



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO QUÍMICO DE ESPECIES SELECTAS DE  
ASCOMICETOS COMO FUENTE POTENCIAL DE MOLÉCULAS  
CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Magaly Rodríguez Reyes**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2022**



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:** Dr. Francisco Hernández Luis

**VOCAL:** Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

**SECRETARIO:** Dr. José Alberto Rivera Chávez

**1er. SUPLENTE:** Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

**2° SUPLENTE:** Q.F.B. Genaro Jiménez Reyes

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 2-5, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES,  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. José Alberto Rivera Chávez**

**SUSTENTANTE:**

**Magaly Rodríguez Reyes**

## Agradecimientos

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación a través del programa UNAM-PAPIIT IA203220.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación a través del proyecto de infraestructura No. CF-2019-263977.

A la Dra. Beatriz Quiroz García y Dra. María del Carmen González García por su apoyo en la adquisición de espectros de RMN y Espectrometría de Masas.

Al Instituto de Química por el apoyo otorgado mediante el programa de Becas Internas de esta institución.

Al responsable del cepario de la Facultad de Química de la UNAM por proporcionar las cepas bacterianas empleadas en este proyecto.

A la Q.F.B Rosario Vázquez Larios del Instituto Nacional de Cardiología por la donación de las cepas intrahospitalarias empleadas en este trabajo.

Agradecimiento a la QFB Diana Arellano Vilchis por su contribución al aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos del microorganismo IQ-051 utilizados en este proyecto.

Al Dr. Jesús Israel Morales Jiménez del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICyT) por la identificación a nivel molecular tanto de las cepas bacterianas como de los ascomicetos utilizados en este trabajo.

A mi tutor de tesis Dr. José Alberto Rivera Chávez por todas sus enseñanzas, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

A mis padres por todo su apoyo y compañía a lo largo de este arduo camino.

A mi hermano por motivarme a seguir adelante con todos mis sueños, además de ser mi cómplice, amigo y confidente.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 2-5 pues sin ellos mi estancia en el Instituto no hubiera sido la misma, gracias por todas sus enseñanzas.

A mis muy queridos amigos de la carrera Diana y Gerardo por tantas risas y anécdotas las cuales siempre serán parte de mi memoria.

A mis amigos del equipo representativo de Ultimate Frisbee de la UNAM por el aprendizaje sobre la disciplina y constancia.

# Índice

Agradecimientos .....	I
Lista de Figuras .....	IV
Lista de Tablas .....	VI
Lista de abreviaturas y símbolos.....	VII
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	2
<b>2.1. Resistencia antimicrobiana .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Resistencia a los antibióticos.....</b>	<b>2</b>
<b>2.3. Infecciones asociadas a la atención de la salud. ....</b>	<b>3</b>
<b>2.4. Importancia de las nuevas opciones terapéuticas.....</b>	<b>4</b>
<b>2.5. Papel de los productos naturales (PN) como fuente de compuestos terapéuticos.....</b>	<b>10</b>
<b>2.6. Relevancia de los hongos microscópicos en la producción de antibióticos.</b>	<b>11</b>
<b>2.7. Generalidades del género <i>Epicoccum</i>. ....</b>	<b>12</b>
<b>2.8. Generalidades del género <i>Westerdykella</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.9. Generalidades del género <i>Aspergillus</i>.....</b>	<b>14</b>
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	17
<b>4.1. Objetivo general.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Objetivos particulares .....</b>	<b>17</b>
5. Desarrollo Experimental.....	18
<b>5.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del control positivo (gentamicina). ....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. Obtención de microorganismos fúngicos y de los extractos orgánicos.....</b>	<b>19</b>
<b>5.3. Actividad antimicrobiana. ....</b>	<b>20</b>
<b>5.4. Estudio Químico de los hongos IQ-013, IQ-050 e IQ-051. ....</b>	<b>21</b>
<b>5.4.1. Cultivos en mediana escala. ....</b>	<b>21</b>
<b>5.4.2. Obtención del extracto orgánico.....</b>	<b>21</b>
<b>5.4.3. Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos de IQ-013, IQ-050 e IQ-051. ....</b>	<b>22</b>
<b>5.4.4. Aislamiento y purificación de los compuestos obtenidos a partir de los extractos primarios de los hongos IQ-013, IQ-050 e IQ-051.....</b>	<b>22</b>
<b>5.4.5. Caracterización de los productos obtenidos.....</b>	<b>26</b>
<b>5.4.6. Identificación taxonómica de los microorganismos seleccionados.....</b>	<b>27</b>

6.	Resultados y Discusión.....	28
6.1.	Resultados de la determinación de MIC para la gentamicina frente a las cepas bacterianas de estudio.....	28
6.2.	Determinación de la actividad antibacteriana de 160 extractos, evaluados frente a los microorganismos de estudio (cepas ATCC y cepas hospitalarias). ...	31
6.3.	Identificación taxonómica de los microorganismos seleccionados; IQ-013, IQ-050 e IQ-051. ....	34
6.4.	Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	36
6.4.1.	Resultados del ensayo inhibitorio de las fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento de <i>Epicoccum nigrum</i> (IQ-013). ....	36
6.4.2.	Resultados del ensayo inhibitorio de las fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento de IQ-050. ....	36
6.5.	Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas de IQ-050.....	37
6.6.	Elucidación estructural de productos puros. ....	38
6.6.1.	Compuestos obtenidos de las fracciones del hongo IQ-050.....	38
6.6.2.	Compuestos obtenidos de las fracciones del hongo IQ-051.....	46
7.	Conclusiones .....	63
8.	Perspectivas .....	64
9.	Referencias .....	65

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Muertes diarias atribuibles a la Resistencia Antimicrobiana para el año 2050. Modificado de <sup>2</sup> .....	2
<b>Figura 2.</b> Microorganismos aislados en Brotes de IAAS, México 2015 por cada 100 egresos. Modificado de <sup>14</sup> .....	4
<b>Figura 3.</b> Número de nuevos antibióticos aprobados por intervalos de tiempo. El número de nuevos antibióticos desarrollados y aprobados ha decrecido considerablemente en las pasadas tres décadas dejando pocas opciones para el tratamiento contra la resistencia bacteriana. Modificado de <sup>23, 24</sup> .....	5
<b>Figura 4.</b> Fármacos antibacterianos obtenidos de distintas fuentes. Modificado de <sup>24</sup> .....	6
<b>Figura 5.</b> Ejemplos de productos naturales de origen fúngico con distintos fines terapéuticos. <sup>25,33</sup> .....	11
<b>Figura 6.</b> Ejemplos de antibióticos obtenidos de microorganismos fúngicos. Tanto la cefalotina como la tiamulina son representantes de dos grandes grupos de antibióticos como lo son las cefalosporinas y las pleuromutilinas, respectivamente. ....	12
<b>Figura 7.</b> Ejemplos de metabolitos aislados a partir de <i>E. nigrum</i> . ....	13
<b>Figura 8.</b> Ejemplos de metabolitos aislados a partir del género <i>Westerdykella</i> . ....	14
<b>Figura 9.</b> Ejemplos de metabolitos aislados a partir de <i>A. niger</i> . ....	15
<b>Figura 10.</b> Distribución de extractos orgánicos IQ-001-IQ-080 en placas de 96 pozos. Biblioteca de extractos orgánicos FELIQ. ....	20
<b>Figura 11.</b> Cromatograma preparativo de la fracción 01002-081-4. ....	23
<b>Figura 12.</b> Cromatograma preparativo de la fracción 01001-105-3. ....	25
<b>Figura 13.</b> Cromatograma preparativo de la fracción 01001-105-8. ....	26
<b>Figura 14.</b> Cromatograma del método analítico de la fracción 01001-105-12. ....	26
<b>Figura 15.</b> Gráficas y valores obtenidos de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de Gentamicina para las cepas de trabajo; microorganismos ATCC y cepas hospitalarias. ....	31
<b>Figura 16.</b> Análisis jerárquico del potencial antibacteriano de 160 extractos frente a 12 cepas bacterianas. Los resultados se reportan en función del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. ....	33
<b>Figura 17.</b> Árbol filogenético del microorganismo IQ-013. ....	34
<b>Figura 18.</b> Árbol filogenético del microorganismo IQ-050. ....	35
<b>Figura 19.</b> Árbol filogenético del microorganismo IQ-051. ....	35
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de inhibición de las distintas bacterias al ser expuestas a las fracciones obtenidas del extracto IQ-013 a una concentración de 200 µg/mL y utilizando gentamicina como control. ....	36
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de inhibición de las distintas bacterias al ser expuestas a las fracciones obtenidas del extracto IQ-050 a una concentración de 200 µg/mL y utilizando gentamicina como control. ....	37
<b>Figura 22.</b> Espectro de absorción de las fracciones del extracto IQ-050: rojo F2, Azul F3, Verde F4 y negro F5. ....	37
<b>Figura 23.</b> Espectro de masas por DART de la aurantacina A (1). ....	39
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> OS) de la aurantacina A (1). ....	40

<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> OS) de la aurantacina A (1).	40
<b>Figura 26.</b> Espectro bidimensional HSQC de la aurantacina A (1).	41
<b>Figura 27.</b> Espectro bidimensional HMBC de la aurantacina A (1).	41
<b>Figura 28.</b> Espectro de masas por DART de la pilobolusona C (2).	42
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la pilobolusona C (2).	44
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la pilobolusona C (2).	44
<b>Figura 31.</b> Espectro bidimensional HSQC de la pilobolusona C (2).	45
<b>Figura 32.</b> Espectro bidimensional HMBC de la pilobolusona C (2).	45
<b>Figura 33.</b> Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) la rubrofusarina B (3).	47
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la rubrofusarina B (3).	48
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la rubrofusarina B (3).	48
<b>Figura 36.</b> Espectro bidimensional HSQC de la rubrofusarina B (3).	49
<b>Figura 37.</b> Espectro bidimensional HMBC de la rubrofusarina B (3).	49
<b>Figura 38.</b> Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) para la aurasperona A (4).	50
<b>Figura 39.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la aurasperona A (4).	52
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la aurasperona A (4).	52
<b>Figura 41.</b> Espectro bidimensional HSQC de la aurasperona A (4).	53
<b>Figura 42.</b> Espectro bidimensional HMBC de la aurasperona A (4).	53
<b>Figura 43.</b> Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) para la fonsecinona A (5).	54
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la fonsecinona A (5).	56
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la fonsecinona A (5).	56
<b>Figura 46.</b> Espectro bidimensional HSQC de la fonsecinona A (5).	57
<b>Figura 47.</b> Espectro bidimensional HMBC de la fonsecinona A (5).	57
<b>Figura 48.</b> Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) para la asperpirona B (6).	58
<b>Figura 49.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la asperpirona B (6).	60
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la asperpirona B (6).	60
<b>Figura 51.</b> Espectro bidimensional HSQC de la asperpirona B (6).	61
<b>Figura 52.</b> Espectro bidimensional HMBC de la asperpirona B (6).	61



## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos. Modificado de <sup>9</sup> .....	3
<b>Tabla 2.</b> Código usado en el análisis presentado en la <b>Tabla 3</b> y <b>Figura 4</b> . Modificado de <sup>24</sup> .....	5
<b>Tabla 3.</b> Fármacos antibacterianos aprobados en el periodo comprendido entre 1981 y 2019. Modificado de <sup>24</sup> .....	7
<b>Tabla 4.</b> Antibióticos con su respectivo hongo productor y mecanismo de acción, así como uso terapéutico. ....	12
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de la cromatografía tipo Flash utilizadas en el fraccionamiento primario del extracto 01002-080-1 (IQ-013).....	22
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento obtenido del fraccionamiento primario del extracto 01002-080-1 (IQ-013).....	22
<b>Tabla 7.</b> Agrupamiento de fracciones secundarias obtenidas del fraccionamiento de 01002-081-4.....	23
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de la cromatografía tipo Flash con la cual fue realizado el fraccionamiento secundario de la fracción 01002-081-5. ....	24
<b>Tabla 9.</b> Agrupamiento de fracciones secundarias obtenidas del fraccionamiento de 01002-081-5. ....	24
<b>Tabla 10.</b> Condiciones de la cromatografía tipo Flash con la cual fue realizado el fraccionamiento secundario del extracto del hongo IQ-050. ....	24
<b>Tabla 11.</b> Valores de MIC calculados para cada una de las cepas utilizadas en el estudio. ....	29
<b>Tabla 12.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C la aurantacina A (1).....	39
<b>Tabla 13.</b> Datos espectroscópicos de RMN-1H (700 MHz) y RMN-13C (175 MHz) de la pilobolusona C (2) en CDCl <sub>3</sub> .....	43
<b>Tabla 14.</b> Datos espectroscópicos de RMN-1H y RMN- <sup>13</sup> C de la rubrofusarina B (3) en CDCl <sub>3</sub> .....	47
<b>Tabla 15.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C de la aurasperona A (4).....	51
<b>Tabla 16.</b> Datos espectroscópicos de RMN-1H y RMN- <sup>13</sup> C de la fonsecinona A (5).....	55
<b>Tabla 17.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C de la asperpirona B (6) en CDCl <sub>3</sub> . ....	59

## Lista de abreviaturas y símbolos

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
$\Delta$ DO	Diferencia de densidad óptica	RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protón.
DO	Densidad Óptica	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
ESBL	Betalactamasas de espectro extendido	C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> OS	Dimetilsulfóxido deuterado
FELIQ	Librería de extractos orgánicos de origen fúngico IQ	CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
g	gramo	$\mu$ L	Microlitros
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	MHz	Mega Hertz
I+D	Investigación y desarrollo	RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud	mL	Mililitro
IDSA	Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América	DMSO	Dimetil sulfóxido
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria	MeOH	Metanol
mm	Milímetros	Mg	Miligramo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina	Min	Minutos
nm	Nanómetros	RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
OMS	Organización Mundial de la Salud	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
PDA	Agar papa dextrosa	t <sub>=16</sub>	Tiempo 16 h
PDB	Caldo papa dextrosa	t <sub>0</sub>	Tiempo cero
PN	Productos Naturales	MH	Miüller-Hinton

# 1. Introducción

La resistencia a los antimicrobianos se define como la capacidad que tienen los microorganismos para impedir que los antibióticos actúen sobre ellos, en consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, ocasionando que se transmitan. Actualmente, la resistencia bacteriana es un grave problema de salud pública ya que ésta pone en riesgo la efectividad de los tratamientos actuales con antibióticos de primera elección y por lo tanto la vida de las personas.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), si no se toman acciones en todos los países, para 2050 las muertes relacionada con la resistencia antimicrobiana podrían superar las defunciones por cáncer.

Hoy en día, más de 1.7 millones de personas alrededor del mundo sufren complicaciones por infecciones intrahospitalarias, también denominadas infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), y representan un importante problema de salud pública, debido a que generan altas tasas de morbilidad y mortalidad. En México, en el 2015 los principales microorganismos aislados en brotes de IAAS fueron *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, concentrando el 43.5% de los casos notificados en el informe anual de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE).

En un reporte emitido por la OMS publicado en el 2017, se manifestó que existe una grave falta de nuevos antibióticos en fase de desarrollo para combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos. Este informe muestra que la mayoría de los fármacos que se están desarrollando son modificaciones de antibióticos ya existentes que ofrecen únicamente soluciones a corto plazo, por lo que se están buscando alternativas para poder tratar de una manera más óptima a este tipo de bacterias resistentes. En este sentido, los productos naturales derivados de microorganismos, especialmente de hongos microscópicos, son una fuente promisoría para la búsqueda de prototipos estructurales, ya que debido a sus procesos metabólicos y de competencia con otros microorganismos, producen metabolitos secundarios con potencial antibacteriano, por ello, el presente trabajo tiene como objetivo general contribuir al descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos a partir de cepas selectas de microorganismos fúngicos.

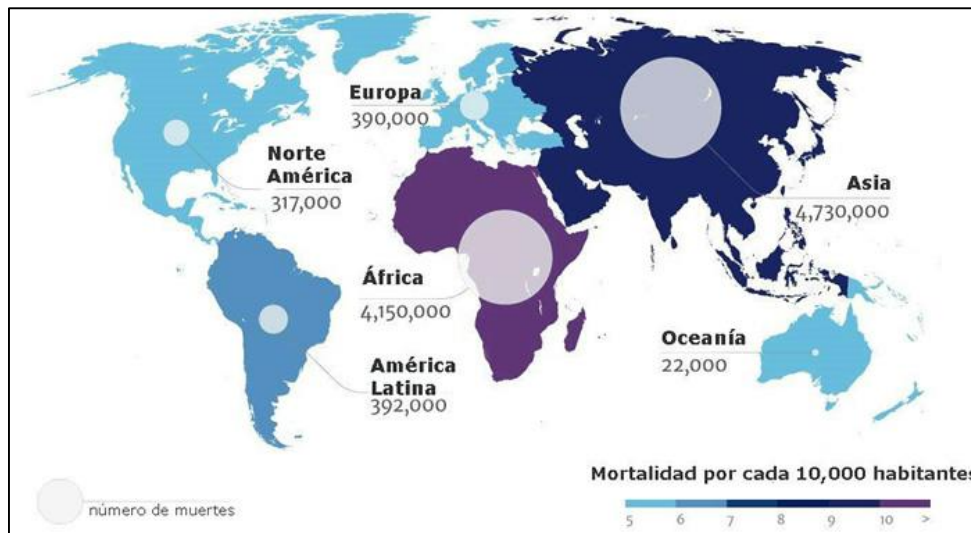
En este trabajo se discuten los resultados obtenidos a lo largo de un proyecto de investigación enfocado en el descubrimiento de nuevos antibióticos a partir de hongos microscópicos. En resumen, se presenta el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de gentamicina (control positivo) para cada una de las cepas utilizadas, la evaluación de la actividad antibacteriana de 160 extractos fúngicos, el cultivo de los hongos seleccionados para la obtención de compuestos antibacterianos, los resultados del estudio químico realizado en las cepas estudiadas y finalmente, el aislamiento y caracterización de algunos de los metabolitos secundarios aislados a partir de los extractos bioactivos seleccionados.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos se define como la capacidad que tienen los microorganismos para impedir que los antibióticos actúen sobre ellos, en consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, ocasionando que se transmitan con el riesgo de provocar epidemias o incluso pandemias.<sup>1</sup> Actualmente, la resistencia antimicrobiana es un grave problema de salud pública, ya que ésta pone en riesgo la efectividad de los tratamientos actuales con antibióticos de primera elección y por lo tanto la vida de las personas.

En el año 2016 la Asamblea General de las Naciones Unidas estimó que en el mundo hay alrededor de 700,000 muertes al año debido a la resistencia a antimicrobianos, y que la cifra ascenderá a 10 millones de muertes en los próximos 35 años. Por lo que si no se toman acciones globales, para 2050 las muertes relacionadas con la resistencia antimicrobiana podrían superar las defunciones por cáncer (**Figura 1**).<sup>1,2,3</sup>



**Figura 1.** Muertes diarias atribuibles a la Resistencia Antimicrobiana para el año 2050. Modificado de<sup>2</sup>.

### 2.2. Resistencia a los antibióticos.

Los antibióticos son medicamentos usados para tratar y prevenir las infecciones bacterianas, la introducción de éstos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, las actividades antropogénicas y el uso inadecuado e indiscriminado de estas sustancias a lo largo del tiempo, han contribuido a la emergencia del fenómeno de resistencia a múltiples tipos o clases de antibióticos, mismo que representa una gran amenaza para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo económico.<sup>4,5</sup> La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos; y se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie. Esto trae como consecuencia el incremento de los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y el aumento en la mortalidad.<sup>6, 7,8</sup>

Por ello, en 2017 la OMS publicó el listado de patógenos prioritarios para guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos (**Tabla 1**). En esta lista se

evidencia a las bacterias que tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes, además de representar un riesgo más alto para los pacientes, por la falta de tratamientos efectivos para combatirlos.<sup>9</sup>

