 minutos); permitió la obtención de 1.3 mg del alternariol (**3**) (**Figura 11**).



4.5.5 Aislamiento y purificación del epicoccólido B (4)

El extracto orgánico (351.5 mg) de la especie identificada con la clave CC8-11 se fracciona en una columna cromatográfica tipo flash utilizando gel de sílice como fase estacionaria (inciso 4.5.1). El proceso de elución se efectuó con hexano-CHCl₃-MeOH (**Figura 12**). Este proceso generó un total de seis fracciones primarias (**Cuadro 5**).

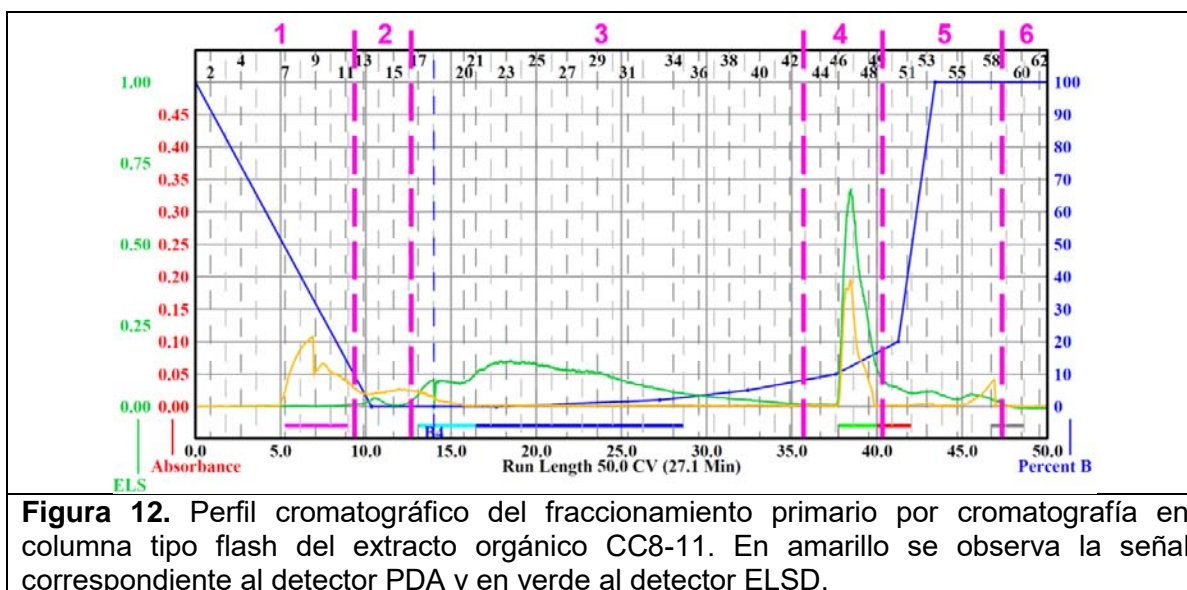
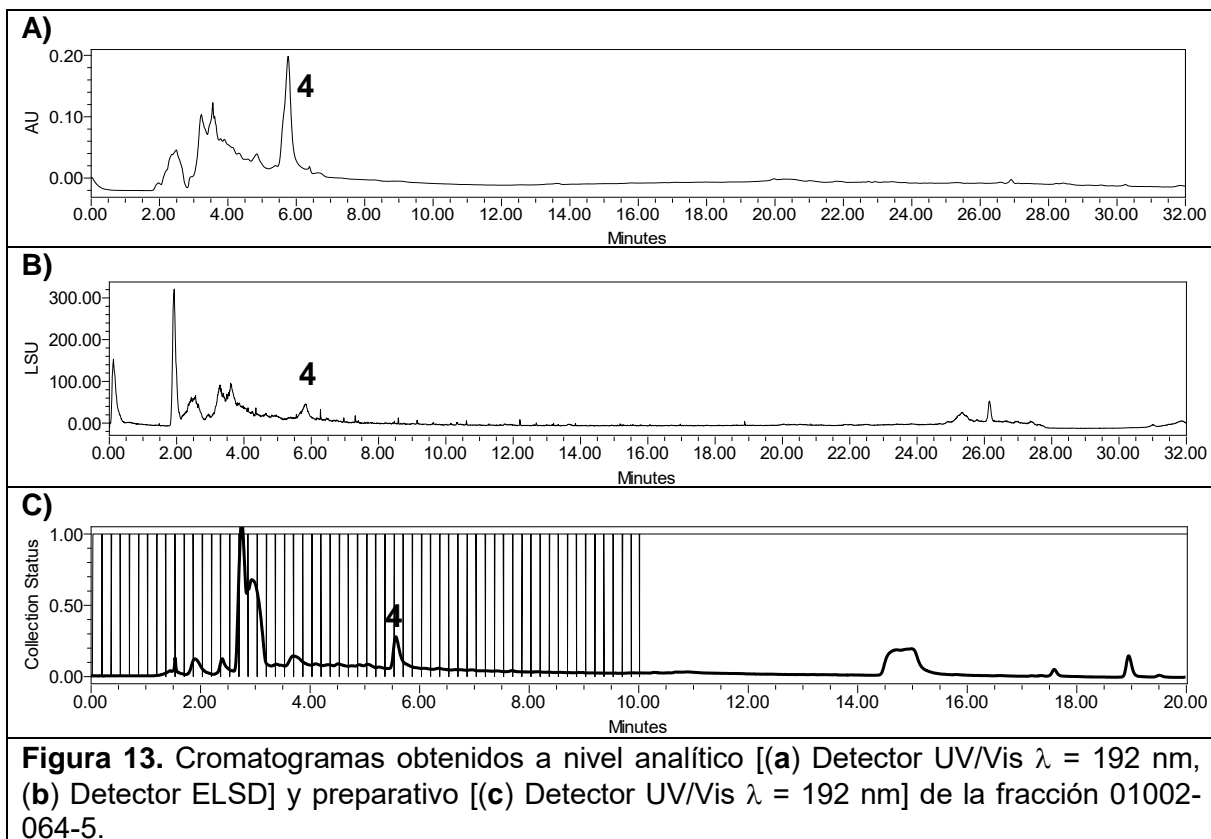


Figura 12. Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-11. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELS.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-11.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-12	01002-64-1	1.3
13-15	01002-64-2	0.0
16-43	01002-64-3	182.2
44-49	01002-64-4	104.8
50-58	01002-64-5	35.6
59-63	01002-64-6	2.0
Total recuperado (mg)		325.9
Rendimiento (%)		92.71

La fracción primaria 01002-064-5 (35.6 mg) se purificó mediante HPLC en un gradiente lineal de ácido fórmico acuoso al 0.1% (A) y MeCN (B) en las siguientes proporciones: [40-100% B (0-15 minutos); 100% B (15-20 minutos); y finalmente 40% B (20-27 minutos) (**Figura 13**), permitiendo el aislamiento y la purificación del compuesto **4** (1.0 mg) identificado como el epicoccólido B^{39,60-61}.



4.5.6 Aislamiento y purificación de la (*E*)-9-eteno-de-*O*-metil-lasiodiplodina (5) y su derivado epoxidado (6)

El extracto orgánico (846 mg) de la especie CC8-19 se fraccionó de manera preliminar mediante la misma estrategia metodológica descrita anteriormente para las otras tres especies objeto de estudio. En el **Cuadro 6** se resume el proceso cromatográfico realizado.

Cuadro 6. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna tipo flash del extracto orgánico CC8-19.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-10	01002-70-1	2.4
11-12	01002-70-2	53.9
13-14	01002-70-3	435.8
15-21	01002-70-4	21.6
22-35	01002-70-5	164.6
36-52	01002-70-6	71.5
53-70	01002-70-7	21.7
71-85	01002-70-8	19.1
Total recuperado (mg)		790.6
Rendimiento (%)		93.45

La fracción primaria 01002-70-3 (435.8 mg) se recromatografió mediante una cromatografía en columna abierta tipo flash (**Figura 14 y Cuadro 7**):

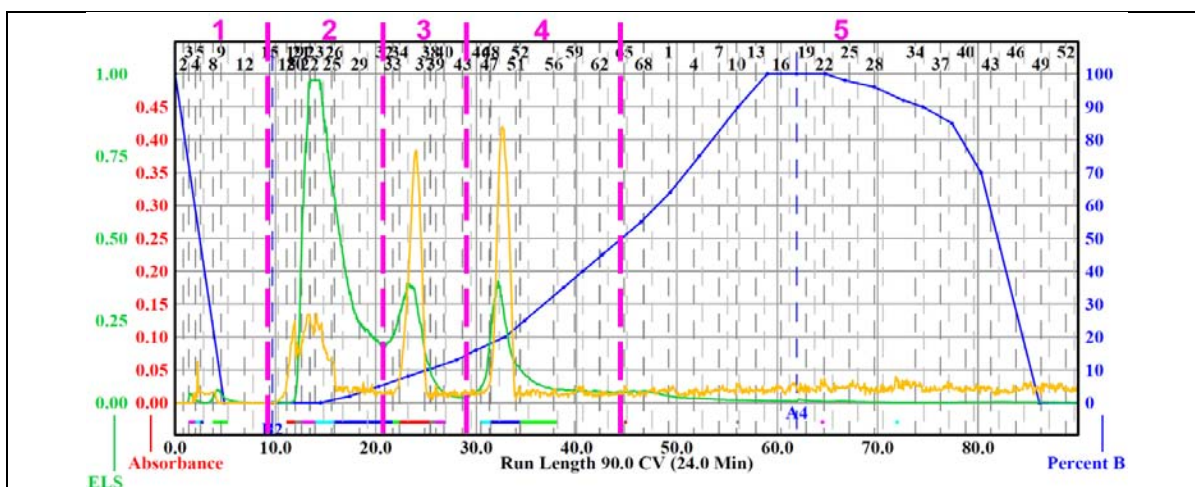
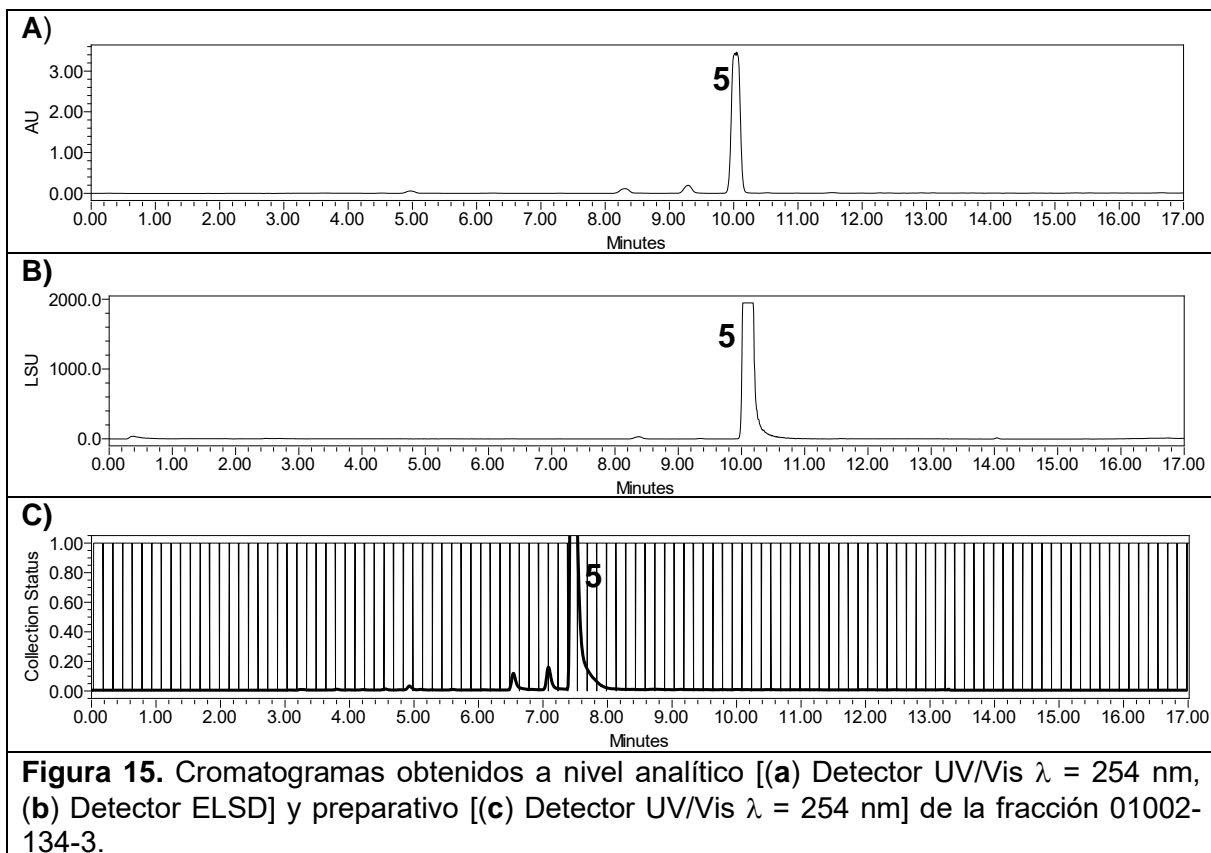


Figura 14. Perfil cromatográfico del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-70-3. En amarillo se observa la señal correspondiente al detector PDA y en verde al detector ELS.

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo flash de la fracción primaria 01002-70-3.

Fracción	Clave	Peso (mg)
1-14	01002-134-1	1.0
15-31	01002-134-2	179.9
32-43	01002-134-3	41.3
44-63	01002-134-4	66.7
64-123	01002-134-5	72.3
Total recuperado (mg)		361.2
Rendimiento (%)		82.88

A partir de la fracción secundaria 01002-134-3 mediante HPLC preparativo utilizando un gradiente de elución lineal de ácido fórmico (0.1% **A**) y MeCN (**B**): [60-100% **B** (0-5 minutos); 100% **B** (5-10 minutos); y finalmente 60% **B** (10-17 minutos) (**Figura 15**)] se realizó el aislamiento de 12.8 mg de un sólido blanco, identificado como la (*E*)-9-eteno-de-*O*-metil-lasiodiplodina (**5**)⁶².



Finalmente, de la fracción secundaria 01002-134-4 utilizando la misma metodología analítica descrita en el párrafo anterior se realizó el aislamiento y la purificación de 15.4 mg del compuesto **6**.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto multidisciplinario enfocado en la bioprospección de microorganismos selectos aislados a partir de nichos ecológicos inexplorados de México, con el propósito de descubrir nuevas entidades químicas bioactivas, y con ello contribuir al conocimiento científico de la biodiversidad fúngica de México; en particular, aquella presente en la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Las muestras para la obtención de los recursos genéticos se recolectaron siguiendo el protocolo de Nagoya, y con la autorización de la SERMARNAT y la asamblea del Ejido del Venado, estando de acuerdo los ejidatarios que los beneficios serán en la fase comercial de la bioprospección (Access and Benefit Sharing). Para cumplir los objetivos planteados en esta investigación, se implementó la estrategia experimental resumida en la **Figura 16**:

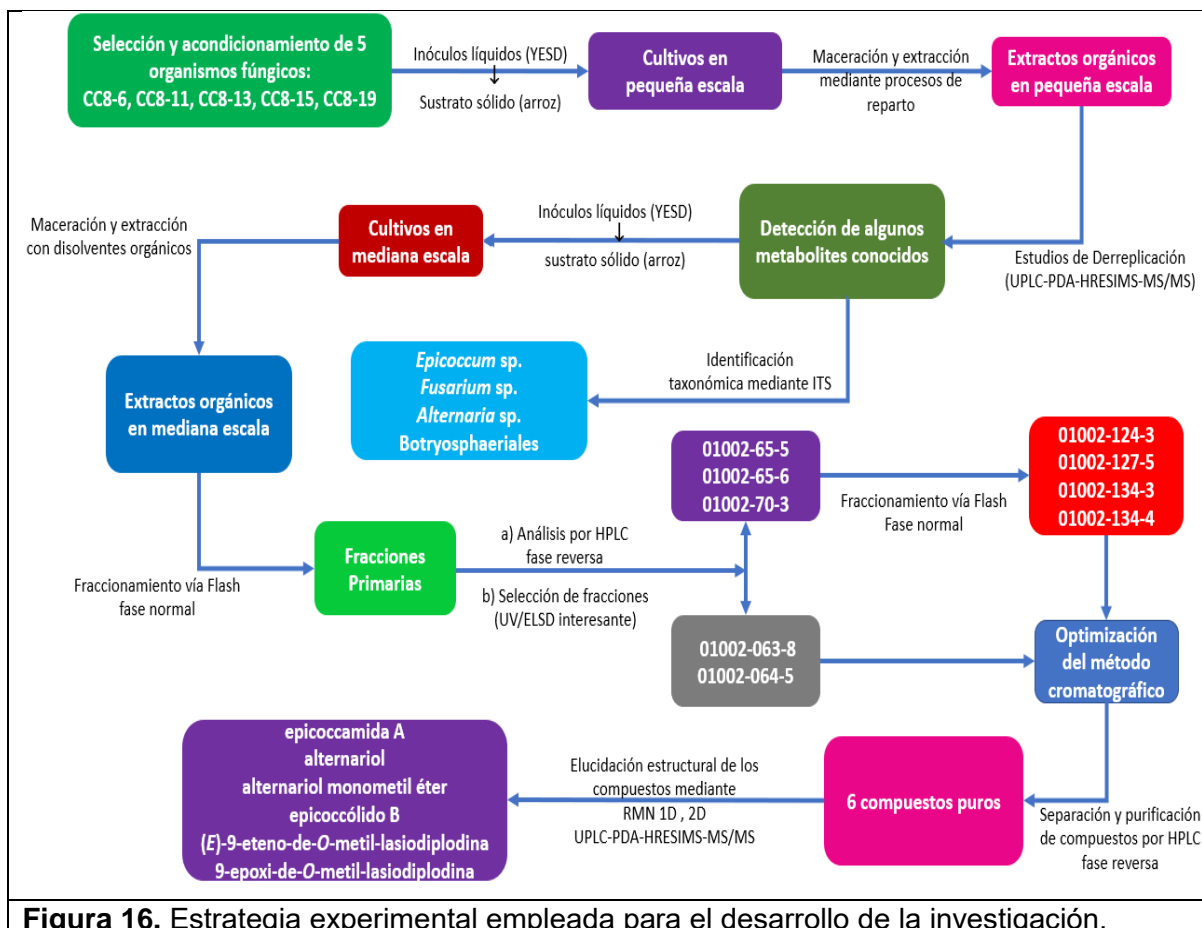


Figura 16. Estrategia experimental empleada para el desarrollo de la investigación.

