



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

OBTENCIÓN DE METABOLITOS BIODINÁMICOS A PARTIR DE HONGOS
SELECTOS DE LA RESERVA DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ITZEL RUBÍ YEVERINO SÁNCHEZ

TUTOR: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
LABORATORIO 125, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD.MX., ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

VOCAL: DRA. VALERIA F. SOUZA SALDÍVAR

VOCAL: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

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.

Los resultados preliminares de este proyecto se presentaron en la 57th Annual Meeting of the PSN, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México (4-8 de agosto de 2018):

- Itzel Yeverino y Mario Figueroa. Chemical and Biological Studies of Ascomycetes from Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, México (Cartel).

Q.F.B Itzel Rubí Yeverino Sánchez

Sustentante

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Tutor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por ser parte fundamental en mi continua formación como profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero brindado durante mis estudios de posgrado en la UNAM (CVU/No. de Becario: 817283/62045), además del apoyo económico otorgado por diferentes instituciones para la realización de la presente investigación a través de los proyectos CONACyT CB 236564, DGAPA PAPIIT IA205017 y PAIP FQ 5000-9145.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Mario A. Figueroa Saldívar, por permitirme formar parte de su incomparable grupo de trabajo; por su dirección, enseñanza, comprensión, paciencia y confianza otorgadas 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. Nicholas H. Oberlies y Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU., por su apoyo en la realización de los estudios de metabolómica, caracterización taxonómica de los organismos fúngicos, y registro de algunos espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Q.F.B. Alejandro Camacho de la Facultad de Química, UNAM, por proporcionar las cepas utilizadas durante la evaluación del potencial antimicrobiano.

Al personal de la USAI, por la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

A los miembros del jurado designados, por sus enriquecedores comentarios, críticas y observaciones.

A todas las personas que han formado parte de este grupo de trabajo, por su ayuda y por siempre generar un ameno ambiente de trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Importancia de los productos naturales de origen fúngico.....	3
1.2 Biodiversidad de organismos fúngicos	4
1.3 Ambientes inexplorados y extremos	6
1.4 Área de protección de flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila	6
1.5 Estrategias de metabolómica para el descubrimiento de nuevas entidades químicas	8
1.6 Antimicrobianos de origen natural	9
1.6.1 Generalidades.....	9
1.7 Generalidades de los organismos fúngicos	12
1.7.1 Género <i>Aspergillus</i>	12
1.7.1.2 <i>Aspergillus terreus</i> sección <i>terrei</i>	12
1.7.2 Orden Pleosporales	14
1.7.3 Orden Sordariales	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general.....	18

4.2 Objetivos particulares	18
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos objeto de estudio.....	19
5.2 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos	19
5.3 Estudios de metabolómica.....	19
5.4 Preparación de los cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos.....	20
5.5 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala.....	21
5.6 Evaluación del potencial antimicrobiano.....	23
5.7 Estudio químico de las especies CC1-1, CC7-5, CC7-12 y CC9-6.....	23
5.7.1 Aislamiento y purificación de los compuestos 1 al 8 a partir de la especie CC1-1.....	23
5.7.2 Aislamiento y purificación de los compuestos 9-11 presentes en la especie CC7-12.....	25
5.7.3 Aislamiento y purificación de los compuestos 12 y 13 a partir de la especie CC9-6.....	26
5.7.4 Aislamiento y purificación de los productos 14 y 15 a partir de la especie CC7-5.....	28
5.8 Caracterización estructural de los compuestos obtenidos.....	28
5.9 Evaluación del potencial citotóxico	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1 Selección de las especies fúngicas	30
6.1.1 Análisis de la actividad antimicrobiana, perfiles cromatográficos y morfología macroscópica.....	30
6.1.2 Estudios de metabolómica	31
6.1.3 Obtención de los extractos en mediana escala, fraccionamiento primario y evaluación del potencial antimicrobiano.....	32

6.1.4 Caracterización taxonómica	33
6.2 Estudio químico de los microorganismos seleccionados.....	35
6.2.1 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de <i>Aspergillus terreus</i> (CC1-1)	36
6.2.1.1 Aspernólida A (7)	38
6.2.1.2 1"-Hidroxi, 2",3"-epoxi-butirolactona I (1).....	41
6.2.1.3 Aspernólida B (2)	43
6.2.1.4 Butirolactona IV (3)	45
6.2.1.5 Butirolactona V (4)	47
6.2.1.6 2",3"-Dihidro, 3"-metoxi-butirolactona I (5).....	49
6.2.1.7 Compuestos 6 y 8	51
6.2.2 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de <i>Aspergillus</i> sp. (CC7-12).....	56
6.2.2.1 Caracterización de la neosartorina (9)	56
6.2.2.2 Caracterización del piripiropeno A (10) y su derivado 7-desacetilado (11)	59
6.2.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir del orden Sordariales (CC9-6).....	63
6.2.4 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir del orden Pleosporales	72
7. CONCLUSIONES.....	73
8. BIBLIOGRAFÍA	74
9. ANEXO.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fármacos antibacterianos y antifúngicos aprobados por la FDA durante el período 1981-2014 (n=172)	11
2	Esqueletos únicos de productos naturales de origen fúngico.	12
3	Ejemplos selectos de productos naturales de origen fúngico de importancia terapéutica.	13
4	Mapa satelital de México mostrando el valle de CCC y los sitios de muestreo.	15
5	Diagrama general de la estrategia metabolómica basada en UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS.	17
6	Principales causas de mortalidad en el mundo.	19
7	Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por <i>Aspergillus</i> sp.	22
8	Metabolitos secundarios producidos por <i>Aspergillus terreus</i> .	22
9	Cromatogramas del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna tipo flash. (A) Extracto CC1-1; (B) Extracto CC7-5, (C) Extracto CC7-12 y (D) Extracto CC9-6.	30
10	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A y B) y preparativo (C) de la fracción CC1-1 ₅ .	32
11	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de la fracción CC7-12 ₇	33
12	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC7-12 ₁₀ .	33-34
13	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC7-12 ₁₁ .	34
14	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico del producto 13 . (A) Detector ELSD; y (B) Detector UV $\lambda = 281$ nm.	35
15	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC9-6 ₇ .	35
16	Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC7-5 ₃ .	36
17	Cultivos axénicos de los taxa CC9-2, CC9-6 y CC9-7 en PDA.	39
18	Cromatogramas en el UV -PDA y espectros en el UV de los extractos en pequeña escala CC9-2 (A y A.1) CC9-6 (B y B.1) y CC9-7 (C y C.1) .	40
19	Espectros de masas en modo ESI ⁺ para los extractos en pequeña escala CC9-2 (A) , CC9-6 (B) y CC9-7 (C) .	40
20	Cultivos axénicos en APD de los taxa seleccionados para su escalamiento: CC1-1 (A) , CC7-5 (B) , CC7-12 (C) y CC9-6 (D) .	41
21	Ejemplo de cultivo fúngico (mediana escala) en medio de arroz del taxón CC9-6.	42
22	Espectros de masas generados por la técnica de ESI ⁻ de los compuestos 1-8 .	44-45
23	Espectros en el UV de los compuestos 1-8 .	45-46
24	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; arriba) y ¹³ C (100 MHz; abajo) de la aspernólida A (7) en CD ₃ OD.	48

25	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; arriba) y ¹³ C (100 MHz; abajo) del derivado 1''-hidroxi, 2''',3''-epoxi-butirolactona I (1) en CD ₃ OD.	50-51
26	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; arriba) y ¹³ C (100 MHz; abajo) de la aspernólida B (2) en CD ₃ OD.	52
27	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; arriba) y ¹³ C (100 MHz; abajo) de la butirolactona IV (3) en CD ₃ OD.	54
28	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; arriba) y ¹³ C (100 MHz; abajo) de la butirolactona V (4) en CD ₃ OD.	56
29	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; arriba) y ¹³ C (100 MHz; abajo) del derivado 2''',3''-dihidro, 3''-metoxi- butirolactona I (5) en CD ₃ OD.	58
30	Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) de los compuestos 6 (arriba) y 8 (abajo) en CD ₃ OD.	61
31	Espectro en el UV (A) y espectros de masas generados por la técnica de electrospray en los modos ESI ⁺ (B) y ESI ⁻ (C) del compuesto 9 .	65
32	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9 (400 MHz, CDCl ₃).	66
33	Espectros de masas generados por la técnica de electrospray en modo ESI ⁺ de los compuestos (A) 10 y (B) 11 .	68
34	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 10 (400 MHz, CDCl ₃).	69
35	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 11 (500 MHz, CDCl ₃).	69
36	Espectros de masas por la técnica de electrospray en modo ESI ⁺ de los compuestos 12 (A.1) y 13 (A.2 y B).	71
37	Espectro de RMN ¹ H (arriba) y ¹³ C (abajo) del compuesto 12 (400 MHz, DMSO <i>d</i> ₆).	72
38	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 13 (A) (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) y (B) vista parcial δ _H 6.8 a 7.5 ppm.	74
39	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 13 (A) (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) y (B) vista parcial δ _H 120.0 a 136.0 ppm.	75
40	Espectro COSY del compuesto 13 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	76
41	Espectro HSQC del compuesto 13 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	76
42	Vista parcial del espectro HMBC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) y correlaciones clave del compuesto 13	77
43	Espectro en el UV (arriba) y espectro de masas (abajo) por la técnica de ESI ⁻ de los compuestos 14 (A y A.1) Y 15 (B y B.1).	79

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña escala de algunos hongos aislados de CCC.	16
2	Principales clases de antibióticos de origen natural.	18
3	Antimicrobianos de origen fúngico.	19-20
4	Datos generales de las muestras de estudio recolectadas en CCC.	27
5	Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de los extractos orgánicos de las especies estudiadas.	29
6	Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala: CC1-1, CC7-5, CC7-12 y CC9-6.	29-30
7	Compuestos obtenidos a partir de la fracción CC1-1 ₅ .	32
8	Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos CC9-2 , CC9-6 y CC9-7 en pequeña escala.	39
9	Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala, y de sus respectivas fracciones.	42-43
10	iones pseudomoleculares y fórmula molecular de los compuestos 1-8 .	44
11	Datos de RMN (¹ H, 400 MHz y ¹³ C, 100 MHz) para los compuestos 1-8 en CD ₃ OD (δ en ppm y <i>J</i> en Hz).	62-63
12	Datos espectroscópicos de ¹ H RMN de la neosartarina (9) (400 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz; CDCl ₃).	65-66
13	Datos espectroscópicos de RMN ¹ H de los compuestos 10 y 11 en CDCl ₃ (δ en ppm; <i>J</i> en Hz).	68-69
14	Evaluación del potencial citotóxico de los compuestos 12 y 13 .	73
15	Datos espectroscópicos de RMN para los compuestos 12 y 13 (¹ H, 400 MHz y ¹³ C, 100 MHz; δ en ppm; <i>J</i> en Hz; DMSO- <i>d</i> ₆) e isocochliodinol.	78
16	Constantes espectroscópicas de los compuestos 14 y 15 .	79

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

APD	Agar papa-dextrosa	L	Litro
BACE1	Enzima crítica beta-secretasa	m	Metro
bs	Señal simple ancha	m	Multiplete
°C	Grado Celsius	MDA-MB-231	Línea celular de adenocarcinoma humano
CCC	Cuatro Ciénegas Coahuila	MDA-MB-435	Línea celular de melanoma humano
CH ₃ CN	Acetonitrilo	mg	Miligramo
CHCl ₃	Cloroformo	mM	Milimolar
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	mm	Milímetro
CD ₃ OH	Metanol deuterado	μg	Microgramo
CE ₅₀	Concentración efectiva media	μm	Micrómetro
CFU	Unidad formadora de colonia	μM	Micromolar
CHCl ₃	Cloroformo	CMH	Caldo Müeller-Hinton
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media	MHz	Megahertz
CMI	Concentración mínima inhibitoria	min	Minuto
COSY	Resonancia magnética nuclear bidimensional de correlación homonuclear simple (¹ H- ¹ H)	mL	Mililitro
PDB	Caldo papa-dextrosa	MS	Espectrometría de masas
d	Doblete	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
dd	Doble de doblete	<i>m/z</i>	Relación masa/carga
ddd	Doble de doblete dobleteado	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
dt	Doble de triplete		
Da	Dalton	RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido	RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado	RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
δ _C	Desplazamiento químico de carbono	RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
δ _H	Desplazamiento químico de hidrógeno	s	Singulete
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz	t	Triplete
ESI	Ionización por la técnica de electrospray	TA	Temperatura ambiente
g	Gramo	td	Triplete dobleteado
HMBC	Resonancia magnética nuclear bidimensional de correlación heteronuclear múltiple (¹ H- ¹³ C)	TMS	Tetrametilsilano
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	<i>t_R</i>	Tiempo de retención
HSQC	Resonancia magnética nuclear bidimensional de correlación	UPLC-PDA-HRESI-	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a

	heteronuclear simple (^1H - ^{13}C)	MS/MS	espectrometría de masas de alta resolución
ITS	Espaciador de transcripción interno	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
<i>J</i>	Constante de acoplamiento	UV	Espectroscopía en el ultravioleta
Kb	Kilobase	V	Volts
kV	Kilovolts	YESD	Medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa
λ	Longitud de onda		

RESUMEN

Como parte de la continua búsqueda de compuestos antimicrobianos novedosos obtenidos a partir de hábitats inexplorados de México, una serie de 44 organismos saprófitos fue aislada a partir de diferentes muestras colectadas en el área de protección de flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México.

La caracterización taxonómica de los hongos aislados fue realizada mediante el análisis de sus características morfológicas y genéticas del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal. Los extractos orgánicos (CHCl₃-MeOH) obtenidos a partir de los cultivos axénicos en medio sólido fueron evaluados contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Adicionalmente, los extractos se sometieron a estudios de metabolómica a través de la técnica UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS contra una base de datos especializada, la cual contiene más de 350 metabolitos secundarios de origen fúngico mediante la comparación de los tiempos de retención, perfiles cromatográficos en el UV y los espectros de masas (alta resolución) de los componentes presentes en el extracto orgánico. Con base en los resultados de ambas evaluaciones, se seleccionaron cuatro organismos fúngicos para continuar con el estudio químico. Dichos organismos fueron identificados como *Aspergillus terreus* (CC1-1), orden Pleosporales (CC7-5), *Aspergillus* sp. (CC7-12), y orden Sordariales (CC9-6).

El fraccionamiento biodirigido (inhibición del crecimiento >80% a 20 µg/mL y dereplicación negativa) de los cultivos en mediana escala (10x) conllevó al aislamiento de una serie de derivados de butirolactonas (1-8) obtenida a partir de *A. terreus*; la ergocromo neosartorina (9) y los meroterpenoides (10 y 11) obtenidos del hongo *Aspergillus* sp.; las bis-indolil-dihidroxibenzoquinonas, isocochliodinol (12) y el producto natural novedoso (13) obtenidos a partir del hongo del orden Sordariales; y dos productos aromáticos 14 y 15 del hongo del orden Pleosporales. La determinación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de las técnicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas de alta resolución.

Finalmente, los estudios químicos y biológicos realizados durante este proyecto contribuyen al conocimiento del contenido metabólico y biodiversidad de algunas especies fúngicas de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

ABSTRACT

As part of our continuing search for novel antimicrobial compounds from unexplored habitats of Mexico, a series of 44 saprotrophic fungi were isolated from soil and sediment samples collected at the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico.

Taxonomic diversity of fungal isolates was assessed by nuclear ribosomal internal transcribed spacer barcoding. The organic (CHCl₃-MeOH) extracts from the axenic solid (moisture rice) cultures were tested against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. Additionally, they were dereplicated by UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS against a database containing more than 350 fungal secondary metabolites, via recording UPLC retention times, UV data, and full-scan (high-resolution) mass spectra and MS/MS spectra in both positive and negative electrospray ionization modes. Based on the activity from the antimicrobial assay and the results from the derreplication studies, four fungal species were selected to continue with their chemical studies. Such microorganisms were identified as *Aspergillus terreus* (**CC1-1**), order Pleosporales (**CC7-5**), *Aspergillus* sp. (**CC7-12**), and order Sordariales (**CC9-6**).

Bioactive-guided fractionation (growth inhibition > 80% at 20 µg/mL and negative dereplication) of the scaled-up (10×) cultures led to the isolation of a series of butyrolactones derivatives **1-8** from the *A. terreus*; the ergochrome neosartorin (**9**) from the *Aspergillus* sp.; the meroterpenoids **10** and **11**; the bis-indolyldihydroxybenzoquinones isocochliodinol (**12**) and a novel compound (**13**) from a fungus of the order Sordariales; and two aromatic compounds **14** and **15** from a fungus of the order Pleosporales. Their structures were elucidated using 1D and 2D NMR and HRMS data analysis.

Thus, the chemical and biological studies carried out during this research project enrich the knowledge composition and biodiversity of fungal species from the Cuatro Ciénegas, Basin.

1. ANTECEDENTES

1.1 Importancia de los productos naturales de origen fúngico

Debido al surgimiento de nuevas enfermedades, a los diversos fenómenos de resistencia desarrollados por los patógenos, y a la disminución en la tasa de desarrollo de nuevos fármacos, existe una creciente y latente necesidad para obtener nuevos metabolitos secundarios biodinámicos que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos.^{1,2} En este contexto, las investigaciones en el área de la química de productos naturales se han centrado en el estudio químico de plantas y microorganismos obtenidos de áreas inexploradas o ambientes extremos, con el objetivo de lograr el flujo continuo de compuestos bioactivos. Cabe destacar, que aunque la química combinatoria continúa desempeñando un papel importante en el desarrollo de fármacos, los productos naturales siguen siendo la fuente más importante y de inspiración para la síntesis química (**Figura 1**), ya que estos compuestos poseen una vasta diversidad y complejidad estructural.^{3,4}

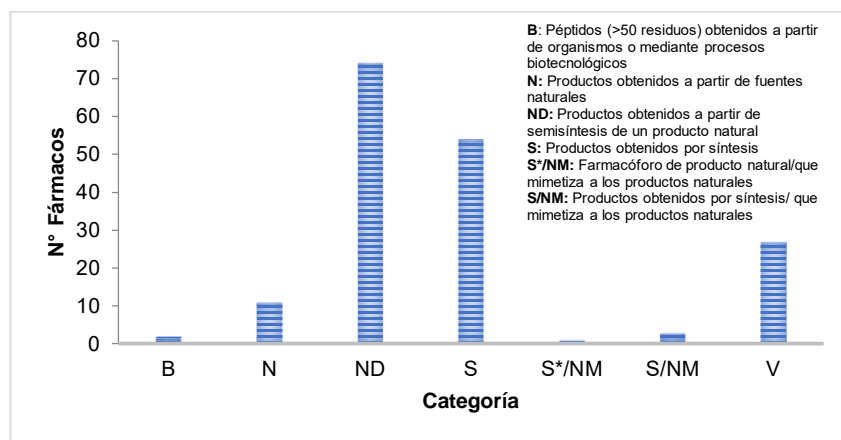


Figura 1. Fármacos antibacterianos y antifúngicos aprobados por la FDA durante el período 1981-2014 (n = 172).⁴

A la fecha han sido descritos más de 500,000 productos naturales, de los cuales, menos de 36,000 provienen de microorganismos, y de éstos, 15,600 son de origen fúngico.¹ Los hongos son organismos ubicuos capaces de biosintetizar moléculas novedosas tomando como sustratos ácidos orgánicos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, azúcares, entre otros (**Figura 2**). En este sentido, los hongos producen metabolitos pertenecientes a clases estructurales altamente diversas, que incluyen compuestos aromáticos, antracenos, aminoácidos, butenólidas, macrólidas, naftalenonas, pironas, terpenos, etc.^{5,6} Además, se ha demostrado que estos organismos poseen numerosos genes “silenciados” capaces de expresar nuevos productos naturales con esqueletos inusuales,³ y estudios recientes han descrito la

capacidad del microbioma para producir hasta 50 compuestos químicos por organismo.²

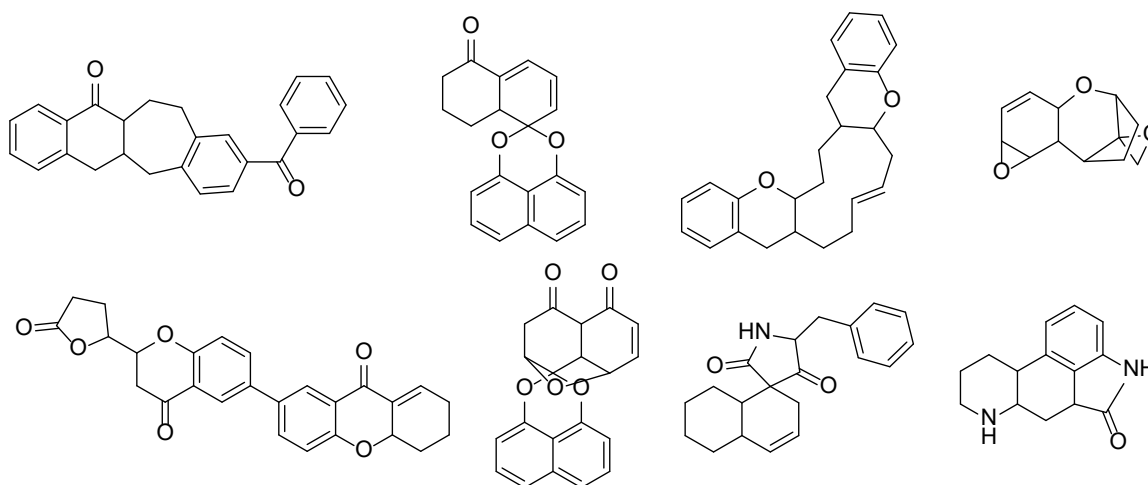


Figura 2. Esqueletos únicos de productos naturales de origen fúngico.³

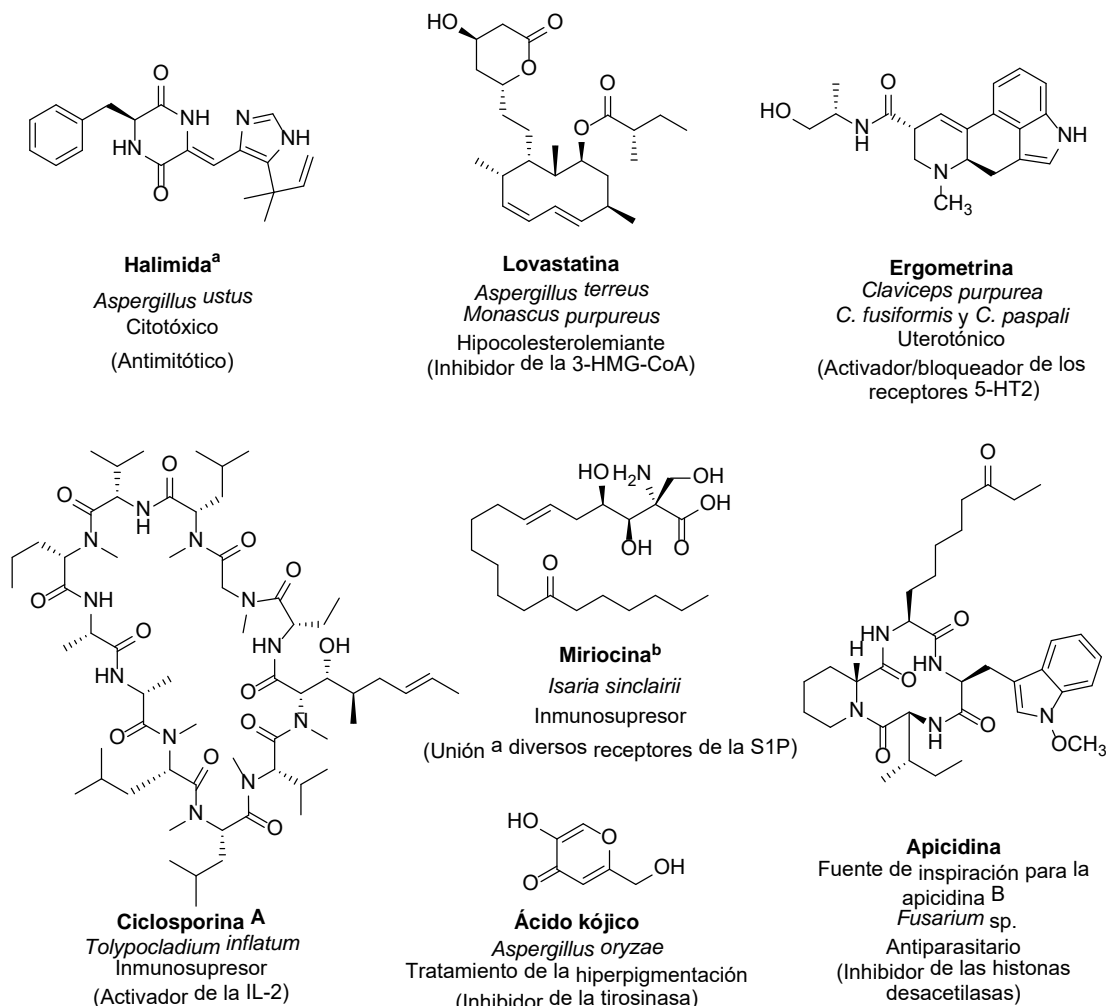
Además, algunos productos naturales de origen fúngico continúan siendo los agentes terapéuticos de elección o compuestos líderes en el desarrollo de terapias efectivas contra enfermedades autoinmunes, cáncer e infecciones (**Figura 3**).^{1,7,8} Asimismo, los hongos son fuentes prolíficas de agroquímicos, y algunos han servido como base para nuevos aditivos en la industria cosmética. Los mejores ejemplos para describir lo anterior son los antibióticos β -lactámicos, como las cefalosporinas y las penicilinas; los hipocolesterolemiantes, como las estatinas y sus derivados; el inmunosupresor ciclosporina A; el inmunomodulador fingolimod obtenido por semisíntesis a partir de la mioricina; el ácido kójico, empleado como antioxidante en los cosméticos y para tratar la hiperpigmentación; entre otros.

1.2 Biodiversidad de organismos fúngicos

El reino de los hongos es un grupo megadiverso morfológica, fisiológica y genéticamente.^{9,10} Las especies de este reino tienen actividades ecológicas esenciales, como la descomposición de la materia orgánica mediante la secreción de enzimas, y pueden ser descritos como organismos filamentosos (en su mayoría) con crecimiento apical, eucarióticos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual (conidios) y sexual, y con pared celular, la cual está constituida por quitina o celulosa.^{11,12}

Se ha estimado que en el mundo existen entre 2.2 a 3.8 millones de especies de hongos, de las cuales, menos del 10% han sido descritas taxonómicamente, y un

número aún menor ha sido estudiado químicamente. La diversidad de especies y la diversificación de grupos de genes biosintéticos con los que cuentan estos organismos denota un potencial casi ilimitado y sin explotar para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas.^{1,13,14}



^{a,b} Precursores de los fármacos plinabulina (fase clínica III) y fingolimod (aprobado desde el 2010)^{1,4,15}

Figura 3. Ejemplos selectos de productos naturales de origen fúngico de importancia terapéutica.

Por otra parte, se sabe que una gran cantidad de las especies fúngicas tienen distribución cosmopolita, sin embargo, existen especies de distribución restringida o endémica, particularmente aquellas que son simbióticas o parasitarias. Las condiciones climáticas, la concentración de nutrientes y tejido hospedero, son factores importantes que determinan la distribución, riqueza y variabilidad de ciertos grupos de hongos.^{16,17} Así, se estima que en México existen 200,000 especies fúngicas, de las cuales, solamente 6,500 han sido descritas en la literatura.^{18,19} Cabe mencionar que los inventarios micológicos de nuestro país se han realizado

principalmente con organismos obtenidos de bosques de coníferas, por lo que la diversidad fúngica mexicana es probable que sea subestimada.¹⁷

1.3 Ambientes inexplorados y extremos

Si tomamos en cuenta que solamente se han descrito taxonómicamente menos del 10% de los organismos fúngicos estimados a nivel mundial, nos podríamos preguntar, en dónde se encuentra el 90% restante de estos organismos. Una de las principales fuentes de diversidad fúngica sin estudiar son los hábitats inexplorados y los ambientes extremos. Estos últimos surgen debido a la formación de cuencas endorreicas, la actividad de las placas tectónicas, la criósfera dinámica, sitios con elevadas concentraciones de sales y gases disueltos, presión, calor, y contenido de metales pesados. Para adaptarse y sobrevivir en dichos ambientes, los microorganismos endémicos suelen acumular metabolitos secundarios con quimiotipos únicos y diversos.^{5,20}

Cabe mencionar que la distribución de algunas especies microbianas, aún en especies cosmopolitas, muestra ciertos patrones biogeográficos, los cuales son principalmente determinados por condiciones microambientales específicas y que podría traducirse en nuevas entidades químicas.²¹ En este sentido, las investigaciones en el área de los productos naturales han centrado sus esfuerzos en el estudio de fuentes naturales obtenidas de áreas inexploradas o ambientes extremos, como son los océanos profundos, las áreas polares, los volcanes, los desiertos y los manglares, siendo estos dos últimos de mayor interés por ser ecosistemas de fácil acceso y con una biodiversidad importante.^{2,22}

1.4 Área de protección de flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila

El área de protección de flora y fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CCC) se encuentra localizada en el estado de Coahuila, México, dentro del desierto Chihuahuense (**Figura 4**). Es una pequeña zona intermontañosa (< 840 km²), a 740 m sobre el nivel del mar, la cual cuenta con siete diferentes sistemas de drenaje permanentes, una macrofauna endémica con una gran diversidad, y una microbiota aún más diversa.^{23,24}

El aislamiento del valle de CCC tiene origen en la regresión final del mar, la cual ocurrió durante el período cenozoico (paleoceno tardío), además de en el levantamiento de la Sierra Madre Oriental.²⁵ Este humedal posee concentraciones muy bajas de nutrientes (fósforo y nitrógeno), y se encuentra dominado por

estromatolitos (microbialitos), que, a diferencia de otros sitios coexisten con matazooarios, formando redes bióticas complejas.²⁶ En CCC, el ratio N: P puede ir desde niveles muy bajos de fósforo (157:1), hasta niveles muy bajos de nitrógeno (1.8:1), siendo la relación promedio que permite la vida en los océanos de 16:1.²⁷ Estas relaciones inusuales, generan estrés nutricional, afectando así la dinámica poblacional, la cual es, quizá, más parecida a la época precámbrica en la tierra.²³

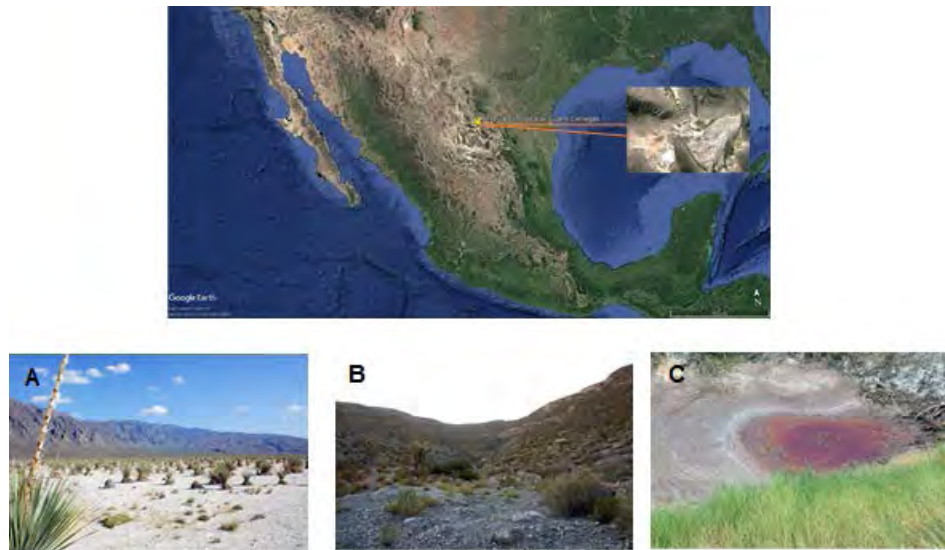


Figura 4. Mapa satelital de México mostrando el valle de CCC y los sitios de muestreo: (A) Churince, (B) pie de la montaña Becerra, y (C) pozas rojas.