**Tabla 1.** Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos. Modificado de <sup>9</sup>.

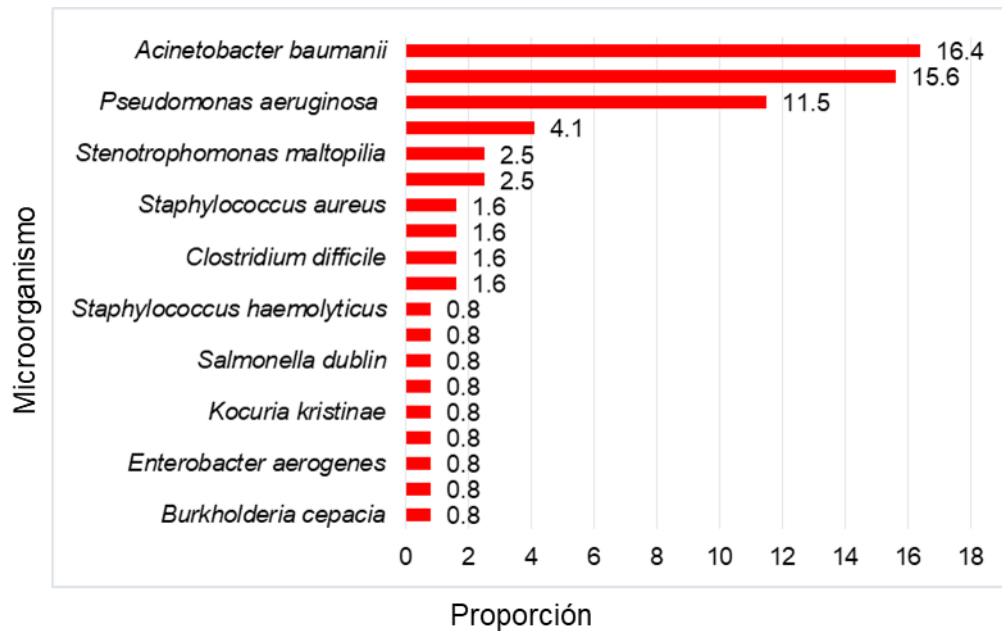
Prioridad 1. Crítica	Prioridad 2. Elevada	Prioridad 3. Media
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos.</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a los carbapenémicos</li> <li>• Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de Betalactamasas de espectro extendido (ESBL).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina.</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina.</li> <li>• <i>Helicobacter pylori</i>, resistente a la claritromicina.</li> <li>• <i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas.</li> <li>• <i>Salmonellae</i>, resistentes a las fluoroquinolonas.</li> <li>• <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina y resistente a las fluoroquinolonas.</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>, sin sensibilidad a la penicilina.</li> <li>2. <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina.</li> <li>3. <i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas.</li> </ol>

### 2.3. Infecciones asociadas a la atención de la salud.

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), antes denominadas infecciones nosocomiales u hospitalarias, son un importante problema de salud pública, debido a que generan altas tasas de morbilidad y mortalidad, además de un importante aumento en los costos de atención, sobre todo cuando el agente etiológico es una bacteria resistente a los antibióticos.<sup>10</sup> Por definición, las IAAS son infecciones contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital o centro sanitario y que dicho paciente no tenía ni estaba incubando en el momento de su ingreso y pueden afectar a los trabajadores de la salud e incluso a los visitantes.<sup>11, 12</sup>

Actualmente, más de 1.7 millones de personas alrededor del mundo sufren complicaciones por infecciones contraídas en un hospital. Para México la tasa global de IAAS por cada 100 egresos, reportada en 2015, fue de 4.7.<sup>13, 14</sup> Entre las especies patógenas causantes de IAAS a nivel mundial destacan las bacterias del grupo **ESKAPE** (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), acrónimo formulado en 2009 por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América para enfatizar el grupo de patógenos que con mayor frecuencia causan infecciones hospitalarias y que "escapan" de manera efectiva a los efectos de los medicamentos antibacterianos de primera elección.<sup>15, 16, 17</sup>

Si bien esta clasificación sirve de referencia a nivel mundial, no se puede generalizar; por tal motivo, es importante conocer la biota de cada país, por ejemplo, Estados Unidos es una de las naciones en donde existe un mayor número de estudios de prevalencia sobre los agentes etiológicos en las IAAS. De estos, el microorganismo más frecuentemente aislado es *Staphylococcus aureus*.<sup>18</sup> Sin embargo, en México en el 2015 los principales microorganismos aislados en brotes de IAAS fueron *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 2**) que concentran el 43.5% de los casos notificados en el informe anual de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE).<sup>14</sup>



**Figura 2.** Microorganismos aislados en Brotes de IAAS, México 2015 por cada 100 egresos. Modificado de <sup>14</sup>.

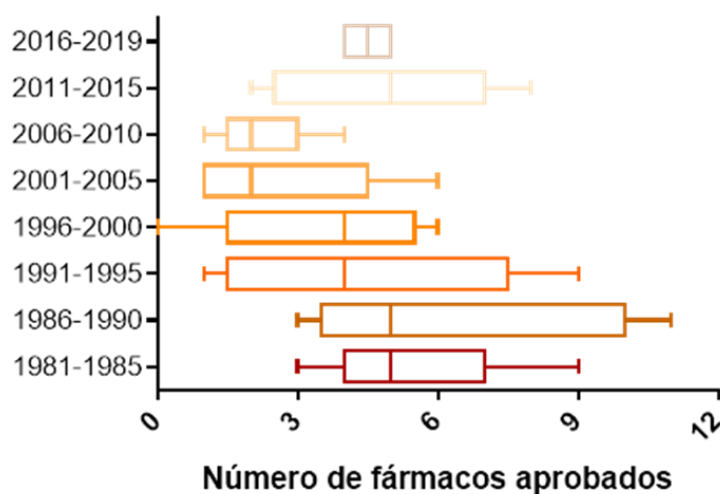
#### 2.4. Importancia de las nuevas opciones terapéuticas.

En las décadas pasadas la emergencia y propagación de la resistencia antibacteriana ha mostrado un aumento dramático, ya que alrededor del mundo la cantidad de bacterias patógenas que afectan a los seres humanos y que son resistentes a uno o más antibióticos ha crecido considerablemente.<sup>19</sup> Debido a esto, se estima que durante el siglo XXI se podría llegar a una “era post-antibióticos” en la cual muchas de las infecciones bacterianas podrían ser intratables, ya que en su mayoría el arsenal de fármacos antibióticos en el mercado y las estrategias de prevención son inadecuadas para el tratamiento de cepas multirresistentes. Por ello, la búsqueda de tácticas alternativas en contra del desarrollo de la resistencia antibacteriana es un reto global para la comunidad científica y los sistemas de salud pública.<sup>20, 21</sup>

Actualmente, la utilidad de los antibióticos convencionales para el tratamiento de las infecciones bacterianas ha disminuido, debido al incremento de las cepas resistentes y a la reducida velocidad de desarrollo de nuevos agentes para tratarlas. De acuerdo con la OMS, existe una grave falta de nuevos antibióticos en fase de desarrollo para combatir la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos. El informe publicado en 2017 por esta institución muestra que la mayoría de los fármacos que están en fase de desarrollo son modificaciones de clases de antibióticos ya existentes que únicamente ofrecen soluciones

a corto plazo. En este sentido la búsqueda de alternativas farmacológicas para poder tratar de una manera más óptima las infecciones causadas por bacterias resistentes es una actividad primordial.<sup>22</sup>

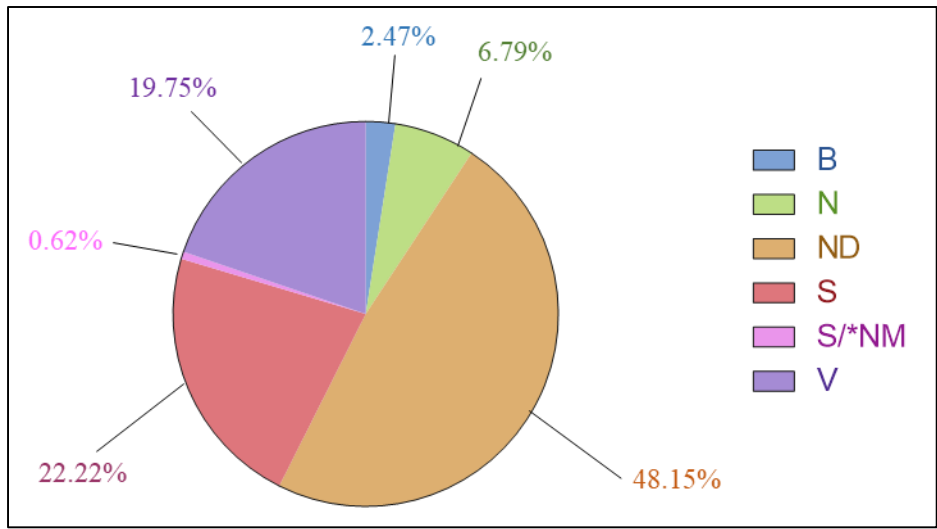
En los últimos 40 años, el desarrollo de nuevos antibióticos por la industria farmacéutica ha disminuido considerablemente, debido a diversos obstáculos económicos y regulatorios (**Figura 3, Figura 4, Tabla 2 y Tabla 3**). Si bien, esta actividad representaba una estrategia efectiva para la industria en el pasado, en la actualidad no es considerada como una investigación económicamente sabia, principalmente porque los antibióticos se usan por tiempos relativamente cortos y la inversión en etapas de investigación y desarrollo no son económicamente atractivas, en comparación con fármacos empleados en el tratamiento de condiciones o enfermedades crónicas como la diabetes, los desórdenes psiquiátricos, el asma o reflujo gastrointestinal.<sup>23</sup>



**Figura 3.** Número de nuevos antibióticos aprobados por intervalos de tiempo. El número de nuevos antibióticos desarrollados y aprobados ha decrecido considerablemente en las pasadas tres décadas dejando pocas opciones para el tratamiento contra la resistencia bacteriana. Modificado de <sup>23,24</sup>.

**Tabla 2.** Código usado en el análisis presentado en la **Tabla 3** y **Figura 4**. Modificado de <sup>24</sup>.

Código	Breve definición/año
<b>B</b>	Macromolécula biológica, 1997
<b>N</b>	Producto natural inalterado, 1997
<b>NB</b>	Droga botánica (mezcla definida), 2012
<b>ND</b>	Derivado de producto natural, 1997
<b>S</b>	Fármaco sintético, 1997
<b>S*</b>	Fármaco sintético (NP farmacóforo), 1997
<b>V</b>	Vacuna, 2003
<b>/NM</b>	Imitación de producto natural, 2003



**Figura 4.** Fármacos antibacterianos obtenidos de distintas fuentes. Modificado de <sup>24</sup>.



**Tabla 3.** Fármacos antibacterianos aprobados en el periodo comprendido entre 1981 y 2019. Modificado de <sup>24</sup>.