En los siguientes párrafos se describirán, en primera instancia, los resultados derivados del aislamiento, la evaluación biológica y estudios de metabolómica de los organismos fúngicos objeto de estudio. Posteriormente, se detallarán los resultados derivados de los estudios químicos de las cuatro especies fúngicas seleccionadas.

5.1 Acondicionamiento de los taxones fúngicos

Se realizó el acondicionamiento mediante resiembras en caja Petri de cinco organismos fúngicos pertenecientes a la serie CC8 (**Figura 17**), que previamente habían demostrado un potencial antimicrobiano importante (**Cuadro 8**)⁵⁶. Dichos taxones fueron aislados a partir de una muestra de placa microbiana sobre piedras recolectada en la cueva del Junco (26°49'41" N, 102°16'17" O), en la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Una vez que se corroboró la viabilidad y pureza de cada cultivo con base en sus características morfológicas macroscópicas, fueron resembrados en medio APD en tubos Eppendorff para su conservación y posterior caracterización taxonómica, así como en medio de cultivo líquido YESD para la preparación de los inóculos líquidos, y la posterior preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala.

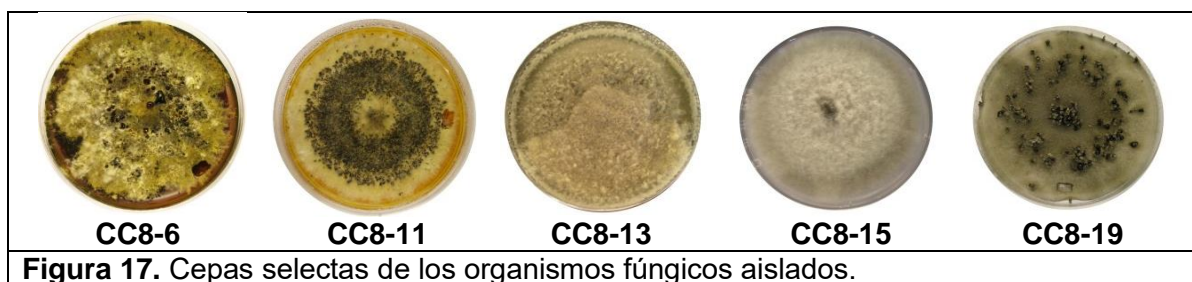


Figura 17. Cepas selectas de los organismos fúngicos aislados.

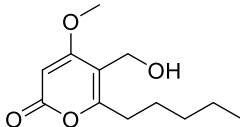
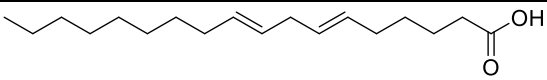
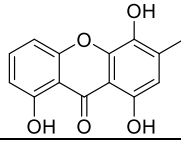
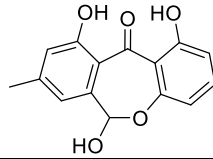
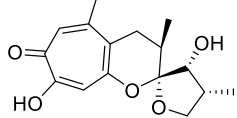
Cuadro 8. Rendimiento de los extractos orgánicos en pequeña escala y resultados de actividad antimicrobiana de los hongos selectos de la serie CC8 aislados de la Reserva de Cuatro Ciénegas⁵⁶.

Extracto	Peso (mg)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC8-6	102.0		IP	I		IP	
CC8-11	52.8			IP	IP	IP	I (IP)
CC8-13	126.6		IP	IP		IP	
CC8-15	44.6		I	IP		IP	I
CC8-19	73.6		IP	IP	IP	IP	
CIM (µg/mL) control positivo:		1.3-2.5 (gentamicina)	0.8 (ampicilina)	0.2 (ampicilina)	3.9-7.8 (ampicilina)	1.6 (ampicilina)	12.5 (nistatina)
		Inhibición total a 20 µg/mL y a 200 µg/mL					
		Inhibición parcial a 20 µg/mL y total a 200 µg/mL					
		Inhibición total sólo a 200 µg/mL					
		Inhibición parcial a 20 µg/mL y a 200 µg/mL					
		Inhibición parcial sólo a 200 µg/mL					

5.2 Estudios de metabolómica

Los análisis de metabolómica de los extractos orgánicos en pequeña escala se realizaron mediante la técnica UPLC-PDA-HRESI-MS/MS. Los resultados obtenidos del análisis comparativo de los tiempos de retención, perfiles en el UV y patrones de fragmentación de los compuestos detectados con aquellos reportados en la base de datos especializada permitieron establecer la presencia de la pirenocina M, arugosina F, *ent*-malettinina B, un derivado de ácido graso y uno de xantona (**Cuadro 9**). Es importante mencionar que a pesar de que los taxones seleccionados presentaban algunos metabolitos conocidos, éstos no fueron descartados de su posterior estudio químico debido a que provienen de un hábitat inexplorado.

Cuadro 9. Metabolitos detectados en los estudios de metabolómica en los taxones CC8-6, CC8-11, CC8-13, CC8-15 y CC8-19.

Hongo de Procedencia	Compuesto detectado	Estructura Química
CC8-6	Pirenocina M	
CC8-11	Ácido 6,9-octadecadienoico	
CC8-13	1,4,8-Trihidroxi-3-metilxantona	
CC8-15	Arugosina F	
CC8-19	<i>ent</i> -Malettinina B	

Una vez realizados los análisis de metabolómica y comparados con el potencial antimicrobiano previamente reportado para estos taxones, se realizó la preparación de los extractos orgánicos en mediana escala (10×; **Figura 18**) siguiendo la estrategia descrita previamente en el inciso **4.3**.



5.3 Identificación taxonómica de los organismos fúngicos seleccionados

En una colaboración con el Dr. Huzefa Raja, de la Universidad de Carolina del Norte, en Greensboro (UNCG), se llevó a cabo la identificación taxonómica de las especies seleccionadas para su estudio químico, mediante el análisis molecular de código de barras correspondiente a la región ITS. Una vez secuenciada la región ITS para cada organismo seleccionado como se detalla en la sección 4.4 del presente manuscrito, se realizó un análisis de homología tipo BLAST mediante el estudio comparativo de las secuencias amplificadas con aquellas reportadas en la base de datos de GenBank. Los resultados de BLAST permitieron la identificación de las especies CC8-6 como *Epicoccum* sp., CC8-11 como *Fusarium* sp., las especies CC8-13 y CC8-15 fueron clasificadas como *Alternaria* sp., y finalmente la especie CC8-19 como perteneciente al orden de Botryosphaerales. Cabe mencionar que debido a que el análisis comparativo entre todas las secuencias analizadas y las reportadas en la base de datos de GenBank fue menor al 97%, no se logró identificar a los organismos objeto de estudio a nivel de especie.

5.4 Estudio químico de las especies fúngicas seleccionadas

A partir de los cultivos en gran escala, se realizó la preparación de los extractos orgánicos correspondientes mediante la técnica de maceración y procesos de reparto. Posteriormente, los extractos activos fueron analizados y fraccionados mediante el uso de técnicas cromatográficas (columna tipo flash y HPLC) utilizando gel de sílice y C₁₈ como fases estacionarias, respectivamente,

como se indicó en la sección experimental. Estos procesos cromatográficos permitieron el aislamiento de los productos **1-6**. En las siguientes secciones se describe brevemente la elucidación estructural de cada uno de estos compuestos.

5.4.1 Caracterización del compuesto 1

El compuesto **1** se obtuvo mediante la purificación vía HPLC de la fracción primaria 01002-063-8 (inciso **4.5.3** parte experimental). Los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$ en una relación masa-carga (m/z) 558.3615 y 556.3490, respectivamente, del compuesto **1** permitieron establecer su fórmula molecular como $C_{29}H_{52}N_1O_9$, la cual permite 5 grados de insaturación (**Figura 19**).

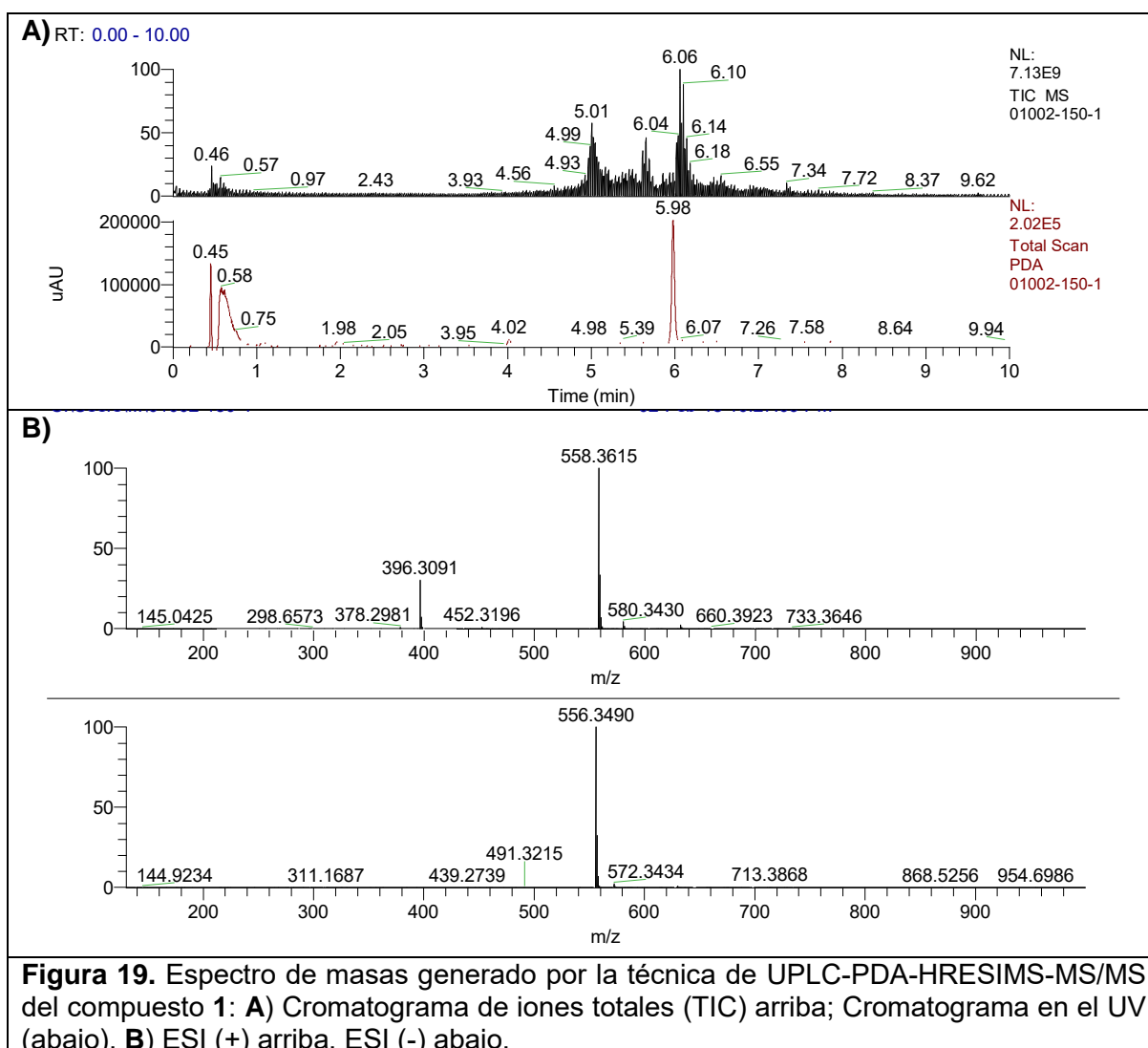
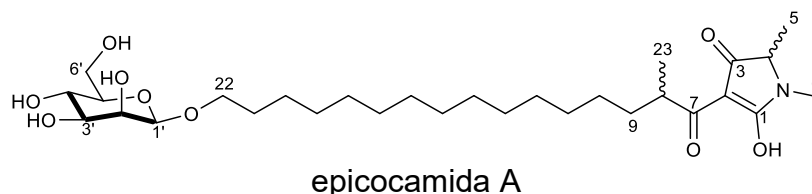


Figura 19. Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto **1**: **A)** Cromatograma de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). **B)** ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.

La búsqueda de los iones moleculares de **1** en las bases de datos Diccionario de Productos Naturales y SciFinder arrojó como único resultado para este valor de masa exacta a la epicoccamida A, derivado glucosilado del ácido tetrámico aislado del hongo *Epicoccum purpurascens*⁶³.



El espectro de ^1H RMN (**Figura 20**) del compuesto **1** mostró las señales correspondientes con la presencia en la molécula de un residuo de hexosa (δ_{H} 3.19-3.89), una cadena alifática (δ_{H} 1.19-1.37) y un *N*-metil derivado del ácido tetrámico (δ_{H} 1.27, 2.89 y 3.54). Además, en el espectro de ^{13}C RMN (**Figura 21**) se observaron 23 señales, que de acuerdo a los espectros de HSQC y HMBC (**Figuras 22 y 23**), correspondían a un metilo, quince metilenos, seis metinos y un carbono cuaternario (**Tabla 1**). Los carbonos en δ_{C} 63.0, 68.7, 72.7, 75.5, 78.4 y 101.9 se encontraban unidos a funciones oxigenadas, lo que es congruente con la presencia de la porción sacárida.

El análisis detallado de los espectros del producto **1** evidenció que algunas señales, a pesar de estar en los mismos desplazamientos químicos que las reportadas para la epicoccamida A (**Tabla 1**), presentaron valores de integración diferente (posiblemente por los efectos tautoméricos que se presentan en este tipo de productos)⁶⁴, además de que otras sólo se pudieron deducir con base en los experimentos bidimensionales. Asimismo, la escasez de material para el registro de espectros de RMN con un tiempo de adquisición mayor, nos impidieron confirmar de manera inequívoca que el producto **1** es la epicoccamida A.

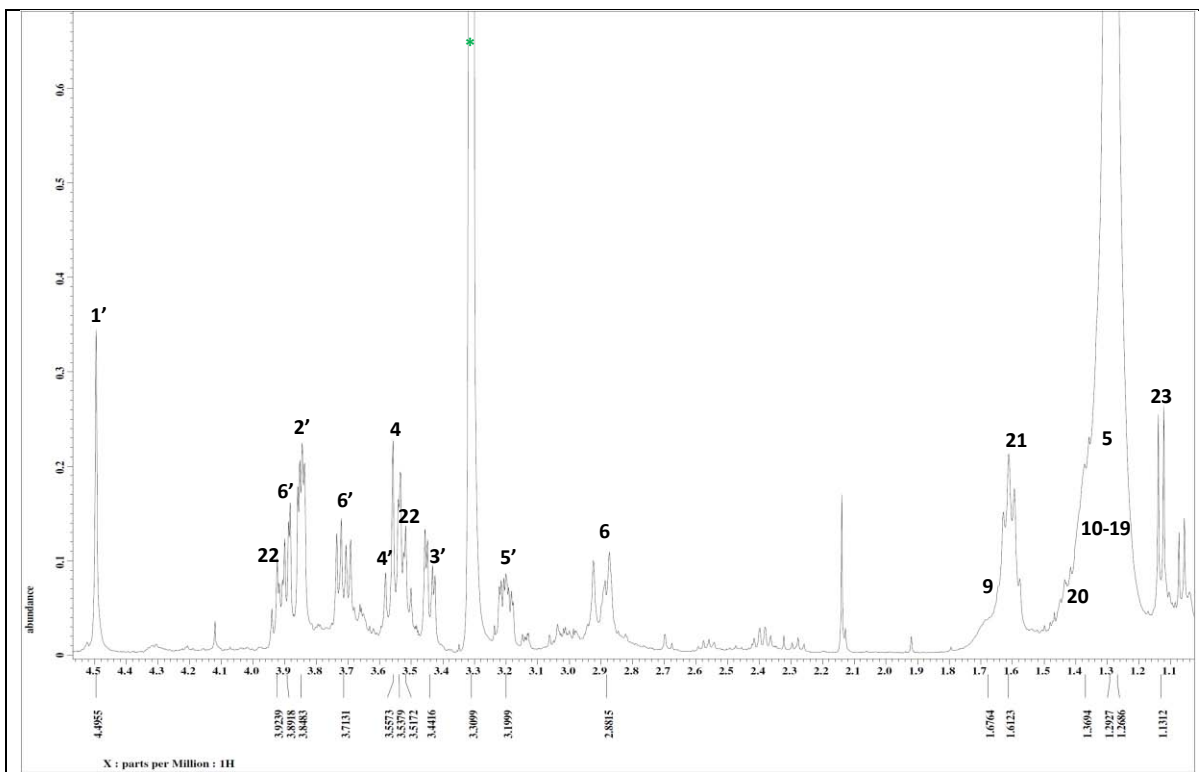


Figura 20. Espectro de ^1H RMN del compuesto 1 (CD_3OD ; 400 MHz.).