Con el objetivo de explorar la biodiversidad fúngica de CCC, Souza y su grupo de trabajo iniciaron una serie de investigaciones sobre los taxa cultivables aislados a partir de sedimentos, suelos, aguas, residuos de plantas, y de tres sistemas contrastantes de aguas dulces en CCC: Churince, la Becerra y las pozas rojas. Los resultados demostraron que esta región cuenta con una diversidad microfúngica moderada, en comparación con otros ambientes áridos, y algunos de los géneros fúngicos más abundantes en la región son *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma*, los cuales han sido identificados para otros sitios áridos.²⁸ Cabe mencionar que para todos estos estudios se contó con el permiso emitido por la Secretaría del 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).






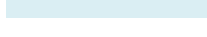



En el 2016, el grupo de investigación del Dr. Figueroa inició un estudio de bioprospección de algunos microorganismos de la región aislados de distintas muestras de suelo, sedimentos y placas microbianas (**Figura 4**).²⁹⁻³¹ Los resultados de la evaluación antimicrobiana de los extractos fúngicos en pequeña escala de los hongos de CCC se indican en el **Cuadro 1**. Cabe destacar que este grupo de

investigación es el primero en realizar estudios químicos y biológicos de hongos aislados de esta región.

Cuadro 1. Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña escala de algunos hongos aislados de CCC.

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>
CC1-1	543.7		Inhibición total a 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL			Inhibición parcial a 20 µg/mL
CC7-1	192.5		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
CC7-2	136.3						
CC7-3	154.7	Inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL		Inhibición total a 200 µg/mL
CC7-4	72.9						
CC7-5	99.3		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL				
CC7-6	41.1						
CC7-7	158.4	Inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
CC7-8	24.2						
CC7-9	23.8						
CC7-10	79.1	Inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
CC7-11	15.2						
CC7-12	285.4		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición total a 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
CC9-1	82.8		Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL				
CC9-2	65.4			Inhibición parcial a 20 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL		
CC9-3	68.2				Inhibición total a 200 µg/mL		
CC9-4	63.9				Inhibición parcial a 20 µg/mL		
CC9-5	36.5					Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL	
CC9-6	74.0						Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
CC9-7	60.3			Inhibición parcial a 20 µg/mL			Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
CIM (µg/mL)		333.0	125.0	0.3	4.6	0.6	2.3

Criterios de inhibición

	Inhibición total a ambas concentraciones (200 y 20 µg/mL)
	Inhibición total a 200 µg/mL e inhibición parcial a 20 µg/mL
	Inhibición total a 200 µg/mL
	Inhibición parcial a ambas concentraciones (200 y 20 µg/mL)
	Inhibición parcial a 20 µg/mL
	No inhibición
	Ampicilina
	Gentamicina
	Nistatina

1.5 Estrategias de metabolómica para el descubrimiento de nuevas entidades químicas

El metaboloma se encuentra conformado por moléculas endógenas de bajo peso molecular, las cuales, forman la huella digital de un organismo en particular. La metabolómica es el estudio de dicha composición y actualmente se realiza

mediante el uso de sistemas analíticos de alta resolución, minería de datos, estadística multivariable, modelado de redes metabólicas, y relación de función de genes, entre otros métodos.^{32,33}

Uno de los principales problemas que se presenta en el descubrimiento de nuevas entidades químicas bioactivas a partir de productos naturales, es el reislamiento de compuestos conocidos. Es por ello que resulta de gran utilidad el poder discriminar desde las etapas iniciales en los estudios químicos, los compuestos ya conocidos de aquellos que son novedosos.³⁴⁻³⁶ En los últimos 5 años, nuestro grupo de investigación ha empleado una estrategia metabolómica para el análisis de extractos fúngicos, basada en técnicas analíticas acopladas de vanguardia como la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS; **Figura 5**), la cual permite un análisis rápido de los extractos (10 min por muestra); y los resultados de tiempos de retención, perfiles en el UV, iones pseudomoleculares en los modos positivo y negativo (ESI^+ y ESI^-), y los patrones de fragmentación moleculares obtenidos, son comparados contra una base de datos creada con estándares puros, y que contiene aproximadamente 350 micotoxinas.

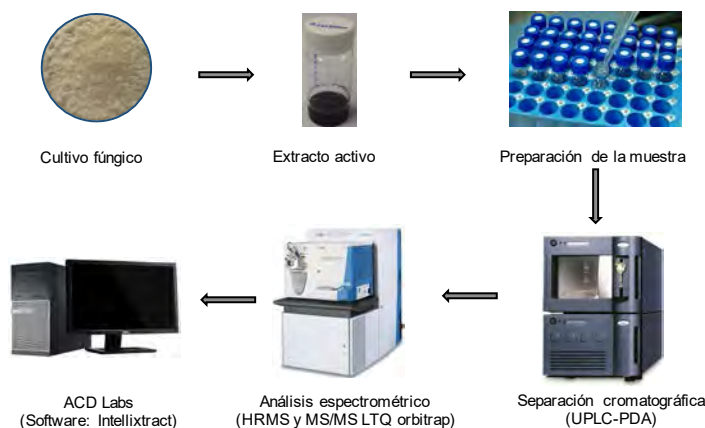


Figura 5. Diagrama general de la estrategia metabolómica basada en la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS.³⁴

1.6 Antimicrobianos de origen natural

1.6.1 Generalidades

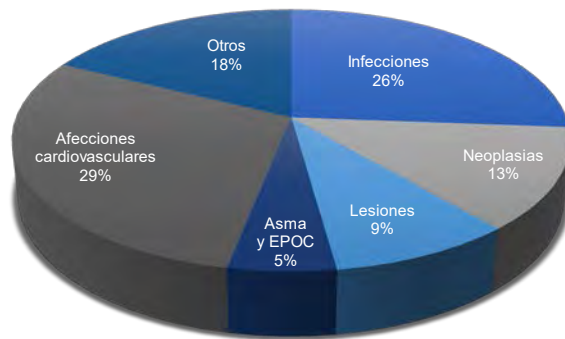
Los antimicrobianos son moléculas orgánicas pequeñas (<1,000 Da) que se emplean para el tratamiento de enfermedades infecciosas. La era de los antibióticos inició con el descubrimiento de la penicilina en el año de 1925 por Alexander Fleming.³⁷ A partir de dicho acontecimiento, las compañías farmacéuticas centraron

sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos fármacos a partir de fuentes naturales, principalmente microorganismos.^{38,39} Así, a la fecha, se han descubierto numerosos antibióticos clasificados en seis clases principales: β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidas, tetraciclinas, glicopéptidos y lipopéptidos (**Cuadro 2**).⁴⁰

Cuadro 2. Principales clases de antibióticos de origen natural.⁴⁰

Año	Clase	Diana	Compuesto
1940	β -Lactámicos	Transpeptidasas	Penicilina G (<i>P. rubens</i>)
1949	Tetraciclinas	Subunidad 30S ribosomal	Clortetraciclina (<i>S. aureofaciens</i>)
1950	Aminoglucósidos	Subunidad 30S ribosomal	Kanamicina (<i>S. kanamyceticus</i>)
1952-1957	Macrólidas	Subunidad 50S ribosomal	Eritromicina (<i>S. erythrae</i>)
1957		RNA polimerasa	Rifampicina (<i>S. mediterranei</i>)
1958	Glicopéptidos	Pared celular	Vancomicina (<i>A. orientalis</i>)
2003	Lipopéptidos	Membrana bacteriana	Daptomicina (<i>S. roseosporus</i>)

Es importante mencionar que las enfermedades infecciosas han sido por siglos, uno de los mayores obstáculos para el progreso y supervivencia de la humanidad (**Figura 6**).⁴¹ En las últimas cuatro décadas, los microorganismos patógenos han desarrollado la habilidad para continuar creciendo aún en presencia del antibiótico a concentraciones que normalmente inhiben su crecimiento.^{42,43} Este fenómeno se conoce como resistencia a los agentes antimicrobianos.



Enfermedad	Muertes anuales (millones)
Respiratorias	3.96
VIH/SIDA	2.77
Diarrea	1.8
Tuberculosis	1.56
Prevenibles con vacunación	1.12
Malaria	1.27
ETS	0.18
Meningitis	0.17
Hepatitis B y C	0.16
Parasitarias	0.13
Dengue	0.02
Otras	1.76

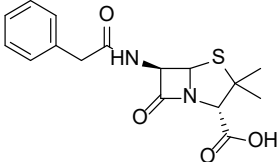
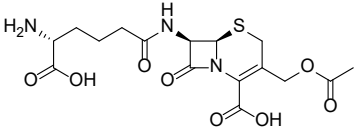
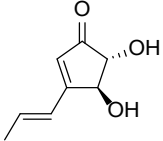
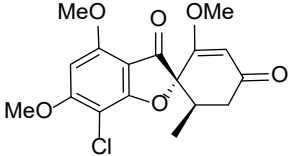
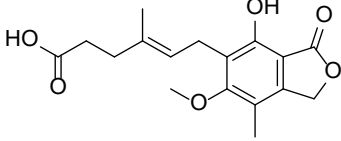
Figura 6. Principales causas de mortalidad en el mundo.⁴¹

Existen dos tipos de resistencia microbiana: la natural y la adquirida. La primera es una característica constante de las cepas de una misma especie bacteriana y no guarda correlación con la dosis del agente antimicrobiano. Por otro lado, cuando la resistencia solamente se presenta en algunas cepas de una especie sensible a un antibiótico, se habla de resistencia adquirida, ya sea por mutación genética o por la adquisición de genes de resistencia (transferencia horizontal). Por último, existen

cuatro mecanismos de resistencia principales: la alteración de las bombas de flujo membranales, la modificación o destrucción del fármaco antimicrobiano, la alteración de la diana molecular y la formación de biocapas; ⁴³⁻⁴⁶ aunque actualmente, otros mecanismos de resistencia están emergiendo y dispersándose mundialmente.

Sin la existencia de antibióticos efectivos, los tratamientos farmacológicos se vuelven costosos y los procedimientos intrahospitalarios peligrosos. En este sentido, la necesidad de buscar nuevas entidades químicas con actividad antimicrobiana a partir de productos naturales se ha convertido en una alternativa para combatir el fenómeno de resistencia. Históricamente, los actinomicetos han sido la principal fuente de antibióticos, sin embargo, cerca del 20% de los antimicrobianos de origen natural han sido aislados a partir de hongos filamentosos (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Antimicrobianos de origen fúngico.

Compuesto	Hongo productor	Diana	Espectro de acción
 <p>Penicilina G</p>	<i>P. rubens</i>	Transpeptidasas	Bacterias Gram positivas
 <p>Cefalosporina C</p>	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Transpeptidasas	Amplio espectro
 <p>Terreína</p>	<i>Aspergillus terreus</i>	No descrita	<i>B. subtilis</i>
 <p>Griseofulvina</p>	<i>P. griseofulvum</i>	Microtúbulos	Hongos dermatofitos
 <p>Ácido micofenólico</p>	<i>P. brevicompactum</i>	Inosina monofosfato deshidrogenasa	Amplio espectro

1.7 Generalidades de los organismos fúngicos

1.7.1 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* p. Micheli exHaller (1768) contiene cerca de 250 especies, las cuales se encuentran clasificadas en 7 subgéneros y 19 secciones.^{47,48} Estos hongos son filamentosos, hialinos, saprótrofos y con reproducción asexual (conidios), y se pueden encontrar en hábitats oligotróficos o extremos, en suelos y material vegetal en descomposición.⁴⁹

Una gran cantidad de hongos pertenecientes a este género han sido explotados industrialmente por casi 100 años. En la industria alimenticia se han utilizado las enzimas (amilasas) producidas por este hongo, aditivos (ácido cítrico), entre otros. Por otra parte, estos hongos producen una gran diversidad de metabolitos secundarios bioactivos y numerosas micotoxinas.⁵⁰

El criterio de clasificación quimiotaxonómico basado en el conocimiento del metabolismo secundario de los organismos, es una herramienta invaluable para la clasificación de las especies de *Aspergillus*, ya que se ha demostrado que el perfil químico es específico de cada especie, siendo algunos metabolitos secundarios biosintetizados solo por especies estrechamente o poco relacionadas dentro de un género, o incluso en especies sin relación.⁵¹ Dentro de una sección, la habilidad para producir un metabolito secundario específico es inherente a un ancestro en común (transferencia lateral). La mayoría de los metabolitos secundarios de *Aspergillus* son producidos por especies de una sola sección y/o de unas cuantas.

Dentro de los siete subgéneros de *Aspergillus*, existen cinco subgéneros que, desde el punto de vista biotecnológico, producen metabolitos secundarios con una gran variedad de actividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antioxidante, entre otras). Dichos subgéneros son: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Cremeri* y *Aspergillus* (**Figura 7**).

1.7.1.2 *Aspergillus terreus* sección *terrei*

Aspergillus terreus es un hongo cosmopolita y ubicuo. Este moho ha sido aislado de suelo de desierto, praderas, composta, y como contaminante de maíz, cebada y cacahuate.⁵² Algunos metabolitos secundarios producidos por *A. terreus* son de interés debido a su diversidad de actividad biológica (antimicrobiana, inhibitoria de BACE1, hipocolesterolemizante, entre otras), o como fuente de inspiración para la síntesis de nuevas moléculas (núcleos complejos que presentan

numerosos centros quirales). Dentro de los compuestos característicos de este hongo se encuentran las γ -butirolactonas, las aspulvinonas, las asterriquinonas y el ácido fenguignárdico. Estos compuestos han sido utilizados como pigmentos y antioxidantes.^{1,52} Asimismo, este hongo es empleado también en la producción industrial del ácido itacónico⁵³, y la lovastatina, estatina empleada para el control de la hipercolesterolemia (**Figura 8**).^{1,54}

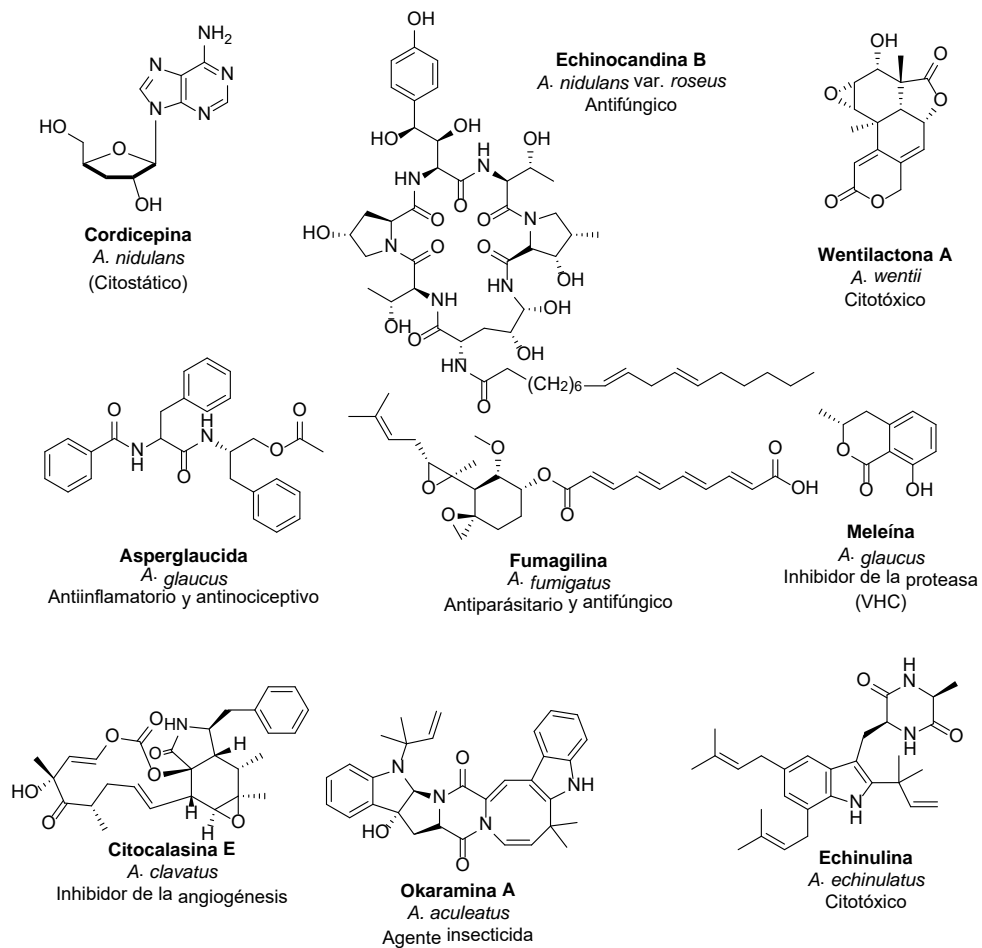


Figura 7. Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus* sp.

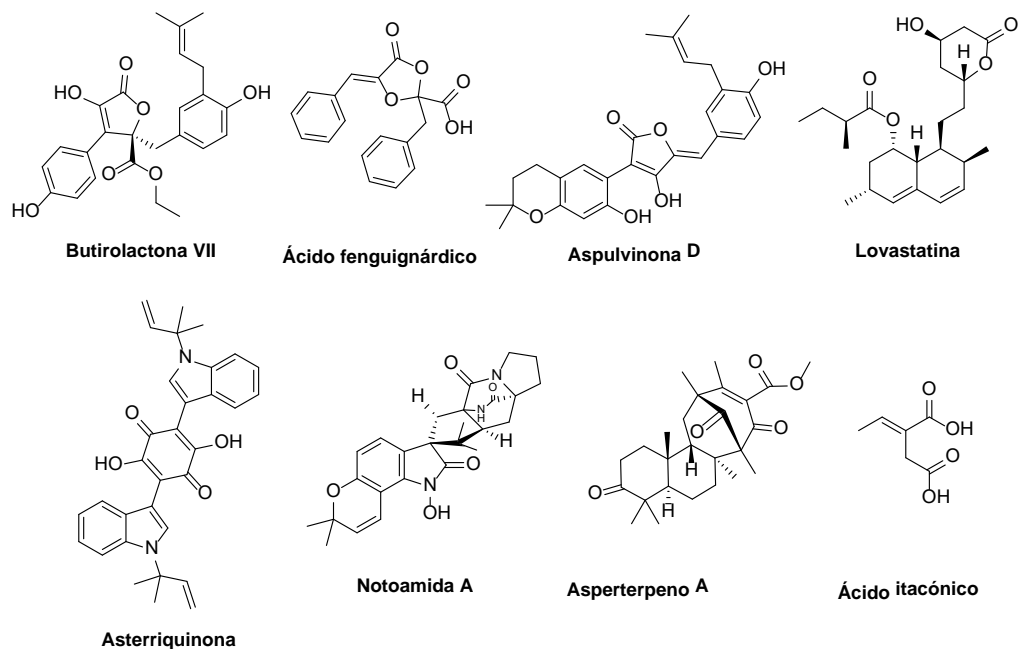


Figura 8. Metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus terreus*.

1.7.2 Orden Pleosporales

El orden Pleosporales, Luttrell ex M.E. Barr, (1987), es el orden más grande dentro de la clase *Dothideomycetes*. Este orden se encuentra formado por 30 familias que agrupan más de 332 géneros y 4,700 especies.^{55,56} Los hongos pertenecientes a este orden tienen diferentes características morfológicas y ecológicas, sin embargo, la mayoría pueden ser encontrados en ambientes acuáticos y/o terrestres, son saprófitos, parásitos de plantas vasculares, endófitos, endoligocénicos y coprófilos.^{57,58} Además, algunas especies son conocidas por causar daños a cultivos agrícolas de importancia económica como cereales, frutas y hortalizas, y por la producción de un amplio espectro de metabolitos secundarios. Algunas de las familias más importantes de este orden son *Leptosphariaceae*, *Lophiostomataceae* y *Pleosporaceae*.^{59,60}

1.7.3 Orden Sordariales

Los taxa pertenecientes a la orden Sordariales Chadeff. Ex. D. Hawksw. & O. E. Erikss. (1986) son generalmente saprófitos, con reproducción sexual, y crecen superficialmente sobre material vegetal y estiércol.⁶¹ Es un grupo taxonómico diverso que contiene entre siete y 14 familias, las cuales se dividen en 115 géneros. Las familias con mayor número de estudios biológicos y químicos dentro de este grupo son *Chaetomiaceae* y *Sordariaceae*.^{55,62,63}

La familia *Chaetomiaceae* del orden Sordariales esta formada por 13 géneros, siendo el género *Chaetomium* el más representativo y diverso, ya que cuenta con cerca de 100 especies descritas en la literatura.⁶⁴ Por otro lado, la familia *Sordariaceae* contiene entre siete y 10 géneros fúngicos, siendo los géneros *Gelasinospora*, *Neurospora* y *Sordaria* los más importantes. Estos taxa son ubicuos de zonas húmedas tropicales y subtropicales.⁶⁵

2. JUSTIFICACIÓN

Como se indicó en la sección de antecedentes, debido al surgimiento de nuevas enfermedades infecciosas y a los fenómenos de resistencia generados por diversos microorganismos, existe una creciente necesidad por obtener nuevas entidades químicas y/o fármacos potenciales para combatir este problema de salud. Es por ello que la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, que sean más eficaces, selectivos, con mecanismos de acción novedosos y/o con menor índice de resistencia, se encuentra plenamente justificada.

En este contexto, y con base en numerosas investigaciones previas, se ha demostrado que los hongos filamentosos, en particular aquellos aislados de hábitats inexplorados y ambientes extremos, representan una de las mejores alternativas para obtener nuevas entidades químicas líderes para el desarrollo de terapias efectivas contra enfermedades infecciosas.

Con base en una serie de resultados previos de nuestro grupo de trabajo, se decidió trabajar con una colección hongos de CCC que mostraron una actividad antimicrobiana importante en los ensayos biológicos pertinentes, con la finalidad de encontrar a las entidades químicas responsables de dicha actividad.

3. HIPÓTESIS

Los microorganismos obtenidos de hábitats inexplorados de nuestro país, como el valle de CCC, debido a su adaptación ambiental, endemismo y capacidad para impedir la inserción de organismos ajenos al ecosistema, son una fuente de metabolitos secundarios con diversidad estructural inusual, y con posible aplicación como compuestos líderes en el desarrollo de nuevos fármacos, y/o en la terapéutica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Continuar con el estudio químico y biológico de una serie de organismos fúngicos aislados a partir de muestras de suelo y sedimento provenientes de CCC, con la finalidad de obtener nuevos compuestos con potencial antimicrobiano.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer la viabilidad y pureza de un grupo de organismos fúngicos selectos obtenidos de CCC.
- Realizar la evaluación del potencial antimicrobiano y los análisis de metabolómica de los extractos orgánicos preparados en pequeña y mediana escala.
- Seleccionar los taxa objeto de estudio, preparar sus cultivos en mediana escala y obtener los correspondientes extractos orgánicos.
- Caracterizar taxonómicamente a los organismos objeto de estudio mediante el análisis del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal.
- Realizar el estudio químico biodirigido de los extractos en mediana escala para la obtención de los compuestos puros a partir de las fracciones activas.
- Caracterizar a los compuestos aislados, utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos objeto de estudio

Los organismos fúngicos objeto de este estudio fueron aislados a partir de diversas muestras de sedimento y de suelo colectadas en CCC. ^{29,31}Para cada muestra, se realizó un registro digital, así como, el registro de las coordenadas geográficas del sitio de colecta y se le asignó un código interno (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Datos generales de las muestras de estudio recolectadas en CCC.

Código	Fecha de colecta dd/mm/aaaa	Lugar de colecta Coordenadas/elevación (msnm)	Tipo de muestra
CC1	06/09/2015	Churince 26°51'1"N; 102°8'54"W (765.0)	Sedimento
CC7	09/09/2015	Pie de la montaña Becerra 26°52'42"N; 102°8'8"W (838.2)	Suelo
CC9	11/09/2015	Pozas rojas 26°52'18"N; 102°1'12"W (740.0)	Suelo

5.2 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos

La identificación taxonómica de los taxones fúngicos identificados con las claves **CC1-1**, **CC7-5**, **CC7-12** y **CC9-6**, se realizó mediante el análisis de sus características morfológicas y genéticas del espaciador de transcripción interno del RNA ribosomal (ITS). En esta técnica se realiza la secuenciación de la región ribosomal ITS del ADN, ya que esta posee un alto grado de conservación. Adicionalmente, se realizó el análisis comparativo de las secuencias obtenidas con aquellas reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). ⁶⁶

5.3 Estudios de metabolómica

Los estudios de metabolómica se realizaron mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS). Los análisis por UPLC se realizaron en un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., MA, EEUU) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) empleando una columna Acquity BEH C₁₈ (Waters Co., MA, EEUU; 1.7 μm, 2.1 × 10 mm) y una mezcla de elución binaria constituida por CH₃CN (A)-ácido fórmico 0.1 % (B), en un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% A hasta 100% A en 8 minutos,

manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. La detección en el ultravioleta se realizó mediante un barrido desde 200 hasta 400 nm con una resolución de 4 nm. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información fueron realizados utilizando el programa Empower 2.0.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución se realizaron por la técnica de ionización mediante electroespray (HRESIMS) en los modos positivo y negativo (ESI^+ y ESI^- , respectivamente) en un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive (ThermoFisher Inc., MA, EEUU). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: ESI^+ : temperatura del capilar y voltaje para la fuente, 275° C y 4.5 kV, respectivamente; 20 V para el voltaje del capilar y 95 V para la lente del tubo; y en ESI^- : temperatura del capilar y voltaje para la fuente, 275° C y 3.5 kV, respectivamente; 42 V para el voltaje del capilar y 110 V para la lente del tubo.

Como gas acarreador se empleó nitrógeno, el cual se fijó entre 20 y 25 unidades arbitrarias para el modo positivo y negativo, respectivamente. El control del instrumento y el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa Xcalibur 2.1 (Thermo). Para cada análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de dioxano-MeOH (1:1) para obtener una concentración final de 2 mg/mL.

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

A partir de los cultivos axénicos de los taxones objeto de estudio (punto 5.1), se procedió a la preparación (por duplicado) de los cultivos en mediana escala en medio sólido, además de la preparación de los respectivos extractos orgánicos. Para ello, cada hongo fue cultivado en 100 mL de medio líquido de enriquecimiento, conteniendo extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%) (YESD). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante (100 rpm) durante cinco días, con la finalidad de incrementar la biomasa. Posteriormente, cada cultivo fue vertido en matraces Erlenmeyer que contenían substrato sólido de arroz (100 g arroz / 200 mL agua). El proceso de fermentación se realizó durante 21 días a temperatura ambiente con fotoperiodos de luz/obscuridad de 12/12 horas.

Posterior al período de fermentación, se realizó la preparación de los extractos orgánicos mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante (100 rpm) durante 8 horas, empleando como mezcla de extracción 400 mL de $CHCl_3$ -MeOH (1:1). Transcurrido el tiempo de extracción, se procedió a filtrar el contenido de cada matraz; y el filtrado obtenido se sometió a un

proceso de reparto con 400 mL de CHCl_3 y una cantidad de agua tal que se ajustara a un volumen final de 2 L. Enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa y esta última se sometió a un proceso de reparto con 200 mL CHCl_3 . Las fracciones orgánicas reunidas se concentraron a sequedad a presión reducida. Finalmente, esta última fase orgánica se resuspendió en una mezcla de CH_3CN - MeOH (1:1) (200 mL), y se sometió a un proceso de desgrase con 200 mL de hexano; la fracción de hexano se descartó y la fase orgánica se concentró a sequedad a presión reducida.

5.5 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala

De manera general, el fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala se realizó mediante una cromatografía en columna tipo flash, en un cromatógrafo CombiFlash[®] Rf system (Teledyne ISCO., NE, EEUU), equipado con una bomba binaria, y los detectores de UV/Visible de arreglo de fotodiodos y evaporativo de dispersión de luz. Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil, un gradiente de polaridad creciente entre diferentes mezclas de hexano, CHCl_3 y MeOH . Las condiciones de estos análisis se resumen en los **Cuadros 5 y 6** y en la **Figura 9**.

Cuadro 5. Condiciones de análisis por cromatografía tipo flash de los extractos orgánicos de las especies estudiadas.

Extracto	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de equilibrio	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes por columna
CC1-1	5.4	120	1.5	23.0	85.0	34.1
CC7-5	0.31	12	2.0	15.0	30.0	50.0
CC7-12	1.5	40	2.0	23.0	45.0	50.0
CC9-6	0.84	40	2.0	23.0	45.0	50.0

Cuadro 6. Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos en mediana escala: **CC1-1**, **CC7-5**, **CC7-12** y **CC9-6**.

CC1-1			CC7-5		
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1-32	CC1-1 ₁	3.2	1-13	CC7-5 ₁	1.3
33-70	CC1-1 ₂	19.8	14-19	CC7-5 ₂	82.5
71-110	CC1-1 ₃	313.2	20-25	CC7-5 ₃	17.7
111-210	CC1-1 ₄	29.9	26-35	CC7-5 ₄	8.7
211-232	CC1-1 ₅	6038.4	36-47	CC7-5 ₅	4.6
233	CC1-1 ₆	261.7	48-49	CC7-5 ₆	7.2
Cantidad recuperada		6666.2	50-52	CC7-5 ₇	39.5

Porcentaje de recobro	123.0	53-55	CC7-5 ₈	10.2
		56-58	CC7-5 ₉	28.3
		59	CC7-5 ₁₀	105.5
		Cantidad recuperada		305.5
		Porcentaje de recobro		98.3

CC7-12			CC9-6		
Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)	Fracción	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1-15	CC7-12 ₁	2.5	1-25	CC9-6 ₁	28.1
16-20	CC7-12 ₂	9.1	26-30	CC9-6 ₂	17.1
21-27	CC7-12 ₃	551.9	31-33	CC9-6 ₃	91.3
38-32	CC7-12 ₄	233.0	34-37	CC9-6 ₄	130.6
33-37	CC7-12 ₅	69.5	38-44	CC9-6 ₅	51.8
38-49	CC7-12 ₆	19.5	45-61	CC9-6 ₆	74.8
50-65	CC7-12 ₇	70.7	62-75	CC9-6 ₇	29.8
66-75	CC7-12 ₈	14.4	76-77	CC9-6 ₈	76.7
76-77	CC7-12 ₉	151.5	78-80	CC9-6 ₉	73.2
78-82	CC7-12 ₁₀	116.8	81	CC9-6 ₁₀	243.9
83-87	CC7-12 ₁₁	52.3	Cantidad recuperada		817.3
88-94	CC7-12 ₁₂	116.0	Porcentaje de recobro		97.2
95	CC7-12 ₁₃	152.0			
Cantidad recuperada		1559.2			
Porcentaje de recobro		97.8			

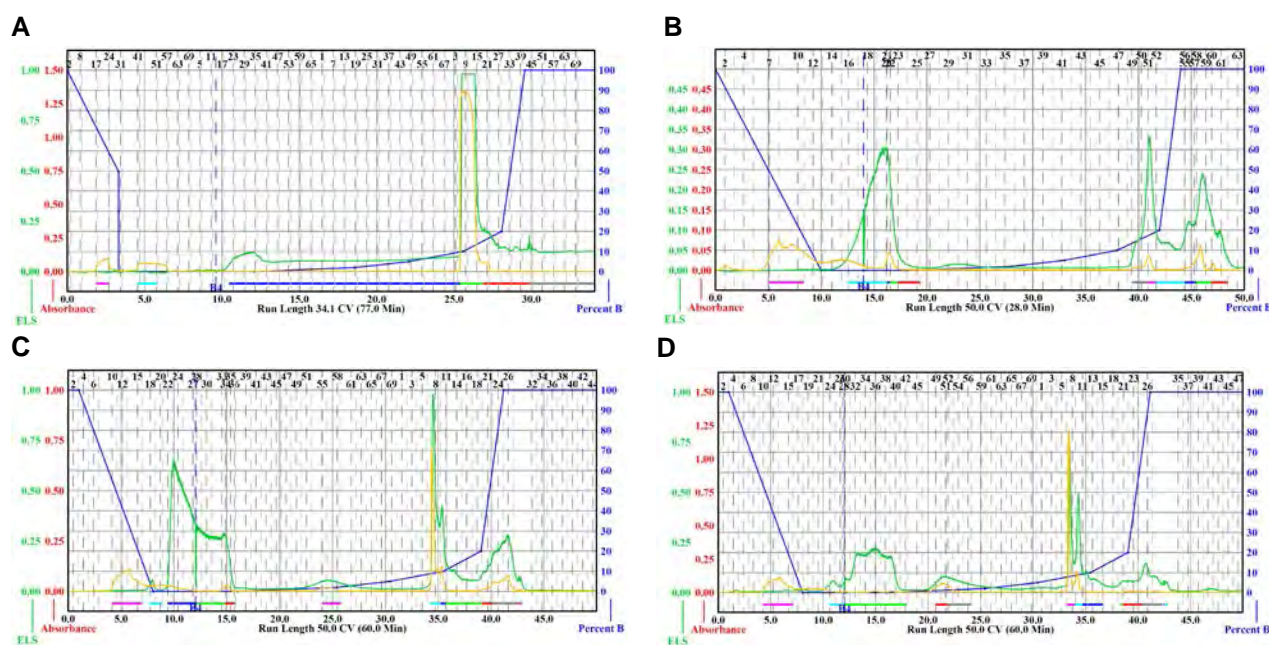


Figura 9. Cromatogramas del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna tipo flash. **(A)** Extracto CC1-1, **(B)** Extracto CC7-5, **(C)** Extracto CC7-12 y **(D)** Extracto CC9-6. La señal en verde corresponde al detector ELSD y en amarillo al detector PDA.