Nº	Nombre genérico	Nombre comercial	Año	Fuente	Nº	Nombre genérico	Nombre comercial	Año	Fuente
1	Sulfato de netilmicina	Netromicina	1981	N	31	Aspoxicilina	Doyle	1987	ND
2	Cefoperazona sódica	Cefobis	1981	ND	32	Cefixima	Cefspan	1987	ND
3	cefotiam	Pansporina	1981	ND	33	Cefminox sódica	Meicelina	1987	ND
4	Cefsoludin	Takesulina	1981	ND	34	Cefpimizol	Ajicef	1987	ND
5	ACWY meningococo PS vacuna	Mencevax	1981	V	35	Pivoxil de cefteram	Tomiron	1987	ND
6	Sulfato de micronomicina	Sagamicina	1982	N	36	Axetil cefuroxima	Zinnat	1987	ND
7	Apalcilina sódica	Lumota	1982	ND	37	Cefuzonam sódico	Cosmosin	1987	ND
8	Ceftizoxima sódica	Epocelina	1982	ND	38	lenampicilina HCl	Varacilina	1987	ND
9	Ceftriaxona sódica	Rocephin	1982	ND	39	Rifaximina	Normix	1987	ND
10	Sal disódica de moxalactama	Shiomarin	1982	ND	40	Roxitromicina	Rulid	1987	ND
11	Cefmenoxima HCl	Tacef	1983	ND	41	Tosilato de sultamicilina	Unasyn	1987	ND
12	Ceftazidima	Fortam	1983	ND	42	Carumonam	Amasulin	1988	N
13	Norfloxacin	Noroxin	1983	S	43	Fosfomicina trometamol	Monuril	1988	N
14	Aztreonam	Azactam	1984	ND	44	Isepamicina	Isepacin	1988	N
15	Cefonicida sódica	Monocid	1984	ND	45	Teicoplanina	Targocid	1988	N
16	Ceforanida	Precef	1984	ND	46	Azitromicina	Sunamed	1988	ND
17	Cefotetan sal discida	Yamatetan	1984	ND	47	Acistrato de eritromicina	Erasis	1988	ND
18	Temocilina sal disdica	Temopen	1984	ND	48	Flomoxef sódico	Flumarin	1988	ND
19	Miocamicina	Miocamicina	1985	N	49	Rifapentina	Rifampin	1988	ND
20	Mupirocina	Bactroban	1985	N	50	Taurolidina	Taurolin	1988	S
21	Sulfato de astromicina	Fortimicina	1985	ND	51	RV-11	Zalig	1989	N
22	Cefbuperazona sódica	Tomiporan	1985	ND	52	cefpodoxima proxetil	Banan	1989	ND
23	Cefpiramida sódica	Sepatren	1985	ND	53	Lomefloxacino	Uniquin	1989	S
24	Imipenem/cilastatina	Zienam	1985	ND	54	h influenzae b vacuna.	Hibtitek	1989	V
25	Rifaximina	Rifacol	1985	ND	55	h influenzae b vacuna.	Prohibit	1989	V
26	Ofloxacin	Tarivid	1985	S	56	Arbekacina	Habekacina	1990	ND
27	Mesilato de pefloxacin	Perflacina	1985	S	57	Cefodizima sódica	Neucef	1990	ND
28	Rokitamicina	Ricamicina	1986	ND	58	Claritromicina	Klaricid	1990	ND
29	Ciprofloxacino	Ciprobay	1986	S	59	Tosufloxacina	Ozex	1990	S
30	Enoxacina	Flumark	1986	S	60	Cefdinir	Cefzon	1991	ND

**Tabla 3.** Fármacos antibacterianos aprobados en el periodo comprendido entre 1981 y 2019. (Continuación).

Nº	Nombre genérico	Nombre comercial	Año	Fuente	Nº	Nombre genérico	Nombre comercial	Año	Fuente
61	Temafloxacin HCl	Temac	1991	S	91	Gatifloxacin	Tequin	1999	S
62	Cefetamet pivoxil HCl	Globocef	1992	ND	92	Moxifloxacin HCl	Avelox	1999	S
63	Cefpiroma sulfato	Cefrom	1992	ND	93	Vacuna meningocócica	Menigetek	1999	V
64	Cefprozil	Cefzil	1992	ND	94	Linezolid	Zyvox	2000	S
65	Ceftibuteno	Seftem	1992	ND	95	Vacuna meningocócica	NeisVac-C	2000	V
66	Loracarbef	Lorabid	1992	ND	96	Vacuna meningocócica	Menjugate	2000	V
67	Rifabutin	Micobutin	1992	ND	97	Vacuna antineumocócica	Prevnar	2000	V
68	Tazobactam sal de sodio	Tazocilina	1992	ND	98	Vacuna hexavalente	Hexavac	2000	V
69	Fleroxacin	Quinodis	1992	S	99	Vacuna hexavalente	Infanrix HeXa	2000	V
70	Rufloxacin HCl	Qari	1992	S	100	Telitromicina	Ketek	2001	ND
71	Cefepim	Maxipim	1993	ND	101	Biapenem	Omegacin	2002	ND
72	Diritromicina	Nortron	1993	ND	102	Ertapenem sódico	Invanz	2002	ND
73	Levofloxacin	Floxacin	1993	S	103	Balafloxacin	Q-Roxin	2002	S
74	Nadifloxacin	Acuatim	1993	S	104	Pazufloxacin	Pasil	2002	S
75	Esparfloxacin	Spara	1993	S	105	Prulifloxacin	Sword	2002	S
76	Brodimoprim	Hyprim	1993	S*/MN	106	Vacunas dpt	Daptacel	2002	V
77	Cefditoren pivoxil	Meiact	1994	ND	107	Daptomicina	Cubicin	2003	N
78	Meropenem	Merrem	1994	ND	108	Mesilato de gemifloxacin	Factive	2003	S
79	Panipenem/betamiprom	Carbenin	1994	ND	109	Meningitis b	MeNZB	2004	V
80	Vacuna oral contra cólera	Orochol	1994	V	110	Doripenem	Finibax	2005	ND
81	cefopran HCl	Firstcin	1995	ND	111	Tigeciclina	Tygacil	2005	ND
82	cefapene pivoxil	Flomox	1997	ND	112	MCV-4	Menactra	2005	V
83	Etilsuccinato de fluritromicina	Ritro	1997	ND	113	DTPw-HepB-Hib	Quinvaxem	2006	V
84	Fropenam	Farom	1997	ND	114	Vacuna DTaP	Tribik	2006	V
85	Grepafloxacin	Vaxor	1997	S	115	Retapamulina	Altabax	2007	ND
86	Cefoselis	Wincef	1998	ND	116	Garenoxacin	Geninax	2007	S
87	Mesilato de trovafloxacin	Trovan	1998	S	117	ceftobiprol medocarilo	Zefera	2008	ND
88	Vacuna de polisacárido tifoideo	Typherix	1998	V	118	telavancina HCl	Vibativ	2009	ND
89	Dalfopristina	Synercid	1999	ND	119	Besifloxacin	Besivance	2009	S
90	Quinupristina	Synercid	1999	ND	120	Vacuna DTaP	Prevenar 13	2009	V

**Tabla 3** Fármacos antibacterianos aprobados en el periodo comprendido entre 1981 y 2019. (Continuación).

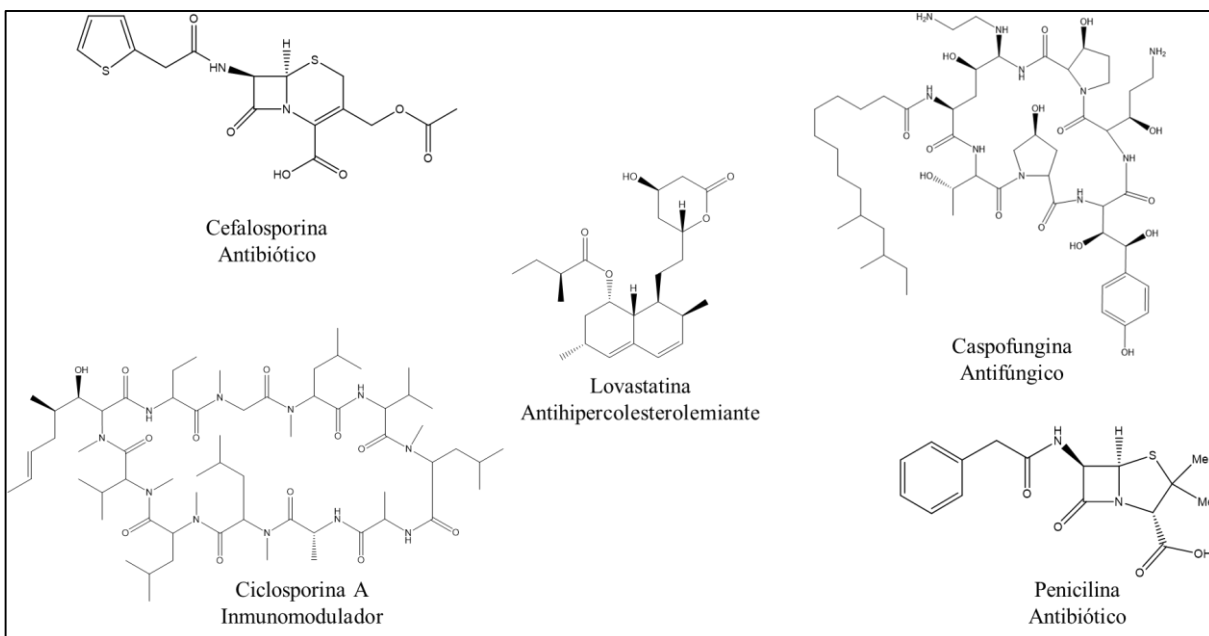
Nº	Nombre genérico	Nombre comercial	Año	Fuente	Nº	Nombre genérico	Nombre comercial	Año	Fuente
121	Vacuna DTaP	Synflorix	2009	V	142	DPT-IPV	Squarekids	2014	V
122	menACWY-CRM	Menveo	2010	V	143	Antrasil	Anthrasil	2015	B
123	PsA-TT	MenAfriVac	2010	V	144	Astrodimer	Vivagel	2015	S
124	Fidaxomicina	Dificid	2011	N	145	Nemonoxacina	Taigexyn	2015	S
125	ceftarolina fosamil acetato	Teflaro	2011	ND	146	Ozenoxacino	Zebiax	2015	S
126	Raxibacumab	ABthrax	2012	B	147	Zabofloxacino HCl	Zabolante	2015	S
127	Bedaquilina	Sirturo	2012	S	148	Bezlotoxumab	Zinplava	2016	B
128	hib-mency-tt	Menhibrix	2012	V	149	Obiltoximab	Anthim	2016	B
129	BK-4SP	Tetrabik	2012	V	150	CVD 103-HgR	Vaxchora	2016	V
130	BK-4SP	Quattrovac	2012	V	151	DTP-HepB-Polio-Hib	Vaxelis	2016	V
131	MenACWY-TT	Nimenrix	2012	V	152	Meropenem/vaborbactam	Vabomere	2017	ND
132	MenACWY-TT	Typbar	2013	V	153	Delafloxacin meglumina	Baxdela	2017	S
133	MenACWY-TT	Bexsero	2013	V	154	Plazomicina	Zemdri	2018	ND
134	Antitoxina botulínica.	Bat	2013	V	155	Omadaciclina	Nuzyra	2018	ND
135	Dalbavancina	Dalvance	2014	ND	156	Eravaciclina	Xerava	2018	ND
136	Oritavancina	Orbactiv	2014	ND	157	Sareciclina	Seysara	2018	ND
137	Cetolozano/tazobactam	Zerbaxa	2014	ND	158	GC-1107	G.C.TD vacc.	2018	V
138	Tedizolid fosfato de sodio	Sivextro	2014	S	159	Lefamulina	Xenlita	2019	ND
139	Nemonoxacina	Taigexyn	2014	S	160	Imicilast-relebactam	Recarbrio	2019	ND
140	Finafloxacina HCl	Xtoro	2014	S	161	lasculfloxacin	Lasvic	2019	S
141	MnB rLP2086	Trumenba	2014	V	162	Pretomanid		2019	S