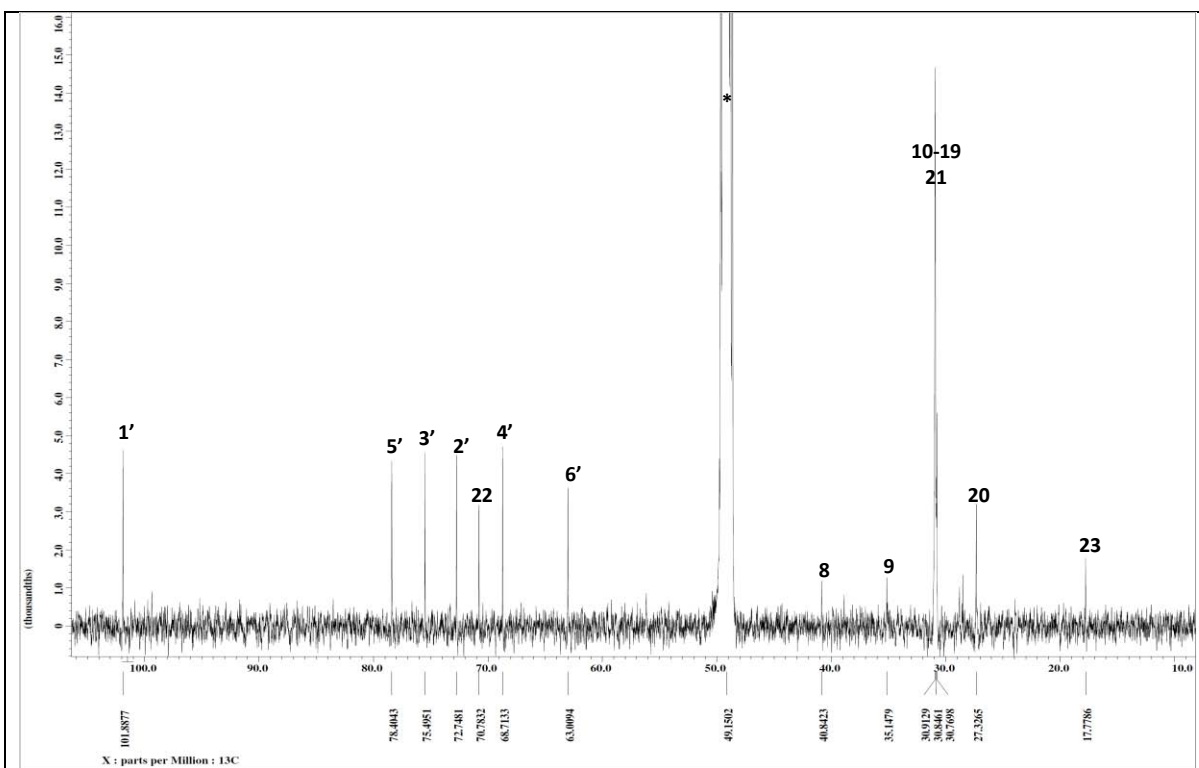


Figura 21. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto 1 (CD_3OD ; 100 MHz).

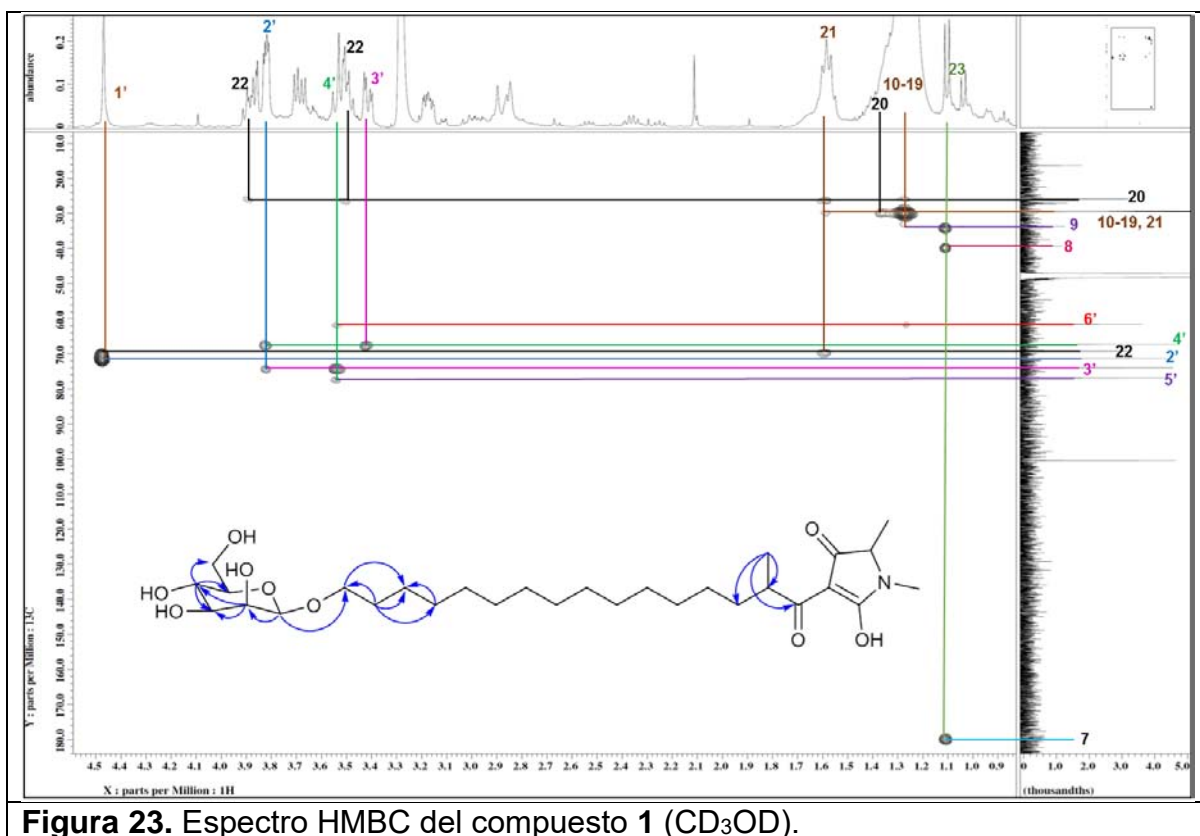
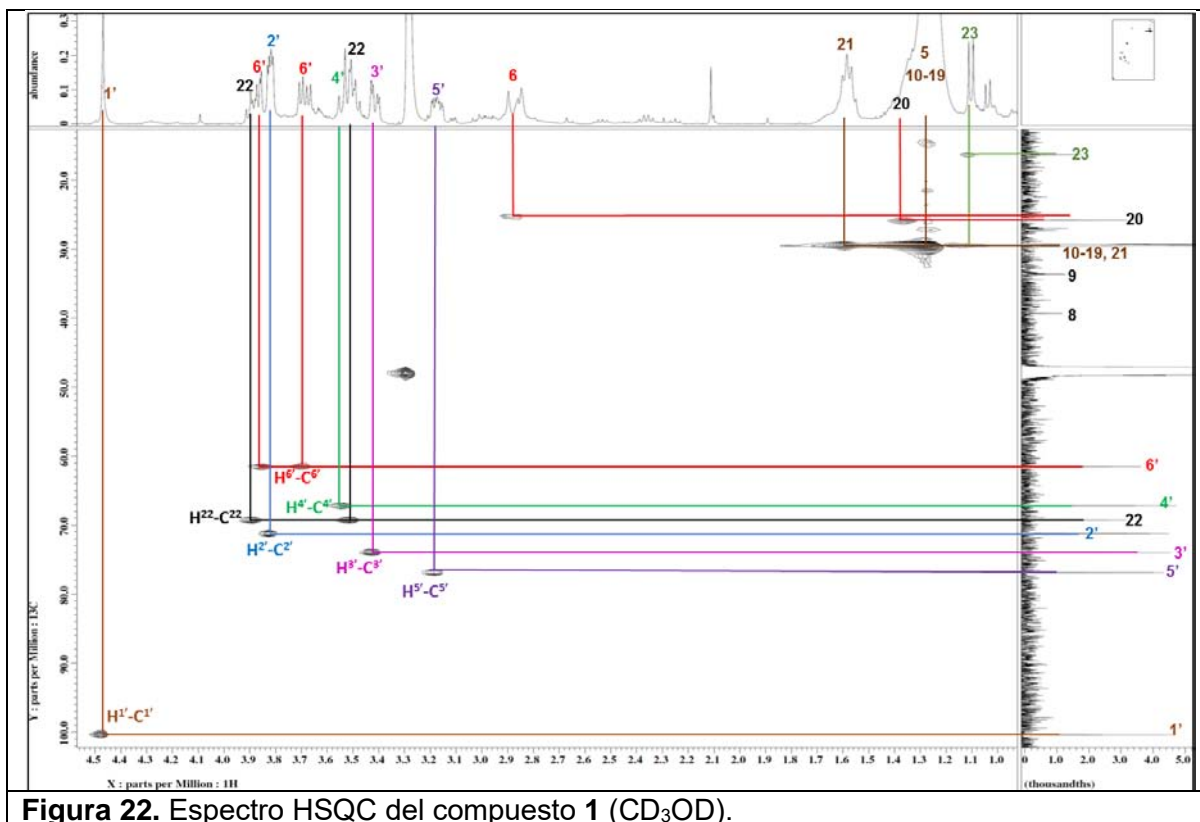
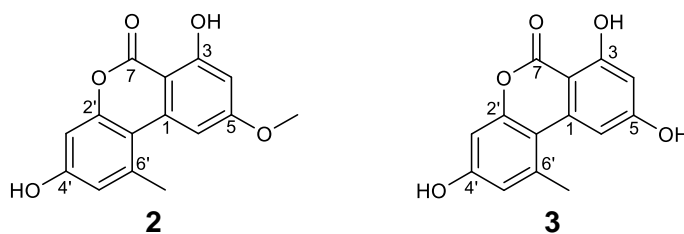


Tabla 1. Datos espectroscópicos del compuesto **1** (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz) y epicoccaimda A (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz)⁶³ en CD_3OD .

Posición	δ_{C} en ppm	δ_{H} en ppm, mult. (J en Hz)	Tipo	δ_{C} en ppm	δ_{H} en ppm, mult. (J en Hz)
1	^a		C	175.3	
2	^a		C	101.6	
3	^a		C	197.6	
4	61.1 ^a	3.54, m	CH	61.8	3.54, m
5	14.5 ^c	1.29, m	CH_3	16.0	1.31 d (6.9)
6	25.2 ^c	2.88, s	CH_3	26.7	2.90 s
7	179.9 ^b		C	201.3	
8	40.8	3.80 ^a	CH	40.8	3.80, m
9	35.1	1.30, m ^c 1.68, m ^c	CH_2	35.0	1.27, m 1.72, m
10-19	30.7-30.9	1.27-1.37, m	CH_2	30.6-30.9	1.25-1.38, m
20	27.3	1.37, m	CH_2	27.3	1.42, m
21	30.8	1.61, m	CH_2	30.8	1.65, m
22	70.8	3.52 ddd (2.8,6.9,9.7) 3.92, ddd (2.9, 6.5, 9.7)	CH_2	70.6	3.57, ddd (2.9,6.8,9.8) 3.98, ddd (6.8, 6.8, 9.8)
23	17.7	1.13, d (6.9)	CH_3	18.0	1.03, d (6.2)
1'	101.9	4.49, s ^c	CH	101.7	4.54, s
2'	72.7	3.85, dd (2.3, 3.2)	CH	72.5	3.90, da (3.2)
3'	75.5	3.44, dd (3.2, 9.6)	CH	75.3	3.50, dd (3.2, 9.5)
4'	68.7	3.56, t (9.6, 9.6)	CH	68.5	3.62, t (9.5, 9.5)
5'	78.4	3.19, ddd (2.3, 6.0, 9.6)	CH	78.1	3.26, ddd (3.0, 5.6, 9.5)
6'	63.0	3.71, dd (5.7, 11.7) 3.89, dd (5.1, 11.5)	CH_2	62.8	3.77, dd (5.6, 11.8) 3.95, dd (3.0, 11.8)

^aNo se observan; ^b HMBC; ^c HSQC

5.4.2 Caracterización del alternariol monometil éter (**2**) y alternariol (**3**)



El alternariol monometil éter (**2**) y el alternariol (**3**) se obtuvieron a partir de la especie *Alternaria* sp. (CC8-13). El espectro de masas del producto **2** permitió determinar su fórmula molecular como $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (**Figura 24**). Por otra parte, el espectro de ^1H RMN reveló la presencia en la molécula de un metilo en δ_{H} 2.74 y de dos sistemas aromáticos de tipo AB diagnósticos para los protones H-3' y H-5'

en δ_H 6.64 (d, $J = 2.3$ Hz) y 6.72 (d, $J = 2.3$ Hz); así como para H-4 y H-6 en δ_H 6.62 (s) y 7.23 (s) respectivamente (**Figura 25**). Mediante el análisis del espectro de ^{13}C RMN se pudieron observar 15 átomos de carbono, seis de los cuales correspondían a dos metilos y cuatro metinos, en consecuencia el producto presenta nueve carbonos cuaternarios (**Figura 26**). En conjunto estas señales están en armonía con un derivado de tipo benzo- α -pirona.

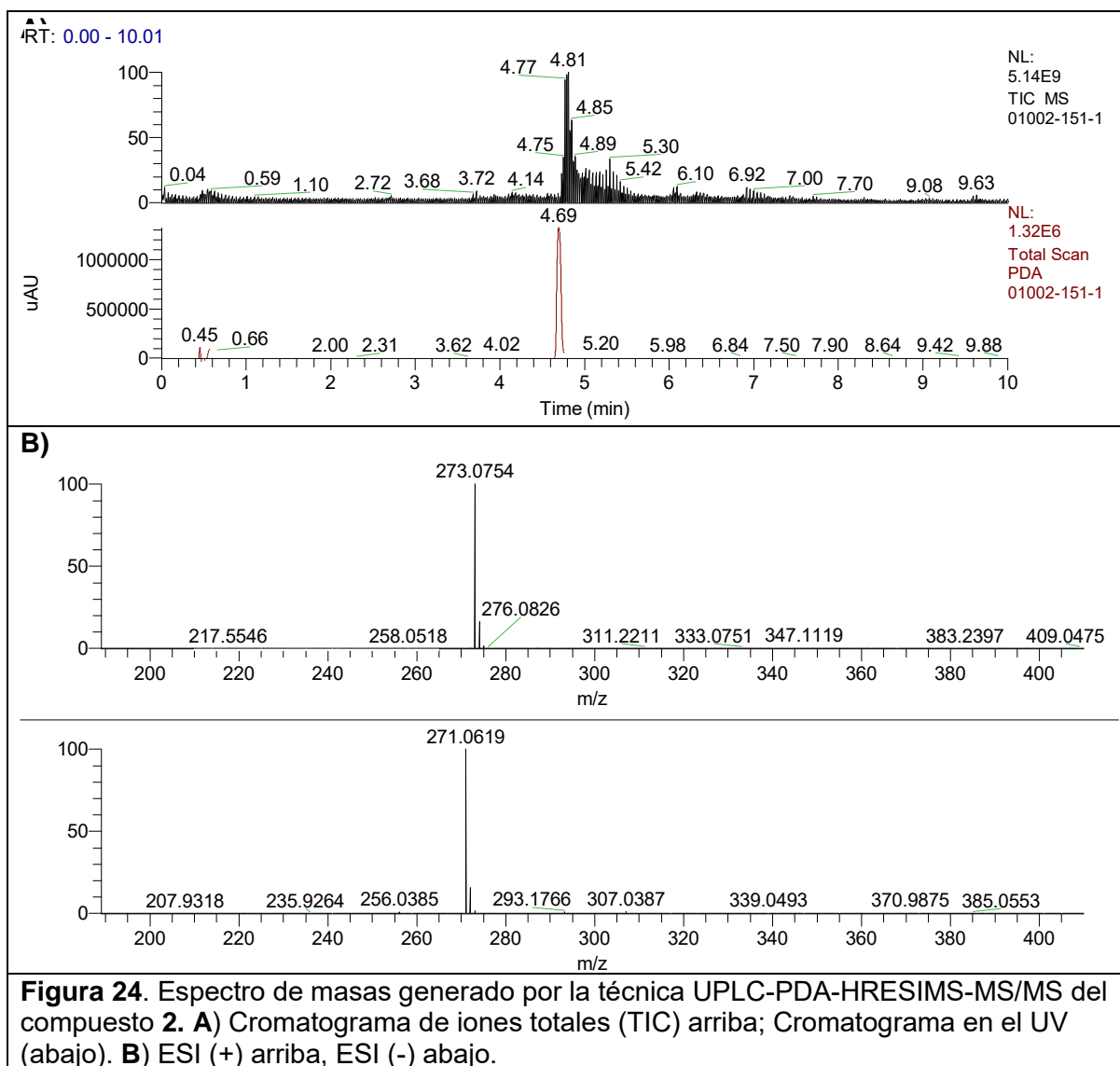


Figura 24. Espectro de masas generado por la técnica UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto **2**. **A)** Cromatograma de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). **B)** ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.

Las correlaciones de las señales observadas en los espectros bidimensionales HSQC y HMBC (**Figuras 27 y 28**) permitieron establecer la asignación de los cuatro metinos, así como de los seis carbonos oxigenados (cinco de ellos

cuaternarios) presentes en la molécula. Con base en este análisis la estructura del compuesto **2** se caracterizó como el derivado metilado del alternariol.