5.6 Evaluación del potencial antimicrobiano

La actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones se determinó empleando el método de microdilución con el colorante MTT, contra una batería de microorganismos Gram positivo [*Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], Gram negativo [*Escherichia coli* (ATC 10536), *Salmonella typhi* (ATCC 33459), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)] y la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231).^{67,68} Todos los microorganismos fueron proporcionados por el cepario de la Facultad de Química, UNAM, y posteriormente incubados por 24 h a 37° C y como medios de cultivo se emplearon caldo Müeller-Hinton (MH), caldo papa-dextrosa (CPD), agar papa-dextrosa (APD) y/o agar nutritivo (AN).

Los ensayos correspondientes se efectuaron en microplacas de 96 pozos y todas las evaluaciones se realizaron por triplicado. Brevemente, cada pozo contenía 100 µL de una suspensión en solución salina del microorganismo de prueba ajustada al 0.5 del estándar turbidimétrico de McFarland (1×10^8 CFU/mL). Posteriormente, se adicionó una alícuota (50 µL ó 5 µL) de la muestra disuelta en DMSO (10%) y 145 µL o 100 µL de medio MH, en cada pozo; enseguida la placa se incubó durante 24 hrs a 37°C. Al término del período de incubación, a todos los pozos se les adicionó 10 µL del reactivo revelador (colorante MTT 5 mg/mL MeOH), y enseguida se incubó la microplaca por 30 minutos a 37°C. Finalmente, se estableció de manera cualitativa, observando el cambio en la coloración de amarillo a púrpura al adicionar el colorante MTT, la inhibición del crecimiento microbiano, a las dos concentraciones evaluadas. Como controles positivos se utilizaron a los fármacos ampicilina, gentamicina y nistatina.

5.7 Estudio químico de las especies CC1-1, CC7-5, CC7-12 y CC9-6.

5.7.1 Aislamiento y purificación de los compuestos 1 al 8 a partir de la especie CC1-1.

El aislamiento y purificación de los componentes presentes en la fracción primaria CC1-1₅ (6.0 g) (**Cuadro 6**) se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) tanto analítica y preparativa; ambos análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con los detectores PDA y ELSD Este último detector se estabilizó utilizando las siguientes condiciones: ganancia 100, presión de gases 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de 70°C ± 25°. Todos los análisis cromatográficos a nivel analítico se realizaron en una columna Kinetex C₁₈ (5 µM,

250 × 4.6 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 15% B por 5 min; 15% a 100% B en 15 min; 100% B por 5 min; y 15% B por 7 min; tiempo de corrida: 32 min; flujo: 1 mL/min; longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm. El control del equipo, procesamiento y manipulación de los datos se realizó utilizando el software Empower versión 3.0 (Waters).

Así, mediante el escalamiento de las condiciones desarrolladas a nivel analítico, en una columna Kinetex C₁₈ (5 μm, 100 Å, 250 × 21.2 mm); y como fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); con el gradiente de elución: 40% a 75% B en 20 min; 100% B por 5 min; y 40% B por 7 min; tiempo de corrida: 32 min; flujo 21.24 mL/min; longitudes de onda de detección: 254, 307 y 365 nm; tiempo de recolección 6 segundos (**Figura 10**); se realizó la separación de los compuestos **1-8** (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Compuestos obtenidos a partir de la fracción CC1-1₅.

Compuesto	t _R (min)	Peso obtenido (mg)
1'''-Hidroxi, 2''',3'''-epoxi-butirolactona I (1) ⁶⁹	5.6	1.6
Aspernólida B (2) ⁷⁰	6.2	3.6
Butirolactona IV (3) ⁷¹	7.5	4.1
Butirolactona V (4) ⁷²	7.8	3.5
2''',3'''-Dihidro, 3'''-metoxi-butirolactona I (5) ⁷⁰	8.9	2.6
6 ^{73,74}	11.6	0.9
Aspernólida A (7) ⁷⁰	13.6	23.9
8 ⁷⁵	15.3	1.4

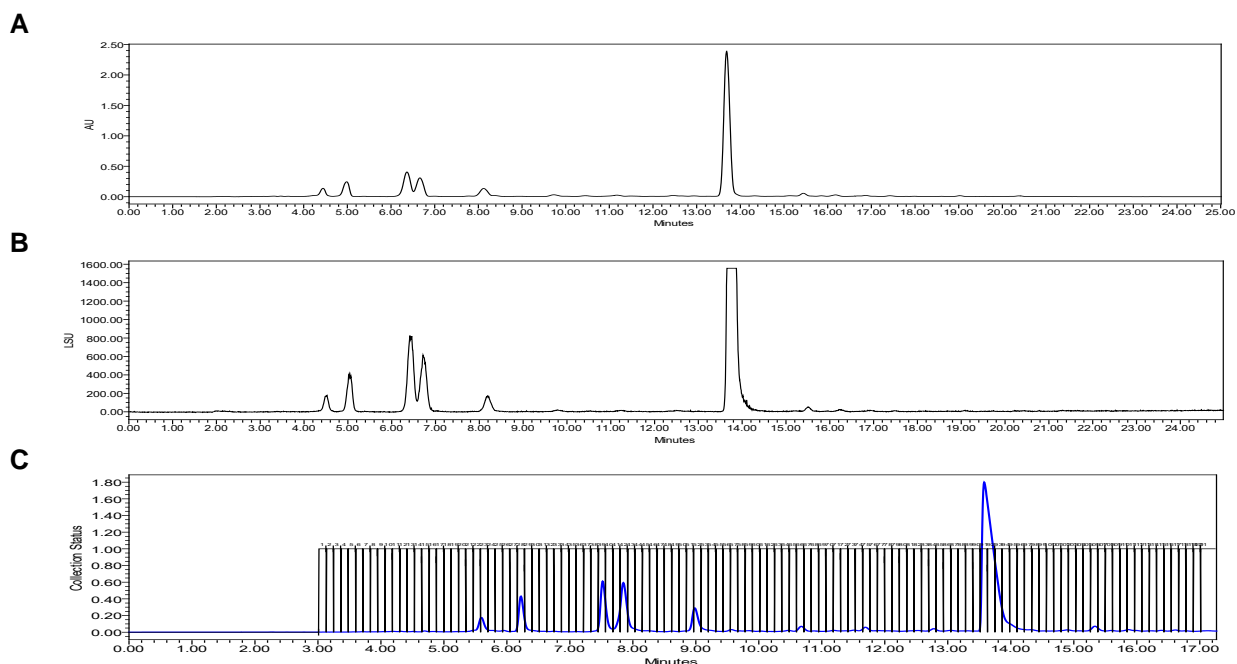


Figura 10. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (**A** y **B**) y preparativo de la fracción primaria CC1-1₅. (**A,C**) Detector UV $\lambda = 307$ nm; y (**B**) Detector ELSD.

5.7.2 Aislamiento y purificación de los compuestos 9-11 presentes en la especie CC7-12.

El fraccionamiento preliminar de la especie identificada con el código interno CC7-12 (**Cuadro 6**) por cromatografía en columna tipo flash, permitió la obtención de un conjunto de 13 fracciones primarias. La resolución cromatográfica de las fracciones secundarias CC7-12₇, CC7-12₁₀ y CC7-12₁₁ tanto a nivel analítico como preparativo, utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas en los párrafos anteriores permitió el aislamiento de los compuestos conocidos neosartorina ⁷⁶ (**Figura 11**) (**9**; t_R 25.0 min, 70.7 mg), piriropeno A ⁷⁷ (**Figura 12**) (**10** t_R 7.4 min, 1.7 mg) y el derivado 7-desacetilado del piriropeno A ^{78,79} (**11**; t_R 5.17 min, 0.8 mg) (**Figura 13**), a partir de CC7-12₇, CC7-12₁₀ y CC7-12₁₁, respectivamente.

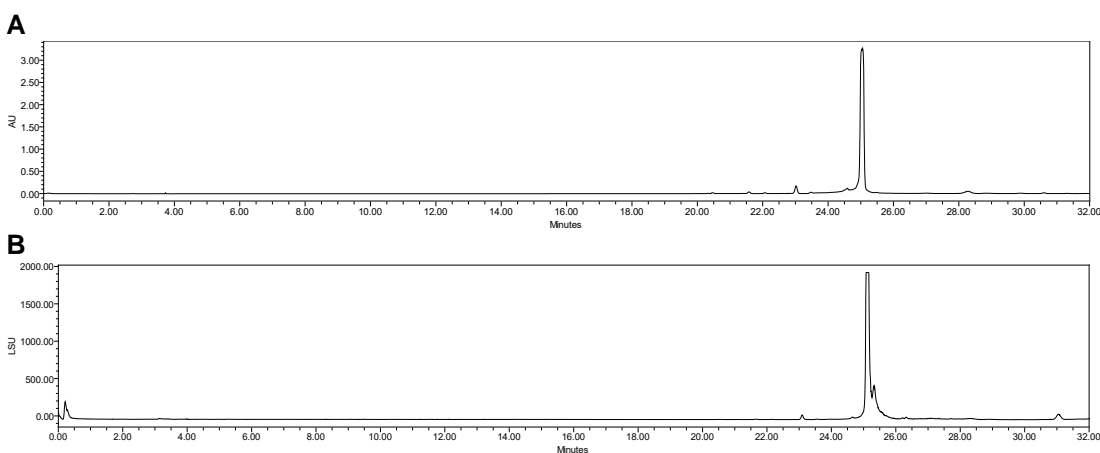
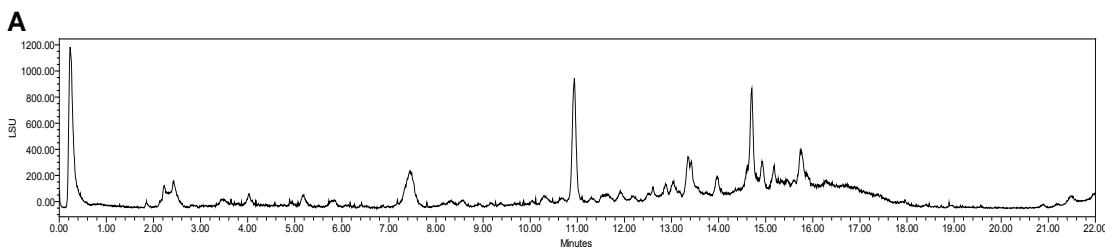


Figura 11. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de la fracción CC7-12₇. (A) Detector UV $\lambda = 333$ nm; y (B) Detector ELSD. Columna Gemini C₁₈ (5 μ m, 100 Å, 250 \times 4.6 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 15% B por 5 min; 15% a 100% B en 15 min; 100% B por 5 min; y 15% B por 7 min; tiempo de corrida: 32 min; flujo: 1 mL/min; longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm.



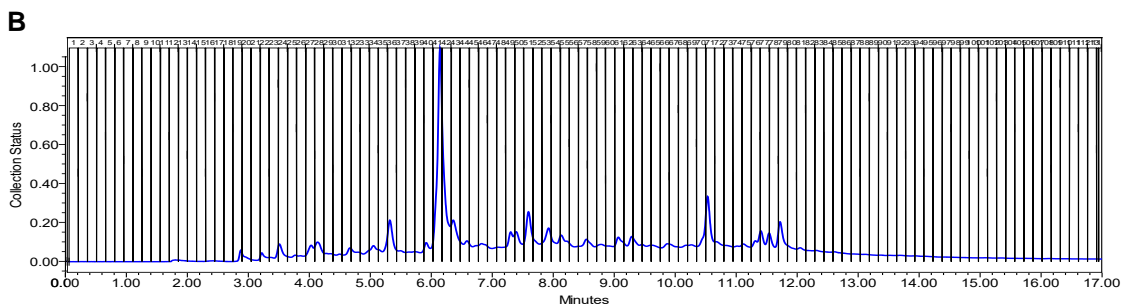


Figura 12. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC7-12₁₀. (A) Detector ELSD; y (B) Detector UV $\lambda = 280$ nm. Columna Gemini C₁₈ (5 μ m, 100 Å, 250 \times 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 40% a 100% B en 10 min; 100% B por 5 min; y 40% B por 7 min; tiempo de corrida: 22 min; flujo: 21.24 mL/min; longitudes de onda de detección: 254, 280 y 365 nm; tiempo de recolección 8.5 s.

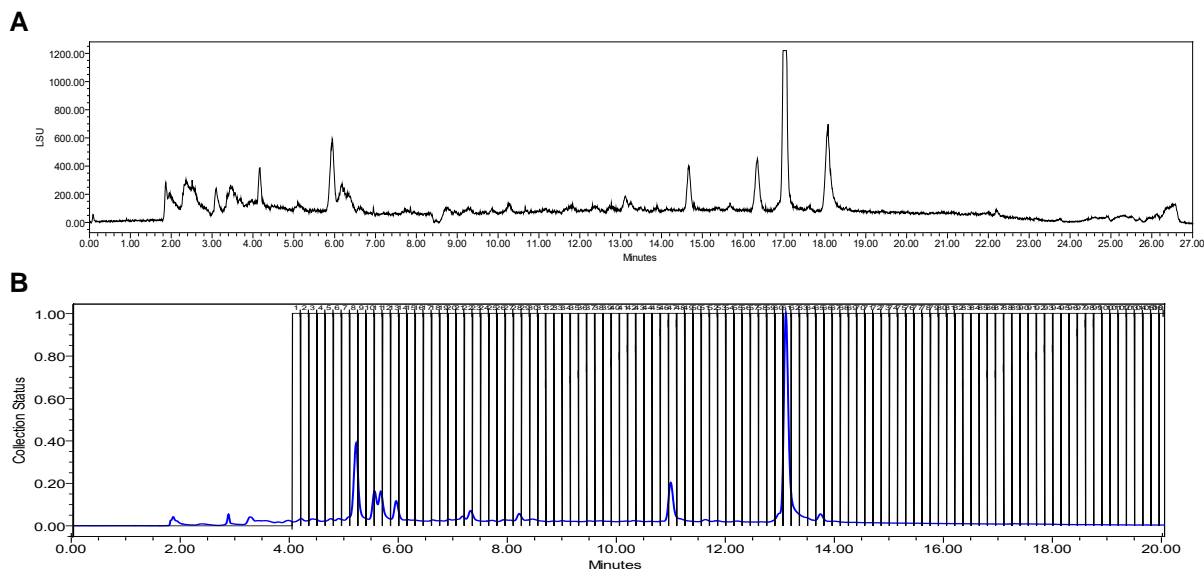


Figura 13. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC7-12₁₁. (A) Detector ELSD; y (B) Detector UV $\lambda = 333$ nm. Columna Gemini C₁₈ (5 μ m, 100 Å, 250 \times 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 40% a 100% B en 15 min; 100% B por 5 min; y 40% B por 7 min; tiempo de corrida: 27 min; flujo: 21.24 mL/min; longitudes de onda de detección: 254, 333 y 365 nm; tiempo de recolección 8 s.

5.7.3 Aislamiento y purificación de los compuestos 12 y 13 a partir de la especie CC9-6.

Los análisis por HPLC a nivel analítico [columna Gemini C₁₈ (5 μ m, 110 Å, 250 \times 4.6 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 70% a 100% B en 15 min; 100% B por 5 min; y 40% B por 7 min; tiempo de corrida: 27 min; flujo: 1 mL/min; longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm]

de la fracción activa CC9-6₆ permitió establecer la presencia de un componente mayoritario (**Figura 14**), el cual fue caracterizado como el 2-(5,6-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-1*H*-indol-3-il)-3,6-dihidroxi-5-(6-(3-metilbut-2-en-1-il)-1*H*-indol-3-il)-ciclohexa-2,5-dien-1,4-diona, el cual constituye un producto natural novedoso (**13**; t_R 16.10 min, 74.8 mg). Finalmente, la separación y purificación por HPLC de los compuestos presentes en la fracción CC9-6₇, permitió aislar 7.5 mg de un producto identificado como el isocochliodinol^{80,81} (**12**; t_R 10.48 min) (**Figura 15**).

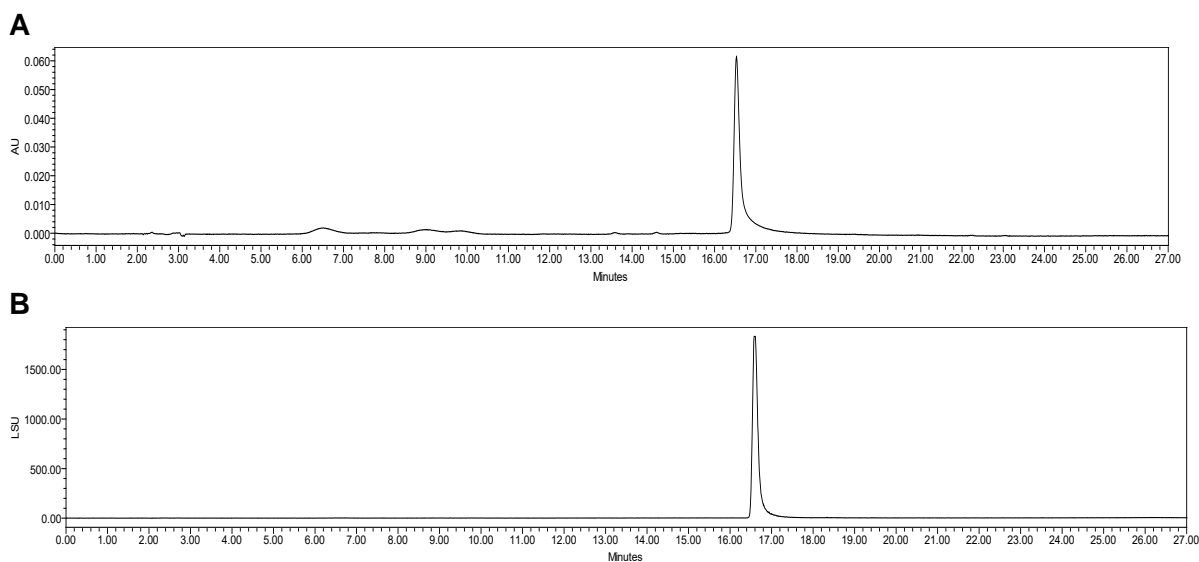


Figura 14. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico del producto **13**. (A) Detector ELSD; y (B) Detector UV $\lambda = 281$ nm.

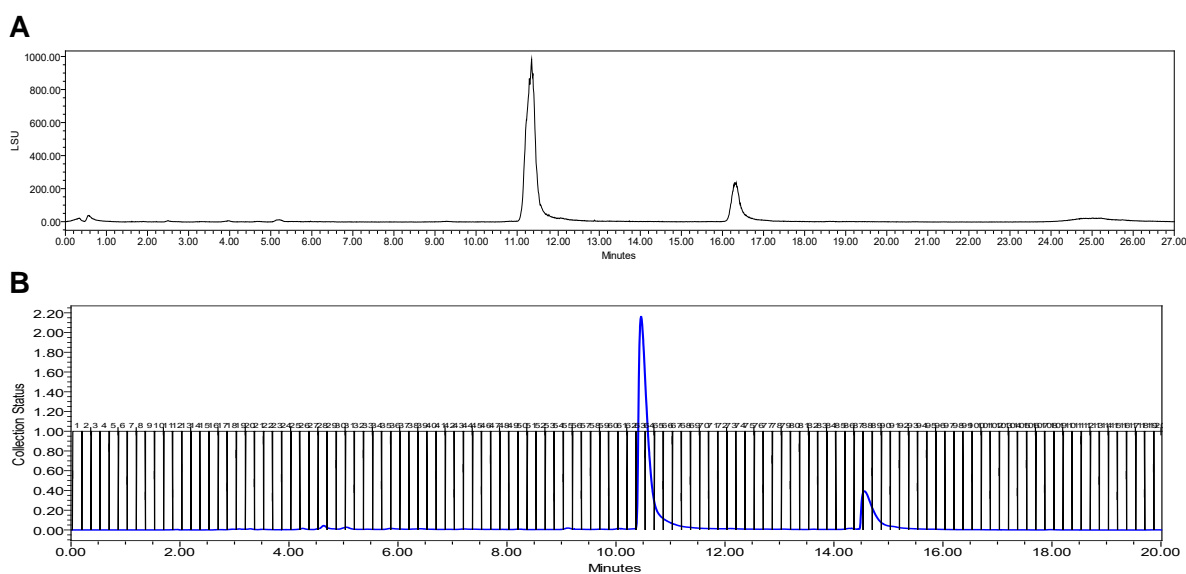


Figura 15. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (A) y preparativo (B) de la fracción CC9-6₇. (A) Detector ELSD; y (B) Detector UV $\lambda = 281$ nm. Columna Gemini C₁₈ (5 μ m, 100 Å, 250 \times 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 70%

a 100% B en 15 min; 100% B por 5 min; y 70% B por 7 min; tiempo de corrida: 27 min; flujo: 21.24 mL/min; longitudes de onda de detección: 254 y 365 nm; tiempo de recolección 8 s.

5.7.4 Aislamiento y purificación de los productos **14** y **15** a partir de la especie **CC7-5**.

La resolución por HPLC preparativo del conjunto de fracciones identificadas como CC7-5₃₋₉, reunidas con base en su similitud cromatográfica, utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas en el inciso anterior de esta parte experimental, permitió la separación de los compuestos identificados como **14** (t_R : 9.9 min; 2.3 mg) y **15** (t_R : 12.1 min; 1.8 mg).

Este análisis se realizó en una columna semipreparativa Gemini C₁₈ (5 μ M, 110 Å, 250 \times 4.6 mm); fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH₃CN (B); gradiente de elución: 60% a 100% B en 20 min; 100% B por 5 min; y 40% B por 7 min; tiempo de corrida: 32 min; flujo 4.72 mL/min; longitudes de onda de detección: 254, 338 y 365 nm; tiempo de recolección 10 segundos (**Figura 16**).

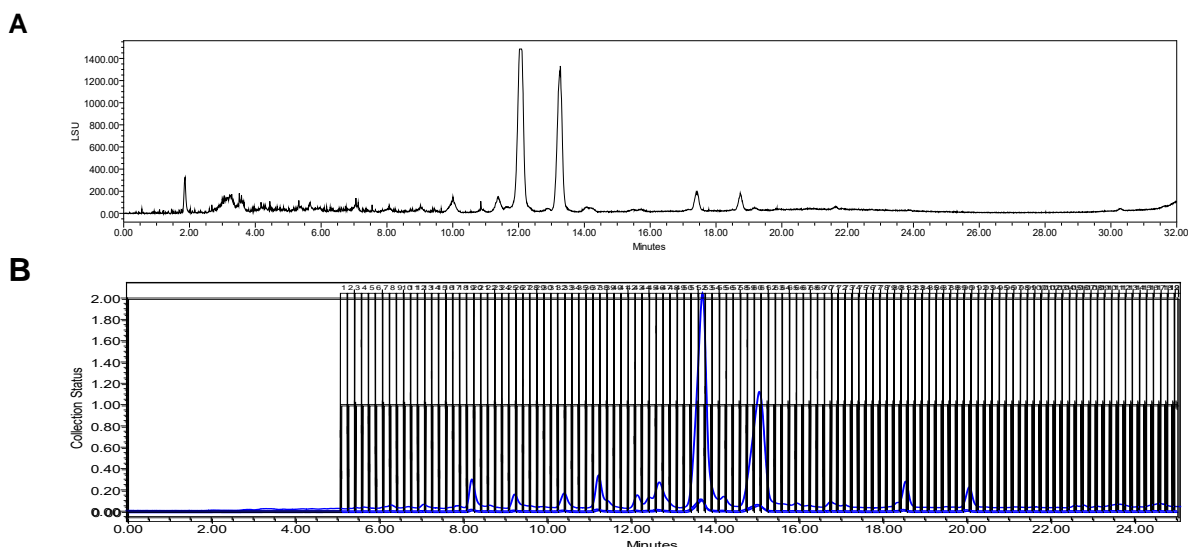


Figura 16. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico (**A**) y preparativo (**B**) de la fracción CC7-5₃. (**A**) Detector ELSD; y (**B**) Detector UV $\lambda = 338$ nm.

5.8 Caracterización estructural de los compuestos obtenidos

La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) de los compuestos **1–8** y **11–13** se registraron en un equipo JEOL JNM ECS-400. El registro de los espectros de los productos **9** y **10** se realizó en un equipo Varian VNMR5 (¹H 400 MHz). Los

desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) con referencia a los disolventes empleados: CD₃OD (**1-8**), CDCl₃ (**9-11**) y DMSO d₆ (**12-13**). Los espectros de masas de alta resolución para cada uno de los productos puros se obtuvieron empleando las mismas condiciones de análisis indicadas en el inciso **5.3** de esta sección. Los registros de los espectros de RMN y EM se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM, así como, en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

5.9 Evaluación del potencial citotóxico

El potencial citotóxico de los compuestos **12** y **13** se evaluó contra las líneas celulares de MDA-MB-435 (melanoma humano), MDA-MB-231 (cáncer de mama), y OVCAR3 (cáncer de ovario). Todas las líneas evaluadas fueron proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Brevemente, en primer lugar, todas las líneas celulares fueron reactivadas e incubadas a 37°C en medio RPMI 1640 con CO₂ al 5%, adicionado con suero fetal bovino (10%), penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Enseguida, las células en fase logarítmica de crecimiento fueron recuperadas mediante la técnica de tripsinización de células en monocapa, y sucesivos lavados, para así remover cualquier remanente de enzimas. Posteriormente, en una microplaca de Elisa de 96 pozos, una alícuota equivalente a 5,000 células se incubó durante una noche a 37°C (CO₂ al 5%). Al término de este período de incubación, a cada pozo se le adicionó una alícuota de productos a evaluar a las concentraciones finales de 2.5 y 25 µM, respectivamente de las muestras a evaluar, disueltas en DMSO y se realizó una segunda incubación durante 72 horas a 37°C; al término de ésta, se evaluó la viabilidad de las células empleando el kit comercial CellTiter-Blue® (Cell Viability Assay, Promega Corp, Madison, WI). Los resultados obtenidos a partir de esta evaluación son reportados con sus valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana a partir de ascomicetos aislados de CCC. A continuación, se presentan los resultados obtenidos siguiendo la estrategia metodológica descrita en la sección anterior. Así, primero se describirá la evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos y fracciones primarias, así como los resultados de metabolómica y posteriormente, se detallarán los resultados del estudio químico de las cuatro especies fúngicas seleccionadas y la caracterización de los metabolitos aislados.

6.1 Selección de las especies fúngicas

6.1.1 Análisis de la actividad antimicrobiana, perfiles cromatográficos y morfología macroscópica

Previamente en nuestro grupo de trabajo, se estableció el potencial antimicrobiano de los extractos en pequeña escala de una serie de organismos aislados de CCC (**Cuadro 1**). Para la selección de las especies objeto de estudio de la presente investigación, se analizó de forma conjunta la morfología macroscópica de todos los cultivos axénicos, los resultados de la evaluación del potencial antimicrobiano y los perfiles cromatográficos y espectrométricos obtenidos por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, de todos los extractos en pequeña escala; considerando las características morfológicas de crecimiento de las diferentes cepas (crecimiento uniforme de colonia, color, bordes, tipo de micelio, etc.), la actividad biológica (inhibición del crecimiento de los mismos microorganismos) y los perfiles cromatográficos (tiempo de retención, espectros en el UV y de masas similares), todos los extractos se fueron agrupando. Un ejemplo de esto, se puede observar entre las cepas **CC9-2**, **CC9-6** y **CC9-7**: los tres hongos presentaron un diámetro de crecimiento equivalente, colonias de color amarillo y un micelio de tipo algodonoso (**Figura 17**); también los extractos mostraron una inhibición parcial a 20 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli*, y no presentaron actividad contra *P. aeruginosa* y *S. typhi* (**Cuadro 8**); y sus perfiles cromatográficos presentan una señal en un tiempo de retención (t_R) de 4.93 min con una relación masa/carga (m/z) de 507.22 $[\text{M}+\text{H}]^+$, con máximos de absorción en el UV a las longitudes de onda (λ) de 224 y 282 nm (**Figuras 18 y 19**). Con base en lo antes mencionado se seleccionó únicamente a uno de estos organismos para su posterior estudio químico. Enseguida, siguiendo los mismos criterios de selección, los hongos saprófitos **CC1-1**, **CC7-5**, **CC7-12** y **CC9-6** (**Figura 20**) fueron elegidos para su escalamiento y estudio químico biodirigido en el presente trabajo de investigación.

6.1.2 Estudios de metabolómica

Todos extractos en pequeña escala de las series CC1, CC7 y CC9 (**Cuadro 1**), se sometieron a un análisis de metabolómica siguiendo la metodología descrita por El-Elimat y colaboradores (2013) (inciso 5.3 parte experimental). Los resultados de estos análisis se compararon contra aquellos reportados en una base de datos compuesta por más de 350 micotoxinas, y se logró establecer que ninguno de los extractos contenía a las micotoxinas descritas en la base de datos, por lo que los taxa **CC1-1**, **CC7-5**, **CC7-12** y **CC9-6** son candidatos para la obtención de nuevos compuestos (**Figura 20**). Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Nicholas Oberlies de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

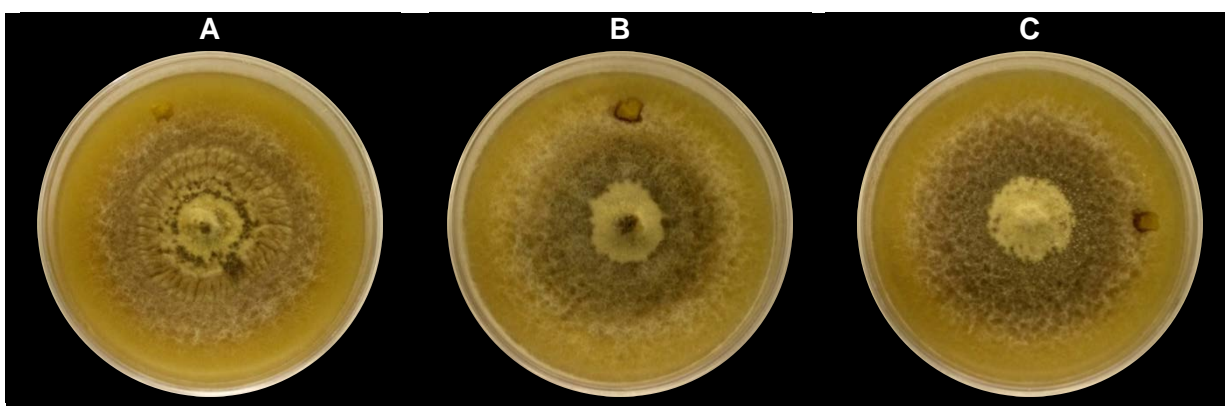


Figura 17. Cultivos axénicos de los taxa CC9-2 (**A**), CC9-6 (**B**) y CC9-7 (**C**) en PDA. Ejemplo de un análisis morfológico macroscópico comparativo.