## 2.5. Papel de los productos naturales (PN) como fuente de compuestos terapéuticos.

Por milenios, los humanos han girado en torno al mundo natural para conseguir medicinas y tratar un amplio número de enfermedades, incluyendo desordenes gástricos, dolor e incluso síndromes psiquiátricos. El conocimiento generado fue pasando de generación en generación entre la comunidad, como resultado de las anécdotas, la experiencia acumulada o las costumbres, muchas de estas medicinas son mezclas hidroalcohólicas de plantas.<sup>25</sup> En especial durante el siglo pasado, los productos naturales (PN) fueron la mayor fuente de diversidad química y contribuyeron significativamente al descubrimiento de un sinnúmero de fármacos. Se les denomina PN a los metabolitos secundarios (moléculas de señalización que permiten no solo que el organismo sobreviva, sino que prospere) biológicamente activos derivados de fuentes naturales, como plantas, animales y microorganismos.<sup>26,27</sup>

Los PN como prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos presentan numerosas ventajas sobre los productos sintéticos, lo que los hace una herramienta insustituible en la búsqueda de nuevos candidatos. Dentro de estas ventajas destaca su elevada diversidad y complejidad química, misma que se traduce en un extenso abanico de actividades biológicas. De cerca de un millón de productos naturales estudiados hasta 2015, aproximadamente el 25% son biológicamente activos, de estos, el 60% proviene de plantas y el resto de microorganismos. En el mundo microscópico, los hongos son la principal fuente de compuestos bioactivos, representando el 42% del total.<sup>28</sup>

Los hongos microscópicos son organismos abundantes y ampliamente distribuidos en la naturaleza,<sup>29</sup> son responsables de ciclos naturales de recambio de nutrientes y juegan un papel muy importante en numerosos procesos metabólicos. Estos microorganismos son utilizados en la elaboración de múltiples productos y síntesis de una gran variedad de moléculas con propiedades químico-biológicas interesantes y con alto valor agregado, como los antibióticos, antifúngicos, inmunomoduladores, antiolesterolémicos y antitumorales, entre otros<sup>30,31</sup> (**Figura 5**). Los PN de origen fúngicos han proporcionado una vista revolucionaria sobre agentes farmacéuticos en contra de varias enfermedades y han inspirado la síntesis química de fármacos innovadores. De las aproximadamente 1.5 millones de especies fúngicas estimadas, al día solo han sido descritas cerca de 120,000 y de éstas, solo una pequeña fracción se ha aislado y cultivado en un laboratorio para estudio químico, lo que significa que aún existe un gran cantidad de microorganismos fúngicos por estudiar.<sup>32</sup>

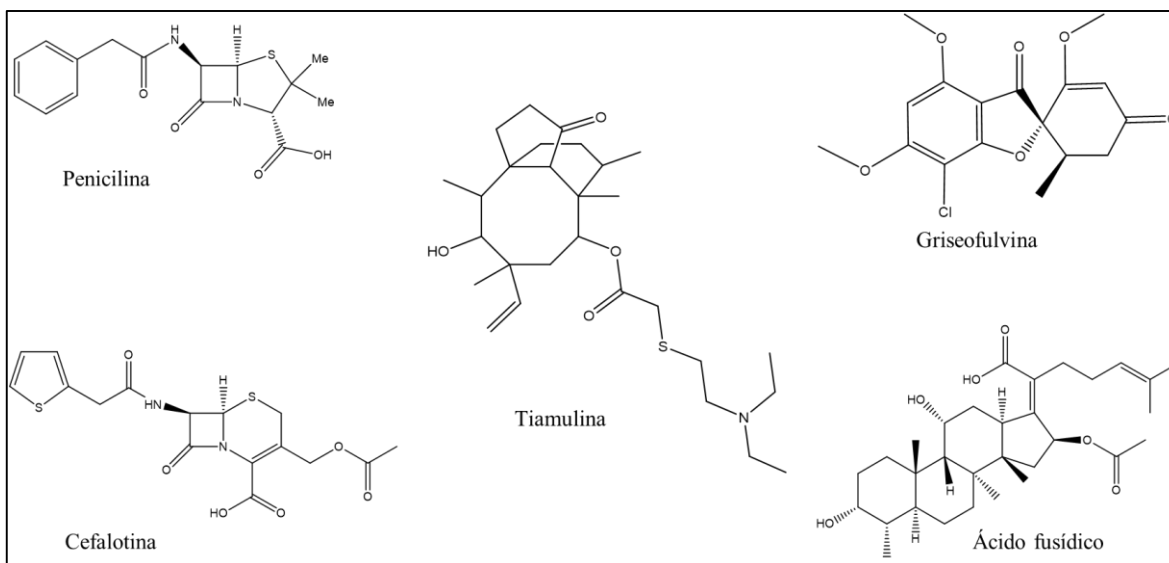


**Figura 5.** Ejemplos de productos naturales de origen fúngico con distintos fines terapéuticos.<sup>25,33</sup>

## 2.6. Relevancia de los hongos microscópicos en la producción de antibióticos.

El uso de los microorganismos productores de antibióticos para prevenir enfermedades ha estado presente por milenios, ejemplo de esto es el uso de los emplastos tradicionales de pan mohoso para tratar heridas abiertas en Serbia, China, Grecia y Egipto, hace más de 2000 años.<sup>34</sup> Sin embargo, el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming marcó el comienzo de la era de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades microbianas, a partir de este hecho, la búsqueda de antibióticos incrementó considerablemente, revolucionando el cuidado de la salud y contribuyendo a los grandes avances médicos del siglo XX.<sup>35</sup> La “era de oro” de los antibióticos se dio de 1930 a 1960, periodo donde se descubrieron las diferentes clases estructurales de antibióticos utilizados en la terapéutica contemporánea. Desde entonces, estas moléculas han jugado un rol muy importante en el desarrollo de la humanidad, aumentando la expectativa de vida y salvando millones de vidas.<sup>36</sup>

Del total de antibióticos conocidos y comercializados en 1955, el 22% se obtuvieron de hongos filamentosos, mientras que para el 2005 esta cifra aumento a 46%. Los antibióticos obtenidos a partir de microorganismos fúngicos varían en su estructura y mecanismo de acción (**Figura 6** y **Tabla 4**).



**Figura 6.** Ejemplos de antibióticos obtenidos de microorganismos fúngicos. Tanto la cefalotina como la tiamulina son representantes de dos grandes grupos de antibióticos como lo son las cefalosporinas y las pleuromutilinas, respectivamente.

**Tabla 4.** Antibióticos con su respectivo hongo productor y mecanismo de acción, así como uso terapéutico.<sup>37</sup>

Antibiótico	Hongo productor	Uso terapéutico	Mecanismo de acción
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Gram (+)	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Cefalosporinas	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Gram (+) y Gram (-)	
Pleuromutilinas	<i>Clitopilus passeckerianus</i>	Gram (+)	Inhibición de la síntesis de proteínas.
Ácido fusídico	<i>Fusidium coccineum</i>	Gram (+)	
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Dermatofitos	Inhibición de la formación de microtúbulos en la replicación.

## 2.7. Generalidades del género *Epicoccum*.

*Epicoccum* es uno de los hongos pioneros en el campo del descubrimiento de metabolitos biológicamente activos, las colonias de *Epicoccum* a menudo son brillantes de color rojo, naranja, café o amarillo y muestran pigmentos típicos que libera el hongo. Es un ascomiceto comúnmente aislado de diferentes fuentes, tiene distribución en todo el mundo y es uno de los invasores más comunes de diferentes plantas. La literatura sugiere porcentajes relativamente altos de producción de nuevas entidades químicas de aislamientos endófitos (51%) comparado con aislamientos de suelo (38%).<sup>38, 39</sup>

Los endófitos son microorganismos que habitan tejidos vivos de plantas superiores sin producir ningún síntoma de enfermedad. La relación mutualista entre los endófitos y su planta hospedera, permite a éstos la producción de diversas clases de metabolitos secundarios como policétidos, terpenos, dicetopiperacinas, sideroforos y carotenoides, entre otros. La mayoría de estos compuestos ejercen una actividad biológica promisoriosa como antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos. (Tabla 5)<sup>40, 41</sup>.

La especie más aislada por muchos científicos es *E. nigrum*, la cual se ha obtenido de diferentes hospederos como plantas, animales y organismos marinos. Esta especie es primariamente conectada con la descomposición de los tejidos vegetales y a veces se ha declarado como un patógeno débil para las plantas. Sin embargo, es famoso por sus exitosas aplicaciones en el biocontrol de muchos fitopatógenos, también es conocido por su capacidad para producir diversas clases de metabolitos secundarios, estructural y biológicamente diversos, con aplicaciones médicas varias, además de la formación de pigmentos y su aplicación industrial. Debido a esto, la comunidad científica se ha enfocado en el estudio de la gran variedad de metabolitos producidos por *E. nigrum* (Figura 7).<sup>38, 41</sup>