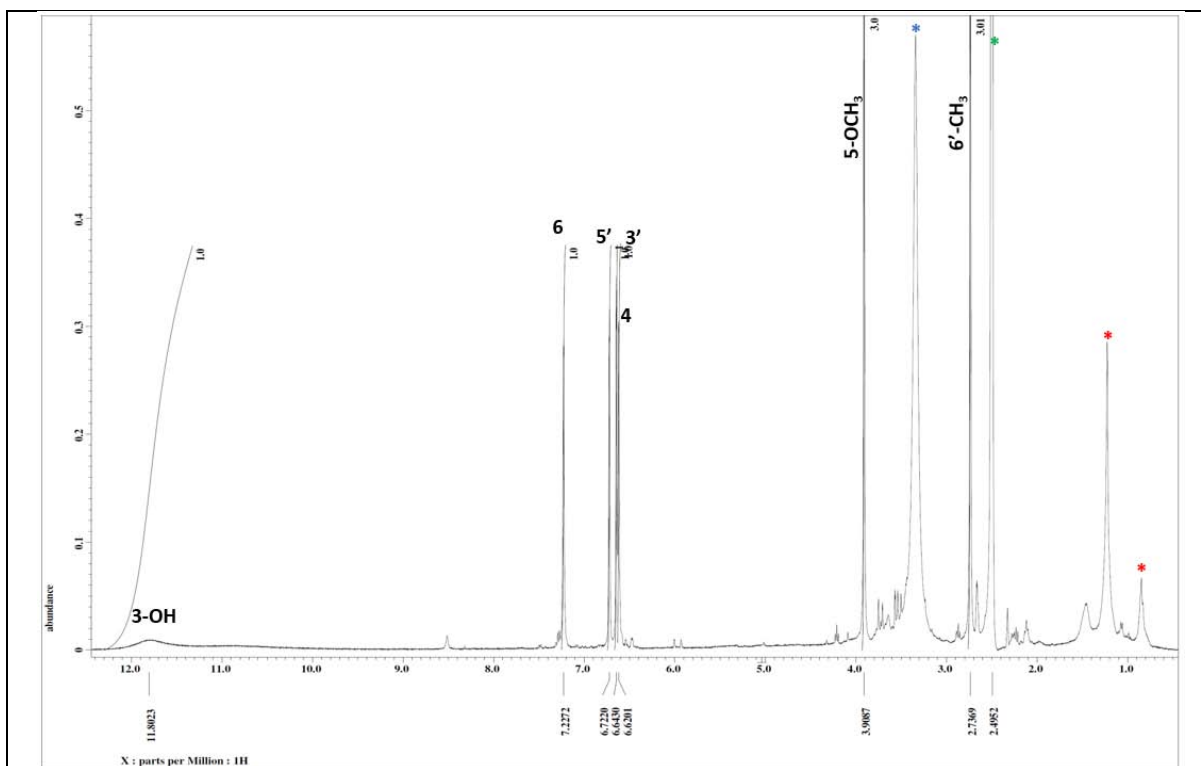


Figura 25. Espectro de ^1H RMN del compuesto **2** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).

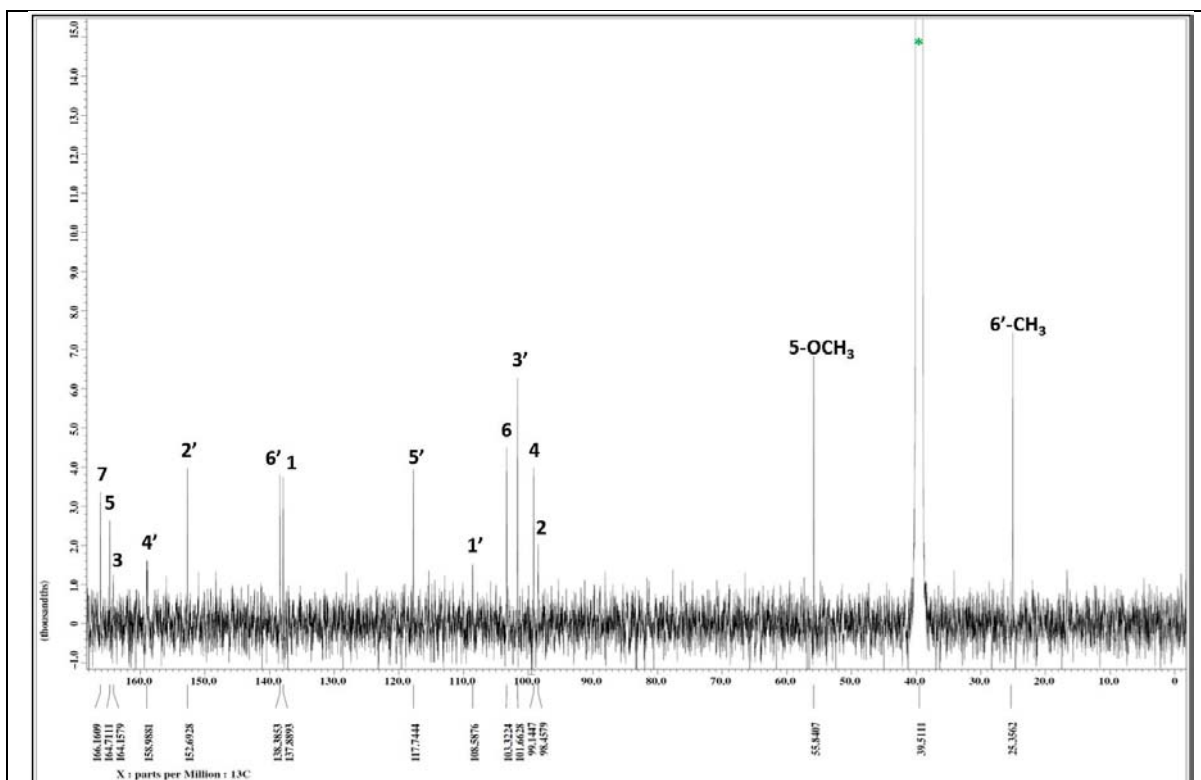
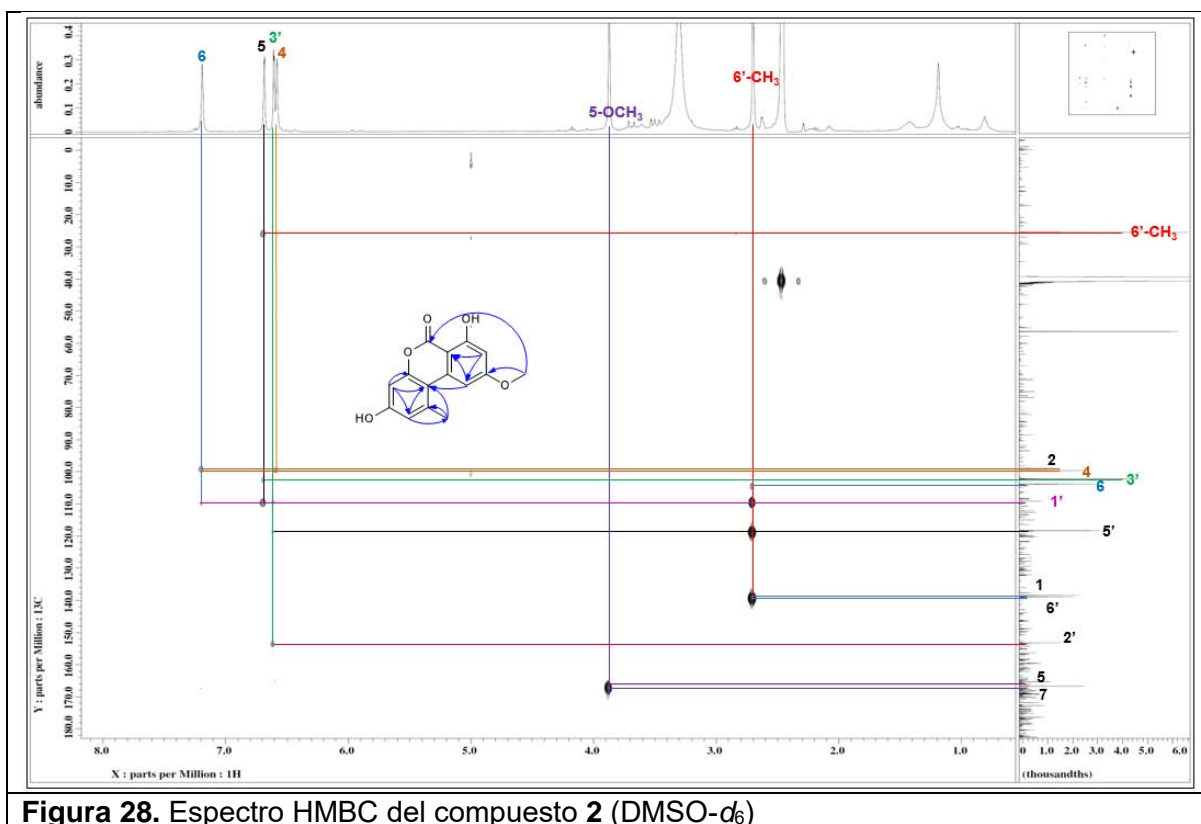
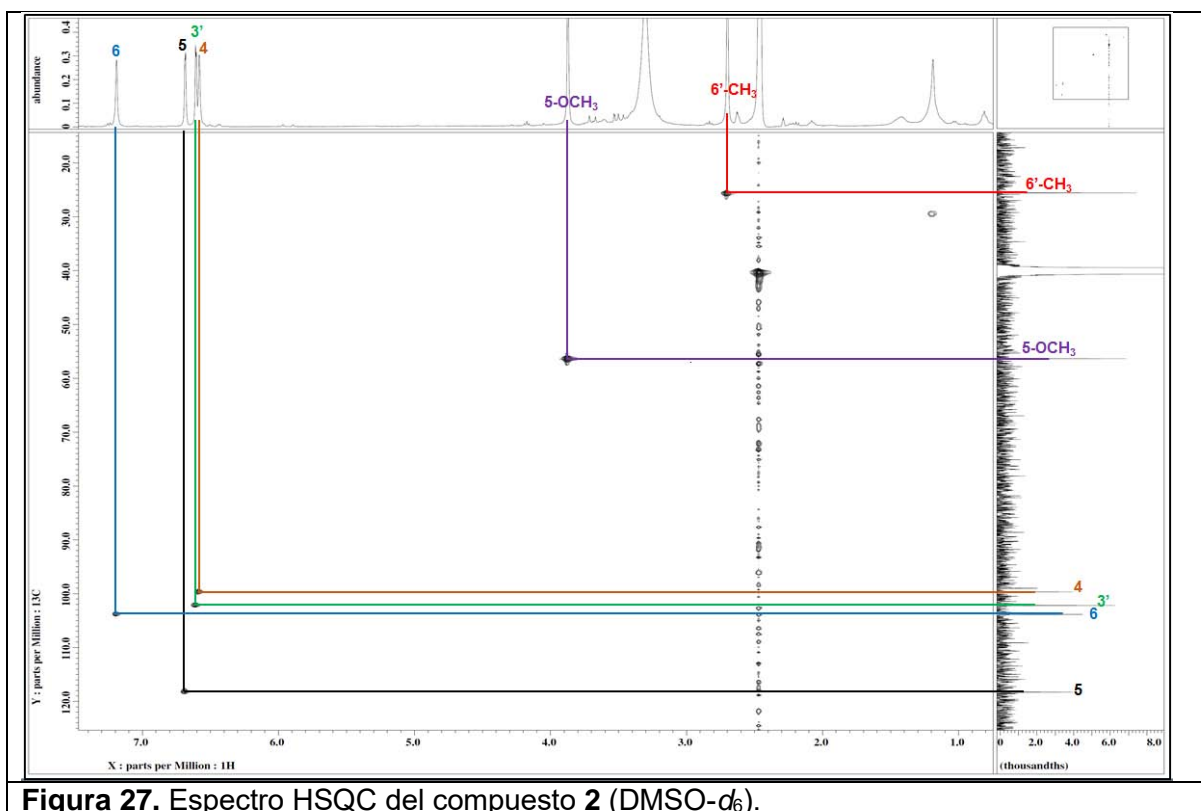
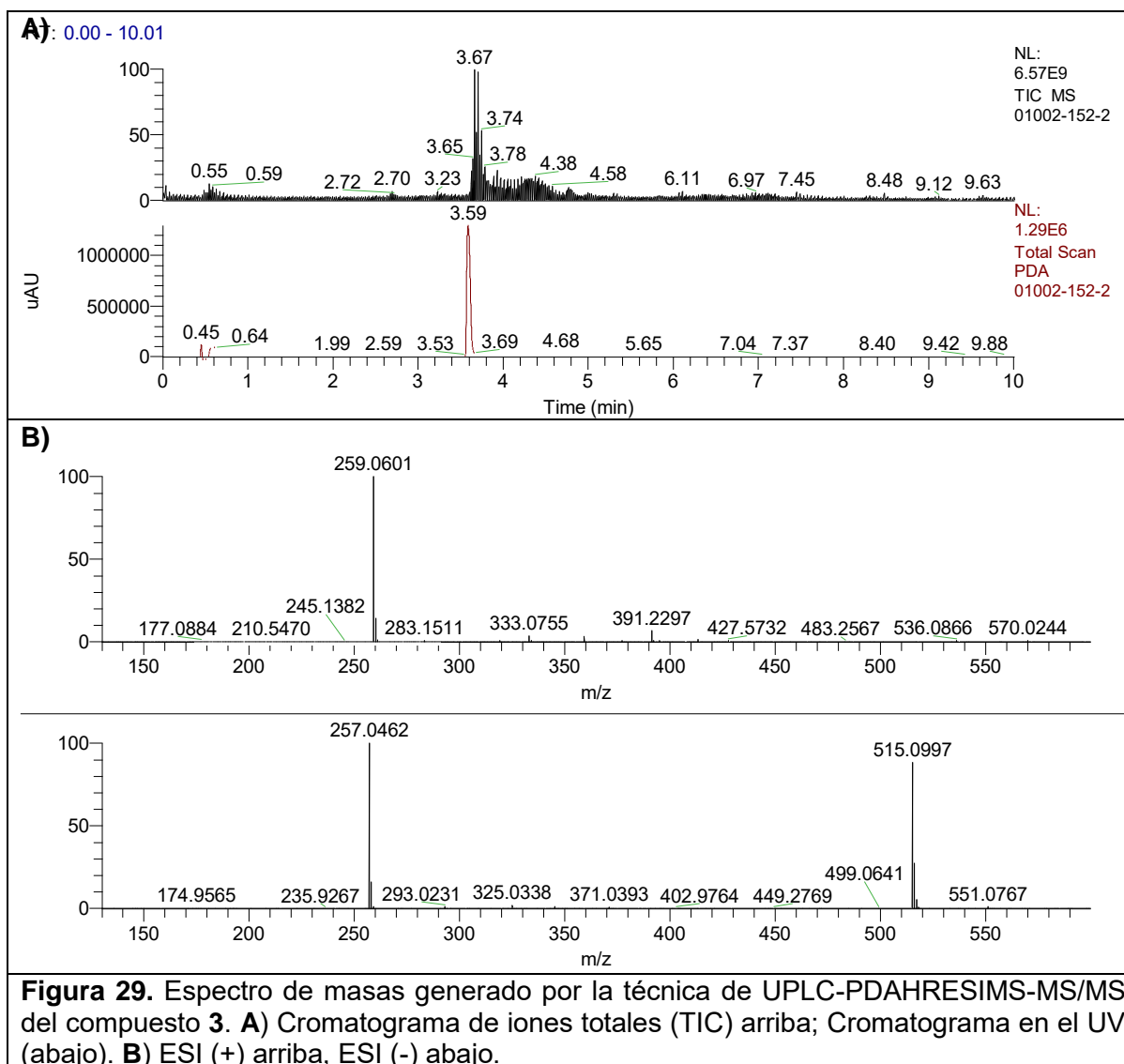


Figura 26. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **2** ($\text{DMSO-}d_6$; 100 MHz).



El análisis por HRESIMS del producto **3** reveló que este compuesto tenía 14 unidades de masa atómica menos que el producto (m/z 259.0601 $[M+H]^+$ y 257.0462 $[M-H]^-$), con una fórmula molecular $C_{14}H_{10}O_5$, la cual presenta un IDH = 10 (**Figura 29**). El análisis detallado del espectro de 1H RMN del producto **2** (**Figuras 30**) permitió comprobar que también se trataba de una benzo- α -pirona muy similar al compuesto **2**, difiriendo fundamentalmente en la presencia de un grupo metoxilo en δ_H/δ_C (3.91/55.8) en la posición C-5. La comparación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los productos **2** y **3** se resumen en la **Tabla 2**.