Cuadro 8. Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos CC9-2, CC9-6 y CC9-7 en pequeña escala.

Extracto	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC9-2		Inhibición total 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL			
CC9-6		Inhibición total 200 µg/mL	Inhibición parcial a 20 µg/mL			Inhibición total 200 µg/mL
CC9-7			Inhibición parcial a 20 µg/mL			Inhibición total 200 µg/mL
CMI (µg/mL)	333.0	125.0	0.3	4.6	0.6	2.3

Criterios de inhibición

Inhibición total 200 µg/mL
Inhibición parcial a 20 µg/mL
No inhibición
Ampicilina
Gentamicina
Nistatina

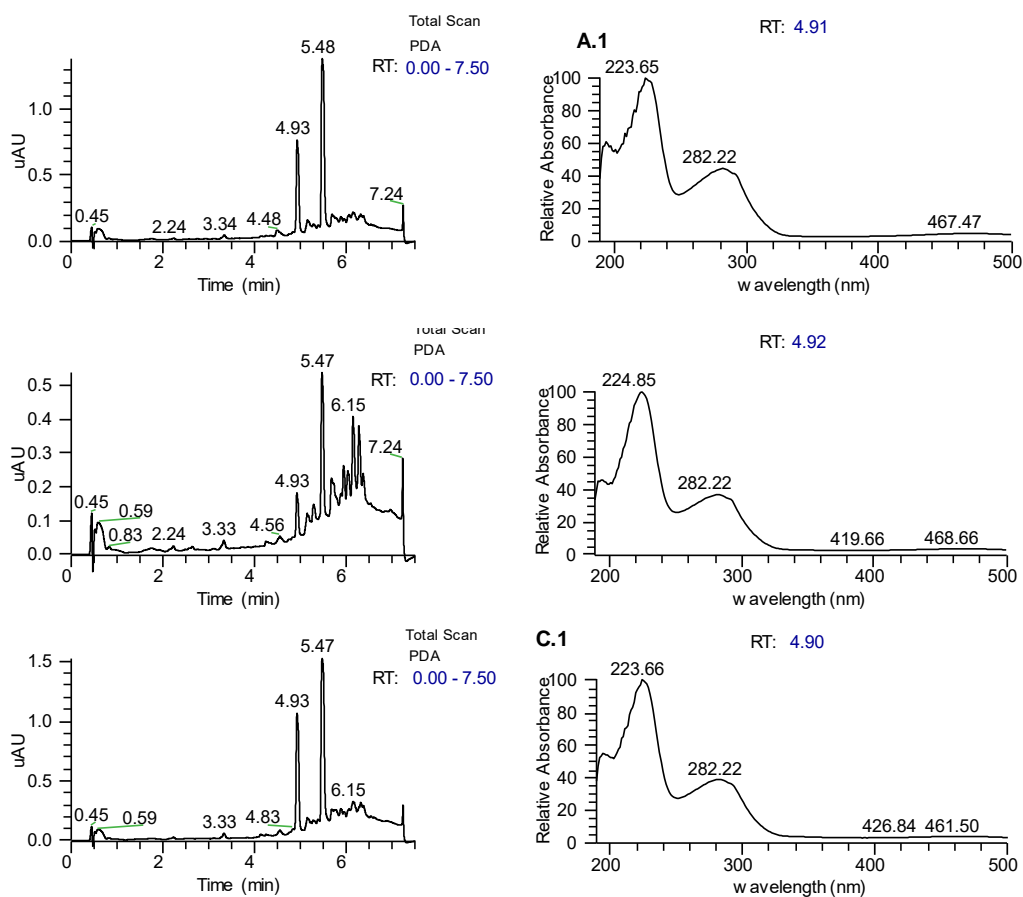


Figura 18. Cromatogramas y espectros en el UV (t_R 4.93 min) de los extractos en pequeña escala CC9-2 (A y A.1) CC9-6 (B y B.1) y CC9-7 (C y C.1).

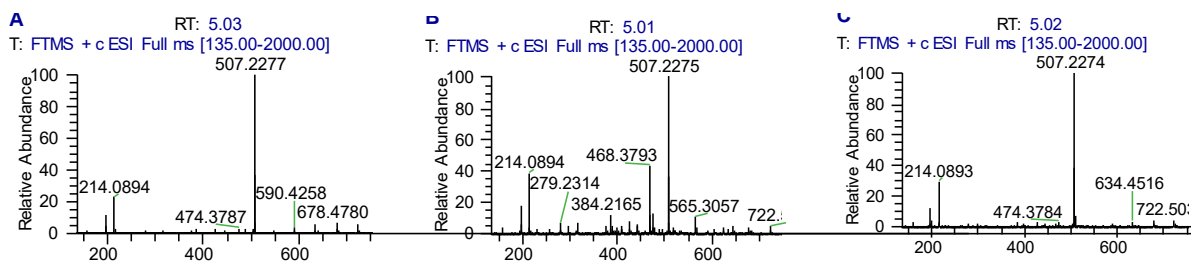


Figura 19. Espectros de masas en modo positivo (ESI⁺) de la señal en t_R 4.93 min de los extractos CC9-2 (A), CC9-6 (B) y CC9-7 (C).

6.1.3 Obtención de los extractos en mediana escala, fraccionamiento primario y evaluación del potencial antimicrobiano

Una vez realizada la selección de las especies fúngicas, se procedió a la preparación de los cultivos en mediana escala (Figura 21). Al término del periodo

de crecimiento, se obtuvieron los correspondientes extractos orgánicos mediante las técnicas de maceración y reparto, y estos se fraccionaron mediante una cromatografía en columna de tipo flash, siguiendo la metodología descrita en la sección experimental (incisos 5.4 y 5.5). Finalmente, todos los extractos y los conjuntos de fracciones primarias fueron evaluados contra una batería de microorganismos para establecer su potencial antimicrobiano (**Cuadro 9**).

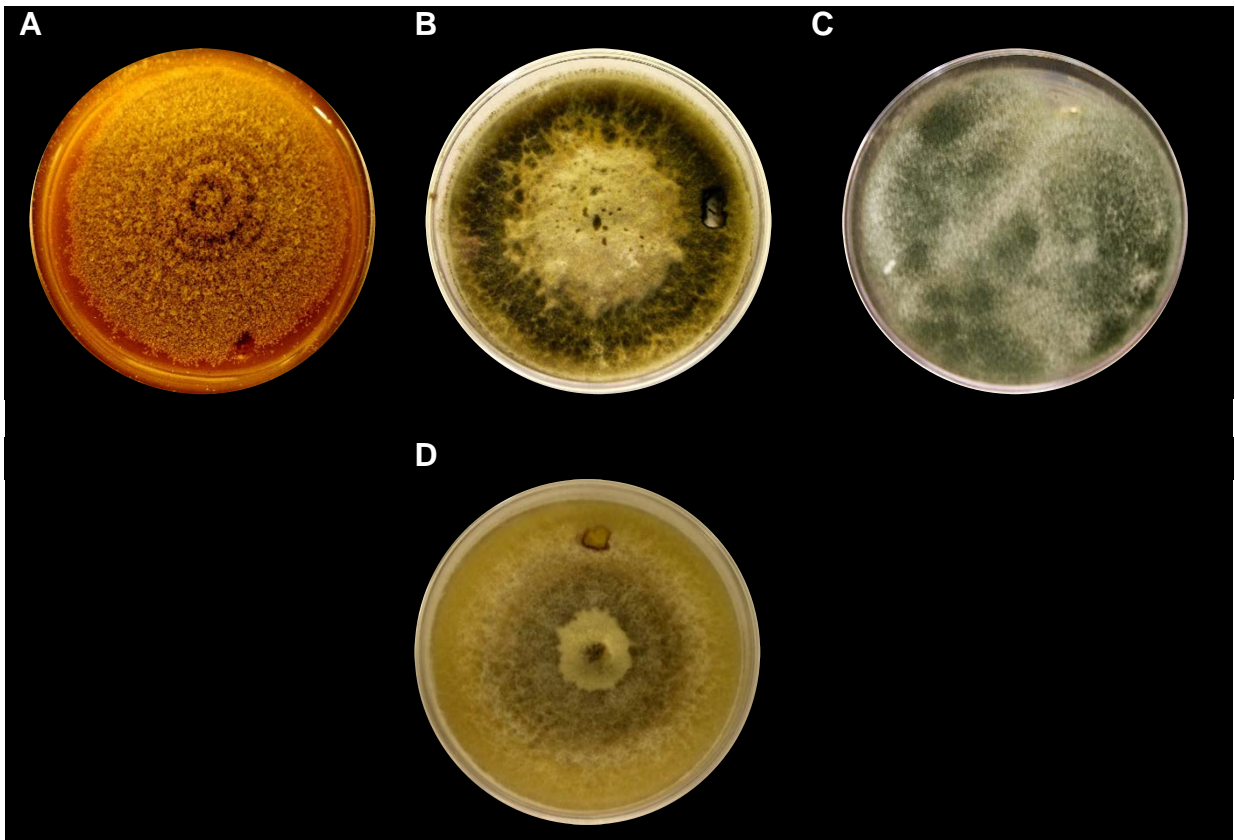


Figura 20. Cultivos axénicos en APD de los taxa seleccionados para su escalamiento: CC1-1 (A), CC7-5 (B), CC7-12 (C) y CC9-6 (D).

6.1.4 Caracterización taxonómica

De manera paralela a la evaluación del potencial antimicrobiano, se realizó la identificación taxonómica de los microorganismos seleccionados mediante el análisis de sus características morfológicas y genéticas del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal. Así, se identificaron a los cuatro microorganismos seleccionados como *Aspergillus terreus* (CC1-1), un hongo del orden Pleosporales (CC7-5), *Aspergillus* sp. (CC7-12), y un hongo del orden Sordariales (CC9-6). Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Huzefa Raja de la UNCG.

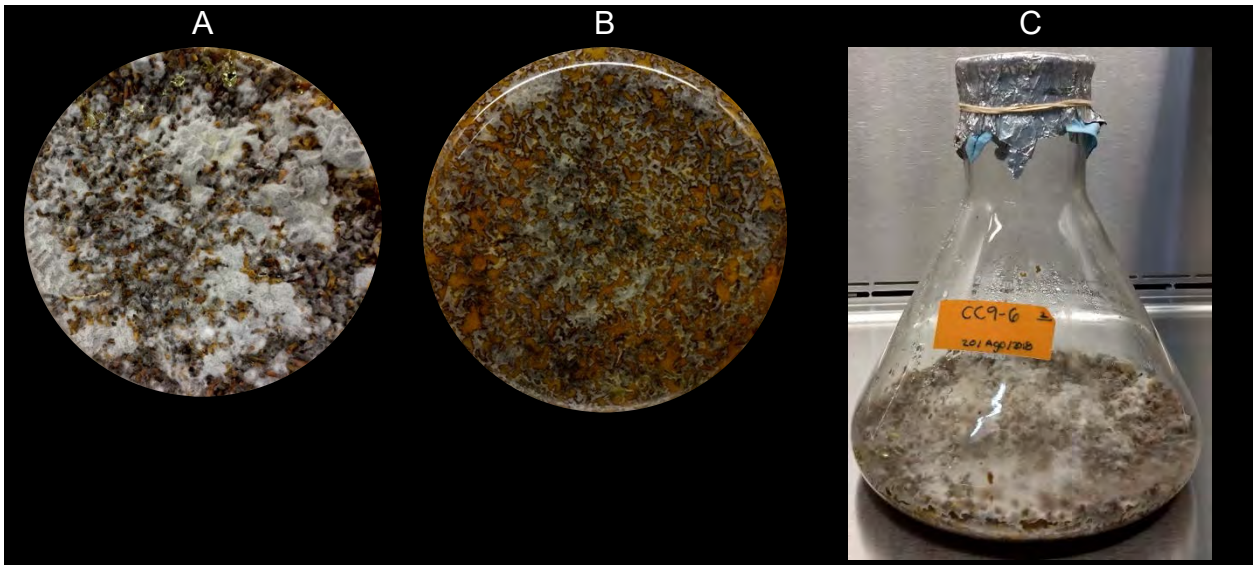
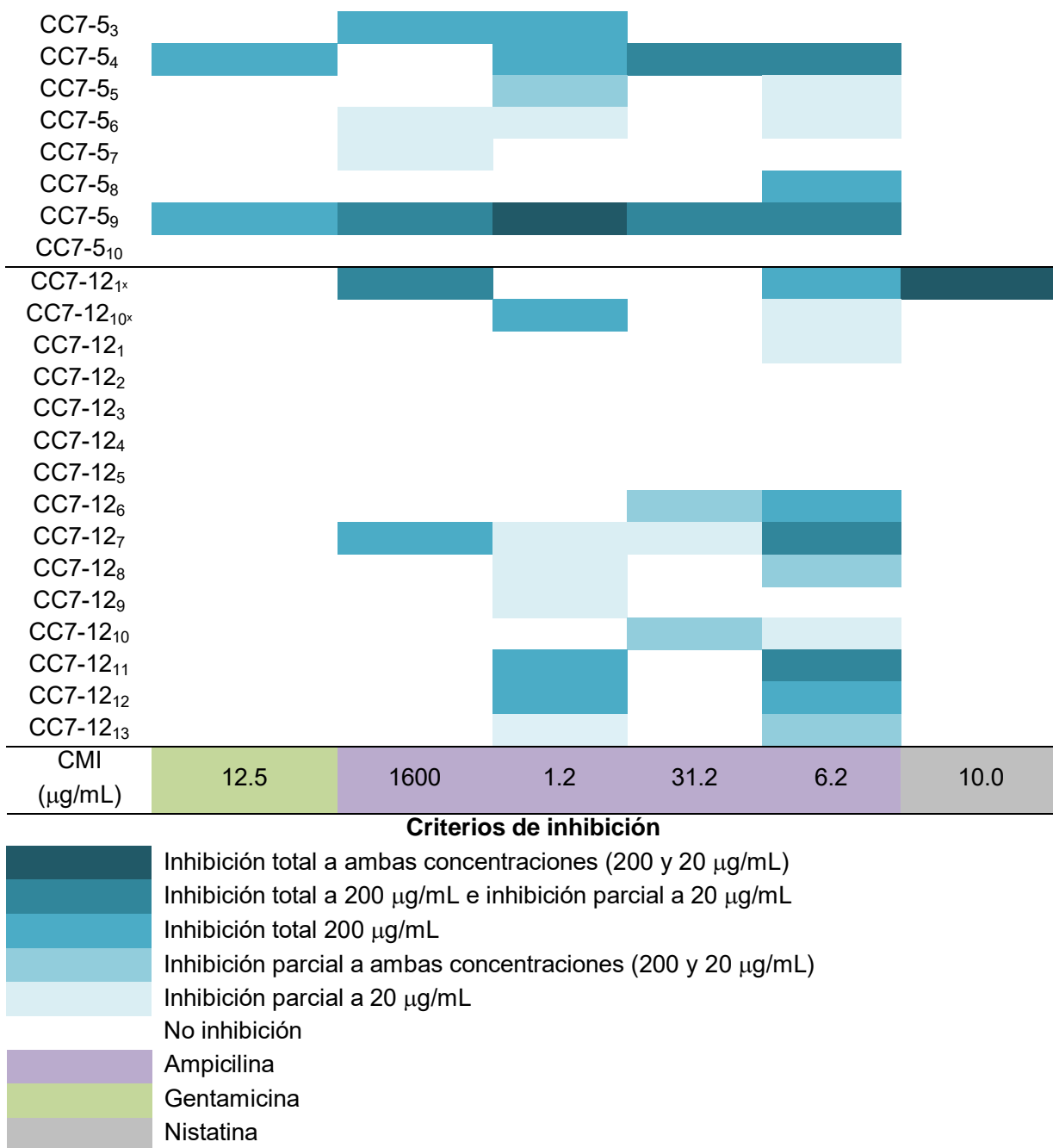


Figura 21. Ejemplo de cultivo fúngico (mediana escala) en medio de arroz del taxón CC9-6: (A) anverso, (B) reverso y (C) vista frontal del cultivo.

Cuadro 9. Evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala, y de sus respectivas fracciones.

Extracto o fracción	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC1-1 _{1x}						
CC1-1 _{10x}						
CC1-1 ₁						
CC1-1 ₂						
CC1-1 ₃						
CC1-1 ₄						
CC1-1 ₅						
CC1-1 ₆						
CC9-6 _{1x}						
CC9-6 _{10x}						
CC9-6 ₁						
CC9-6 ₂						
CC9-6 ₃						
CC9-6 ₄						
CC9-6 ₅						
CC9-6 ₆						
CC9-6 ₇						
CC9-6 ₈						
CC9-6 ₉						
CC9-6 ₁₀						
CC7-5 _{1x}						
CC7-5 _{10x}						
CC7-5 ₂						



6.2 Estudio químico de los microorganismos seleccionados

A partir de las fracciones activas (inhibición total o parcial a 20 µg/mL) obtenidas de los hongos **CC1-1**, **CC7-5**, **CC7-12** y **CC9-6** (**Cuadro 9**), se realizó la separación y purificación mediante HPLC en fase reversa de los componentes presentes como se indicó en la sección experimental (inciso **5.7**). Así, se obtuvieron 15 metabolitos secundarios: ocho derivados de butirolactonas (**1-8**), un metabolito de tipo ergocromo (**9**), dos meroterpenoides (policétido-monoterpenoide) (**10** y **11**),

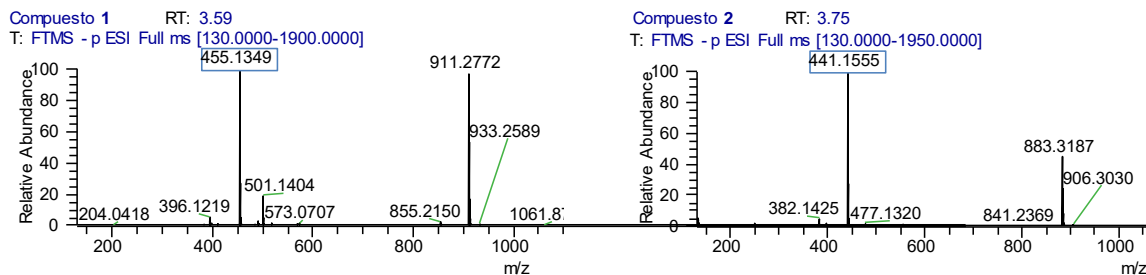
dos compuestos tipo indolil-benzohidroquinona (**12** y **13**), y dos compuestos aromáticos (**14** y **15**). De manera general, la elucidación de los compuestos obtenidos se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales, las cuales se describen a detalle a continuación.

6.2.1 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de *Aspergillus terreus* (CC1-1)

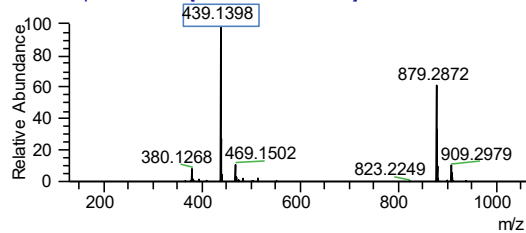
Los compuestos **1-8** se obtuvieron a partir de la fracción **CC1-1₅** como sólidos café claro. Las fórmulas moleculares y los índices de deficiencia de hidrógeno (IDH) se establecieron mediante el análisis de los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$ (**Cuadro 10** y **Figura 22**). Además, como se puede observar en los espectros en el UV (**Figura 23**), todos los compuestos presentan el mismo perfil, exhibiendo dos máximos de absorción entre 217-223 y 306-309 nm, que corresponden con la presencia de un núcleo base de tipo γ -butirolactona- α,β -insaturada.⁷⁴

Cuadro 10. Iones pseudomoleculares y fórmula molecular de los compuestos **1-8**.

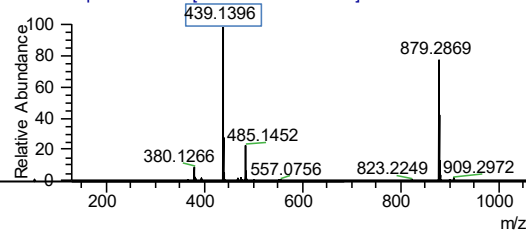
Compuesto	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	Fórmula molecular	IDH
1''-Hidroxi, 2''',3''-epoxi-butirrolactona I (1)	457.1474	455.1530	C ₂₄ H ₂₄ O ₉	13
Aspernólida B (2)	443.1581	441.1555	C ₂₄ H ₂₆ O ₈	12
Butirolactona IV (3)	441.1525	439.1398	C ₂₄ H ₂₄ O ₈	13
Butirolactona V (4)	441.1526	439.1396	C ₂₄ H ₂₄ O ₈	13
2''',3''-Dihidro, 3''-metoxi-butirrolactona I (5)	457.1839	455.1713	C ₂₅ H ₂₈ O ₈	12
Compuesto 6	425.1576	423.1451	C ₂₄ H ₂₄ O ₇	13
Aspernólida A (7)	425.1574	423.1449	C ₂₄ H ₂₄ O ₇	13
Compuesto 8	439.1748	437.1606	C ₂₅ H ₂₆ O ₇	13



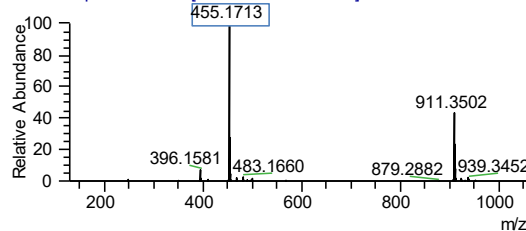
Compuesto 3 RT: 3.94
T: FTMS - p ESI Full ms [130.0000-1950.0000]



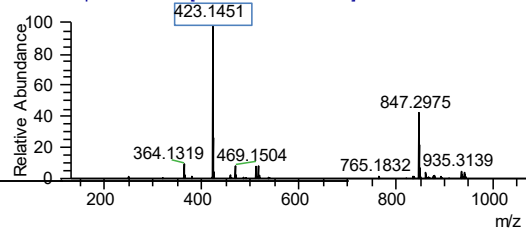
Compuesto 4 RT: 4.03
T: FTMS - p ESI Full ms [130.0000-1950.0000]



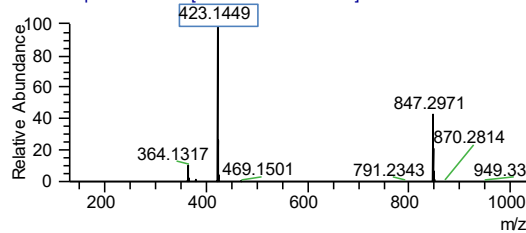
Compuesto 5 RT: 4.27
T: FTMS - p ESI Full ms [130.0000-1950.0000]



Compuesto 6 RT: 4.64
T: FTMS - p ESI Full ms [130.0000-1950.0000]



Compuesto 7 RT: 4.99
T: FTMS - p ESI Full ms [130.0000-1900.0000]



Compuesto 8 RT: 5.27
T: FTMS - p ESI Full ms [130.0000-1950.0000]

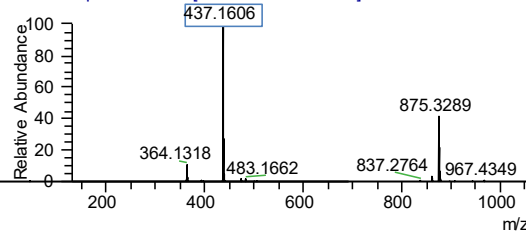
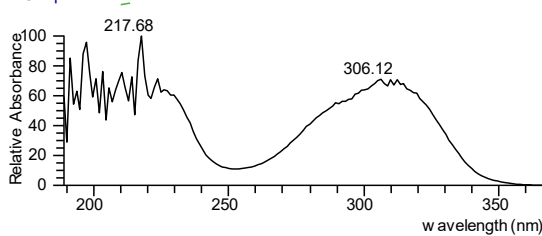
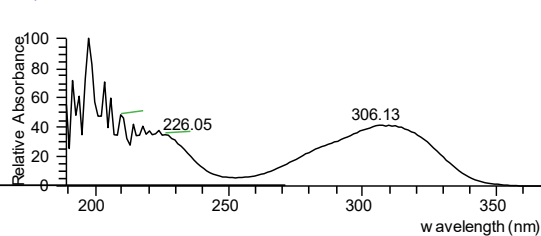


Figura 22. Espectros de masas generados por la técnica de ESI⁻ de los compuestos 1-8.

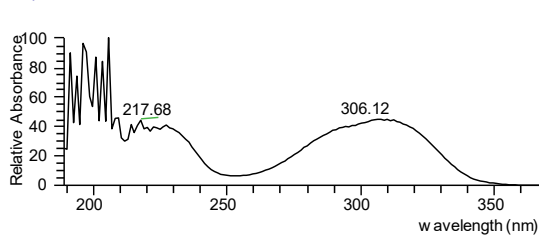
Compuesto 1 RT: 3.52



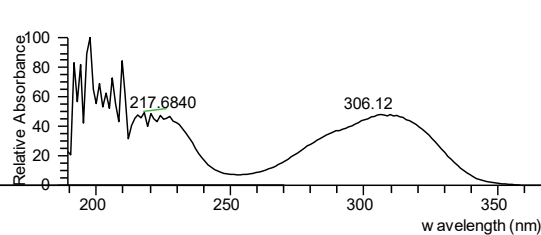
Compuesto 2 RT: 3.66



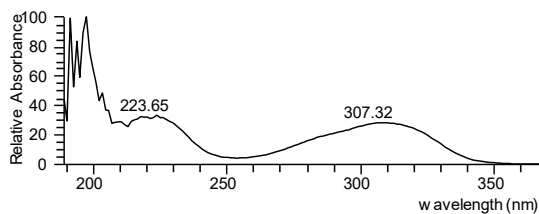
Compuesto 3 RT: 3.91



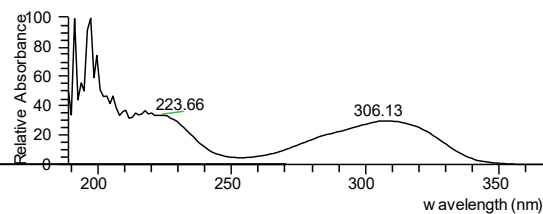
Compuesto 4 RT: 3.97



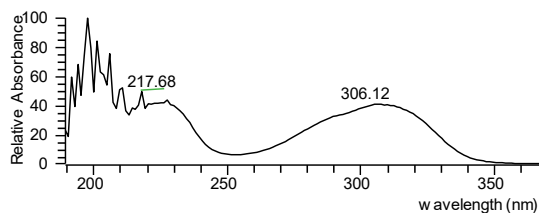
Compuesto 5 RT: 4.19



Compuesto 6 RT: 4.53



Compuesto 7 RT: 4.95



Compuesto 8 RT: 5.20

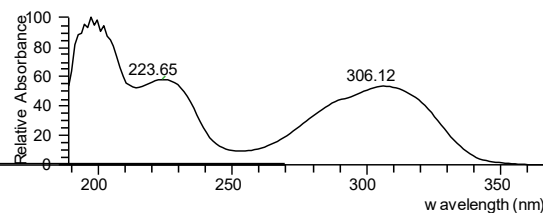
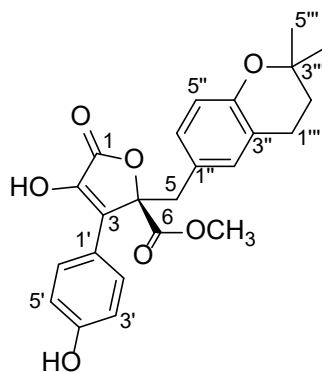


Figura 23. Espectros en el UV de los compuestos 1-8.

El análisis de los espectros de RMN ^1H (**Cuadro 11**) de estos compuestos, evidenció que todos presentaban un perfil similar, y que las diferencias más importantes se encontraban en los desplazamientos químicos de campos altos (entre 1 y 3 ppm), correspondientes a los sustituyentes en 3'' y 4'' del núcleo base. A continuación, se describirán las características espectroscópicas más importantes de cada uno de los productos **1-8**. Cabe mencionar que se iniciará con la descripción del producto **7**, ya que fue el producto mayoritario aislado de la fracción **CC1-1₅** y que sirvió de modelo para la caracterización estructural de los demás metabolitos.

6.2.1.1 Aspernólida A (7)



La fórmula molecular calculada para este producto, $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_7$, permite 13 grados de insaturación, que se justifican con la presencia de dos anillos aromáticos, un anillo de γ -lactona, una doble ligadura, dos grupos carbonilo, y un anillo

dihidropirano. En los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Cuadro 11** y **Figura 24**) se observaron las siguientes señales características:

- Las señales en δ_{H} 7.56 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2'/6') y 6.86 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3'/5') evidencian la presencia de un anillo aromático *p*-sustituido. Por otro lado, las señales en δ_{H} 6.50 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6''), 6.42 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'') y 6.48 (sa, H-2'') corresponden con la presencia de un segundo sistema aromático trisustituido. En δ_{H} 3.78 (3H, sa, 6-OCH₃) se observa una señal simple intensa, la cual es asignable a un grupo metoxilo de una función éster, y en δ_{H} 3.43 (2H, sa, H₂-5) se observa una señal simple atribuible a un grupo metileno. En δ_{H} 2.57 (2H, td, $J = 10.0, 6.8$ Hz, H-1''') se observa una señal asignable a un metileno unido a otro grupo metileno en δ_{H} 1.71 (2H, t, $J = 6.8$ Hz). Finalmente, en δ_{H} 1.24 (6H, sa, H₃-4''' y H₃-5''') se observa una señal simple diagnóstica para presencia de dos grupos metilo.

- En el espectro de RMN ^{13}C se observa un conjunto de 24 señales, de las cuales 12 corresponden a carbonos aromáticos (dos de ellas base de oxígeno), dos señales diagnósticas para carbonilos de un grupo éster en δ_{C} 170.5 (C-1) y 171.7 (C-6), dos señales olefínicas en δ_{C} 140.0 (C-2) y 129.3 (C-3), tres señales de metilenos en δ_{C} 23.3, 32.8 y 39.6 (C-1''', C-2''' y C-5, respectivamente), dos señales en δ_{C} 27.1 correspondientes a dos metilos (C-4''' y C-5'''), y tres señales de carbonos base de oxígeno en δ_{C} 86.9, 54.0 y 75.2 (C-4, 6-OCH₃ y C-3'', respectivamente).

La comparación de los datos espectroscópicos antes descritos con aquellos reportados en la literatura por Parvatkar y colaboradores ⁷⁰, permitieron establecer que la estructura del compuesto **7** corresponde con la de la aspernólida A.