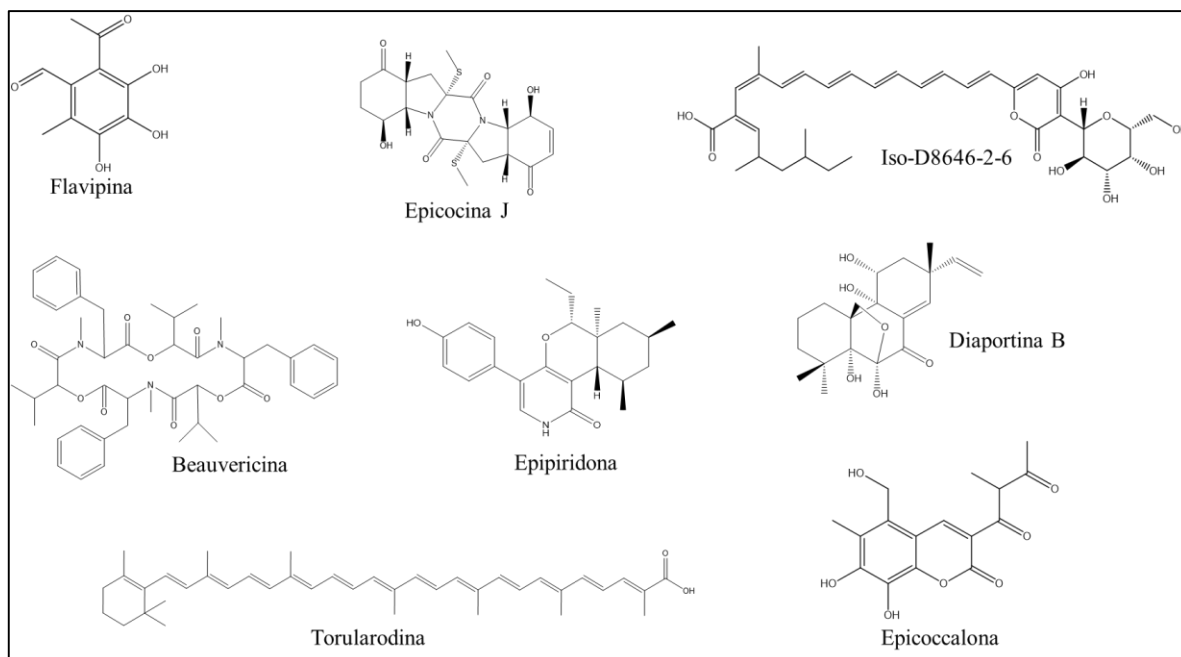


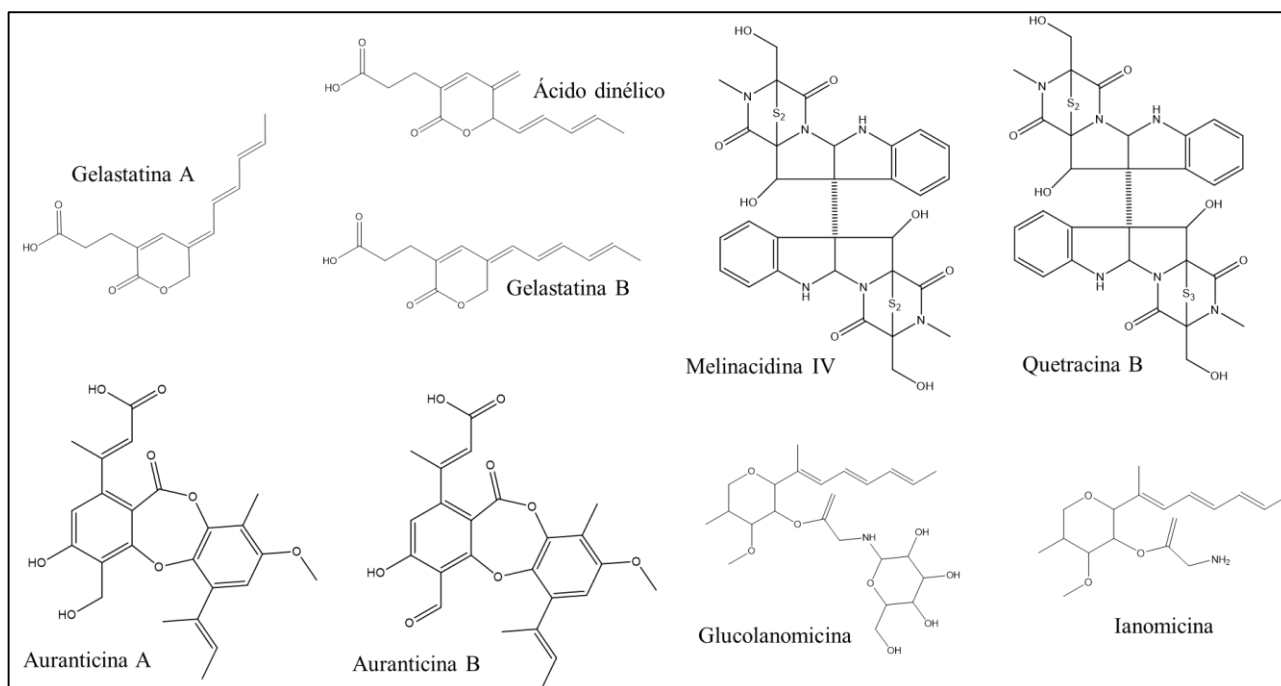
Figura 7. Ejemplos de metabolitos aislados a partir de *E. nigrum*.

## 2.8. Generalidades del género *Westerdykella*

El género *Westerdykella* se encuentra dentro de la familia Sporormiaceae, de distribución cosmopolita. Este género comprende cerca de 100 especies, de las que se tienen bien caracterizadas 11 de ellas: *W. ornata*, *W. angulata*, *W. aurantiaca*, *W. cilyndrica*, *W. dispersa*, *W. globosa*, *W. multispora*, *W. nigra*, *W. rapa-nueinsis*, *W. purpurea* y *W. reniformis*, las diferentes especies de este hongo han sido aisladas de una amplia variedad de sustratos ambientales incluyendo suelo/sedimento, estiércol y restos de plantas. A pesar de que estos hongos son comúnmente obtenidos de ambientes terrestres, también son capaces de crecer y esporular en ambientes salinos y no salinos, esto sugiere que es un hongo marino no obligado, por lo que incluso han sido aislados de ambientes acuáticos, estuarios y marinos; por ejemplo, sedimentos de mangle y lagos de agua fresca y salina.<sup>42,</sup>

43

Algunos grupos de trabajo han examinado los aislados del género *Westerdykella* para estudiar la producción de moléculas bioactivas, dentro de las cuales se encuentran epipolotiodioxopiperazinas (ETPs), citocalasinas y derivados de alcaloides (**Figura 8**). De estas investigaciones, se han encontrado compuestos con actividades importantes dentro de las que destacan la inhibición del mecanismo de apoptosis, inhibición de la gelatinasa NMP-2, y finalmente actividades como inhibidores del crecimiento de varios dermatofitos y algunas especies de *Candida*, además de actividad antibiótica frente a diferentes cepas bacterianas como lo son *B. subtilis*, MRSA y *Staphylococcus warneri*.<sup>44, 45, 46, 47</sup>



**Figura 8.** Ejemplos de metabolitos aislados a partir del género *Westerdykella*.

## 2.9. Generalidades del género *Aspergillus*

*Aspergillus* es un género diverso con alto impacto económico y social. Las especies de este hongo se encuentran alrededor del mundo en diferentes hábitats y son conocidas por el deterioro de la comida, producción de micotoxinas y son frecuentemente reportadas como patógenos animales y humanos. Además, muchas especies son usadas en biotecnología para la producción de varios metabolitos como antibióticos, ácidos orgánicos, medicamentos o enzimas, e incluso como agentes en muchas fermentaciones de alimentos.<sup>48</sup>

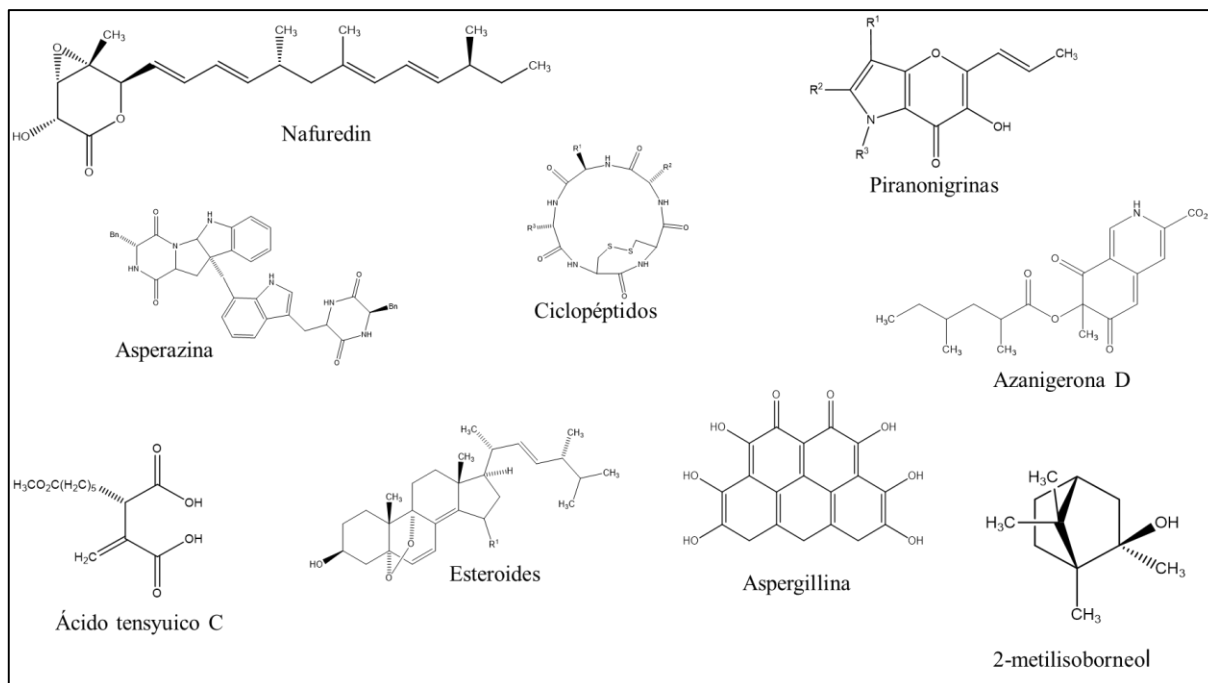
El hongo más estudiado dentro de este género es *Aspergillus niger*, éste es un fitopatógeno responsable de la enfermedad llamada “moho negro” en las plantas y es considerado como el microorganismo más versátil para producir ácidos, proteínas y enzimas de valor industrial, además de una gran variedad de compuestos de interés farmacológico.<sup>48</sup>

A partir de 1919, cuando Pfizer introdujo la producción de ácido cítrico en este hongo, se dio el nacimiento de la industria biotecnológica, lo cual provocó que los científicos se enfocaran en la investigación de *A. niger* y ésta creció en los siguientes años. Un amplio rango de proteínas únicas involucradas en ciertos mecanismos que no ocurren en otros



hongos filamentosos indican que esta especie es versátil a nivel de producción celular, así se reveló a *A. niger* como una herramienta poderosa para la producción de diversos compuestos, estructuralmente complejos.<sup>49</sup>

Una revisión de la literatura, que va de 1917 a 2018, reveló 213 metabolitos secundarios producidos por cepas de *A. niger* de diferentes fuentes y corrobora a las especies de este hongo como una fuente copiosa de productos naturales (**Figura 9**).<sup>49</sup>



**Figura 9.** Ejemplos de metabolitos aislados a partir de *A. niger*.

### **3. Hipótesis**

El cribado de la actividad antibacteriana (12 cepas bacterianas de prueba, incluyendo microorganismos tipificados ATCC y aislamientos intrahospitalarios) de extractos orgánicos (160) de microorganismos fúngicos, permitirá detectar los aislamientos más apropiados para el descubrimiento o reposicionamiento de metabolitos secundarios con potencial antibacteriano contra cepas intrahospitalarias de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

El presente proyecto tiene como objetivo contribuir al descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos a partir de especies fúngicas selectas colectadas de diversas zonas del territorio nacional, utilizando estudios biodirigidos contra cepas bacterianas del grupo ESKAPE, tanto ATCC como de aislamientos intrahospitalarios.