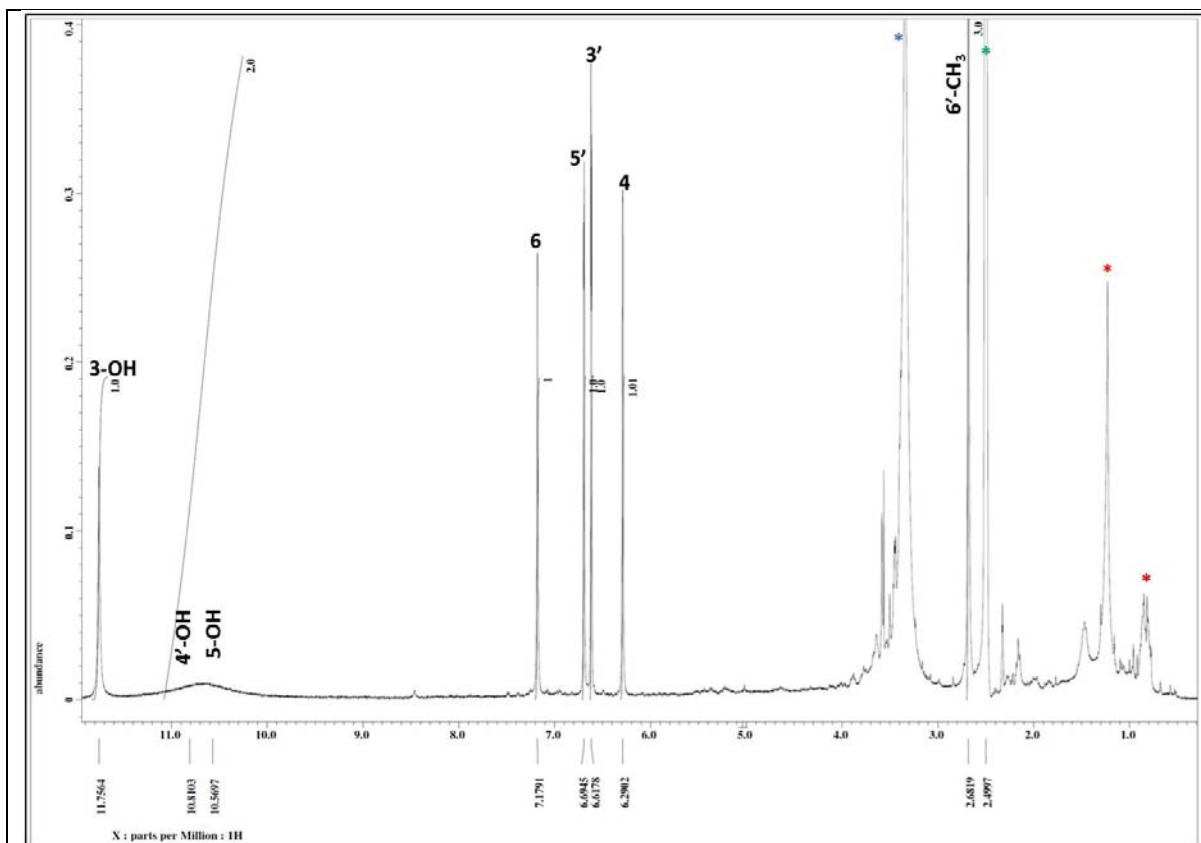


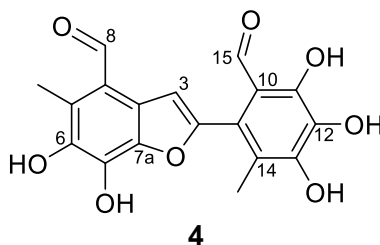
Figura 30. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **3** ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de los compuestos **2** y **3** en $\text{DMSO-}d_6$ (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz).

Posición	2		3
	δ_c en ppm	Tipo	δ_H en ppm, mult. (J en Hz)
1	137.9	C	-
2	98.4	C	-
3	164.2	C	-
4	99.1	CH	6.62, bs
5	164.7	C	-
6	103.3	CH	7.23, s
7	166.2	C	-
1'	108.6	C	-
2'	152.7	C	-
3'	101.7	CH	6.64, d (2.3)
4'	159.0	C	-
5'	117.7	CH	6.72, d (2.3)
6'	138.4	C	-
3-OH	-	-	11.80, s
5-OH	-	-	10.57, bs
5-OCH ₃	55.8	CH ₃	3.91, s
6'-CH ₃	25.1	CH ₃	2.74, s
4'-OH	-	-	10.81, bs

Así los compuestos **2** y **3** fueron caracterizados como el alternariol monometil éter (**2**) y alternariol (**3**). Ambos compuestos fueron aislados por primera vez a partir de un hongo fitopatógeno *Alternaria tenuis* aislado de hojas del tomate en el año de 1953⁵⁸, y también han sido aislados de otras especies vegetales como *Polygonum senegalense*⁵⁹. Estudios farmacológicos de ambos productos han permitido establecer su potencial fitotóxico⁶⁵, citotóxico⁵⁹, antimicrobiano⁵⁸ e inhibidor de las enzimas acetil colinesterasas⁶⁶, por mencionar las más relevantes.

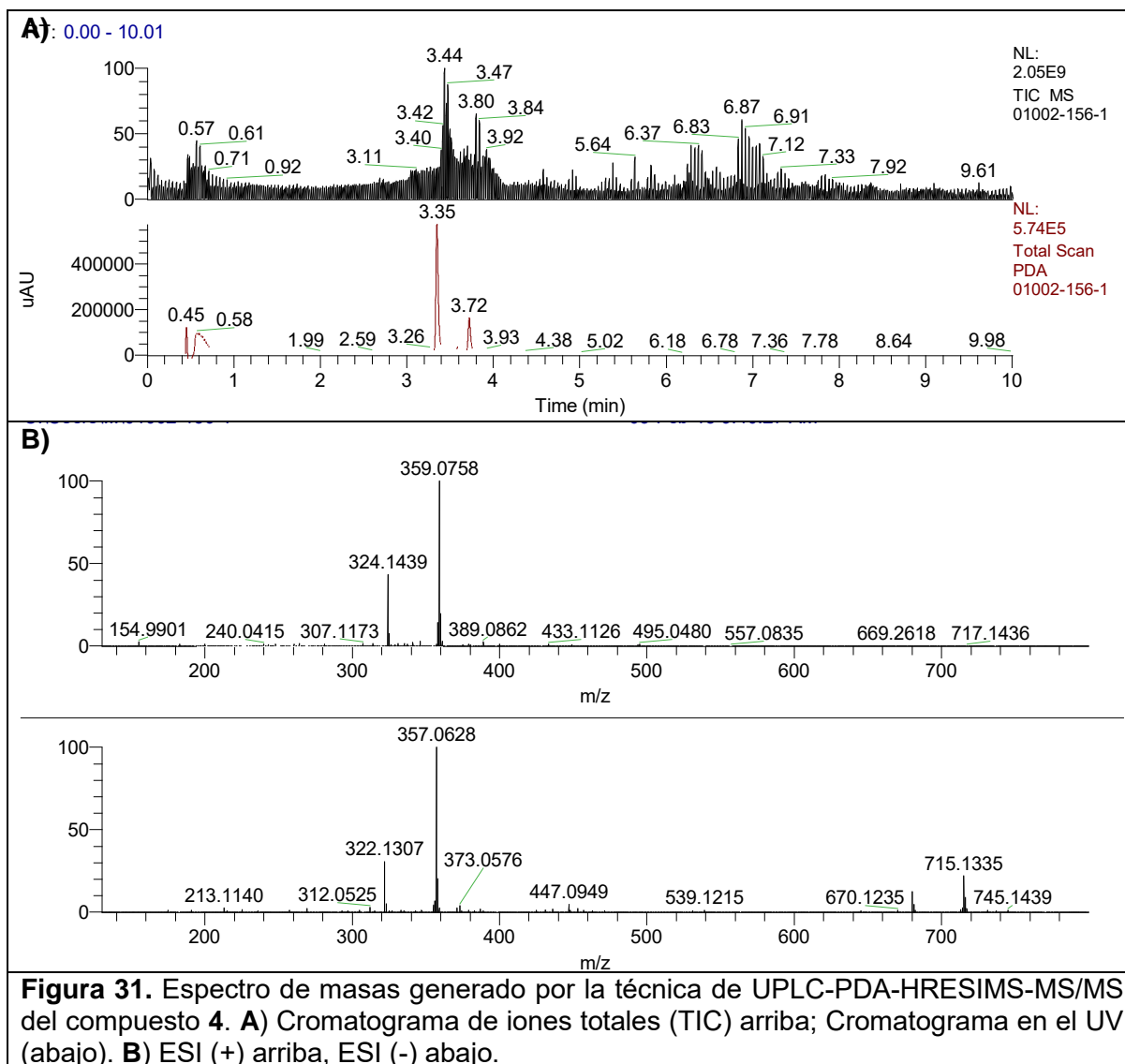
5.4.3 Caracterización del epicocólido B (**4**)



El espectro de HRESI-MS del compuesto **4** permitió establecer su fórmula molecular como C₁₈H₁₄O₈ con base en los iones pseudomoleculares observados para [M+H]⁺ y [M-H]⁻ en una relación *m/z* de 359.0758 y 357.0628, respectivamente, con un IDH de doce (**Figura 31**). En el espectro de ¹H RMN de **4** (**Figura 32**) se observaron cinco señales de tipo singulete en δ_H 10.45, 9.51, 7.44, 2.66 y 2.09, que corresponden dos grupos formilo, dos metilos sobre anillo aromático y un metino de doble ligadura. Con base en una búsqueda exhaustiva en la literatura, se logró establecer que se trataban de un derivado de benzofurano unido un anillo aromático totalmente sustituido. Las señales antes mencionadas fueron asignables a los hidrógenos H-8, H-15, H-3, 5-CH₃ y 14-CH₃ de la molécula (**Tabla 3**). Con base en la información antes mencionada, el compuesto **4** se caracterizó como el epicocólido B.

Los compuestos de tipo benzofurano han sido aislados previamente a partir de especies fúngicas como *Epicoccum* sp.³⁹ y *Aspergillus flavipes* ST003878⁶⁷. El epicocólido B ha mostrado propiedades antimicrobianas contra cepas de *S. aureus* y *E. coli* y antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Pythium ultimum*,

Aphanomyces cochlioides y *Rhizoctonia solani*⁸⁹, así como inhibición de la enzima histona deacetilasa (HDAC)⁶⁸



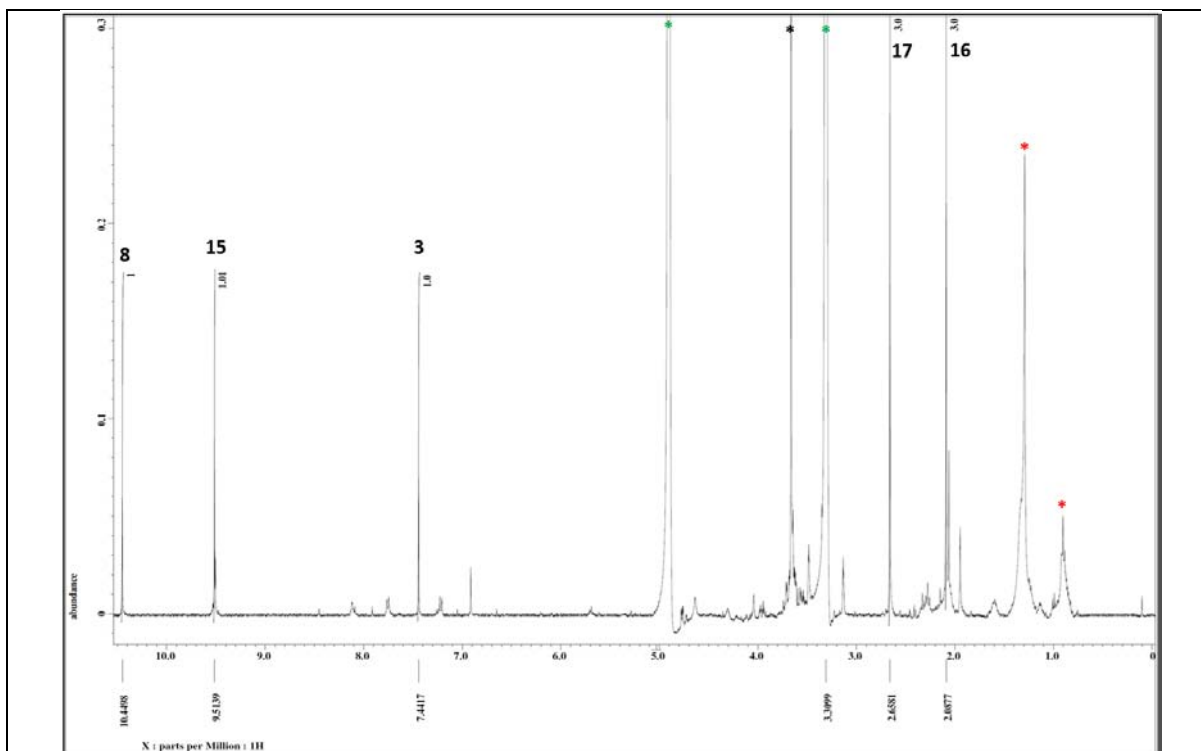
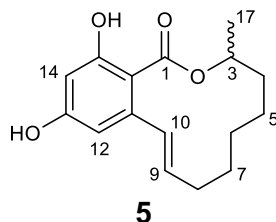


Figura 32. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **4** (CD_3OD ; 400 MHz).

Tabla 3. Datos espectroscópicos del compuesto **4** en CD_3OD (^1H , 400 MHz) y $\text{DMSO}-d_6$ (^1H , 300 MHz; ^{13}C , 75 MHz)³⁹.

Posición	δ_{H} en ppm, mult. (J en Hz)	δ_{H} en ppm, mult. (J en Hz) ³⁹	δ_{C} en ppm, 75 MHz ³⁹
2	-	-	151.6
3	7.44, s	7.46, s	108.9
3 ^a	-	-	122.8
4	-	-	117.1
5	-	-	127.5
5-CH ₃	2.66, s	2.58, s	11.0
6	-	-	141.0
6-OH	-	-	-
7	-	-	136.4
7-OH	-	-	-
7 ^a	-	-	142.4
8	10.45, s	10.41, s	190.1
9	-	-	124.8
10	-	-	112.6
11	-	-	118.7
11-OH	-	-	-
12	-	-	132.7
12-OH	-	-	-
13	-	-	151.5
13-OH	-	-	-
14	-	-	150.2
14-CH ₃	2.09, s	2.01, s	12.6
15	9.51, s	9.48, s	194.7

5.4.4 Caracterización del (*E*)-9-eteno-de-*O*-metil-lasiodiplodina (**5**)



La fórmula molecular del compuesto **5** se determinó como C₁₆H₂₀O₄ por HRESI-MS (m/z 277.1422 [M+H]⁺ y 275.1289 [M-H]⁻; IDH = 7) (**Figura 33**).

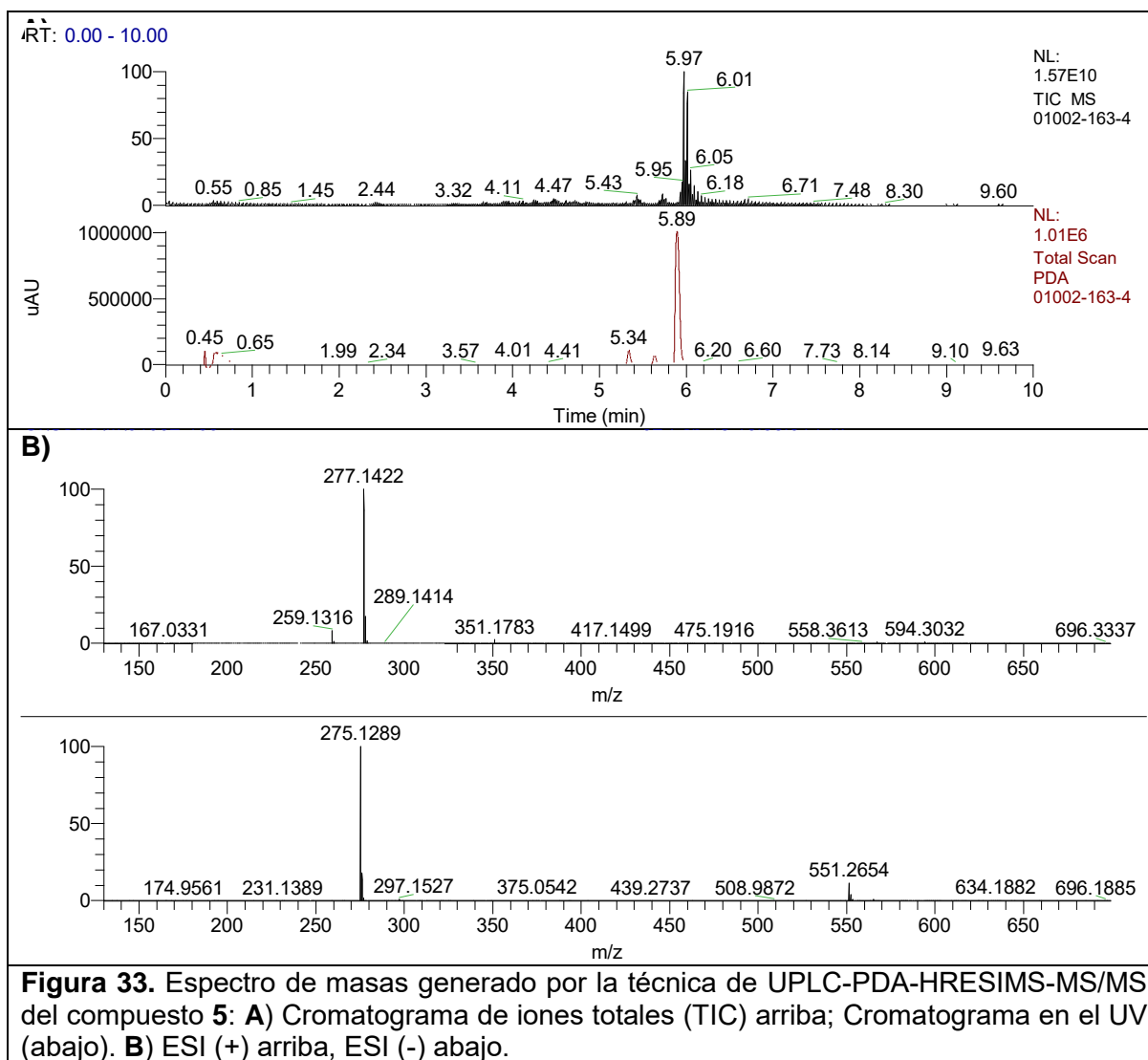
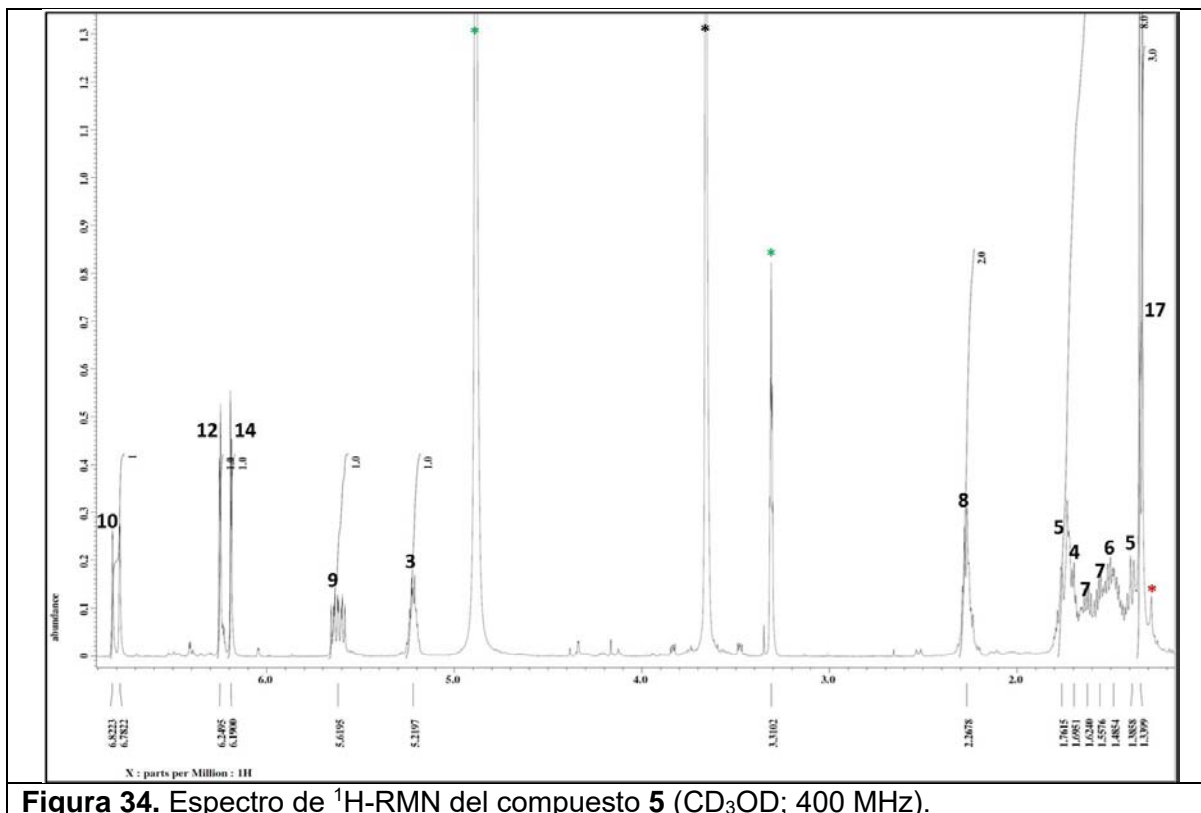