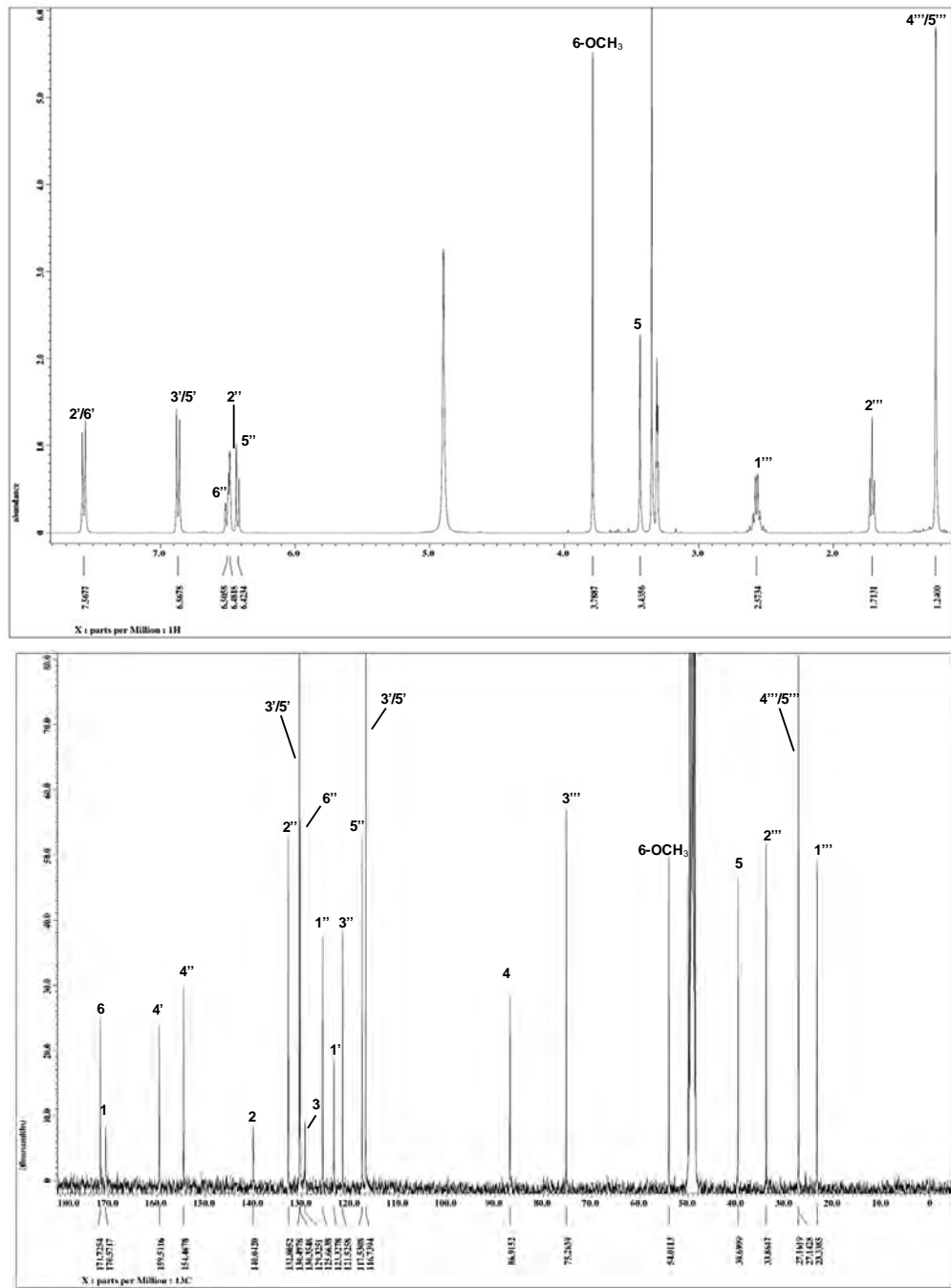
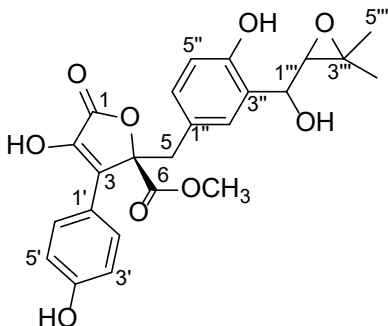


Figura 24. Espectro de RMN ¹H (400 MHz; arriba) y ¹³C (100 MHz; abajo) de la aspernólida A (7) en CD₃OD.

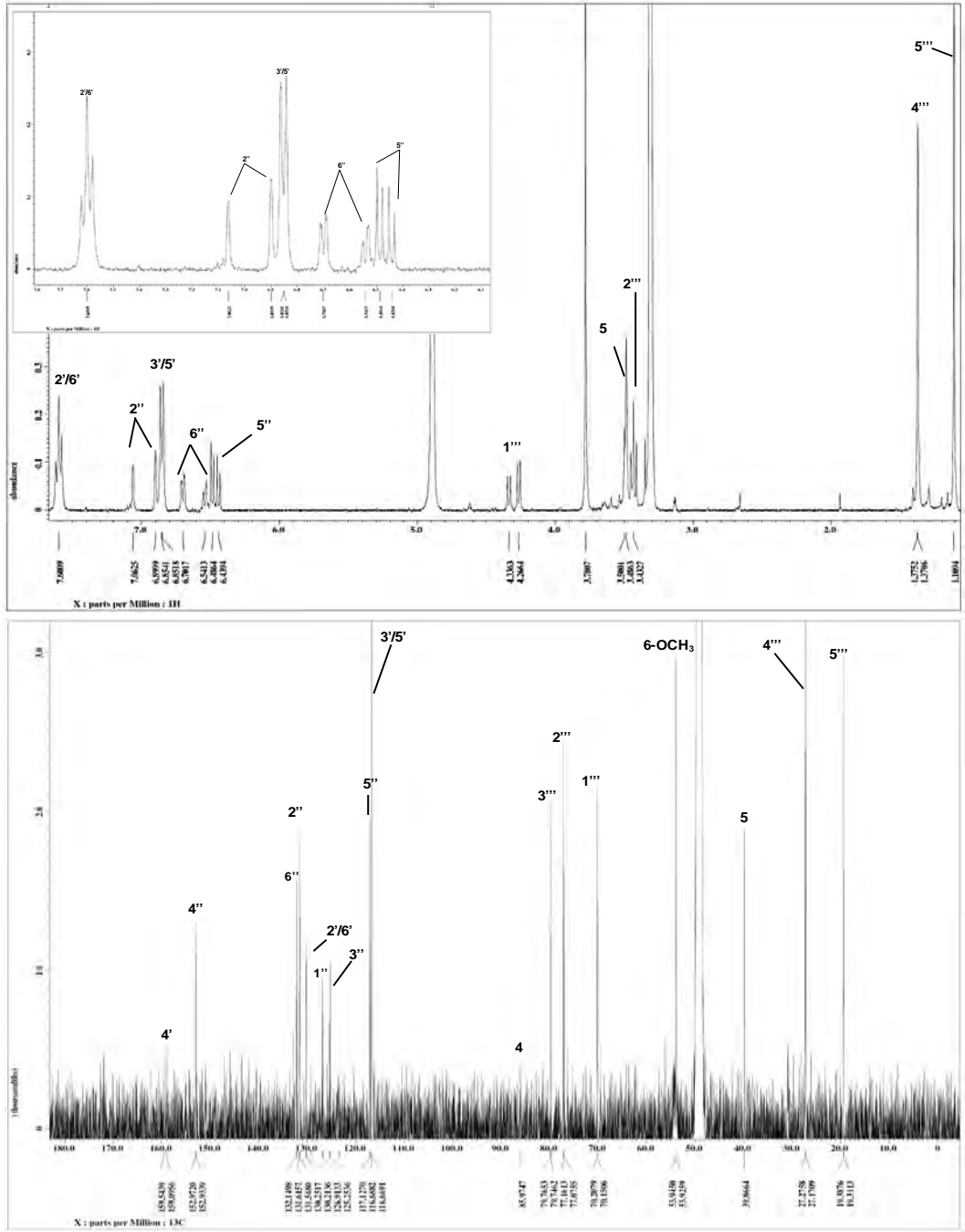
6.2.1.2 1'''-Hidroxi, 2''',3'''-epoxi-butirolactona I (1)



La fórmula molecular calculada para este producto es $C_{24}H_{24}O_9$ (IDH = 13). Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Cuadro 11** y **Figura 25**) de **1** respecto a la aspernólida A (**7**) se describen a continuación:

- En δ_C 70.1, 77.0 y 79.7 se observan tres señales adicionales de carbonos base de oxígeno, dos de carbonos terciarios y una más de un carbono cuaternario. Estas señales están en armonía con lo observado en el espectro de RMN 1H en δ_H 4.26 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-1''') y 3.43 (1H, d, $J = 8.2$, H-2'''). Cabe mencionar que este conjunto de señales corresponde a una cadena de isopreno funcionalizada en lugar del anillo dihidropirano presente en la aspernólida A (**7**)

La comparación de los datos espectroscópicos antes mencionados con lo descrito por Shen y colaboradores,⁶⁹ permitieron establecer que la estructura del compuesto **1** corresponde acon la del derivado 1'''-hidroxi, 2''',3'''-epoxi-butirolactona I (**1**). Sin embargo, el análisis detallado de los espectros de RMN de 1H y ^{13}C reveló que el producto en solución se encuentra formando una mezcla isomérica en una relación (6:4) (**Figura 25**), ya que las señales correspondientes a las posiciones 1'-4', 1''-6'' y 1'''-5''' se observan duplicadas (**Cuadro 11**). Cabe señalar que, a pesar de realizar numerosos intentos cromatográficos para separar dichos productos, no fue posible la resolución necesaria, además de que se requiere de la separación de una mayor cantidad de esta mezcla de compuestos para su posterior caracterización.



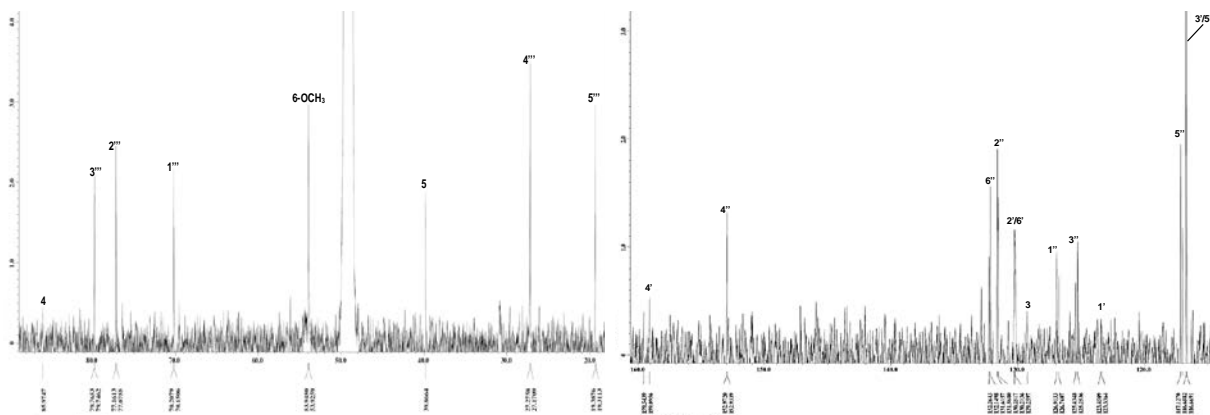
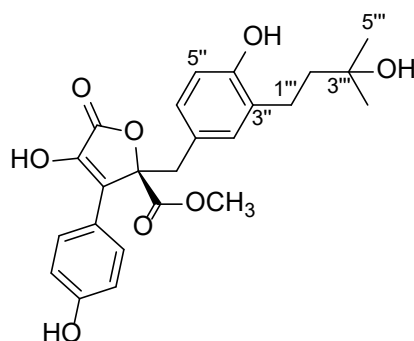


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz; arriba) y ^{13}C (100 MHz; abajo) del derivado 1''-hidroxi, 2'',3''-epoxi-butirolactona I (**1**) en CD_3OD .

6.2.1.3 Aspernólida B (**2**)



La fórmula molecular calculada para el compuesto **2** es $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_8$ y permite 12 grados de insaturación. Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Cuadro 11** y **Figura 26**) de **2** respecto a la aspernólida A (**7**) se describen a continuación:

- En el espectro de RMN ^{13}C de **2** se observan variaciones significativas en los δ_{C} de los siguientes carbonos: C-1'' (δ_{C} 129.9, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4.3 ppm), C3'' (δ_{C} 125.6, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 4.1 ppm), C-1''' (δ_{C} 25.9, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2.6 ppm), C-2''' (δ_{C} 44.8, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 11.0 ppm), C-4''' (δ_{C} 29.1, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2.0 ppm), y C-5''' (δ_{C} 19.4, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2.3 ppm), las cuales se deben a la desprotección generada al encontrarse la cadena de isoprenilo abierta y sin funciones oxigenadas en C-1''' y C-2'''.

El resto de las señales observadas en los espectros se encontraron en armonía con las descritas para la aspernólida A (**7**), y con base en estas evidencias la estructura del compuesto **2** se caracterizó como la aspernólida B.⁷⁰

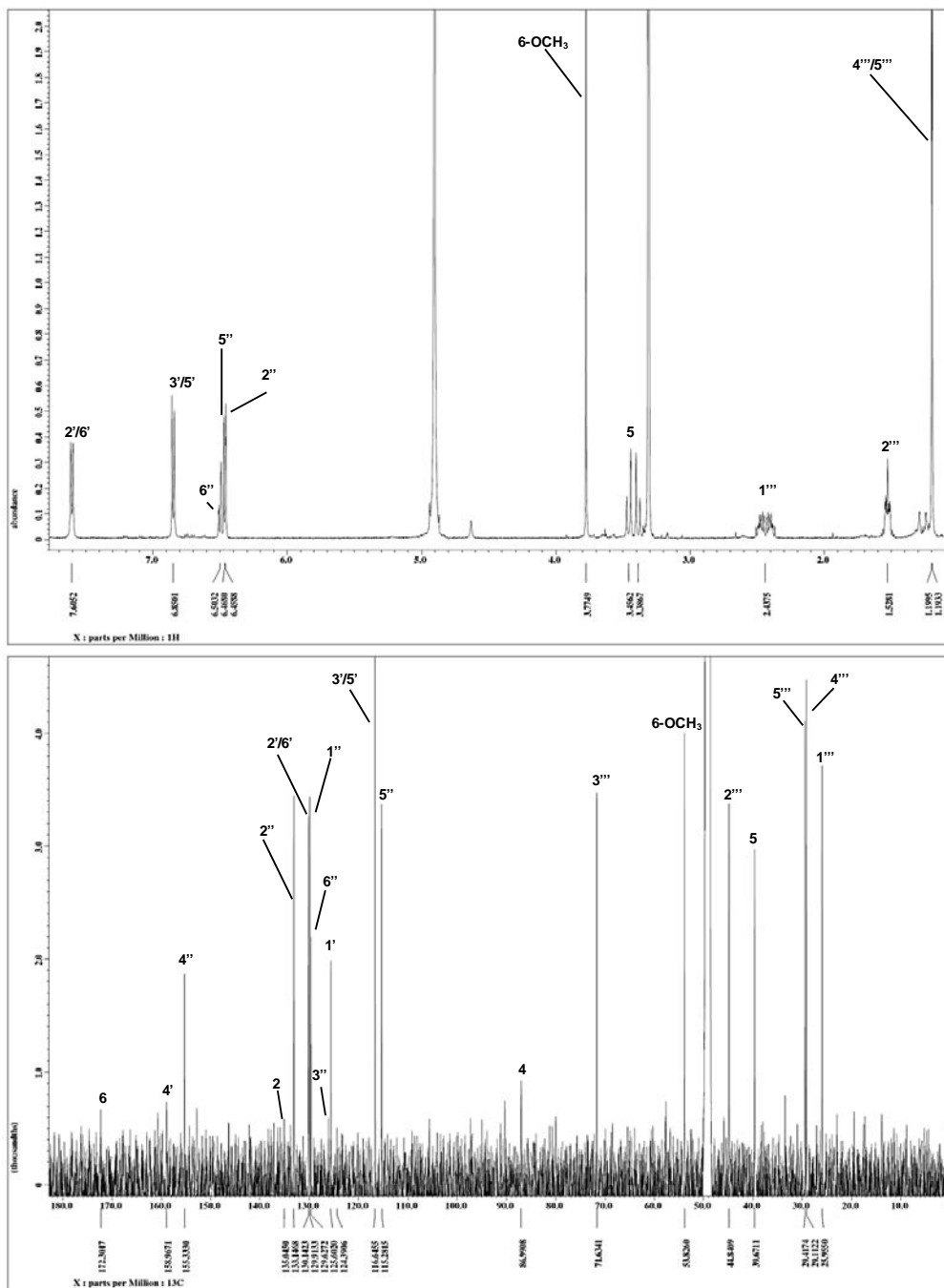
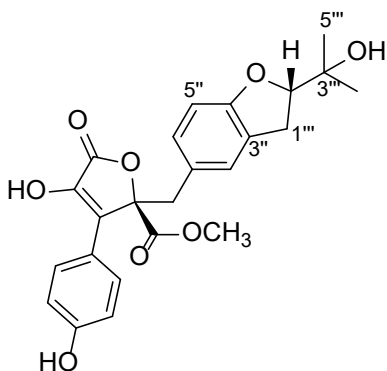


Figura 26. Espectro de RMN ¹H (400 MHz; arriba) y ¹³C (100 MHz; abajo) de la aspernólida B (2) en CD₃OD.

6.2.1.4 Butirolactona IV (3)



La fórmula molecular calculada para este producto es $C_{24}H_{24}O_8$ (IDH = 13). Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Cuadro 11** y **Figura 27**) de **3** respecto a la aspernólida A (**7**) se describen a continuación:

- En el espectro de RMN 1H se observa que el metino H-2''' se desplaza a campos bajos, δ_H 4.49, dd (1H, $J = 9.1, 8.7$ Hz), como resultado de la presencia de un anillo de tipo furano entre el residuo de isoprenilo y la función oxigenada en C-4''.
- En el espectro de RMN ^{13}C , los carbonos C-3'' (δ_C 128.2), C-4'' (δ_C 160.6), C-1''' (δ_C 31.5) y C-2''' (δ_C 90.5) también se encuentran desplazados a campos más bajos por la desprotección debida a la formación del anillo de furano.

El resto de las señales observadas en los espectros de RMN se encontraron en armonía aquellas descritas para la aspernólida A (**7**), y la estructura del compuesto **3** se elucidó como la butirolactona IV.⁷¹

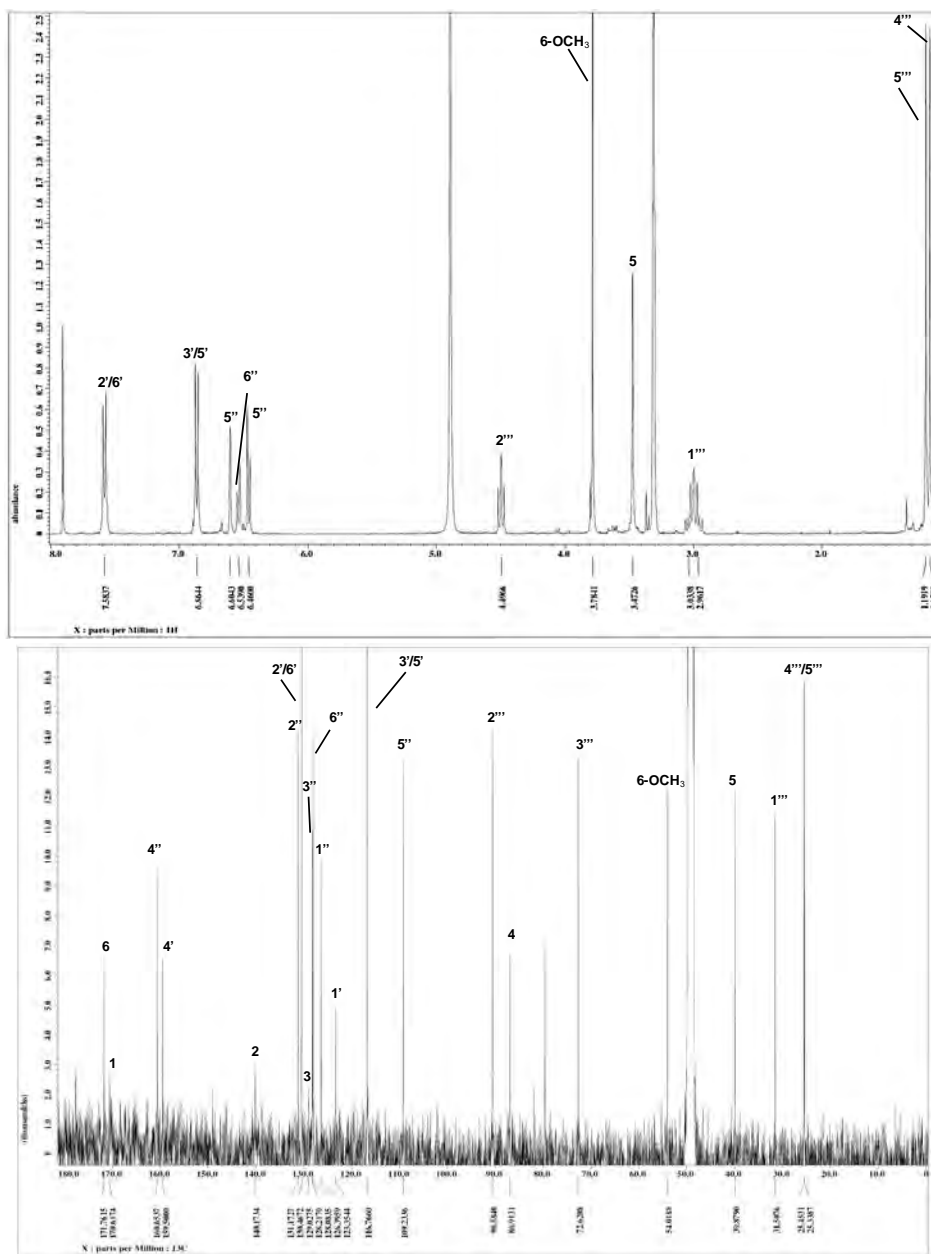
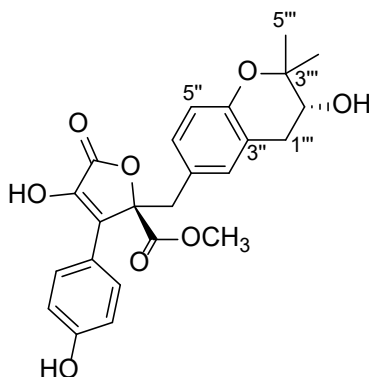


Figura 27. Espectro de RMN ¹H (400 MHz; arriba) y ¹³C (100 MHz; abajo) de la butyrolactona IV (3) en CD₃OD.

6.2.1.5 Butirolactona V (4)



La fórmula molecular calculada para este producto también es $C_{24}H_{24}O_8$ (IDH = 13) al igual que la butirolactona IV (3), y esta fórmula tiene 16 una más que la aspernólida A (7). Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN 1H y ^{13}C (Cuadro 11 y Figura 28) de 4 respecto al producto (7) son:

- El espectro de RMN 1H revela nuevamente las señales características de un anillo de pirano al igual que en el compuesto 7, sin embargo, en el espectro del producto 4, se observa un sistema de espín más complejo entre el metileno H-1''' [δ_H 2.52, dd (1H, $J = 16.9, 7.7$ Hz) y 2.76, dd (1H, $J = 16.9, 5.0$ Hz)] y H-2''' (δ_H 3.66, dd (1H, $J = 7.7, 5.5$ Hz), debido a la presencia de un grupo hidroxilo en C-2''' (δ_C 70.5).

Con base en estas evidencias espectroscópicas la estructura del compuesto 4 se asignó como la butirolactona V.⁷²

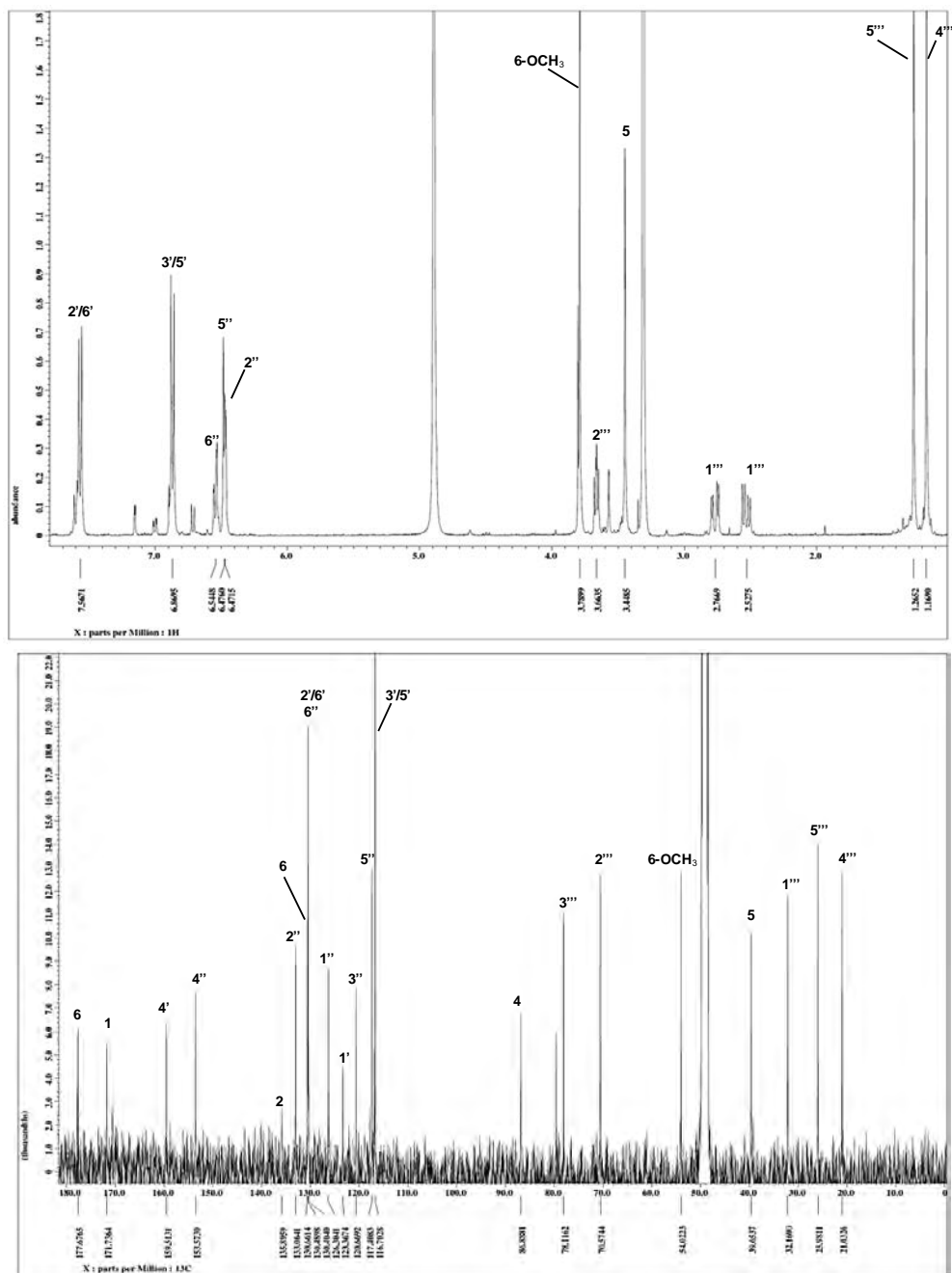
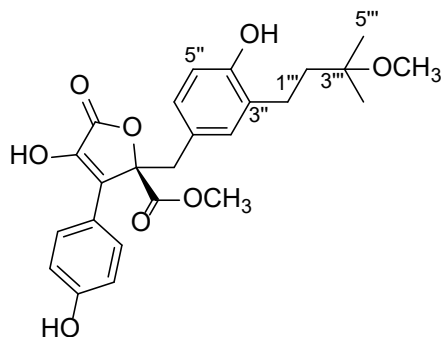


Figura 28. Espectro de RMN ¹H (400 MHz; arriba) y ¹³C (100 MHz; abajo) de la butirolactona V (4) en CD₃OD.

6.2.1.6 2''',3'''-Dihidro, 3'''-metoxi-butirolactona I (5)



La fórmula molecular calculada para el producto **5** es $C_{25}H_{24}O_8$ (IDH = 12), 14 una más que la aspernolida B (**2**). Las diferencias más importantes observadas en los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Cuadro 11** y **Figura 29**) de **5** respecto a la aspernolida B (**2**) y se detallan a continuación:

- En los espectros de **5** se observa la presencia de una señal simple en $\delta_{H/C}$ 3.18/49.8 atribuible a un grupo metoxilo en la posición C-3'''. Además, se logró asignar inequívocamente dos sistemas de spin de la cadena de isoprenilo en δ_H 2.42, dt (1H, $J = 12.8, 5.0$ Hz, $H_{2-1''}$) y 2.28, dt (1H, $J = 12.8, 5.0$ Hz, $H_{2-1''}$), y δ_H 1.51, m (2H, $H_{2-2''}$).