### **4.2. Objetivos particulares**

1. Evaluar el potencial antibacteriano (12 cepas de prueba) de 160 extractos orgánicos de origen fúngico.
2. Realizar el fraccionamiento primario de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana.
3. Realizar el estudio biodirigido de por lo menos una especie fúngica.
4. Optimizar las condiciones para el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).
5. Establecer la estructura química de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos.
6. Determinar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios obtenidos, utilizando un método de microdilución en placa.

## 5. Desarrollo Experimental

### 5.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del control positivo (gentamicina).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) del control positivo (gentamicina) se determinó mediante la técnica de microdilución en placa, utilizando dos grupos de microorganismos de prueba, en primer lugar cepas ATCC proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM: Gram (+) *Enterococcus faecium* (ATCC700323) y *Staphylococcus aureus* (ATCC35667); Gram (-) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC17178), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) y *Enterobacter cloacae* (ATCC700323), y en segundo lugar, cepas proporcionadas por la QFB Rosario Vázquez Larios, jefa del laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez": *K. pneumoniae* 1906, *K. pneumoniae* 1905, *P. aeruginosa* 5676, *P. aeruginosa* 5687, *E. cloacae* 5312 y *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA).

De manera general, los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, colocando en cada pozo 10  $\mu\text{L}$  de concentraciones crecientes de gentamicina (1, 10, 100, 500, 1000, 2000 y 5000  $\mu\text{g/mL}$ ) posteriormente se adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller- Hinton (MH) y 10  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana ajustada aproximadamente a  $1 \times 10^8$  células/mL (0.5% del estándar turbidimétrico de McFarland); enseguida, se leyó la densidad óptica (DO) a 600 nm al tiempo cero ( $t_0$ ) en un lector Synergy HT y posteriormente, las muestras se incubaron por 16 horas a 37 °C. Al término del periodo de incubación se registró la DO de las muestras y los resultados se determinaron mediante el cambio en la medida entre ambas lecturas, utilizando la siguiente ecuación (1);

$$\% \text{Crecimiento} = \frac{\Delta DO \text{ muestra}}{\Delta DO \text{ del control}} \times 100, \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$$\Delta DO \text{ muestra} = DO_{t=16} - DO_{t=0}$$

$$\Delta DO \text{ del control} = DO \text{ de la suspensión bacteriana}_{t=16} - DO \text{ de la suspensión bacteriana}_{t=0}$$

Las curvas de inhibición de crecimiento bacteriano y el valor de MIC para cada una de las cepas bacterianas se obtuvieron mediante ajuste no lineal empleando la ecuación (2) modificada de Gompertz con el programa GraphPad Prism 6.0.

$$N(t) = Ae^{-Be^{-Kt}}, \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

N (t) = tamaño de la población al tiempo t

A= valor del máximo crecimiento y además determina un punto de inflexión en  $\frac{A}{e}$

B= número positivo que desplaza el modelo a la izquierda o derecha

K= establece la tasa intrínseca de crecimiento.

## 5.2. Obtención de microorganismos fúngicos y de los extractos orgánicos.

Se trabajaron extractos orgánicos de origen fúngico previamente obtenidos en el grupo de trabajo. Los microorganismos se obtuvieron de muestras de hojarasca, musgo, corteza de árbol, maleza y tallos sumergidos en depósitos de agua dulce colectados en la Sierra de Guadalupe (IQ-001 IQ-032) y muestras varias obtenidas en los humedales de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México (IQ-033- IQ-080).

Inicialmente, todos los microorganismos (IQ-001 a IQ-080) se obtuvieron en cultivo axénico siguiendo la metodología descrita por Aguilar-Ramírez y Martínez-Aviña, 2019. Brevemente, cada una de las muestras se fragmentó en trozos de 1-2 mm con el fin de reducir la población de microorganismos en la superficie de los fragmentos. Para ello, los fragmentos se sometieron a un proceso de desinfección de acuerdo con los siguientes pasos: 1) las muestras se lavaron con agua estéril (1 minuto), 2) se sumergieron en una solución al 70% de alcohol etílico (1 minuto), 3) se enjuagaron nuevamente con agua estéril (1 minuto) y posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (30 segundos), 4) se enjuagaron con agua estéril (1 minuto) y se dejaron secar en una gasa estéril, y finalmente 5) las muestras se sembraron por separado y por triplicado en cajas Petri de 100 mm conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA) y amoxicilina (500 mg/L). Estos cultivos se almacenaron a temperatura ambiente.

Para el aislamiento de los microorganismos fúngicos en cultivo axénico se observaron las colonias de microorganismos que emergieron de las muestras sembradas y se resembraron en cajas de Petri de 60 mm con PDA. Una vez obtenidos los cultivos puros de microorganismos, se les asignó una clave de identificación con independencia de su fuente de origen. Una vez teniendo los cultivos axénicos, tres fragmentos de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm de este cultivo se transfirieron a tubos para centrifuga de 50 mL con 15 mL de caldo papa dextrosa (PDB), para aumentar la cantidad de biomasa y generar un cultivo semilla que sirviera como pre-inóculo para posteriormente ser cultivados en medio sólido (arroz y Cheerios®). Los cultivos se mantuvieron en condiciones estáticas a temperatura ambiente con periodos normales de luz- oscuridad por 28 días.

Posteriormente, los extractos se prepararon de acuerdo con la siguiente metodología: 1) a cada matraz con cultivo se le añadieron 60 mL de una mezcla 1:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH y se fragmentó la biomasa. Las muestras se dejaron macerar con agitación por aproximadamente 2 h a temperatura ambiente; 2) después de este tiempo, las muestras se filtraron al vacío y el residuo sólido se lavó con 90 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 3) se agregaron 75 mL de agua destilada para realizar un reparto y las fracciones orgánicas se concentraron a presión reducida; 4) el extracto orgánico se reconstituyó con 100 mL de una mezcla 1:1 MeOH-MeCN y se sometió a un segundo reparto con 100 mL de hexano. Las fracciones de MeOH-MeCN se concentraron a presión reducida.

Finalmente, los extractos orgánicos (160 muestras) se prepararon a una concentración de 10,000 µg/mL en DMSO y se organizaron como se indica en la **Figura 10**, en placas de 96 pozos para crear una biblioteca de extractos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		IQ-001	IQ-002	IQ-003	IQ-004	IQ-005	IQ-006	IQ-007	IQ-008	IQ-009	IQ-010	
B		IQ-001	IQ-002	IQ-003	IQ-004	IQ-005	IQ-006	IQ-007	IQ-008	IQ-009	IQ-010	
C		IQ-011	IQ-012	IQ-013	IQ-014	IQ-015	IQ-016	IQ-017	IQ-018	IQ-019	IQ-020	
D		IQ-011	IQ-012	IQ-013	IQ-014	IQ-015	IQ-016	IQ-017	IQ-018	IQ-019	IQ-020	
E		IQ-021	IQ-022	IQ-023	IQ-024	IQ-025	IQ-026	IQ-027	IQ-028	IQ-029	IQ-030	
F		IQ-021	IQ-022	IQ-023	IQ-024	IQ-025	IQ-026	IQ-027	IQ-028	IQ-029	IQ-030	
G		IQ-031	IQ-032	IQ-033	IQ-034	IQ-035	IQ-036	IQ-037	IQ-038	IQ-039	IQ-040	
H		IQ-031	IQ-032	IQ-033	IQ-034	IQ-035	IQ-036	IQ-037	IQ-038	IQ-039	IQ-040	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		IQ-041	IQ-042	IQ-043	IQ-044	IQ-045	IQ-046	IQ-047	IQ-048	IQ-049	IQ-050	
B		IQ-041	IQ-042	IQ-043	IQ-044	IQ-045	IQ-046	IQ-047	IQ-048	IQ-049	IQ-050	
C		IQ-051	IQ-052	IQ-053	IQ-054	IQ-055	IQ-056	IQ-057	IQ-058	IQ-059	IQ-060	
D		IQ-051	IQ-052	IQ-053	IQ-054	IQ-055	IQ-056	IQ-057	IQ-058	IQ-059	IQ-060	
E		IQ-061	IQ-062	IQ-063	IQ-064	IQ-065	IQ-066	IQ-067	IQ-068	IQ-069	IQ-070	
F		IQ-061	IQ-062	IQ-063	IQ-064	IQ-065	IQ-066	IQ-067	IQ-068	IQ-069	IQ-070	
G		IQ-071	IQ-072	IQ-073	IQ-074	IQ-075	IQ-076	IQ-077	IQ-078	IQ-079	IQ-080	
H		IQ-071	IQ-072	IQ-073	IQ-074	IQ-075	IQ-076	IQ-077	IQ-078	IQ-079	IQ-080	

Blanco
Control (+)
ARROZ
CHEERIOS

**Figura 10.** Distribución de extractos orgánicos IQ-001-IQ-080 en placa de 96 pozos. Biblioteca de extractos orgánicos FELIQ.

### 5.3. Actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos presentes en la librería se determinó utilizando el método de microdilución en placa, contra los microorganismos de prueba Gram (+) *E. faecium* (ATCC700323) y *S. aureus* (ATCC35667), Gram (-) *K. pneumoniae* (ATCC700603), *A. baumannii* (ATCC17178), *P. aeruginosa* (ATCC27853) y *E. cloacae* (ATCC700323) proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM y contra *K. pneumoniae* 1906, *K. pneumoniae* 1905, *P. aeruginosa* 5676, *P. aeruginosa* 5687, *E. cloacae* 5312 y MRSA, proporcionadas por la QFB Rosario Vázquez Larios del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Se utilizó gentamicina como control positivo.