Figura 33. Espectro de masas generado por la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto **5**: **A)** Cromatograma de iones totales (TIC) arriba; Cromatograma en el UV (abajo). **B)** ESI (+) arriba, ESI (-) abajo.

El espectro de ^1H RMN (**Figura 34**) del compuesto **5** presenta señales para: (1) un grupo metilo unido a un carbono terciario en δ_{H} 1.34 (d); (2) un sistema AB en δ_{H} 6.25 ($J = 2.3$ Hz) y 6.19 ($J = 2.3$ Hz). Este conjunto de señales es congruente con un acoplamiento de tipo *meta* entre los protones aromáticos de un anillo aromático tetrasustituido; y (3) dos conjuntos de señales dobles centradas en δ_{H} 6.80 (d, $J = 15.6$ Hz) y 5.62 (ddd, $J = 5.5, 8.2, 15.6$ Hz) asignables a una doble ligadura conjugada con el sistema aromático. El valor de la constante de acoplamiento calculado ($J = 15.6$ Hz) para estas señales sugiere una configuración *E* del doble enlace.



Por otra parte, el espectro de ^{13}C RMN presentó señales para 16 átomos de carbono (**Figura 35**), y el análisis del espectro HSQC (**Figura 36**) reveló que las señales correspondían a un metilo, cinco metilenos y cinco metinos. De manera adicional, se estableció que los carbonos cuaternarios se encontraban como se describe a continuación: dos unidos a una función oxigenada (δ_{C} 163.8 y 165.1), uno de un grupo carbonilo de éster (δ_{C} 172.3) y dos aromáticos asignados a C-11

(δ_C 145.5) y C-16 (δ_C 105.7). Cabe mencionar que la ubicación del doble enlace en la posición C-9 se estableció con base en las correlaciones COSY observadas entre los protones H-8 (δ_H 2.27), H-9 (δ_H 5.62) y H-10 (δ_H 6.82) (**Figura 37**).

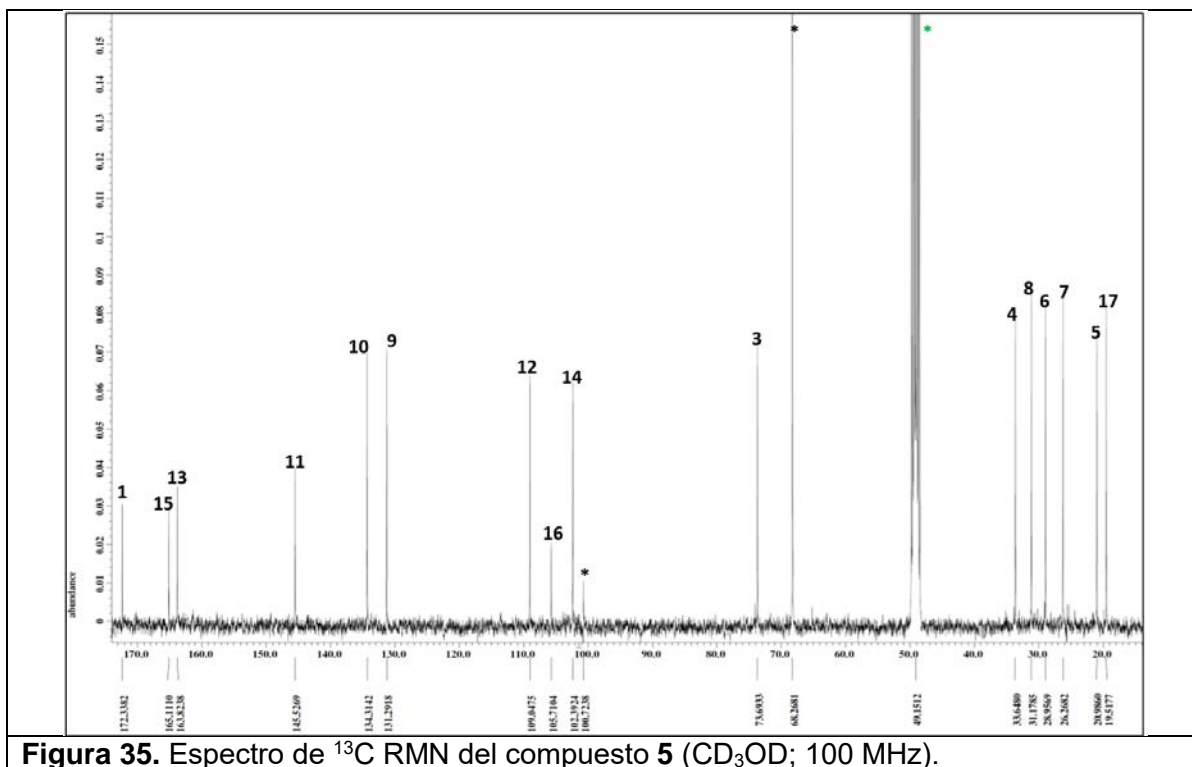


Figura 35. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **5** (CD_3OD ; 100 MHz).

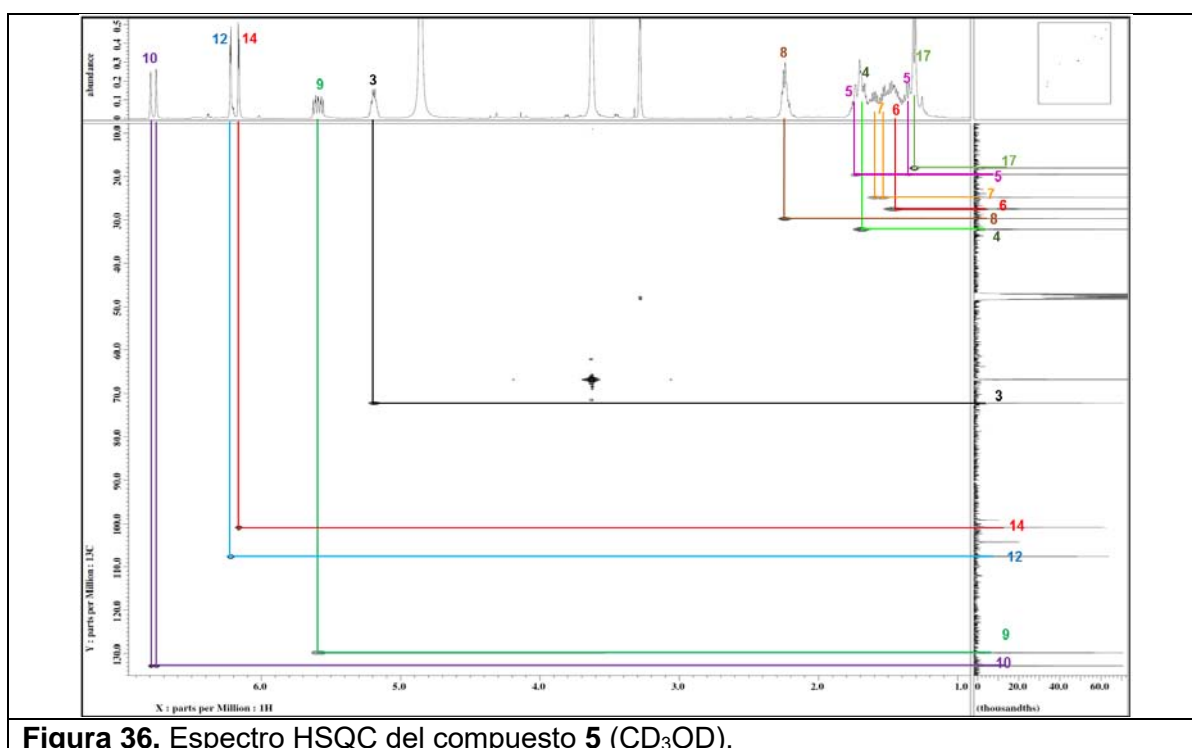


Figura 36. Espectro HSQC del compuesto **5** (CD_3OD).

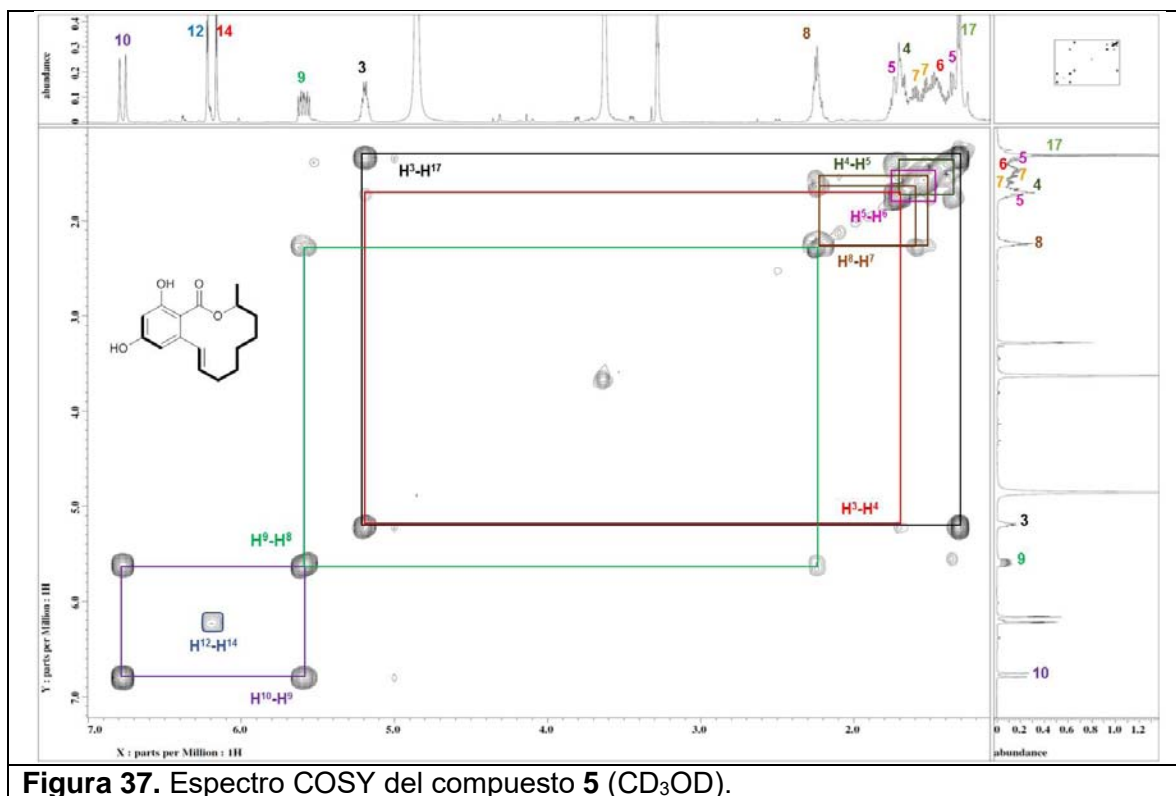


Figura 37. Espectro COSY del compuesto **5** (CD₃OD).

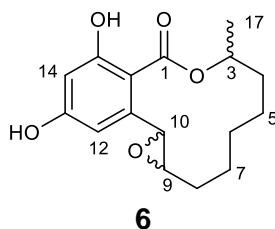
Así, los datos espectroscópicos del producto **5** (Tabla 4) resultaron ser idénticos con aquellos reportados en la literatura para el producto (*E*)-9-eteno-de-*O*-metil-lasiodiplodina⁶². Este compuesto había sido aislado únicamente a partir del hongo endófito *Lasiodiplodia theobromae*, aislado de la especie *Mapania kurzii* (Cyperaceae), por lo que la presente investigación representa el primer reporte sobre el aislamiento de este producto natural a partir de un organismo saprófito.

Tabla 4. Datos espectroscópicos del compuesto **5** en CD₃OD (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz).

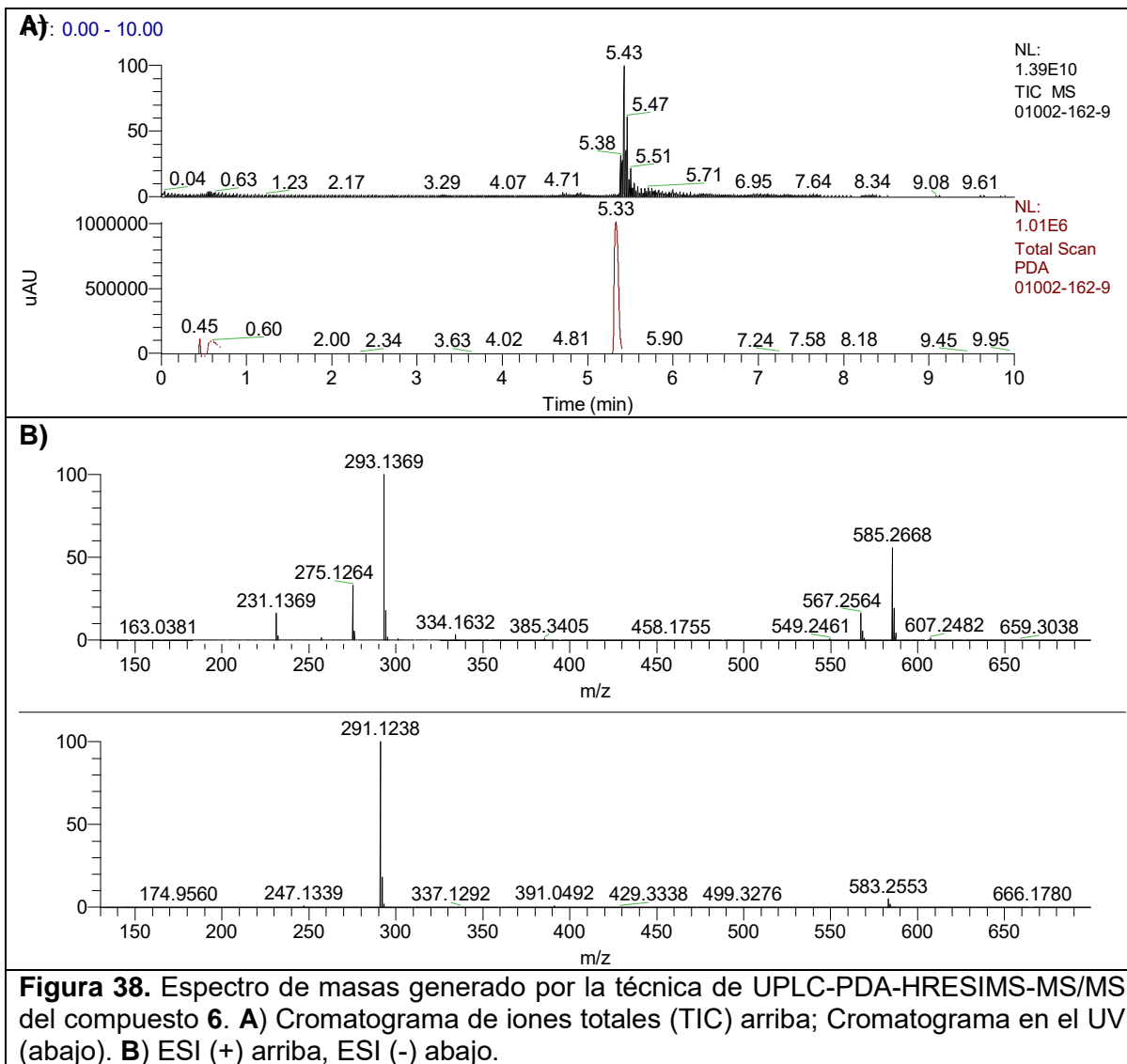
Posición	δ _c en ppm	Tipo	δ _H en ppm, mult. (J en Hz)
1	172.3	C	-
2	-	-	-
3	73.7	CH	5.22, m
4	33.6	CH ₂	1.69, m
5	21.0	CH ₂	1.76, m 1.39, m
6	29.0	CH ₂	1.48, m
7	26.3	CH ₂	1.62, m 1.56, m

8	31.2	CH ₂	2.27, m
9	131.3	CH	5.62, ddd (5.5,8.2,15.6)
10	134.3	CH	6.82, d (15.6)
11	145.5	C	-
12	109.0	CH	6.25, d (2.3)
13	163.8	C	-
14	102.4	CH	6.19, d (2.3)
15	165.1	C	-
16	105.7	C	-
17	19.5	CH ₃	1.34, d (6.4)

5.4.5 Caracterización de la 9-epoxi-de-O-metil-lasiodiplodina (**6**)



La fórmula molecular del compuesto **6** se estableció como C₁₆H₂₀O₅ mediante HRESI-MS (m/z 293.1369 [M+H]⁺ y 291.1238 [M-H]⁻; IDH = 7) (**Figura 38**), y difiere de la (*E*)-9-eteno-de-O-metil-lasiodiplodina (**5**) por 16 uma. Por otra parte, el análisis detallado de los espectros de RMN del compuesto **6** (**Figuras 39-42** y **Tabla 5**), reveló una gran similitud con aquellos del producto **5**. La diferencia más evidente entre los espectros de los dos compuestos fue la falta de las señales de la doble ligadura presente en C-9 y C-10 del compuesto **5**, y la presencia de señales asignables a una función epóxido en **6** en $\delta_{H/C}$ 4.34 (d, $J = 1.8$ Hz)/59.6 y 2.52 (dt, $J = 1.8, 9.6$ Hz)/65.3. Por otro lado, la posición de la función epóxido en C-9 y C-10 fue confirmada mediante las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre H-10 con C-11, C-12 y C-9; así como H-9 con C-8 (**Figura 42**). Así, el conjunto de resultados antes descritos permitió establecer a **6** como el derivado epoxidado en C-9 y C-10 de **5**, y representa un producto natural novedoso.