La comparación de los datos espectroscópicos antes mencionados con los descritos en la literatura ⁷⁰, permitieron establecer que la estructura del compuesto **5** corresponde a la de la 2''',3'''-dihidro, 3'''-metoxi-butirolactona I.⁷⁰

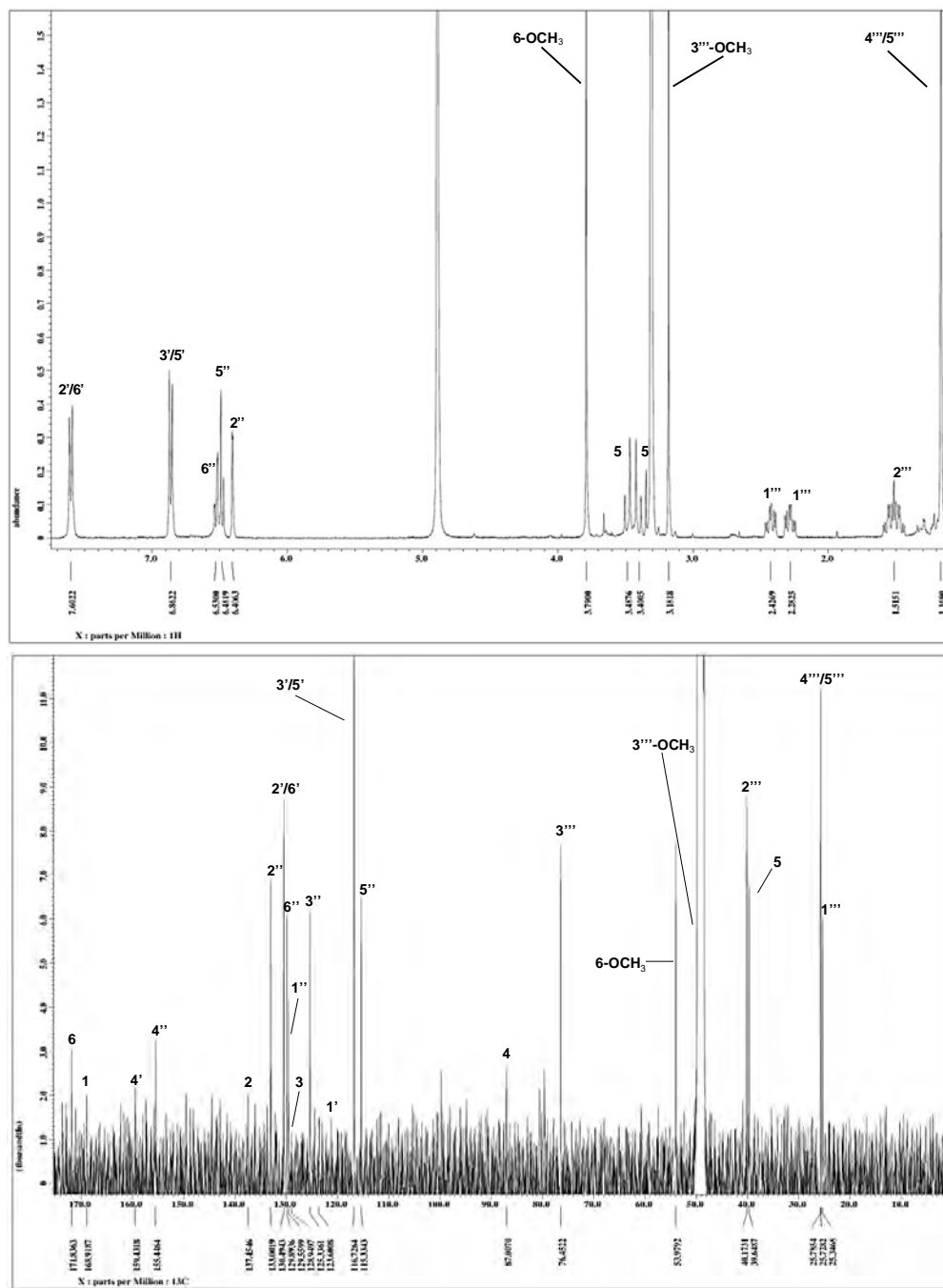
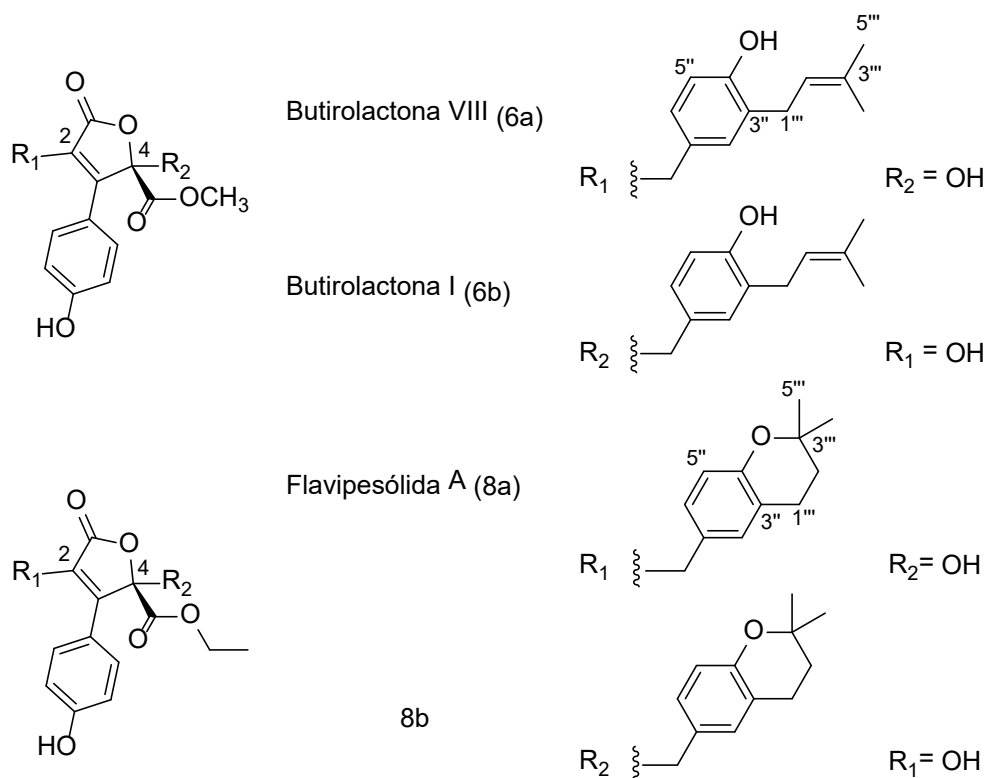


Figura 29. Espectro de RMN ¹H (400 MHz; arriba) y ¹³C (100 MHz; abajo) del derivado 2'',3''-dihidro, 3'''-metoxi- butiolactona I (5) en CD₃OD.

6.2.1.7 Compuestos 6 y 8



Las fórmulas moleculares calculadas para los productos **6** y **8** son $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_7$ y $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_7$, respectivamente y permiten 13 grados de insaturación, que se justifican con la presencia de dos anillos aromáticos, un anillo de γ -lactona, una doble ligadura, dos grupos carbonilo, y un anillo dihidropirano y/o una doble ligadura adicional. En los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Cuadro 11** y **Figura 30**) se observaron las siguientes señales características:

- En el caso del compuesto **6**, se observa que los protones en posición H-1''' [δ_{H} 3.06, d (2H, $J = 7.3$ Hz)] y H-2''' [δ_{H} 5.06, t (1H, $J = 7.3$ Hz)] se desplazan a campos bajos, y el metino en H-3''' no se observa. Estos cambios se atribuyen a la presencia de una doble ligadura en la cadena de isoprenilo en C-2''' y C-3'''.
- En el caso del compuesto **8**, se observan todas las señales diagnósticas del anillo de dihidropirano como en la aspernólida A (**7**); la señal del grupo metoxilo en $-\text{OCH}_3$ no se observa, y aparece un conjunto nuevo de señales en δ_{H} 4.24, dd (2H, $J = 14.2, 6.8$ Hz) que se acopla con un metilo en δ_{H} 1.21, t (3H, $J = 6.8$ Hz). Estas dos últimas señales son características de una cadena de etilo unida a la función éster en C-4 de la γ -lactona.

Es importante señalar que no se lograron registrar los espectros de RMN ^{13}C para estos productos, indispensables para la ubicación del grupo hidroxilo en la γ -lactona en la posición C-2 o C-4, ya que cuando el hidroxilo está en C-2, los δ_{C} típicos son 130-140 ppm, mientras que si está en C-4, los valores están entre δ_{C} 100-102 ppm. En este sentido no fue posible caracterizar de manera inequívoca a los productos **6** y **8**; mediante la comparación de los datos espectroscópicos antes mencionados con lo descritos por Wang y colaboradores ^{73,75}, se puede proponer que la estructura del compuesto **6** corresponde a la butirolactona VII (**6a**) o I (**6b**), mientras que **8** puede ser la flavipesólida A (**8a**) o el compuesto novedoso **8b**. Para lo anterior es necesaria la purificación de cantidades adicionales de dichos compuestos, para así obtener la espectroscopía completa y reportar las estructuras inequívocas.

Las γ -butenólidas fenil y bencil di-sustituidas son producidas principalmente por especies del género *Aspergillus*.^{75,82,83} Esta clase de metabolitos son un tipo especial de fenilpropanoides 7,8-diméricos, en donde las sustituciones del bencilo y fenilo pueden ser en 2,3, 3,4, y 2,4, siendo las últimas dos las clases de butenólidas más comunes en la naturaleza. Como se mencionó anteriormente, solamente existen dos reportes de butenólidas sustituidas en 2 y 3 de origen natural (butirolactona VIII y flavipesólida A).^{73,75}

Estos productos naturales presentan diversas actividades biológicas, como agentes antimicrobianos contra *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *M. tuberculosis* y *B. subtilis*, por mencionar a los más importantes ^{82,84,85}; antivirales contra los virus del tabaco y H1N1 ^{73,86,87}; antimaláricos ⁸² y antioxidantes. ⁸⁴

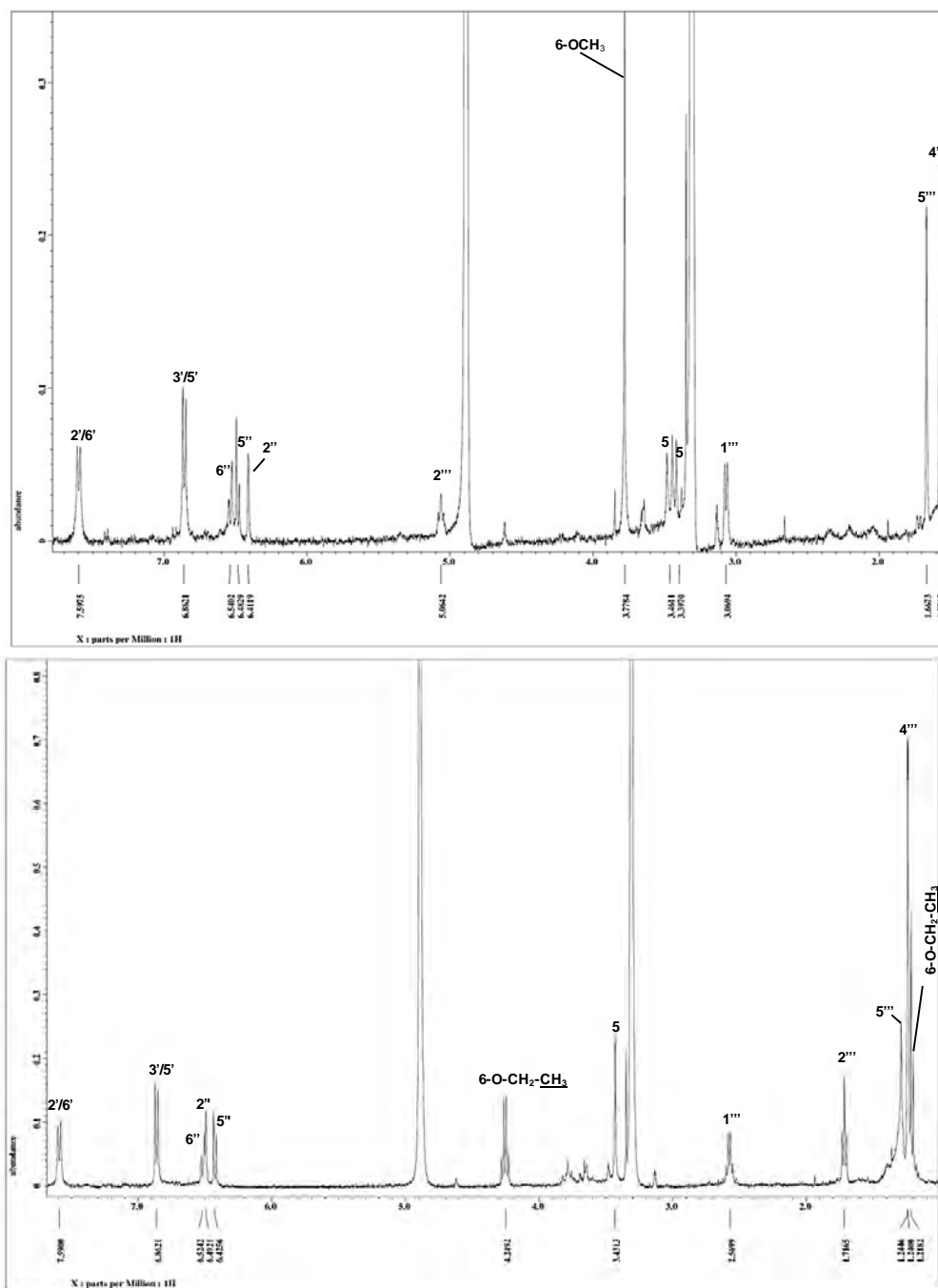


Figura 30. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) de los compuestos **6** (arriba) y **8** (abajo) en CD_3OD .

Cuadro 11. Datos de RMN (^1H , 400 MHz y ^{13}C , 100 MHz) para los compuestos **1-4** en CD_3OD (δ en ppm y J en Hz).

Posición	1		2 ^a		3		4	
	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)
1	^b		^b		^b		171.7	
2	^b		135.0		140.1		135.8	
3	129.2		128.0 ^c		129.0		130.6	
4	85.9		86.9		86.9		86.8	
5	39.8	3.50, sa / 3.48, sa	39.6	3.45, d (14.5) 3.37, d (14.5)	39.8	3.47, s	39.6	3.44, s
6	^b		172.3		171.7		177.6	
6-OCH ₃	54.0/53.9	3.78, s	53.8	3.77, s	54.0	3.78, s	54.0	3.75, s
1'	123.7/123.4		124.3		123.3		123.3	
2'/6'	130.3/130.2	7.6, d (8.7)	130.1	7.60, d (8.4)	130.4	7.58, d (8.7)	130.4	7.56, d (8.7)
3'/5'	159.5/159.0	6.85, d (8.7)	116.6	6.85, d (8.4)	116.7	6.86, d (8.7)	116.7	6.86, d (8.7)
4'	116.7/116.6		158.9		159.5		159.5	
1''	126.9/126.7		129.9		126.3		126.3	
2''	131.6/131.5	7.06, d (1.8) / 6.89, d (1.8)	133.1	6.45, d (2.2)	131.1	6.60, bs	133.0	6.47, d (1.8)
3''	125.4/125.2		125.6		128.2		120.6	
4''	153.0/152.9		155.3		160.6		153.3	
5''	117.1/116.9	6.48, d (8.2) / 6.43, d (8.2)	115.2	6.46, d (8.4)	109.2	6.46, d (8.2)	117.4	6.47, d (8.2)
6''	132.2/132.1	6.70, dd (8.2, 1.8) / 6.54, dd (8.2, 1.8)	129.6	6.50, dd (8.4, 2.2)	128.0	6.53, dd (8.2, 1.8)	130.4	6.54, dd (8.2, 1.8)
1'''	70.2/70.1	4.33, d (8.2) / 4.26, d (8.2)	25.9	2.43, m	31.5	3.03, dd (16.0, 9.1) 2.96, dd (16.0, 9.1)	32.1	2.52, dd (16.9, 7.7) 2.76, dd (16.9, 5.0)
2'''	77.1/77.0	3.43, d (8.2)	44.8	1.52, m	90.5	4.49, dd (9.1, 8.7)	70.5	3.66, dd (7.7, 5.5)
3'''	79.8/79.7		71.6		72.6		78.1	
4'''	27.2/27.1	1.38, s / 1.37, s	29.1	1.19, bs	25.3	1.15, s	21.0	1.16, s
5'''	19.4/19.3	1.10, s	29.4	1.19, bs	25.4	1.19, s	25.9	1.26, s
3'''-OCH ₃								

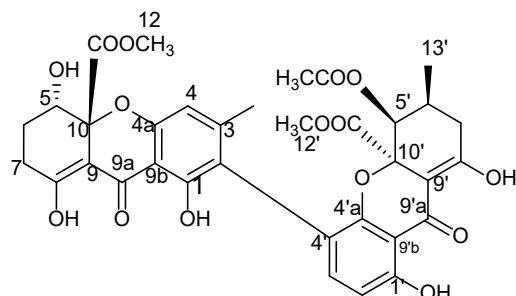
^a ^1H , 500 MHz y ^{13}C , 125 MHz; ^b No observados.

Cuadro 11. Datos de RMN (^1H , 400 MHz y ^{13}C , 100 MHz) para los compuestos **5-8** en CD_3OD (δ en ppm y J en Hz).

Posición	5		7		6		8	
	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J)
1	168.9		170.5					
2	137.4		140.0					
3	128.9		129.3					
4	87.0		86.9					
5	39.6	3.48, d (14.6) 3.40, d (14.6)	39.6	3.43, sa	3.44, d (14.6) 3.39, d (14.6)		3.43, sa	
6	171.8		171.7					
6-OCH ₃	53.9	3.79, s	54.0	3.78, sa	3.77, s			
1'	123.6		123.3					
2'/6'	130.4	7.60, d (8.7)	130.4	7.56, d (8.7)	7.59, d (8.2)		7.59, d (8.7)	
3'/5'	116.7	6.86, d (8.7)	116.7	6.86, d (8.7)	6.86, d (8.2)		6.86, d (8.7)	
4'	159.4		159.5					
1''	129.5		125.6					
2''	133.0	6.40, d (1.8)	132.8	6.48, sa	6.41, d (1.8)		6.49, d (1.8)	
3''	125.3		121.5					
4''	155.4		154.4					
5''	115.3	6.48, d (8.2)	117.5	6.42, d (8.2)	6.48, d (8.2)		6.42, d (8.2)	
6''	129.8	6.53, dd (8.2, 1.8)	130.3	6.50, dd (8.2, 1.8)	6.54, dd (8.2, 1.8)		6.52, dd (8.2, 1.8)	
1'''	25.3	2.42, dt (12.8, 5.0) 2.28, dt (12.8, 5.0)	23.3	2.57, td (10.0, 6.8)	3.06, d (7.3)		2.56, dd (12.8, 6.4)	
2'''	40.1	1.51, m	33.8	1.71, t (6.8)	5.06, t (7.3)		1.71, t (6.8)	
3'''	76.4		75.2					
4'''	25.7	1.16, sa	27.1	1.24, sa	1.57, s		1.24, s	
5'''	25.7	1.16, sa	27.1	1.24, sa	1.66, s		1.24, s	
3'''-OCH ₃	49.8	3.18, s						
6-O-CH ₂ -CH ₃							4.24, dd (14.2, 6.8)	
6-O-CH ₂ -CH ₃							1.21, t (6.8)	

6.2.2 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir de *Aspergillus* sp. (CC7-12)

6.2.2.1 Caracterización de la neosartorina (9)



La neosartorina (**9**; 70.7 mg) se obtuvo mediante sucesivas cromatografías (CC tipo flash, HPLC) a partir de la fracción primaria CC7-12₇. Las constantes espectroscópicas de este producto se resumen en el **Cuadro 12**.

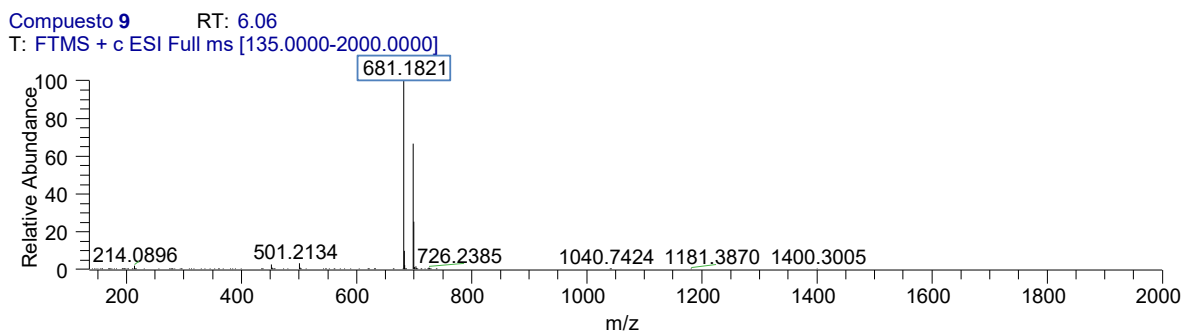
El espectro en el UV del producto **9** presentó dos máximos de absorción observados en 279 y 333 nm (**Figura 31**) confirmando la presencia de grupos cromóforo de tipo cromanona. Los iones pseudomoleculares observados en el espectro de masas en una m/z de 681.1821 $[M+H]^+$ y 679.1461 $[M-H]^-$ corresponden con la fórmula molecular $C_{34}H_{32}O_{15}$ que permite 19 grados de insaturación (**Figura 31**). Otros picos importantes observados en m/z 621 $[M-59]$, 579 $[M-59-42]$, 561 $[M-59-60]$, y 501 $[M-59-60-60]$, son característicos de los compuestos de tipo ergocromos como el ácido secalónico o la eumitrina A₁.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis de los espectros de RMN del producto **9** es un isómero de la eumitrina A₁ (**Figura 32**). Así el espectro de RMN ¹H presenta las señales para:

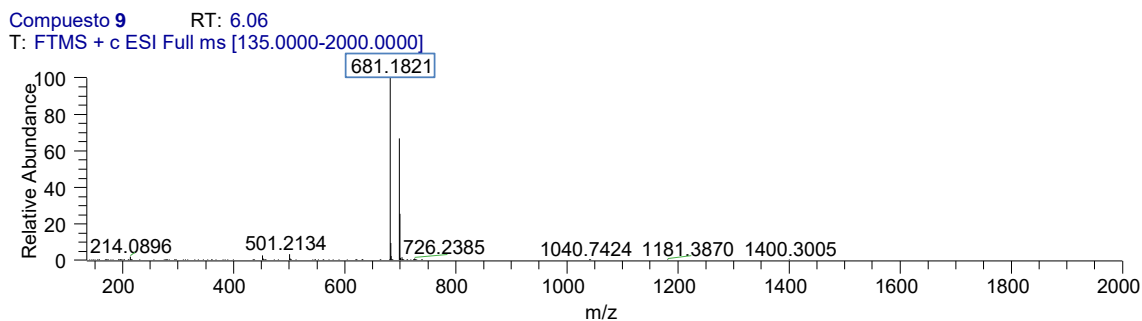
- Cuatro grupos hidroxilo quelatados en δ_H 13.88, 13.76, 11.52 y 11.35 (8-OH, 1'-OH, 1-OH y 8'-OH).
- Cuatro señales simples en δ_H 3.77 (s), 3.62 (s), 2.06 (s) y 0.90 (s), y una señal doble en δ_H 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz). El desplazamiento químico de las dos primeras señales es asignable a los metilos de dos grupos metoxilo y la señal en δ_H 2.06 indicó la presencia de metilo sobre doble ligadura.

- Finalmente, se observa un conjunto de dos señales dobles atribuibles a un sistema AB de dos protones aromáticos en δ_H 7.12 (1H, d, $J = 8.6$ Hz) y 6.57 (1H, d, $J = 8.6$ Hz) y una señal simple en δ_H 6.45 (s) también atribuible a un protón aromático. Con base en el análisis anterior y el análisis comparativo de los datos espectroscópicos reportados en la literatura la estructura del compuesto **9** se estableció como la de la neosartorina.⁷⁶

A



B



C

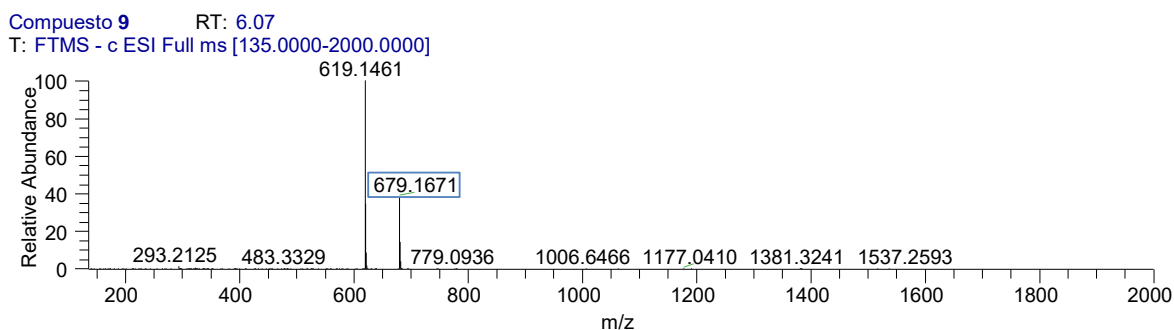


Figura 31. Espectro en el UV (**A**) y espectros de masas generados por la técnica de electrospray en los modos ESI⁺ (**B**) y ESI⁻ (**C**) del compuesto **9**.

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de ^1H RMN de la neosartarina (**9**) (400 MHz; δ en ppm; J en Hz; CDCl_3).

Neosartarina (9)		
Posición	δ_H , mult. (J)	δ_H , mult. (J) ⁷⁶
4	6.45, s	6.47, s
5	4.34, dd	4.36, dd (4.1, 1.7)
6ax	1.95, m	1.97, m
6eq	2.17, m	2.14, m
7ax	2.82, m	2.83, m
7eq	2.37, m	2.37, m
12	3.77, s	3.78, s
C-1-OH	11.52, s	11.53, s
C-3-CH ₃	2.06, s	2.07, s
C-8-OH	13.88, s	13.90, s
2'	6.57, d (8.6)	6.58, d (8.5)
3'	7.12, d (8.6)	7.12, d (8.5)
5'	5.26, d (1.34)	5.28, d (1.4)
6'	2.30, m	2.31, m
7'eq	2.35, m	2.37, m
7'ax	2.35, m	2.37, m
12'	3.62, s	3.64, s
13'	0.90, d (6.4)	0.92, d
C-1'-OH	13.76, s	13.78, s
C-5'-OCOCH ₃	1.90, s	1.92, s
C-8'-OH	11.35, s	11.36, s

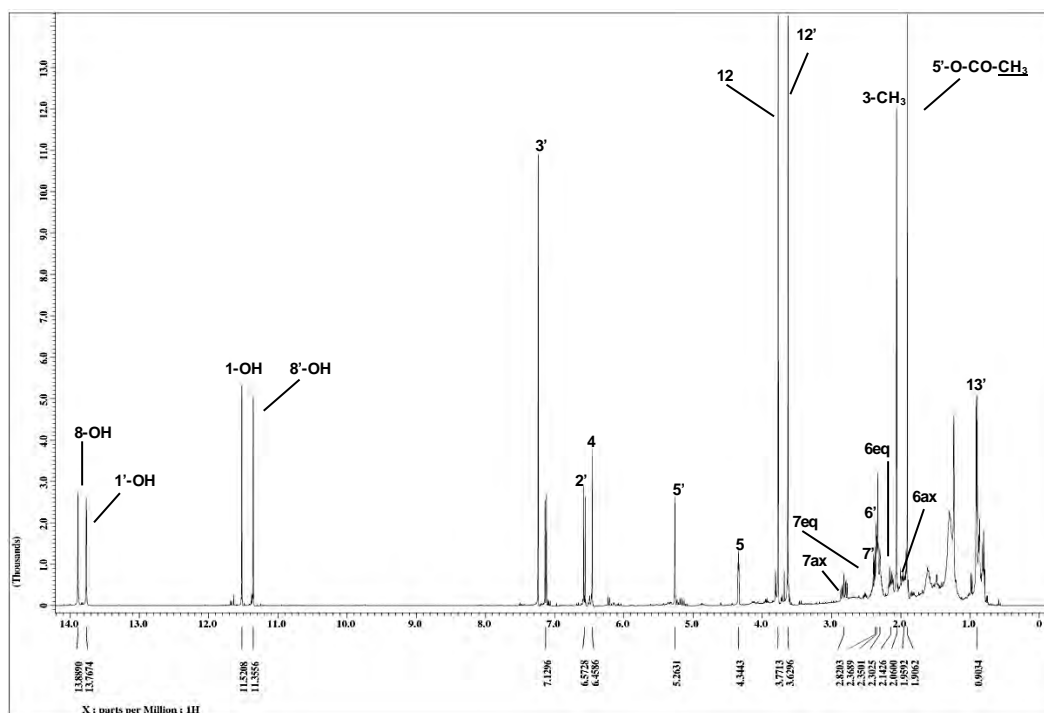
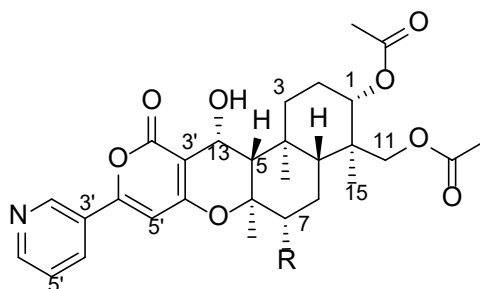


Figura 32. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9** (400 MHz, CDCl_3).

La neosartorina (**9**) fue aislada por primera vez en el año de 1998 de la especie *Neosartorya fischeri* (Trichocomaceae), aislada de una muestra de sedimento del río Vah en Eslovaquia.⁷⁶ También, ha sido reportado su aislamiento a partir de *A. fumigatiiformis*⁸⁸ y *A. lentulus*.⁸⁹ Este metabolito presenta una importante actividad como agente antimicrobiano selectivo contra bacterias gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *B. subtilis*).^{88,89}

6.2.2.2 Caracterización del piripiropeno A (**10**) y su derivado 7-desacetilado (**11**)



Piripiropeno A (**10**)

R = OCOCH₃

7-Desacetil-piripiropeno A (**11**)

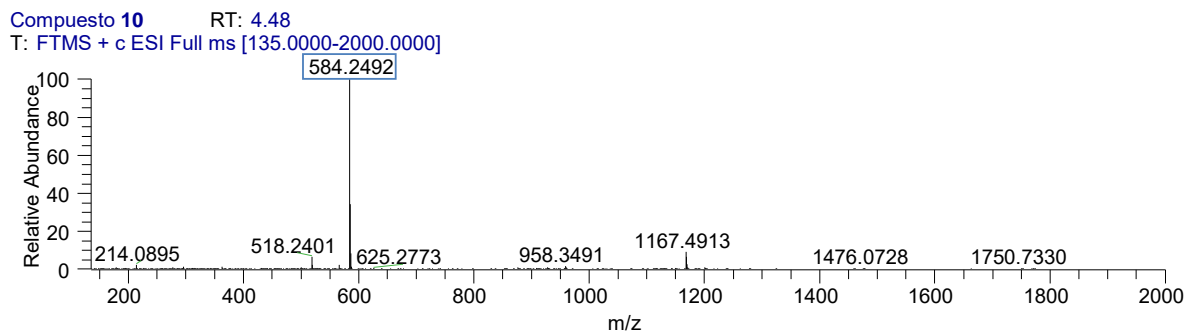
R = OH

Los compuestos **10** y **11** se obtuvieron como sólidos. El análisis detallado de los espectros de masas de alta resolución generados por la técnica de ionización de electrospray en modo positivo permitieron establecer sus iones pseudomoleculares (**Figura 33**) en una m/z de 584.2492 [M+H]⁺ (**10**) y 542.2378 [M+H]⁺ (**11**), estos iones corresponden con las fórmulas moleculares de C₃₁H₃₇NO₁₀ y C₂₉H₃₅NO₉, respectivamente.

Los espectros de RMN ¹H de ambos productos resultaron muy similares (**Figuras 34** y **35**) difiriendo fundamentalmente en la ausencia en el producto **11** de una de las señales correspondientes a los tres grupos acetato presentes en δ_H 2.02-2.1 en el producto **10**. En su lugar en el espectro de RMN ¹H se observó una señal en δ_H 3.48 (s). Estas observaciones aunadas a la diferencia de 42 uma que presentan ambos productos permitían inferir que el compuesto **11** es el derivado desacetilado en C-7 del compuesto **10**. Así, el análisis detallado de los datos espectroscópicos de estos productos con aquellos reportados en la literatura para el piripiropeno A se encuentra en perfecta armonía, permitiendo caracterizar al compuesto **10** como el

piriropeno A⁷⁷ y al producto **11** como su correspondiente derivado 7-desacetilado.^{78,79}

A



B

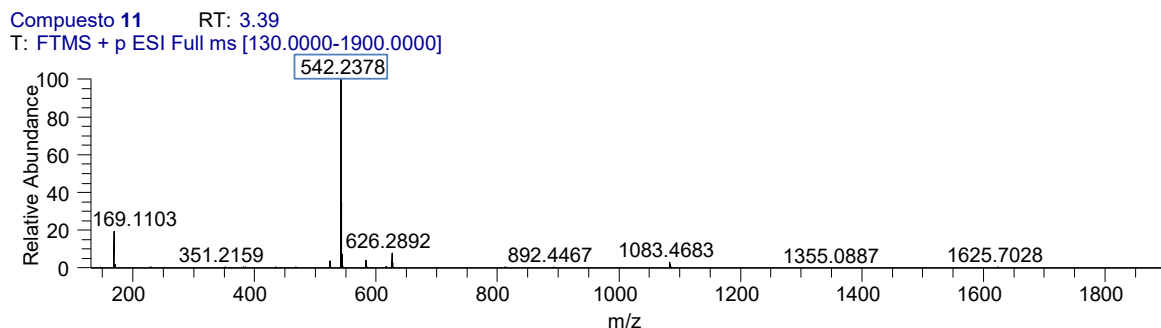


Figura 33. Espectros de masas generados por la técnica de electrospray en modo ESI⁺ de los compuestos **(A) 10** y **(B) 11**.

Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN ¹H de los compuestos **10** y **11** en CDCl₃ (δ en ppm; J en Hz).

Posición	10^a	11^b	Piriropeno A⁷⁷
	δ_{H} , mult, (J)	δ_{H} , mult, (J en Hz)	δ_{H} , mult, (J en Hz)
1	4.77, dd (11.6, 4.7)	4.78, dd (11.4, 4.5)	4.79, dd (11.5, 4.8)
2	1.85, m	1.84, m	1.90, m 1.82, m
3	2.32, m 1.31, m	2.15, m 1.33, m	2.16, m 1.38, m
5	1.52, d (4.2)	1.49, d (4.1)	1.54, m
7	5.00, m	3.48, s	5.02, m
8	1.77, m	1.78, m 1.75, m	1.78, m 1.60, m
9	c	c	1.63, m
11	3.78, d, (12.0) 3.68, d, (12.0)	3.80, d (12.0) 3.76, d (12.0)	3.79, d (12.0) 3.71, d (12.0)
12	1.42, s	1.41, s	1.44, s

13	4.97, d (4.6)	4.98, d (4.0)	4.99, m
13-OH	2.87, sa	2.86, sa	2.91, sa
14	1.67, s	1.65, s	1.69, s
15	0.88, s	0.89, s	0.89, s
1-OCOCH ₃	2.04, s	2.04, sa	2.04, s
7-OCOCH ₃	2.16, s		2.15, s
11-OCOCH ₃	2.08, s	2.05, s	2.09, s
5'	6.45, sa	6.50, s	6.45, s
2''	9.00, sa	8.90, s	9.00, d (2.0)
4''	8.14, d (8.6)	8.10, ddd (8.0, 1.7, 1.1)	8.09, ddd (8.0, 2.0, 1.5)
5''	7.44, sa	7.41, dd (8.0, 4.5)	7.40, dd (8.0, 5.0)
6''	8.67, sa	8.69, d (4.5, 1.7)	8.68, dd (5.0, 1.5)

^a 400 MHz; ^b 500 MHz; ^c Debajo de la señal de H₂O.

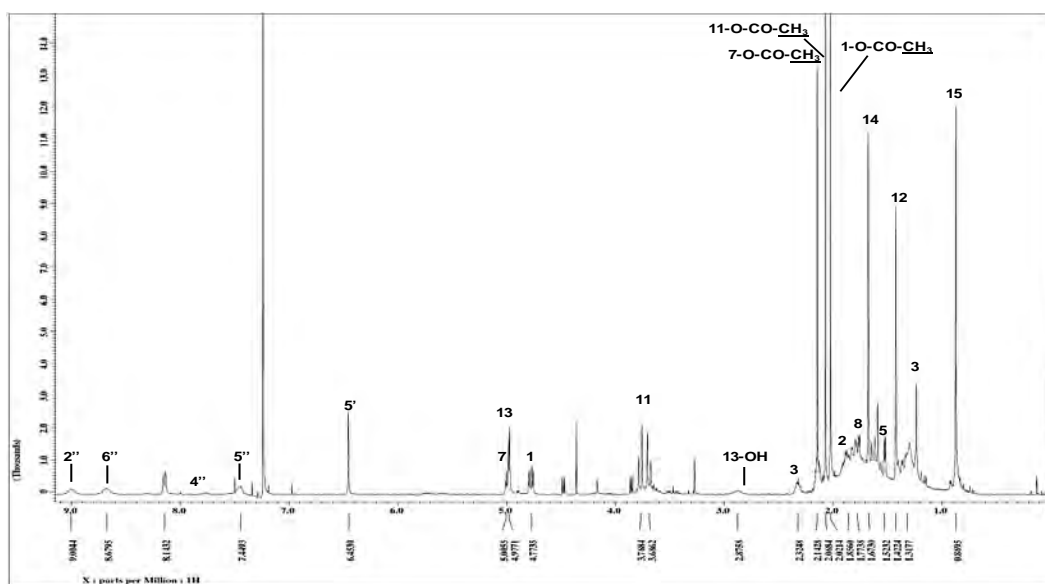


Figura 34. Espectro de RMN ¹H del compuesto **10** (400 MHz, CDCl₃).

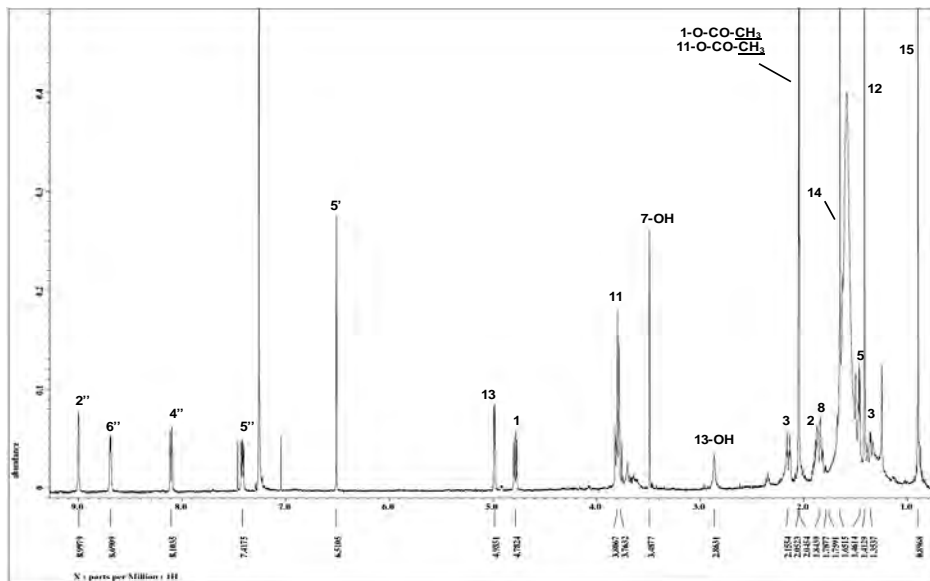
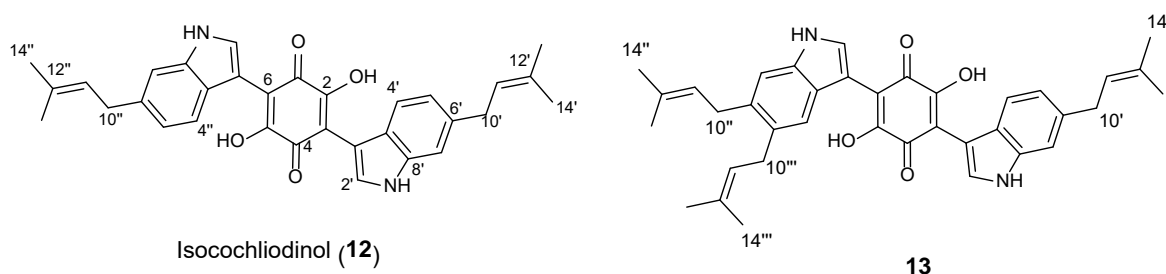


Figura 35. Espectro de RMN ^1H del compuesto **11** (500 MHz, CDCl_3).

El piripiropeno A (**10**) fue aislado por primera vez de *A. fumigatus*⁷⁷, y a la fecha no existen reportes en la literatura sobre el aislamiento de su derivado 7-desacetilado (**11**) a partir de fuentes naturales. Sin embargo, existen reportes de la síntesis total de **11**⁷⁹ y de su aislamiento a partir co-cultivos de *P. coprobium* en *A. oryzae* mediante la clonación de la región 24 Kb del ADN genómico, para caracterizar a las enzimas implicadas en la producción de **10** por *P. coprobium*.⁷⁸

En la literatura especializada se encuentra reportado el aislamiento de 20 piripiropenos (piripiropenos A-T) en el género *Aspergillus*. Los compuestos **10** y **11** han sido evaluados como inhibidores de la enzima colesterol aciltransferasa; con valores de CI_{50} de $0.1 \mu\text{M}$ y $> 50 \mu\text{M}$, respectivamente.⁷⁹ Estos resultados sugieren que el grupo acetato presenta un rol importante en la actividad inhibitoria de la enzima. También el producto **12** ha sido evaluado como agente antimicrobiano y no mostró una actividad significativa. Finalmente, la evaluación de la actividad citotóxica de este grupo de compuestos contra células Vero, tampoco fue relevante.

6.2.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir del orden Sordariales (CC9-6)

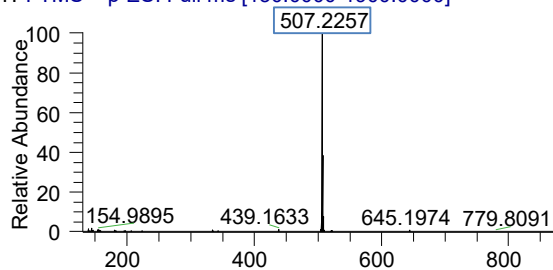


Los compuestos **12** y **13** fueron aislados a partir de la especie **CC9-6** como pigmentos color púrpura. Sus fórmulas moleculares fueron establecidas por HRESIMS en los modos positivo (ESI^+) y negativo (ESI^-) como $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$ y $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$, respectivamente (**Figura 36**). Los espectros de RMN de estos productos permitieron evidenciar que ambos compuestos presentan un núcleo de tipo 2',5'-dihidroxi-3',6'-bisindolilbenzoquinona, y que el producto **12** es un isómero estructural del cochliodinol. El análisis comparativo de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento observados en los espectros de RMN de los productos **12** y **13** se resume en el **Cuadro 15**.

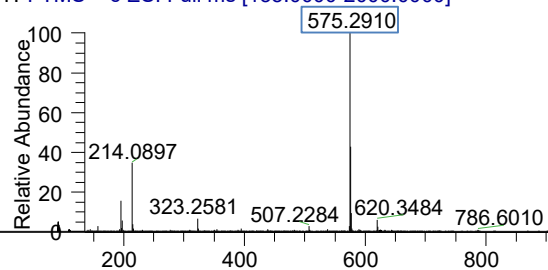
Así, el análisis detallado de los datos espectroscópicos de RMN ^1H del isocochliodinol y el producto **12** evidenció en primer lugar la presencia de dos residuos metil-but-2-enilo [δ_{H} 1.72 (s); 3.39 (d, $J = 7.3$); 5.35 (2H, t, $J = 7.3$)] que en el producto **12** forman al isómero estructural simétrico del cochliodinol (**Figura 37**). Esto se confirmó al observar las correlaciones en el espectro COSY del producto **12** entre el conjunto de señales dobles para los protones H-4' y H-5' y H-4'' y H-5'' en δ_{H} 7.32 (d, $J = 8.2$ Hz) y 6.81 (dd, $J = 8.2, 0.9$ Hz), indicativo de que los grupos isoprenilo presentes, se encontraban unidos en el anillo aromático de la subestructura de indol en C-6' y C-6''. De manera adicional, en el espectro HMBC también se evidenció que las cadenas laterales de isoprenilo estaban situadas en posición *meta* con respecto a los protones H-4' y H-4''; con base estas observaciones, el producto **12** fue caracterizado como el isocochliodinol. Este compuesto ha sido aislado de las especies *Chaetomium mororum* y *Humicula fuscoatra* (también perteneciente al orden Sordariales).⁸⁰ Por otra parte, el cochliodinol es la primer asterriquinona (*N*-1,1-dimetilalil o 3,3-dimetilalil-indolil benzoquinona) descrita en la literatura, aislada de *Chaetomium cochliodes* y *C. globosum*.⁹⁰

A.1

Compuesto 12 RT: 6.75
T: FTMS + p ESI Full ms [130.0000-1900.0000]

**A.2**

Compuesto 13 RT: 7.57
T: FTMS + c ESI Full ms [135.0000-2000.0000]

**B**

Compuesto 13 RT: 7.57
T: FTMS + c ESI Full ms [135.0000-2000.0000]

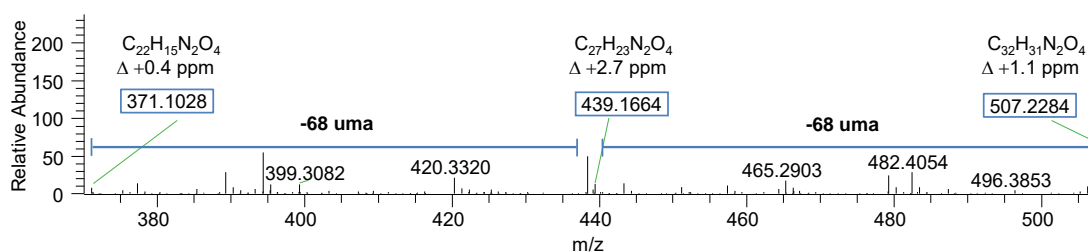
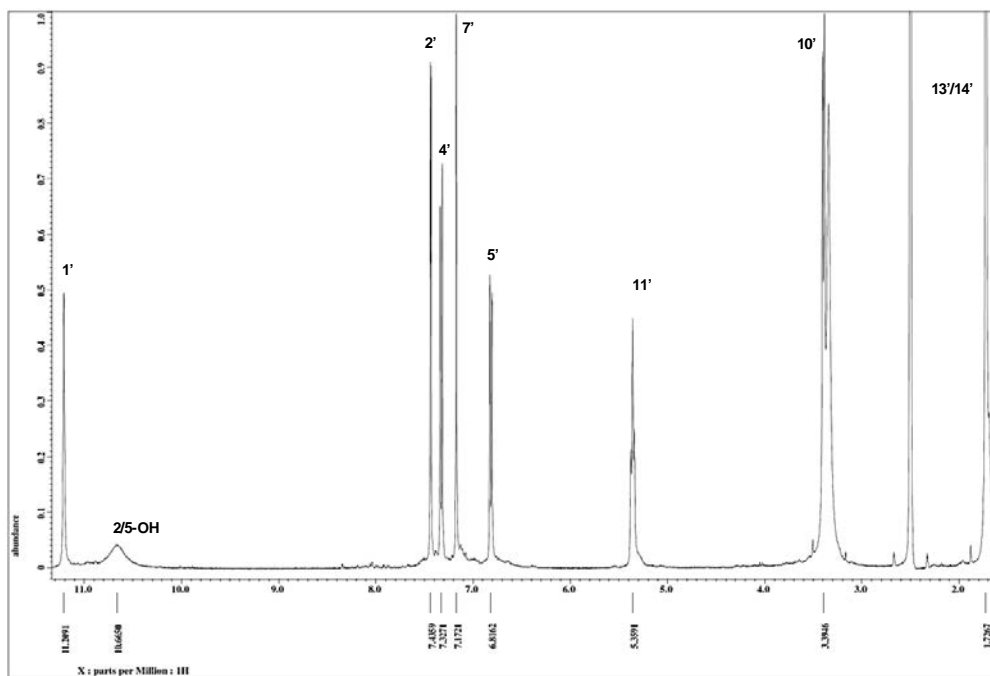


Figura 36. Espectros de masas por la técnica de electrospray en modo ESI⁺ de los compuestos 12 (A.1) y 13 (A.2 y B).



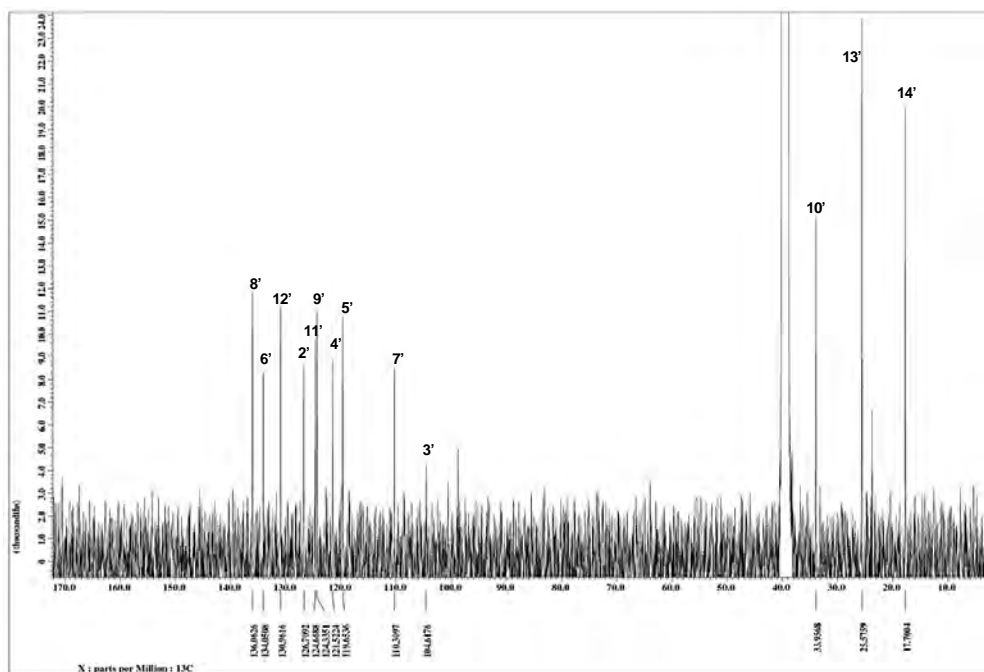


Figura 37. Espectro de RMN ^1H (arriba) y ^{13}C (abajo) del compuesto **12** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

En el caso del producto **13** la información proporcionada por la espectrometría de masas (m/z 575.2763 $[\text{M}+\text{H}]^+$) y los espectros de RMN ^{13}C permitieron confirmar que el compuesto **13** presenta señales adicionales para cinco átomos de carbono; así, el análisis del espectro de RMN ^{13}C en su modalidad HSQC y de acuerdo con la teoría del desplazamiento químico, indicaron claramente que estas señales eran congruentes con la presencia en la molécula de un residuo de metil-but-2-enilo adicional [δ_c 31.2 (C-10'''); 123.8 (C-11'''); 131.2 (C-12'''); 25.6 (C-13'''); 17.7 (C-14''')]. La ubicación de este residuo de isoprenilo en el núcleo 2',5'-dihidroxi-3',6'-bisindolilbenzoquinona, se realizó con base en las correlaciones HMBC observadas entre C-3''/H-4'', C-5''/H-7'' y C-9''/H-7'' (**Figuras 42-43**). Este hallazgo representa la primera descripción del aislamiento de **13** a partir de una fuente natural.

Las asterriquinonas, como el cochliodinol, son metabolitos conocidos por su importante actividad antibiótica y/o citotóxica.^{90,91} Este producto ha sido reportado por su importante actividad citotóxica contra la línea celular L5178Y (células de linfoma de ratón) (CE_{50} = 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), además, de ser un excelente inhibidor de la enzima tirosina cinasa EGFR (factor de crecimiento epidérmico).⁹² Finalmente, este tipo de compuestos también han sido reportados como inhibidores de la actividad proteolítica de las enzimas implicadas en la coagulación sanguínea, siendo el isocochliodinol (**12**) un importante y selectivo inhibidor que no presenta actividad contra las serina proteasas, trombina y tripsina.⁸⁰

Los resultados de la evaluación del potencial antimicrobiano de **13** realizada en nuestro grupo de trabajo, permitió establecer que este producto (fracción CC9-6₆) presenta una actividad antimicrobiana significativa contra las cepas *S. aureus*, *E. coli* (Inhibición total a 200 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e inhibición total a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y parcial a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). También se realizó la evaluación del potencial citotóxico de **12** y **13** contra las líneas celulares MDA-MB-435, MDA-MB-231 y O vcar 3. Los resultados obtenidos se muestran en el **Cuadro 18**, y se puede observar que el isocochliodinol (**12**) fue más potente que el compuesto **13**, para las tres líneas celulares evaluadas; estos resultados concuerdan con los encontrados por Debbab y colaboradores, ya que **13** posee un grupo electroatractor (cadena de isoprenilo) en la posición 5, lo cual podría afectar la selectividad/afinidad de este compuesto por la diana.

Cuadro 14. Evaluación del potencial citotóxico de los compuestos **12** y **13**.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)		
	MDA-MB-435	MDA-MB-231	Ovcar 3
12	1.51	3.80	3.95
13	2.48	6.27	12.32
Taxol (nM)	0.522	5.26	4.23

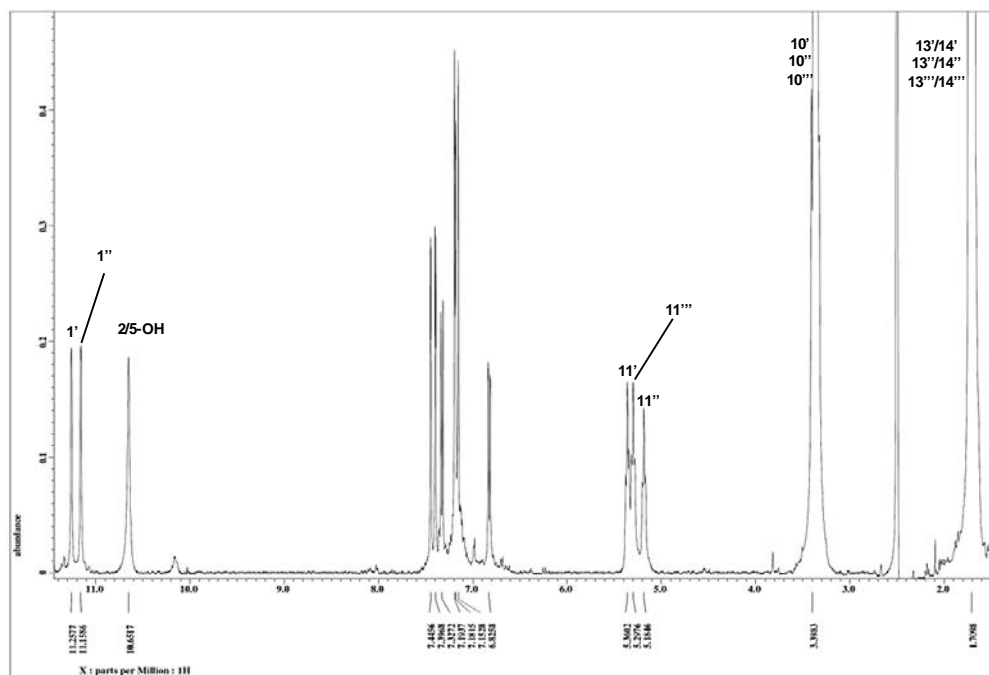
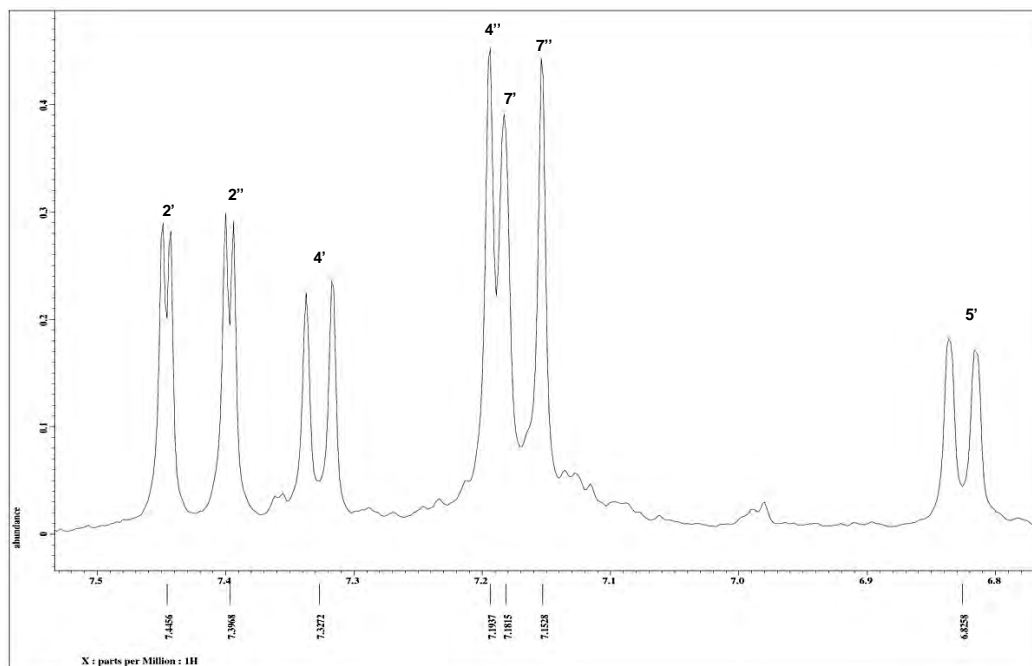
A**B**

Figura 38. Espectro de RMN ^1H del compuesto **13** (A) (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) y (B) vista parcial δ_{H} 6.8 a 7.5 ppm.

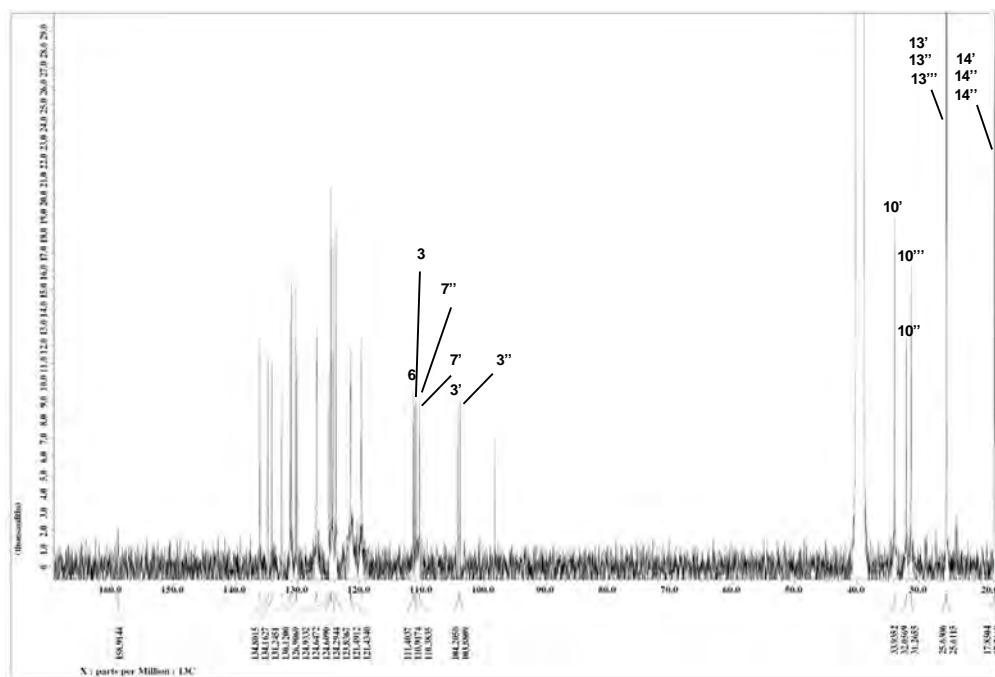
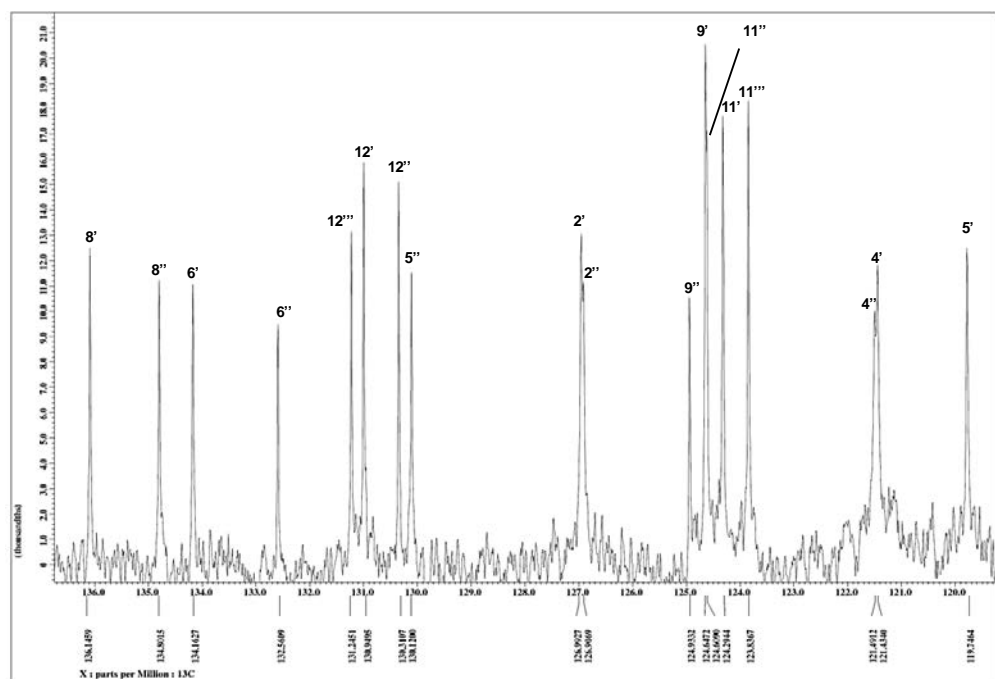
A**B**

Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **13** (A) (400 MHz, DMSO- d_6) y (B) vista parcial δ_{H} 120.0 a 136.0 ppm.

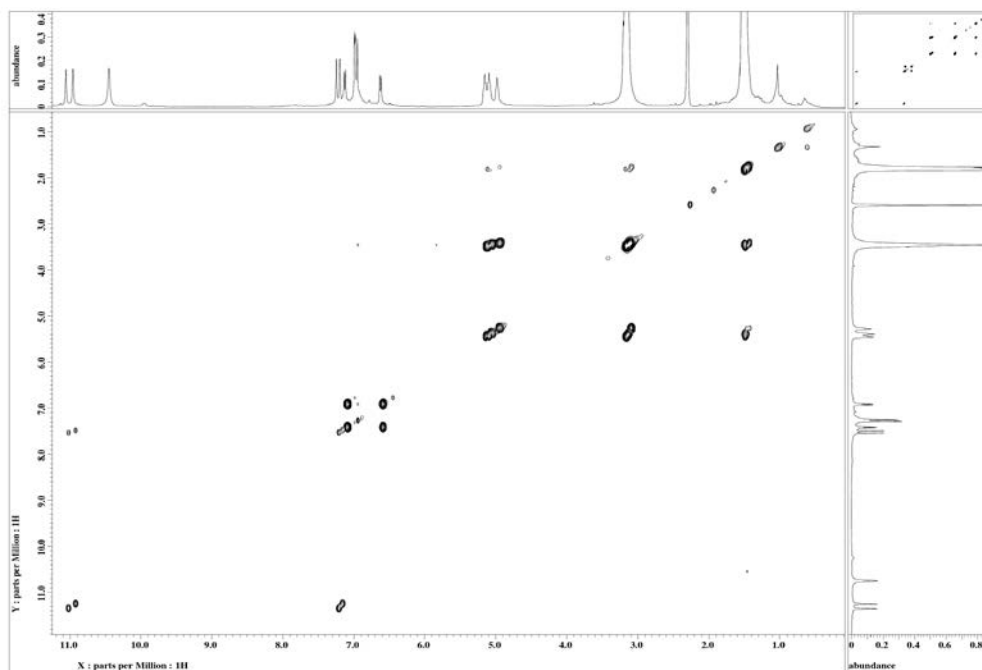


Figura 40. Espectro COSY del compuesto **13** (400 MHz, DMSO- d_6).