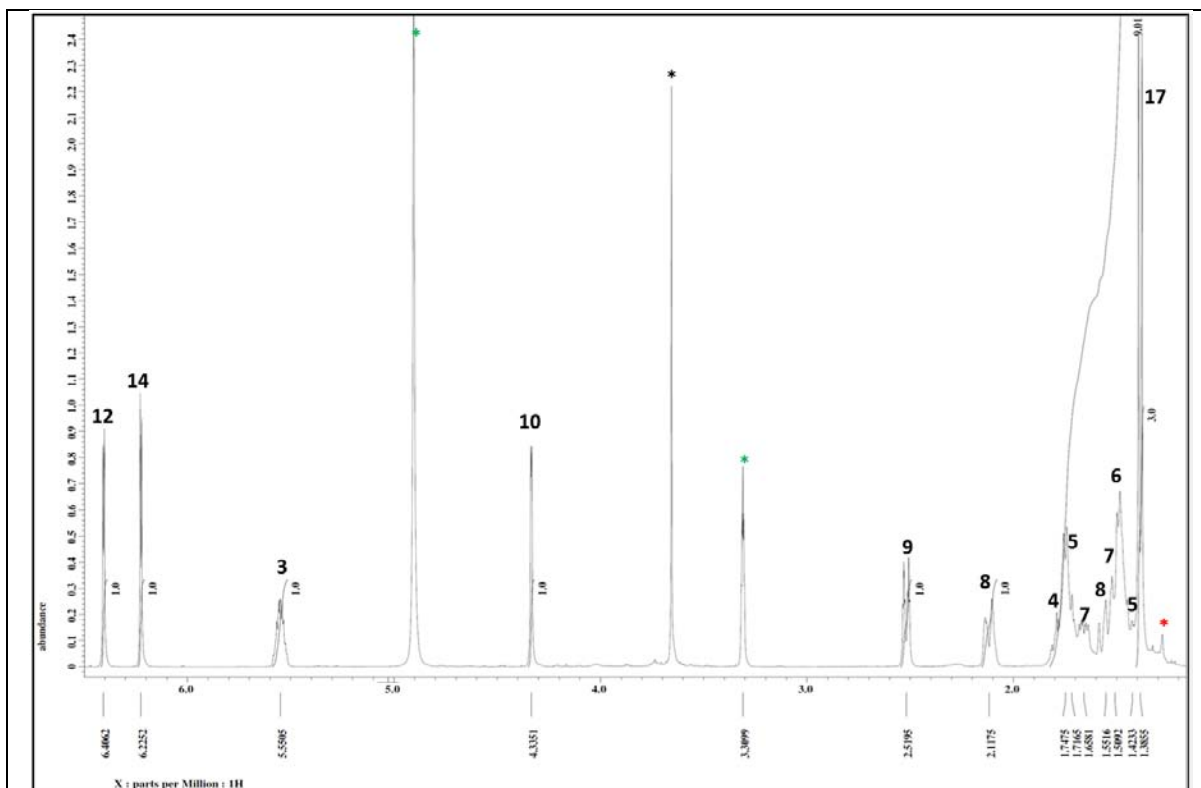


Figura 39. Espectro de ^1H RMN del compuesto **6** (CD_3OD ; 400 MHz).

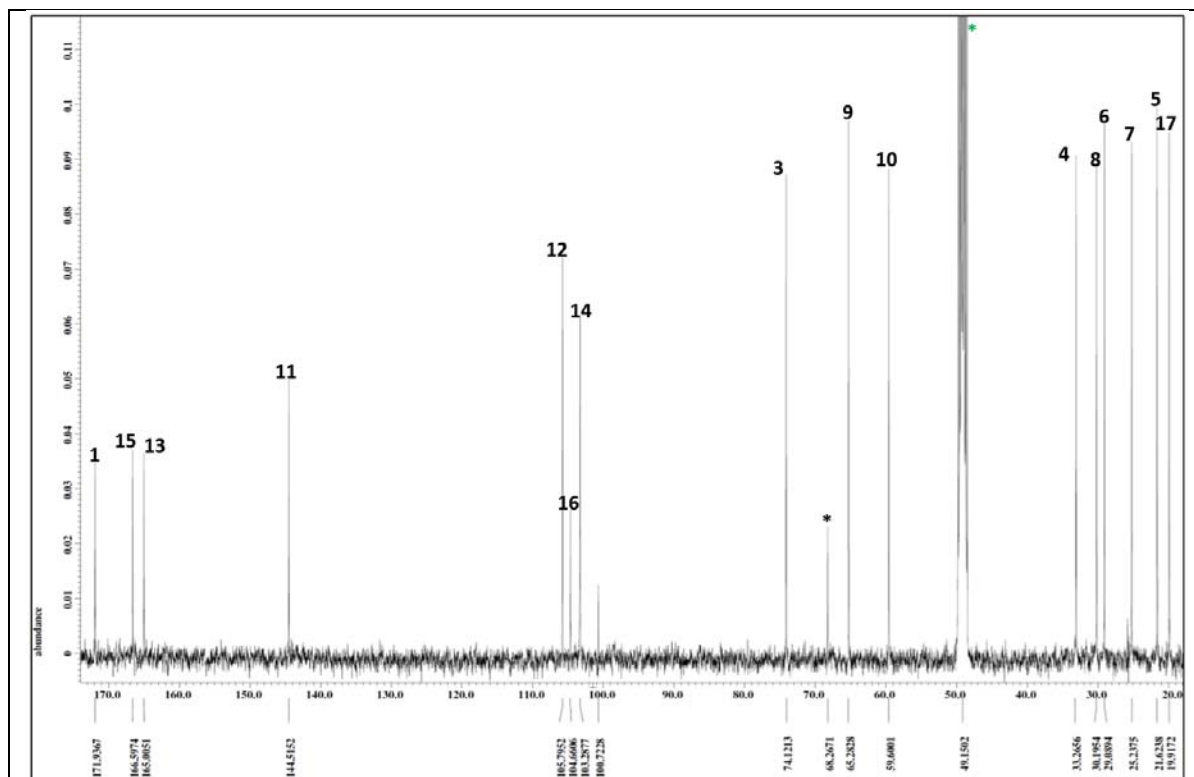


Figura 40. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **6** (CD_3OD ; 100 MHz).

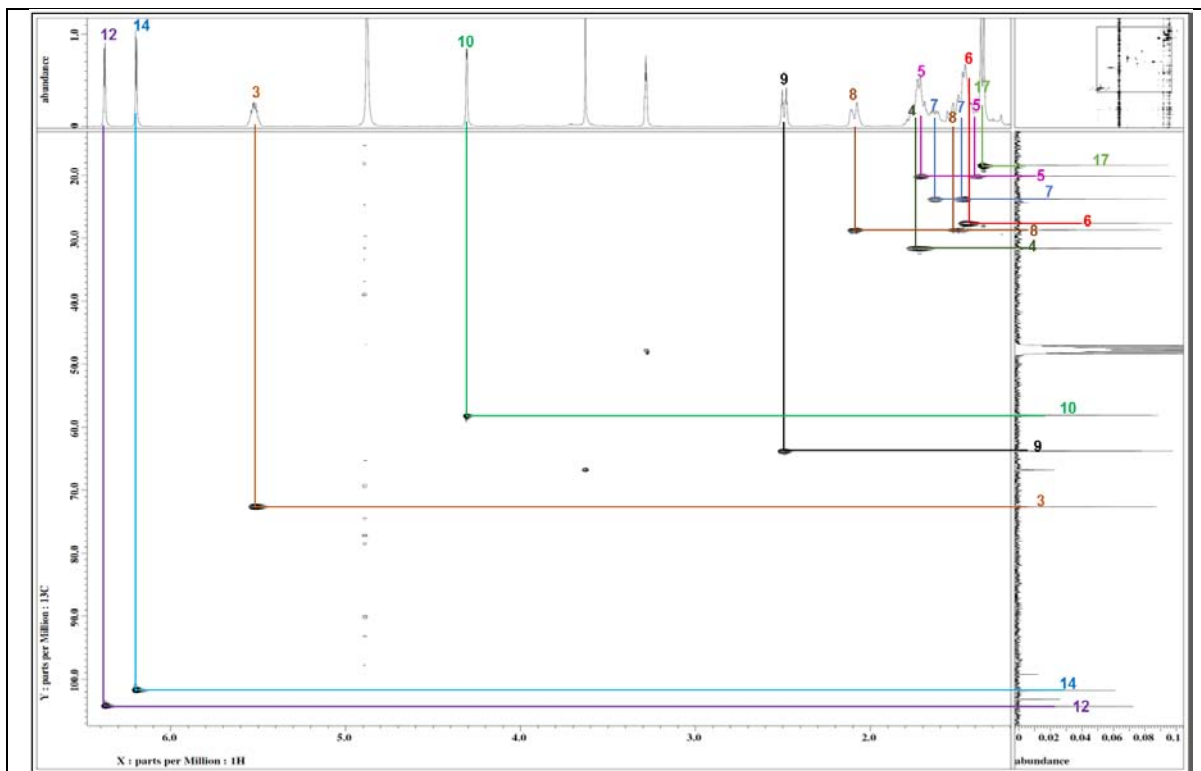


Figura 41. Espectro HSQC del compuesto 6 (CD₃OD).

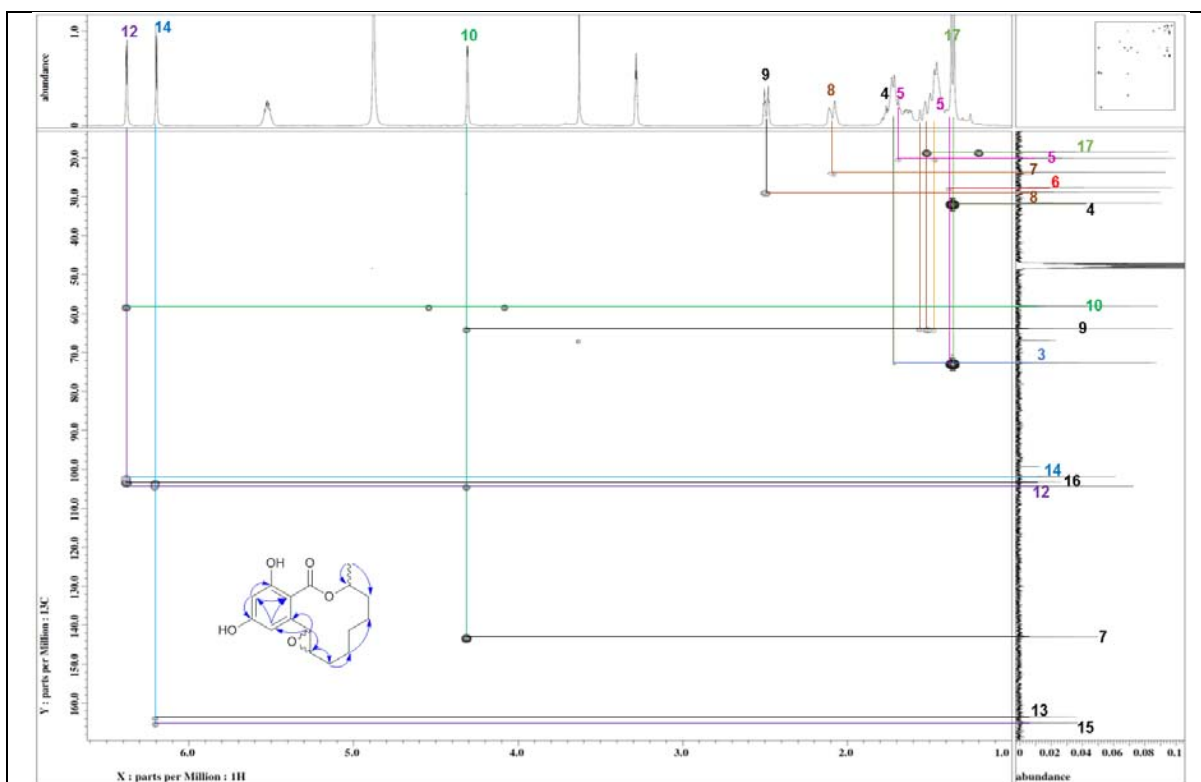


Figura 42. Espectro HMBC del compuesto 6 (CD₃OD).

Tabla 5. Datos espectroscópicos del compuesto **6** en CD₃OD (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz).

Posición	δ_c en ppm, tipo	δ_H en ppm, mult. (J en Hz)
1	171.9, C	-
2	-	-
3	74.1, CH	5.55, m
4	33.3, CH ₂	1.75, m
5	21.6, CH ₂	1.42, m 1.72, m
6	29.1, CH ₂	1.47, m
7	25.2, CH ₂	1.51, m 1.66, m
8	30.2, CH ₂	1.55, dd (2.3, 13.3) 2.12, dd (2.3, 13.3)
9	65.3, CH	2.52, dt (1.8, 9.6)
10	59.6, CH	4.34, d (1.8)
11	144.5, C	-
12	105.8, CH	6.41, d (2.8)
13	165.0, C	-
14	103.3, CH	6.23, d (2.8)
15	166.6, C	-
16	104.7, C	-
17	19.9, CH ₃	1.39, d (6.9)

6. CONCLUSIONES

En la presente investigación, se realizó el acondicionamiento de una serie de taxones fúngicos procedentes de una muestra de placa microbiana sobre piedras recolectada en la Cueva del Junco, en la Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Con base en los resultados de los estudios de metabolómica y de la evaluación de la actividad antimicrobiana, se seleccionaron cinco especies para su estudio químico. Ambos criterios de selección permitieron establecer en el presente estudio que son los adecuados para la búsqueda de compuestos bioactivos y/o novedosos.

La caracterización taxonómica de los organismos fúngicos seleccionados permitió establecer su identidad preliminar como *Epicoccum* sp. (CC8-6), *Fusarium* sp. (CC8-11), *Alternaria* spp. (CC8-13 y CC8-15), y una especie ubicada en el orden Botryosphaerales (CC8-19).

De manera general, el estudio químico de todas las especies seleccionadas mediante las técnicas cromatográficas descritas en la sección experimental, permitió el aislamiento y purificación de cinco productos naturales caracterizados el alternariol mono metil éter (**2**), el alternariol (**3**), el epicocólido B (**4**), la (*E*)-9-eteno-de-O-metil-lasiodiplodina (**5**) y su derivado novedoso epoxidado en C-9 y C-10 (**6**). En el caso del compuesto **1**, los experimentos preliminares permitieron caracterizarlo tentativamente como la epicoccamida A (**1**).

Finalmente, la presente investigación representa una contribución al conocimiento de la diversidad química estructural de los organismos fúngicos aislados a partir de hábitats inexplorados, como la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

7. Perspectivas

- Continuar con el aislamiento de los compuestos minoritarios presentes en las especies fúngicas estudiadas.
- Confirmar la estructura de compuesto **1** y establecer la configuración absoluta de los productos **1**, **5** y **6**.
- Evaluar el potencial antimicrobiano de todos los metabolitos aislados.