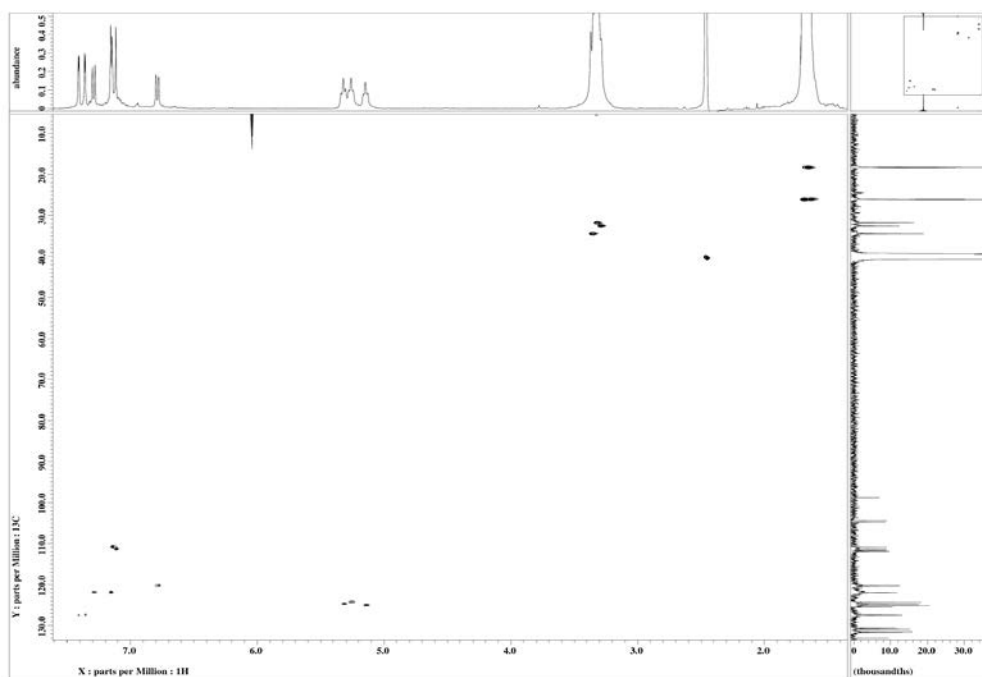


Figura 41. Espectro HSQC del compuesto **13** (400 MHz, DMSO- d_6).

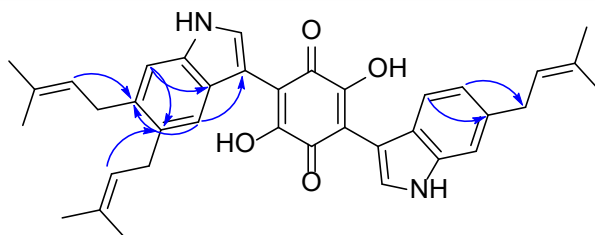
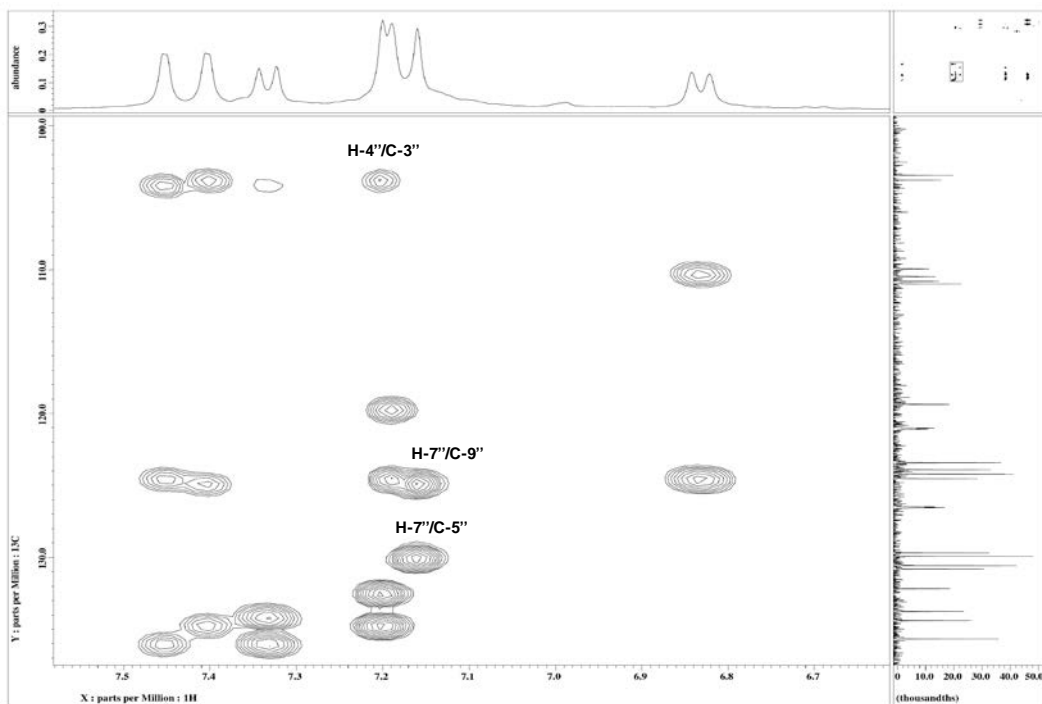


Figura 42. Vista parcial del espectro HMBC (400 MHz, DMSO- d_6) y correlaciones clave del compuesto **13**.

Cuadro 15. Datos espectroscópicos de RMN para los compuestos **12** y **13** (^1H , 400 MHz y ^{13}C , 100 MHz; δ en ppm; J en Hz; DMSO- d_6) e isochliodinol.^{81,90}

Posición	12			13			Isochliodinol ^{81,90}	
	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J en Hz)	COSY (^1H - ^1H)	HMBC (^1H - ^{13}C)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J en Hz)
2/5		10.66		10.65			168.5	10.75, sa
3/6	112.6		111.2/ 111.4				112.3	
1'		11.20, sa		11.25, d (1.8)	2'	2', 3', 8'		11.17, sa
1''				11.15, d (1.8)	2''	2'', 3'', 8''		
2'	126.7	7.43, d (2.2)	127.0	7.44, d (2.4)	1'	3, 3', 8', 9'	128.2	7.40, d (1.8)
2''			126.9	7.39, d (2.4)	1''	6, 3'', 8'', 9''		
3'	104.7		104.2				106.2	
3''			103.8					
4'	121.5	7.32, d (8.2)	121.4	7.32, d (8.5)	5'	3', 6', 8'	112.0	7.30, d (7.9)
4''			121.5	7.19, s		3'', 5'', 6'', 8''		
5'	119.6	6.81, dd (8.2, 0.9)	119.7	6.82, d (8.3)	4'	6', 7', 9', 10'	122.9	
5''			130.1					
6'	134.0		134.1				131.9	
6''			132.5					
7'	110.3	7.17, bs	110.3	7.18, bs		5', 9'	122.1	7.7.11, s
7''			110.9	7.15, s		4'', 5'', 9'', 10''		
8'	136.0		136.1				135.7	
8''			134.8					
9'	124.3		124.9				129.9	
9''			124.9					
10'	33.9	3.39, d (7.3)	33.9	3.40, m	11'	5', 6', 7', 11', 12'	35.8	3.38, d (7.3)
10''			32.0	3.28, m	11''	4'', 6'' 11'', 12''		
10'''			31.2	3.33, m	11'''	5'', 7'', 11''', 12'''		
11'	124.6	5.33, t (7.3)	124.2	5.36, t (7.3)	10'	6', 10', 13', 14'	126.3	5.32, d (7.3)
11''			124.6	5.18, t (7.3)	10''	5'', 10'', 13'', 14''		
11'''			123.8	5.29, t (7.3)	10'''	6'', 10''', 13''', 14'''		
12'	130.9		130.9				131.1	
12''			130.3					
12'''			131.2					
13'	25.5	1.72, s	25.7	1.74, m			25.9	1.69, s
13''			25.5	1.70, m				
13'''			25.6	1.70, m				
14'	17.7	1.72, s	17.8	1.70, m			17.9	1.69, s
14''			17.8	1.70, m				
14'''			17.7	1.70, m				

6.2.4 Caracterización estructural de los compuestos aislados a partir del orden Pleosporales

Los compuestos **14** y **15** se obtuvieron como sólidos color rojo oscuro (2.3 y 1.9 mg, respectivamente). Los análisis de los iones pseudomoleculares (**Figura 43**) permitieron determinar sus fórmulas moleculares como se indica en el **Cuadro 16**. Por otra parte, los perfiles de UV permitieron evidencia la naturaleza aromática de estos compuestos, lo cuales se encuentran en p roceso de caracterización estructural.

Cuadro 16. Constantes espectroscópicas de los compuestos **14** y **15**.

Compuesto	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula molecular calculada	IDH
14	525.1176	523.1032	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	21
15	541.1122	539.0984	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	21

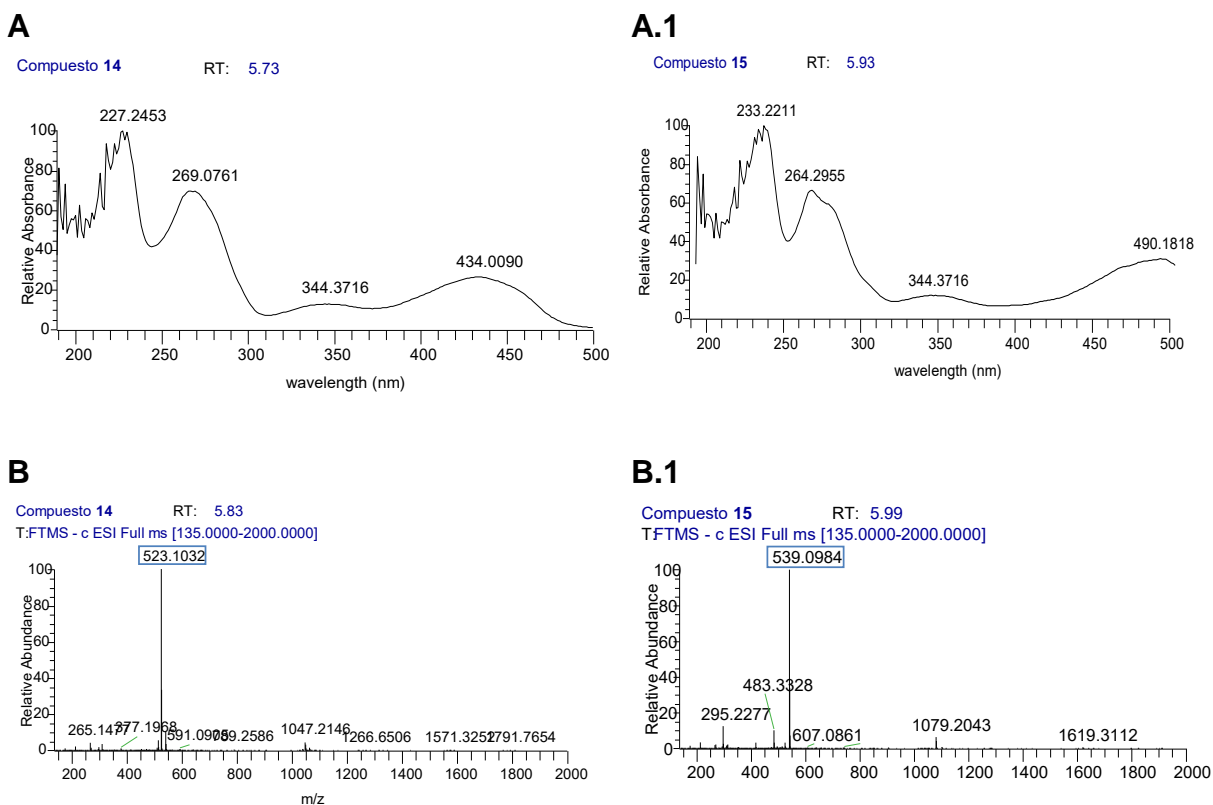


Figura 43. Espectro en el UV (arriba) y espectro de masas (abajo) por la técnica de ESI⁻ de los compuestos **14** (**A** y **A.1**) Y **15** (**B** y **B.1**).

7. CONCLUSIONES

- Los análisis de la morfología macroscópica, los perfiles cromatográficos y espectrométricos, y de la evaluación del potencial antimicrobiano de una serie de hongos aislados de CCC, permitieron la selección de cuatro especies fúngicas pertenecientes a las series CC1, CC7 y CC9 para su estudio químico biodirigido.
- El análisis genético del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal permitió la identificación de los taxa seleccionados como: *Aspergillus terreus* (CC1-1), *Aspergillus* sp. (CC7-12), orden Pleosporales (CC7-5), y orden Sordariales (CC9-6).
- El fraccionamiento del extracto orgánico a mediana escala de la especie *A. terreus* permitió el aislamiento y caracterización de 8 metabolitos de tipo butirolactona. Lo anterior permite evidenciar el metabolismo en rejilla realizado por este hongo.
- El estudio químico del extracto orgánico del hongo *Aspergillus* sp. (CC7-12), permitió el aislamiento e identificación de tres metabolitos secundarios conocidos: la neosartorina (9), el piriropeno A (10) y su derivado desacetilado (11). Los compuestos 10 y 11 han sido ampliamente estudiados como inhibidores de la colesterol aciltransferasa. Es importante mencionar que este trabajo describe por primera vez el aislamiento del compuesto 11, mediante estrategias convencionales, ya que solamente se ha descrito su obtención mediante estrategias biotecnológicas y de semi-síntesis.
- A partir del extracto orgánico del hongo Sordariales se obtuvieron dos metabolitos tipo indolil benzohidroquinonas, el isocochliodinol (12), y el producto natural novedoso identificado como 2-(5,6-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-1H-indol-3-il)-3,6-dihroxi-5-(6-(3-metilbut-2-en-1-il) ciclohexa-2,5-dien-1,4-diona) (13). Estos metabolitos poseen actividades biológicas diversas, siendo la actividad citotóxica la de mayor interés.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bills, G. F.; Gloer, J. B. *Microbiol. Spectr.* **2016**, 4, 1-32.
- (2) Debbab, A.; Aly, A. H.; Lin, W. H.; Proksch, P. *Microb. Biotechnol.* **2010**, 3, 544-563.
- (3) Gonzalez-Medina, M.; Owen, J. R.; El-Elimat, T.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H.; Figueroa, M.; Medina-Franco, J. L. *Front. Pharmacol.* **2017**, 8, 180.
- (4) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629-661.
- (5) Giddings, L.; Newman, D. J. *Bioactive compounds from terrestrial extremophiles*; Springer, Cham: Frederick, USA, 2015; p 90.
- (6) Evidente, A.; Kornienko, A.; Cimmino, A.; Andolfi, A.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Kiss, R. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 617-627.
- (7) Alberti, F.; Foster, G. D.; Bailey, A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101, 493-500.
- (8) Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1830, 3670-3695.
- (9) Primack, R. B. *Essentials of Conservation Biology*; Sinauer Associates: Sunderland, 2015; p 601.
- (10) Blackwell, M. *Am. J. Bot.* **2011**, 98, 426-438.
- (11) Blackwell, M.; Spatafora, J. W. In *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, Amsterdam; 2004; pp 7-21.
- (12) Herrera, T.; Ulloa, M. *El Reino de los Hongos: micología básica y aplicada.*; UNAM-Fondo de Cultura Económica: D.F., México, 1990; p 552.
- (13) Hawksworth, D. L.; Lucking, R. *Microbiol. Spectr.* **2017**, 5.
- (14) Du, L.; Robles, A. J.; King, J. B.; Powell, D. R.; Miller, A. N.; Mooberry, S. L.; Cichewicz, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 804-809.
- (15) Schueffler, A.; Anke, T. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 1425-48.
- (16) Tedersoo, L.; Bahram, M.; Pölme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N. S.; Wijesundera, R.; Ruiz, L. V.; Vasco-Palacios, A. M.; Thu, P. Q.; Suija, A. *science* **2014**, 346, 1256688.
- (17) Guzman, G. *Biodiversity and Conservation* **1998**, 7, 369-384.
- (18) Sarukhán, J., et.al., Síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales. In Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad México, 2017.
- (19) Aguirre-Acosta, E.; Ulloa, M.; Aguilar, S.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R. *Rev Mex Biodivers* **2014**, 85, 76-81.
- (20) Lewin, A.; Wentzel, A.; Valla, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, 24, 516-525.
- (21) Genilloud, O.; Gonzalez, I.; Salazar, O.; Martin, J.; Tormo, J. R.; Vicente, F. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 38, 375-389.
- (22) Xu, D. B.; Ye, W. W.; Han, Y.; Deng, Z. X.; Hong, K. *Mar. Drugs.* **2014**, 12, 2590-2613.
- (23) Souza, V.; Siefert, J. L.; Escalante, A. E.; Elser, J. J.; Eguiarte, L. E. *Astrobiology* **2012**, 12, 641-7.
- (24) Escalante, A. E.; Eguiarte, L. E.; Espinosa-Asuar, L.; Forney, L. J.; Noguez, A. M.; Souza Saldivar, V. *FEMS Microbiol. Ecol* **2008**, 65, 50-60.
- (25) Villafranca, I. F. *Ramamoorthy, TP, R. Bye, A. Lot y J. Fa.(1998), Diversidad biológica de México: orígenes y distribución, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 1998*, 689-713.
- (26) Elser, J. J.; Schampel, J. H.; Garcia-Pichel, F.; Wade, B. D.; Souza, V.; Eguiarte, L.; Escalante, A. N. A.; Farmer, J. D. *Fresh. Biol.* **2005**, 50, 1808-1825.
- (27) Redfield, A. C. *James Johnstone memorial volume* **1934**, 176-192.
- (28) Velez, P.; Gasca-Pineda, J.; Rosique-Gil, E.; Eguiarte, L. E.; Espinosa-Asuar, L.; Souza, V. *PeerJ.* **2016**, 4, e2064.

- (29) Villedas, O. Bioprospección de hongos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, para el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, 2018.
- (30) Vilchis, V. Potencial herbicida de hongos saprófitos y marinos facultativos de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, 2018.
- (31) Fajardo, C. A. Actividad antimicrobiana de ascomicetos selectos de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, 2018.
- (32) Turi, K. N.; Romick-Rosendale, L.; Ryckman, K. K.; Hartert, T. V. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2018**, *141*, 1191-1201.
- (33) Fiehn, O.; Kopka, J.; Dörmann, P.; Altmann, T.; Trethewey, R. N.; Willmitzer, L. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1157-1161.
- (34) El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B. M.; Cech, N. B.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1709-1716.
- (35) Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 437-455.
- (36) Kanani, H.; Dutta, B.; Quackenbush, J.; Klapa, M. I. In *Concepts in Plant Metabolomics*; Nikolau, B.; Wurtele, E., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp 93-110.
- (37) Landmarks, A. C. S. I. H. C. The discovery and development of penicillin. <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html> (25 septiembre 2018),
- (38) Salud, O. M. d. I. **2017**.
- (39) Singh, S. B.; Barrett, J. F. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1006-1015.
- (40) Walsh, C.; Wenczewicz, T. In *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*; Walsh, C.; Wenczewicz, T., Eds.; American Society for Microbiology: USA, 2016; pp 17-32.
- (41) Morens, D. M.; Folkers, G. K.; Fauci, A. S. *Nature* **2004**, *430*, 242.
- (42) Salud, O. M. d. I. Resistencia a los antibióticos. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos> (30 septiembre 2018),
- (43) Walsh, C.; Wenczewicz, T. In *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*; Walsh, C.; Wenczewicz, T., Eds.; American Society for Microbiology: USA, 2016; pp 181-196.
- (44) Nielsen, J. C.; Grijseels, S.; Prigent, S.; Ji, B.; Dainat, J.; Nielsen, K. F.; Frisvad, J. C.; Workman, M.; Nielsen, J. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 1-9.
- (45) Pérez-Cano, H. J.; Robles-Contreras, A. *Revista Médica MD* **2013**, *4*, 186-191.
- (46) Nazar, J. *Rev. Med. Chil.* **2007**, *67*, 161-172.
- (47) Houbraken, J.; de Vries, R. P.; Samson, R. A. *Adv. Appl. Microbiol.* **2014**, *86*, 199-249.
- (48) Bennett, J. W. In *Aspergillus: molecular biology and genomics*; Machida, M.; Gomi, K., Eds.; Caister Academic Press: Gran Bretaña, 2010; pp 1-18.
- (49) Aparicio-Cuevas, M. A.; Rivero-Cruz, I.; Sanchez-Castellanos, M.; Menendez, D.; Raja, H. A.; Joseph-Nathan, P.; Gonzalez, M. D. C.; Figueroa, M. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2311-2318.
- (50) Meyer, V.; Fiedler, M.; Nietzsche, B.; King, R. In *Filaments in bioprocess*; Krull, R.; Bley, T., Eds.; Springer: pp 91-133.
- (51) Frisvad, J. C.; Larsen, T. O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 7859-7877.
- (52) Varga, J.; Toth, B.; Kocsube, S.; Farkas, B.; Szakacs, G.; Teren, J.; Kozakiewicz, Z. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2005**, *88*, 141-150.
- (53) Kuenz, A.; Krull, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3901-3914.
- (54) Liu, M.; Sun, W.; Wang, J.; He, Y.; Zhang, J.; Li, F.; Qi, C.; Zhu, H.; Xue, Y.; Hu, Z.; Zhang, Y. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 525-530.
- (55) Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*; 10 ed.; Cabi International: 2008.

- (56) System, I. T. I. Pleosporales L uttrell ex M.E. Barr, 1987. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=14054#null (10 octubre 2018),
- (57) Zhang, Y.; Crous, P. W.; Schoch, C. L.; Hyde, K. D. *Fungal Divers.* **2012**, *53*, 1-221.
- (58) Kruys, A.; Eriksson, O. E.; Wedin, M. *Mycol. Res.* **2006**, *110*, 527-536.
- (59) Ismaiel, A.; Papenbrock, J. *Agriculture* **2015**, *5*, 492-537.
- (60) Friesen, T. L.; Faris, J. D.; Solomon, P. S.; Oliver, R. P. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*, 1421-8.
- (61) Barr, M. E. In *The mycota: systematics and evolution. Part A.*; McLaughlin, D. J.; McLaughlin, E. G.; Esser, K.; Lemke, P., Eds.; Springer-Verlag: USA, 2001; Vol. VII, pp 161-178.
- (62) System, I. T. I. Sordariales C had. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss., 1986. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=610649#null (08 Octubre 2018),
- (63) Zhang, G.; Zhang, Y.; Qin, J.; Qu, X.; Liu, J.; Li, X.; Pan, H. *Indian. J. Microbiol.* **2013**, *53*, 175-180.
- (64) Chovanová, K.; Zámocký, M. *Biologia* **2016**, *71*, 1204-1211.
- (65) Cai, L.; Jeewon, R.; Hyde, K. D. *Mycol. Res.* **2006**, *110*, 137-50.
- (66) Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W.; Bolchacova, E.; Voigt, K.; Crous, P. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 6241-6246.
- (67) Rivero-Cruz, I.; Duarte, G.; Navarrete, A.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. *J. Food. Sci.* **2011**, *76*, C309-C317.
- (68) Appendino, G.; Gibbons, S.; Giana, A.; Pagani, A.; Grassi, G.; Stavri, M.; Smith, E.; Rahman, M. M. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1427-1430.
- (69) Shen, Y.; Zou, J.; Xie, D.; Ge, H.; Cao, X.; Dai, J. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *60*, 1437-1441.
- (70) Parvatkar, R. R.; D'Souza, C.; Tripathi, A.; Naik, C. G. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 128-32.
- (71) Rao, K.; Sadhukhan, A.; Veerender, M.; Ravikumar, V.; Mohan, E.; Dhanvantri, S.; Sitaramkumar, M.; Babu, J. M.; Vyas, K.; Reddy, G. O. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 559-562.
- (72) Lin, T.; Lu, C.; Shen, Y. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 77-85.
- (73) Ma, X.; Zhu, T.; Gu, Q.; Xi, R.; Wang, W.; Li, D. *J. Ocean Univ. China* **2014**, *13*, 1067-1070.
- (74) Kiriyama, N.; Nitta, K.; Sakaguchū, Y.; Taguchi, Y.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull* **1977**, *25*, 2593-2601.
- (75) Wang, C.; Guo, L.; Hao, J.; Wang, L.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2977-2981.
- (76) Proksa, B.; Uhrin, D.; Liptaj, T.; Šturdíková, M. *Phytochemistry*. **1998**, *48*, 1161-1164.
- (77) Tomoda, H.; Kim, Y. K.; Nishida, H.; Masuma, R.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 148-153.
- (78) Hu, J.; Okawa, H.; Yamamoto, K.; Oyama, K.; Mitomi, M.; Anzai, H. *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 221-7.
- (79) Obata, R.; Toshiaki, S.; Tomoda, H.; Harigaya, Y.; Omura, S. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2683-2688.
- (80) Mocek, U.; Schultz, L.; Buchan, T.; Baek, C.; Fretto, L.; Nzerem, J.; Sehl, L.; Sinha, U. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 854-859.
- (81) Sekita, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2998-3001.
- (82) Haritakun, R.; Rachtawee, P.; Chanthaket, R.; Boonyuen, N.; Isaka, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1545-1548.
- (83) Nong, X. H.; Wang, Y. F.; Zhang, X. Y.; Zhou, M. P.; Xu, X. Y.; Qi, S. H. *Mar. Drugs.* **2014**, *12*, 6113-6124.
- (84) An, X.; Pei, Y.; Chen, S.; Li, S.; Hu, X.; Chen, G.; Lin, B.; Wang, H. *Molecules.* **2016**, *21*, 1361.

- (85) Nagia, M. M.; El-Metwally, M. M.; Shaaban, M.; El-Zalabani, S. M.; Hanna, A. G. *Org. Med. Chem. Lett.* **2012**, *2*, 9.
- (86) Zhou, M.; Lou, J.; Li, Y.-K.; Wang, Y.-D.; Zhou, K.; Ji, B.-K.; Dong, W.; Gao, X.-M.; Du, G.; Hu, Q.-F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 545-549.
- (87) Zhang, L. H.; Feng, B. M.; Zhao, Y. Q.; Sun, Y.; Liu, B.; Liu, F.; Chen, G.; Bai, J.; Hua, H. M.; Wang, H. F.; Pei, Y. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 346-350.
- (88) Ola, A. R.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Mandi, A.; Zerfass, I.; Hamacher, A.; Kassack, M. U.; Brötz-Oesterhelt, H.; Kurtan, T.; Proksch, P. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 1020-1023.
- (89) Li, T.-X.; Yang, M.-H.; Wang, Y.; Wang, X.-B.; Luo, J.; Luo, J.-G.; Kong, L.-Y. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38958.
- (90) Brewer, D.; Jerram, W.; Taylor, A. *Can. J. Microbiol.* **1968**, *14*, 861-866.
- (91) Casella, T. M.; Eparvier, V.; Mandavid, H.; Bendelac, A.; Odonne, G.; Dayan, L.; Duplais, C.; Espindola, L. S.; Stien, D. *Phytochemistry.* **2013**, *96*, 370-377.
- (92) Debbab, A.; Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Müller, W. E.; Mosaddak, M.; Hakikj, A.; Ebel, R.; Proksch, P. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment (BASE)* **2009**, *13*, 229-234.

9. ANEXO



Chemical and Biological Studies of Ascomycetes from Cuatro Ciénegas Basin, Mexico

Itzel Yeiverino and Mario Figueroa

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico.



As part of our continuing search for novel antimicrobial compounds from unexplored habitats of Mexico, a series of 20 saprotrophic fungi were isolated from soil and sediment samples collected at the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico (Figure 1).¹ Taxonomic diversity of fungal isolates was assessed by nuclear ribosomal internal transcribed spacer barcoding (Figure 2).² The organic (CHCl₃-MeOH) extracts from the axenic solid (moisture rice) cultures were tested against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* (Table 1).

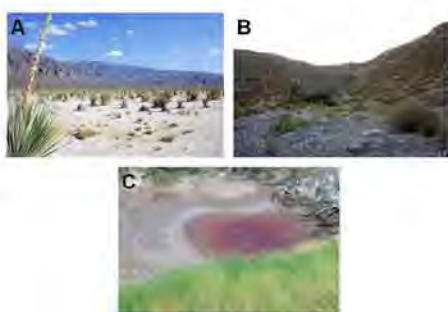


Figure 1. Sampling sites in Cuatro Ciénegas: (A) Churince, (B) Becerra Mountain Foothills, and (C) Pozas rojas.



Figure 2. Fungal cultures in PDA of selected fungi from Cuatro Ciénegas Basin: *Aspergillus terreus* (CC1-1), Order Pleosporales (CC7-5), Order Sordariales (CC9-6), and *Aspergillus* sp. (CC7-12).

Additionally, the extracts were dereplicated against a database containing more than 300 fungal secondary metabolites via recording UPLC retention times, UV data, and full-scan (high-resolution) mass spectra and MS/MS spectra in both positive and negative electrospray ionization modes,³ however, no hits were observed. Bioactive-guided fractionation (growth inhibition > 80% at 20 µg/mL and negative dereplication) of the scaled-up (10×) cultures led to the isolation of a series of butyrolactone derivatives (1-5) from the *Aspergillus* sp. (CC1-1); the bis-indolyl-dihydroxy benzoquinone cochliodinol (6) from a fungus of the order Sordariales (CC9-6); and the ergochrome neosartorin (7) from the *Aspergillus* sp. (CC7-12). Their structures were elucidated using 1D and 2D NMR and HRMS data analysis (Figure 3). To the best of our knowledge, this is the first report of chemical and biological studies of Ascomycetes isolated from the Cuatro Ciénegas Basin, and further chemical and biological studies on the remaining fractions are ongoing.

References. ¹Souza V., Siefert J., Escalante A., Elser J., Eguiarte L. *Astrabology*, 2012, 12 (7), 641-647; ²Raja H., Miller A., Pearce C., Oberlies N. *J. Nat. Prod.*, 2017, 80(3), 756-770; ³El-Elmatt T., Figueroa M., Ehrmann B., Cech N., Pearce C., Oberlies N. *J. Nat. Prod.*, 2013, 76(9), 1709-1718.

Table 1. Antimicrobial activity for selected fungal extracts and primary fractions from Cuatro Ciénegas Basin.

Extract or fraction	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>
CC1-1 (ss)						
CC1-1 (10×)						
CC1-1-1						
CC1-1-2						
CC1-1-3						
CC1-1-4						
CC1-1-5						
CC1-1-6						
CC9-6 (ss)						
CC9-6 (10×)						
CC9-6-1						
CC9-6-2						
CC9-6-3						
CC9-6-4						
CC9-6-5						
CC9-6-6						
CC9-6-7						
CC9-6-8						
CC9-6-9						
CC9-6-10						
CC7-5 (ss)						
CC7-5 (10×)						
CC7-5-1						
CC7-5-2						
CC7-5-3						
CC7-5-4						
CC7-5-5						
CC7-5-6						
CC7-5-7						
CC7-5-8						
CC7-5-9						
CC7-12 (ss)						
CC7-12 (10×)						
CC7-12-1						
CC7-12-2						
CC7-12-3						
CC7-12-4						
CC7-12-5						
CC7-12-6						
CC7-12-7						
CC7-12-8						
CC7-12-9						
CC7-12-10						
CC7-12-11						
CC7-12-12						
CC7-12-13						

MIC controls (µg/mL)	12.5	1000	1.2	31.2	6.2	10.0
Inhibition criteria						
Total inhibition at both concentrations (200 v 20 µg/ml)						
Total inhibition at 200 µg/ml, and partial inhibition at 20 µg/ml						
Total inhibition at 200 µg/ml						
Partial inhibition at both concentrations (200; 20 µg/mL)						
Partial inhibition at 20 µg/ml						
Ampicilin						
Gentamicin						
Nystatin						

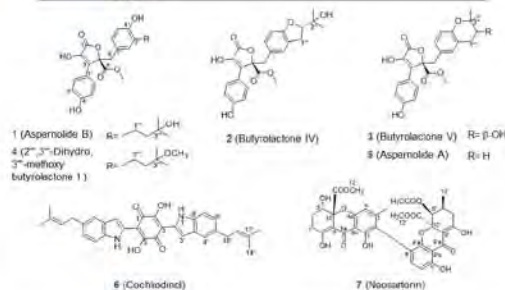


Figure 3. Structure of compounds 1-7.

Acknowledgments. This work was supported by grants from CONACyT-CB 236564 and -INFRA 252226, DGAPA-UNAM 205017, and PAIP-UNAM 5000-5000-9145. I.Y. acknowledges CONACyT (620245) and Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, for the financial support.