8. REFERENCIAS

- (1) Gould, K. Antibiotics : from prehistory to the present day. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, 71 (May), 572–575.
- (2) Raja, H. A.; Miller, A. N.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 756–770.
- (3) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. Fungal diversity revisited : 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectr.* **2017**, 5 (4), 1–17.
- (4) Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat. Rev.* **2005**, 3 (12), 937–947.
- (5) Bills, G. F.; Gloer, J. B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiol. Spectr.* **2016**, 4 (6), 1–32.
- (6) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629–661.
- (7) Rodrigues, T.; Reker, D.; Schneider, P.; Schneider, G. Counting on natural products for drug design. *Nat. Chem.* **2016**, 8 (April), 531–541.
- (8) Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. For drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev.* **2015**, 14 (2), 111–129.
- (9) Gaynes, R. The discovery of Penicillin - new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, 23 (5), 849–853.
- (10) G. G. F., N.; E. P., A. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid. *Nature* **1955**, 175 (548).
- (11) Godtfredsen, W. O.; Jahnsen, S.; Lorck, H.; Roholt, K.; Tybring, L. Fusidic acid: a new antibiotic. *Nature* **1962**, 4819, 987.
- (12) Flint, A.; Forsey, R. R.; Usher, B. Griseofulvin, a new oral antibiotic for the treatment of fungous infections of the skin. *Can. Med. Assoc.* **1959**, 81 (3), 173–175.
- (13) Li, Y.; Lan, N.; Xu, L.; Yue, Q. Biosynthesis of pneumocandin lipopeptides and perspectives for its production and related echinocandins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 102, 9881–9891.
- (14) Rossiter, S. E.; Fletcher, M. H.; Wuest, W. M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 12415–12474.
- (15) Moloney, M. G. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, 37 (8), 689–701.
- (16) Mohana, N. C.; Rao, H. C. Y.; Rakshith, D.; Mithun, P. R.; Nuthan, B. R.; Satish, S. Omics based approach for biodiscovery of microbial natural products in antibiotic resistance era. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2018**, 16 (1), 1–8.
- (17) Aguirre-Acosta, E.; Ulloa, M.; Aguilar, S.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R. Biodiversidad de hongos en México. *Rev. Mex. Biodivers.* **2014**, 85, 76–81.
- (18) CONABIO. La diversidad biológica de México
http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html.
- (19) Velez, P.; Gasca-Pineda, J.; Rosique-Gil, E.; Eguiarte, L. E.; Espinosa-Asuar, L.; Souza, V. Microfungal oasis in an oligotrophic desert : diversity patterns and community structure in three freshwater systems of Cuatro Ciénegas, México. *PeerJ* **2016**, 1–34.
- (20) Peimbert, M.; Alcaraz, L. D.; Herna, I.; Eguiarte, L. E.; Olmedo-alvarez, G.; Souza, V. Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Cienegas basin ii : community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology* **2012**, 12 (7).
- (21) McCoy, C. J. Ecological and zoogeographic relationships of amphibians and reptiles

- of the Cuatro Ciénegas. *J. Arizona-Nevada Acad. Sci.* **1984**, 19 (1), 49–59.
- (22) Souza, V.; Espinoza-Pérez, H. S.; Ariana, H. Trophic analysis of the fish community in the Ciénega Churince, Cuatro Ciénegas, Coahila. **2017**, 1994, 1–17.
- (23) Velez, P.; Espinosa-Asuar, L.; Figueroa, M.; Gasca-Pineda, J.; Aguirre-Von-Wobeser, E.; Eguiarte, L. E.; Hernandez-Monroy, A.; Souza, V. Nutrient dependent cross-kingdom interactions: fungi and bacteria from an oligotrophic desert oasis. *Front. Microbiol.* **2018**, 9 (August), 1–15.
- (24) Taboada, B.; Isa, P.; Gutiérrez-Escolano, A. L.; M. del ángel, R.; Ludert, J. E.; Vázquez, N.; Tapia-Palacios, M. A.; Chávez, P.; Garrido, E.; Espinosa, A. C.; et al. The geographic structure of viruses in the Cuatro Ciénegas basin, a unique oasis in northern Mexico, reveals a highly diverse population on a small geographic scale. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 84 (11), 1–25.
- (25) Souza, V.; Eguiarte, L. E.; Siefert, J.; Elser, J. J. Microbial endemism : does phosphorus limitation enhance speciation ? *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6 (july), 559–564.
- (26) Olmedo-Alvarez, G.; Eguiarte, L. E.; Moreno-Letelier, A. divergence and phylogeny of firmicutes from the Cuatro Cienegas basin, México: a window to an ancient ocean. *Astrobiology* **2012**, 12 (7), 674–685.
- (27) Martínez-Carranza, E.; Ponce-Soto, G. Y.; Díaz-Pérez, A. L.; Cadenas, E.; Souza, V.; Campos-García, J. Involvement of cyclodipeptides in the competition of bacterial communities in the oligotrophic churince aquatic system of Cuatro Ciénegas basin dominated by gammaproteobacteria. *Extremophiles* **2018**, 22 (1), 73–85.
- (28) Nighat Fatima, T. I.; Syed Aun Muhammad, M. J.; Safia Ahmed, S. A. and A. M. *Epicoccum sp.*, an emerging source of unique bioactive metabolites. *Acta Pol. Pharm. Res.* **2016**, 73 (1), 13–21.
- (29) Perveen, I.; Asam, M.; Iqbal, T.; Naz, I.; Sehar, S. Isolation of anticancer and antimicrobial metabolites from *Epicoccum nigrum*; endophyte of *Ferula sumbul*. *Microb. Pathog.* **2017**, 110, 214–224.
- (30) Guo, H.; Sun, B.; Gao, H.; Chen, X.; Liu, S.; Yao, X.; Liu, X.; Che, Y. Diketopiperazines from the cordyceps -colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Natur* **2009**, 72, 2115–2119.
- (31) Wangun, H. V. K.; Dahse, H.; Hertweck, C. Epicoccamides B - D , glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum sp.* associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1800–1803.
- (32) Kemami, H. V.; Hertweck, C. Epicoccarines A , B and Epipyridone : tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum sp.* associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa* †. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 49 (0), 1702–1705.
- (33) K. Sharma, S.; Kumar, S.; Chand, K.; Kathuria, A.; Gupta, A.; Jain, R. An update on natural occurrence and biological activity of chromones. *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18 (25), 3825–3852.
- (34) Xia, X.; Qi, J.; Liu, Y.; Jia, A.; Zhang, Y.; Liu, C.; Gao, C.; She, Z. Pimarane diterpenes from the fungus, *Epicoccum sp.* hs-1, associated with *Apostichopus japonicus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3017–3019.
- (35) Ikawa, M.; McGrattan, C. J.; Burge, W. R.; Iannitelli, R. C.; Uebel, J. J.; Noguchi, T. Epirodin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1978**, 31 (2), 159–161.
- (36) Cretu, R.; Bahrim, G.; Stefan, D.; Olteanu, M. Evaluation of physical and chemical characteristics of yellow colorant produced by *Epicoccum nigrum* MIUG 2.15 in crude extracts and emulsions. *Roum. Biotechnol. Lett.* **2008**, 13 (5), 59–68.
- (37) Kortekamp, A. *Epicoccum nigrum* Link: a biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk et Curt.) Berl. et De Toni? *Vitis* **1997**, 36 (4), 215–216.
- (38) Diana, F.; Lima, C. De; Araújo, L.; Oliveira, F. L. De; Aparicio, R.; Jocelyne, A. Epicolactone – natural product isolated from the sugarcane endophytic fungus

- Epicoccum nigrum*. *European J. Org. Chem.* **2012**, 5225–5230.
- (39) Talontsi, F. M.; Dittrich, B.; Schüffler, A.; Sun, H.; Laatsch, H. Epicoccolides : antimicrobial and antifungal polyketides from an endophytic fungus *Epicoccum* sp. associated with *Theobroma cacao*. *European J. Org. Chem.* **2013**, 3174–3180.
- (40) Pessôa, M. G.; Paulino, B. N.; Cezar, M.; Mano, R.; Neri-numa, I. A.; Molina, G.; Pastore, G. M. *Fusarium* species — a promising tool box for industrial biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 3493–3511.
- (41) Tupaki-sreepurna, A.; Kindo, A. J. *Fusarium*: the versatile pathogen. *Indian J. Med. Microbiol.* **2018**, No. 1, 1–10.
- (42) Escrivá, L.; Oueslati, S.; Font, G.; Manyes, L. *Alternaria* mycotoxins in food and feed : an overview. *J. Food Qual.* **2017**, 1–20.
- (43) Lee, H. B.; Patriarca, A.; Magan, N. Mycobiology *Alternaria* in food : ecophysiology , mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology* **2015**, 43 (2), 93–106.
- (44) Musetti, R.; Polizzotto, R.; Vecchione, A.; Borselli, S.; Zulini, L. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola* : an ultrastructural study. **2007**, 38, 643–650.
- (45) Gu, W. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08 , an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 25, 1677–1683.
- (46) Liebermann, B.; Ellinger, R.; Inther, W. G. I.; Ihn, W.; Gallander, H. Tricycloalternarenes produced by *Alternaria alternata* related to ACTG-toxins. *Phytochemistry* **1997**, 46 (2), 297–303.
- (47) Isidoro, M. M.; Toffano, L.; Vieira, P. C.; Forim, M. R.; Rodrigues-filho, E.; Stuart, R. M.; Machado, M. A. Rapid detection of ACTG- and AK-toxins in *Alternaria alternata* by LC-ESI-MS/MS analysis and antifungal properties of citrus compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 27 (8), 1493–1505.
- (48) Yang, T.; Groenewald, J. Z.; Cheewangkoon, R.; Jami, F.; Abdollahzadeh, J.; Lombard, L.; Crous, P. W. Families, genera and species of Botryosphaerales. *Fungal Biol.* **2016**, No. November.
- (49) Slippers, B.; Willem, P.; Jami, F.; Zacharias, J.; John, M. Diversity in the Botryosphaerales : looking back , looking forward. *Fungal Biol.* **2017**, 121 (4), 307–321.
- (50) Esteves, A. C.; Saraiva, M.; Correia, A.; Alves, A. Botryosphaerales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Can. J. Microbiol.* **2014**, 342, 332–342.
- (51) Wei, W.; Jiang, N.; Ning, Y.; Liang, Y.; Ming, H.; Chun, Y.; Weng, S.; Xiang, R. Phytochemistry an antibacterial metabolite from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* F2. *Phytochemistry* **2014**, 100, 103–109.
- (52) Sun, Z.; Li, H.; Liang, F.; Chen, Y.; Liu, H.; Li, S. Two new secondary metabolites from the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. *Molecules* **2016**, 943 (21), 1–6.
- (53) Secretariat of the convention on biological diversity in Montreal. Nagoya protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the convention on biological diversity. **2011**.
- (54) Bautista-Lopez, A. Aislamiento e identificación de metabolitos biodinámicos a partir de especies fúngicas de México, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, 2014.
- (55) Fajardo-Hernández, C. A. Actividad antimicrobiana de ascomicetos de México, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, 2018.
- (56) Villedas-Hernández, O. Bioprospección de hongos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, para el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos., Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, 2018.
- (57) El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B. M.; Cech, N. B.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. High-Resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites

- as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (9), 1709–1716.
- (58) Raistrick, H.; Stickings, C. E.; Thomas, R. Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochemistry* **1951**, *55*, 421–433.
- (59) Aly, A. H.; Edrada-ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Mu, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Scha, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972–980.
- (60) Vertesy, Laszlo; Kurz, Michael; Markus-Erb, Astrid; Toti, L. Fermentative preparation of 2-phenylbenzofurans as antibacterials and antimycotics. WO 2005047275, A1, 2005.
- (61) Li, W.; Yang, X.; Yang, Y.; Duang, R.; Chen, G.; Li, X.; Li, Q.; Qin, S.; Li, S.; Zhao, L.; et al. Anti-phytopathogen, multi-target acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of metabolites from endophytic *Chaetomium globosum*. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30* (22), 2616–2619.
- (62) Sultan, S.; Sun, L.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Munro, M. H. G.; Ramasamy, K.; Weber, J. F. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts. 3 : further lasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae* , an endophyte from *Mapania kurzii*. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (2), 453–455.
- (63) Wright, A. D.; Osterhage, C.; König, G. M. Epicoccamide , a novel secondary metabolite from a jellyfish- derived culture of *Epicoccum purpurascens*. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 507–510.
- (64) Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Kato, Y.; Hirota, H. Aurantosides A and B: cytotoxic tetramic acid glycosides from the marine sponge *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (25), 9690–9692.
- (65) Vilchis-Romero, V. Potencial herbicida de hongos saprófitos y marinos facultativos de México, UNAM, 2018.
- (66) Meng, X.; Mao, Z.; Lou, J.; Xu, L.; Zhong, L.; Peng, Y.; Zhou, L.; Wang, M. Benzopyranones from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. ponipodef 12 and their bioactivities. *Molecules* **2012**, *17* (10), 11303–11314.
- (67) Appl, I. SciFinder® TAN 1711 Papent 2005 Page 1 TAN 1711 Papent 2005, 2018.
- (68) Amrani, M. El; Lai, D.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Siems, K.; Seidel, C.; Schneidenburger, M.; Gaigneaux, A.; Diederich, M.; Feger, D.; et al. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 49–56.

ANEXO



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIOS DE DERREPLICACIÓN Y QUÍMICOS DE HONGOS SAPRÓFITOS DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA

Raúl Enrique Camiña Blando y Mario Figueroa Saldívar
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, CDMX, 04510, México. Email: enrique.cb91@gmail.com; mafiguer@unam.mx.

INTRODUCCIÓN

Los organismos fúngicos de hábitats inexplorados de nuestro país representan fuentes naturales únicas para la obtención de nuevas moléculas bioactivas.¹ Así, el presente trabajo de investigación tiene por objetivo la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana a partir de hongos saprófitos aislados de la reserva de Cuatro Ciénegas (CC; Figura 1). Estos microorganismos fueron cultivados en medio sólido, y sus extractos orgánicos se sometieron a un ensayo de actividad contra cepas Gram (+), Gram (-) y una levadura, utilizando el colorante MTT. Además, los extractos fueron derreplicados contra una base de datos que contiene más de 350 micotoxinas comunes.



Figura 1. Localización geográfica de la reserva de CC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los taxones fueron aislados a partir de una muestra de placa microbiana depositada sobre rocas, fueron fermentados en arroz húmedo durante 21 días, para su posterior maceración y extracción vía reparto entre H₂O-CHCl₃-MeOH. Los extractos orgánicos secos fueron evaluados contra las cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhi* y *C. albicans*. De forma paralela, los extractos se analizaron mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS y los resultados obtenidos de tiempos de retención, perfiles en el UV y espectros de masas de alta resolución en los modos positivo y negativo, fueron comparados con los contenidos en una base de datos "in house" de metabolitos secundarios varios.²

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos de los cultivos axénicos obtenidos se ilustran en la Figura 2. Los rendimientos de los extractos en pequeña y los resultados de actividad antimicrobiana contra las cepas ensayadas se muestran en la Tabla 1. Los estudios de derreplicación revelaron la presencia de diversos policétidos bioactivos (Figura 3).

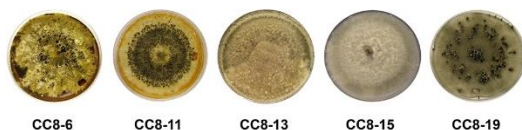


Figura 2. Rendimientos y actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos.

Tabla 1. Rendimientos y actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos.

Extracto	Peso (mg)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC8-1	327.8						
CC8-2	25.5		I	I (IP)			
CC8-3	56.1						
CC8-4	128.9						
CC8-5	40.6						
CC8-6	102		IP				IP
CC8-7	116.6						
CC8-8	70.2						
CC8-9	37.5						
CC8-11	52.8						
CC8-12	192.7						
CC8-13	126.6						
CC8-14	29.4						
CC8-15	44.6						
CC8-16	43.2						
CC8-17	123.7						
CC8-18	20.6						
CC8-19	73.6						
CC8-20	25.4						
CC8-21	53.3						
control positivo MIC (µg/mL)		1.3-2.5	0.8	0.2	3.9-7.8	1.6	12.5
		Inhibición total a 20 µg/mL y a 200 µg/mL					
		Inhibición parcial a 20 µg/mL y total a 200 µg/mL					
		Inhibición total sólo a 200 µg/mL					
		Inhibición parcial a 20 µg/mL y a 200 µg/mL					
		Inhibición parcial sólo a 200 µg/mL					
		control positivo Ampicilina					
		control positivo Nistatina					
		control positivo Gentamicina					

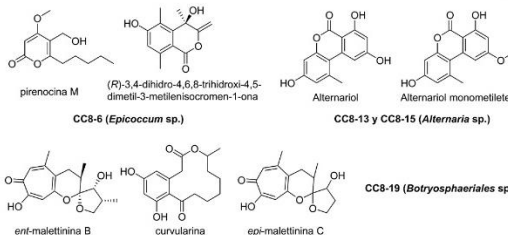


Figura 3. Algunos metabolitos secundarios identificados vía derreplicación.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los estudios biológicos y de derreplicación permiten la selección adecuada de candidatos para la obtención de nuevas moléculas bioactivas y/o moléculas de interés para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. La perspectiva de este trabajo es continuar con el estudio químico bidirigido para la obtención de los compuestos responsables de la actividad biológica.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo de proyectos financiados: CONACyT CB 236564, DGAPA PAPIT IA205017 y PAIP FQ 5000-9145. Beca CONACyT del alumno RECB: CVU/Becario: 770052.

REFERENCIAS

- Aparicio-Cuevas, M.A. et al. (2017). *Journal of Natural Products*, 80, 8, 2311-2318.
- El-Elimat, T., et al. (2013). *Journal of Natural Products*, 76, 9, 1709-1716.