De manera general, los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, colocando 2  $\mu$ L de los extractos a una concentración de 10,000  $\mu$ g/mL preparados en DMSO, para obtener una concentración final de 200  $\mu$ g/mL en cada pozo, posteriormente se adicionaron 88  $\mu$ L de caldo MH y 10  $\mu$ L de suspensión bacteriana ajustada aproximadamente a  $1 \times 10^8$  células/mL (0.5% del estándar turbidimétrico de McFarland); enseguida se leyó la DO a  $t_0$  en un lector Synergy HT, posteriormente se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Al término del periodo de incubación se leyó nuevamente la DO de la placa y los resultados se determinaron mediante el cambio en la medida de DO entre ambas lecturas, utilizando la siguiente ecuación (3);

$$\%Inhibición = 1 - \frac{\Delta DO \text{ muestra}}{\Delta DO \text{ Control}} \times 100, \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$$\Delta DO \text{ muestra} = DO_{t=16} - DO_{t=0}$$

$$\Delta DO \text{ del control} = DO \text{ de la suspensión bacteriana }_{t=16} - DO \text{ de la suspensión bacteriana }_{t=0}$$

Posterior a esto, los datos obtenidos se procesaron mediante el software JMP Pro 13 para obtener un análisis jerárquico.

## **5.4. Estudio Químico de los hongos IQ-013, IQ-050 e IQ-051.**

### **5.4.1. Cultivos en mediana escala.**

Con base en los resultados obtenidos mediante los ensayos de actividad antimicrobiana, se seleccionaron tres de los organismos fúngicos con mayor actividad frente a *A. baumannii*; IQ-013, IQ-050 e IQ-051, para su cultivo en mediana escala y obtención del extracto orgánico.

Los microorganismos se inocularon en cajas de agar papa dextrosa (PDA) por un periodo de 7 días para asegurar que fuera un cultivo axénico, posteriormente tres fragmentos de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm de este cultivo se transfirieron a tubos para centrífuga de 50 mL con 15 mL de caldo papa dextrosa (PDB) para aumentar la cantidad de biomasa y generar un cultivo semilla que sirviera como pre-inóculo, para posteriormente ser transferido a 10 matraces con Cherrios® o arroz (10 g y 12 g respectivamente) estériles, con el propósito de aumentar la biomasa y promover la biosíntesis de metabolitos secundarios. Estos cultivos se mantuvieron en condiciones estáticas a temperatura ambiente con periodos normales de luz-oscuridad por 28 días.

### **5.4.2. Obtención del extracto orgánico.**

Transcurrido el periodo de fermentación, se preparó el extracto orgánico de los microorganismos de acuerdo con la siguiente metodología: 1) a cada matraz con cultivo se le añadieron 60 mL de una mezcla 1:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH y con ayuda de una espátula se fragmentó la biomasa. Las muestras se sonicaron durante 30 minutos, repitiendo esto dos veces; 2) después de este tiempo, las muestras se filtraron al vacío y el residuo sólido se lavó con 90 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 3) se agregaron 75 mL de agua destilada para su posterior agitación por 10-15 minutos; 4) se realizó un reparto y las fracciones orgánicas se concentraron a presión reducida; 5) el extracto orgánico se reconstituyó con 100 mL de una mezcla 1:1 MeOH-MeCN y se sometió a un proceso de reparto con 100 mL de hexano. La mezcla se transfirió a un embudo de separación y la fase de MeOH-MeCN se concentró a presión reducida. La fracción hexánica se descartó; 6) el extracto obtenido fue reconstituido con MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para ser colocado en un vial y obtener el rendimiento.

### 5.4.3. Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos de IQ-013, IQ-050 e IQ-051.

#### 5.4.3.1. Fraccionamiento del extracto orgánico de la especie fúngica IQ-013.

El fraccionamiento primario del extracto se realizó mediante cromatografía en columna tipo Flash, utilizando un sistema Sephacore equipado con dos bombas y un controlador. Aproximadamente 700 mg del extracto 01002-080-1 (IQ-013) se fraccionaron utilizando una columna RediSep Rf Gold® (CV= 26.4 mL), usando un flujo de 20 mL/min y 10 Bar. Las condiciones empleadas en este fraccionamiento se indican en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Condiciones de la cromatografía tipo Flash utilizadas en el fraccionamiento primario del extracto 01002-080-1 (IQ-013).

<b>Muestra inyectada</b>	700 mg
<b>volumen de la columna</b>	26.4 mL
<b>Flujo de la fase móvil</b>	20 mL/min
<b>Solvente A1</b>	Acetato de Etilo
<b>Solvente B1</b>	Hexano
<b>Solvente B2</b>	Metanol
<b>Volumen de la fracción</b>	50 mL

El fraccionamiento primario del extracto orgánico del 01002-080-1 (IQ-013) condujo a la obtención de siete fracciones. El rendimiento para cada fracción se resume en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Rendimiento obtenido del fraccionamiento primario del extracto 01002-080-1 (IQ-013).

<b>Grupo</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Código de muestra</b>	<b>Rendimiento (mg)</b>
<b>1</b>	1-4	01002-081-1	11.9
<b>2</b>	5	01002-081-2	58
<b>3</b>	6	01002-081-3	53.5
<b>4</b>	7-8	01002-081-4	103.1
<b>5</b>	9-12	01002-081-5	241.8
<b>6</b>	13-16	01002-081-6	56.5
<b>7</b>	17-19	01002-081-7	167.4
<b>Rendimiento total</b>			<b>692.2</b>

### 5.4.4. Aislamiento y purificación de los compuestos obtenidos a partir de los extractos primarios de los hongos IQ-013, IQ-050 e IQ-051.

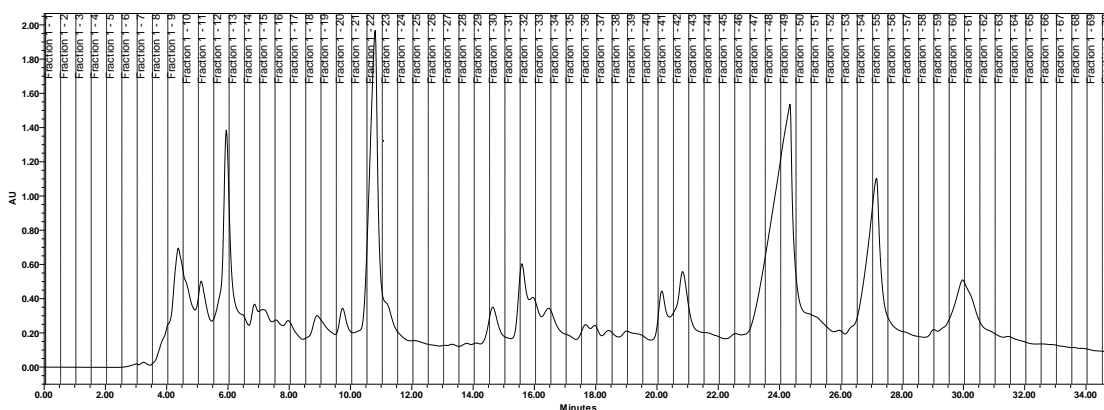
#### 5.4.4.1. Aislamiento y purificación de los compuestos obtenidos a partir del extracto primario de 01002-080-1 (IQ-013).

Con base en los resultados obtenidos mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario, se seleccionaron aquellas con la mejor actividad antimicrobiana para continuar el proceso de aislamiento y purificación de sus componentes. La fracción 01002-081-4 se resolvió mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en modo preparativo mientras que la fracción 01002-081-5 se separó por cromatografía tipo Flash.



#### 5.4.4.1.1. Fraccionamiento de la fracción 01002-081-4

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Waters, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo así como la adquisición y manejo de los datos se efectuó con el programa Empower versión 3.0, Waters. Los análisis a nivel analítico se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 4.6 mm) y como fase móvil un gradiente iniciando con 60% de A (MeCN) y 40% de B (0.1% ácido fórmico en agua) hasta un 100% de A en 30 minutos, con un flujo de 1.0 mL/min. Los análisis a nivel preparativo se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 21.0 mm) y como fase móvil un gradiente iniciando con 60% de A (MeCN) y 40% de B (0.1% ácido fórmico en agua) hasta un 100% de A en 30 minutos, con un flujo de 15.0 mL/min (**Figura 11**). La detección de los compuestos se realizó a diferentes longitudes de onda (200-800 nm). De este análisis se obtuvieron 12 fracciones, los datos se presentan en la **Tabla 7**.



**Figura 11.** Cromatograma preparativo de la fracción 01002-081-4

**Tabla 7.** Agrupamiento de fracciones secundarias obtenidas del fraccionamiento de 01002-081-4

Grupo	Fracciones	Código de muestra	Rendimiento (mg)
1	21-23	01002-083-1	3.2
2	31	01002-083-2	0.6
3	32	01002-083-3	0.7
4	33-34	01002-083-4	0.9
5	36-39	01002-083-5	1.5
6	40-41	01002-083-6	1.1
7	42-43	01002-083-7	1.2
8	47-50	01002-083-8	3.8
9	51-53	01002-083-9	3.6
10	54-56	01002-083-10	8.9
11	58-62	01002-083-11	3.7
12	1-20, 24-30, 35, 44-46, 57, 63-70.	01002-083-12	14.3

#### 5.4.4.1.2. Fraccionamiento de 01002-081-5

El fraccionamiento secundario de la fracción 01002-081-5 se realizó mediante cromatografía en columna tipo Flash. Aproximadamente 300 mg la fracción 01002-081-5 fueron fraccionados utilizando una columna cromatográfica Biotage® SNAP Ultra (CV= 26.5 mL), usando flujo de 20 mL/min y 10 Bar. Las condiciones empleadas en este fraccionamiento se indican en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Condiciones de la cromatografía tipo Flash con la cual fue realizado el fraccionamiento secundario de la fracción 01002-081-5.

<b>Muestra inyectada</b>	300 mg
<b>Volumen de la columna</b>	26.5 mL
<b>Flujo de la fase móvil</b>	20 mL/min
<b>Solvente A1</b>	Agua destilada
<b>Solvente B1</b>	Metanol
<b>Volumen de la fracción</b>	50 mL

Así, el fraccionamiento secundario de la fracción del 01002-081-5 condujo a la obtención de siete fracciones. El rendimiento de cada fracción se resume en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Agrupamiento de fracciones secundarias obtenidas del fraccionamiento de 01002-081-5.

<b>Grupo</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Código de muestra</b>	<b>Rendimiento (mg)</b>
<b>1</b>	2-7	01002-084-1	24.4
<b>2</b>	8-10	01002-084-2	33
<b>3</b>	11-13	01002-084-3	54.1
<b>4</b>	14-15	01002-084-4	160.9
<b>5</b>	16	01002-084-5	7.9
<b>6</b>	17-20	01002-084-6	7.1
<b>7</b>	1	01002-084-7	9.9

#### 5.4.4.2. Aislamiento y purificación de los compuestos obtenidos a partir del extracto primario de IQ-050.

##### 5.4.4.2.1. Fraccionamiento del extracto obtenido del hongo IQ-050

El fraccionamiento primario se realizó mediante cromatografía en columna tipo Flash. Aproximadamente 910 mg del extracto fueron fraccionados utilizando una columna cromatográfica Gold de 12 g de sílice, usando flujo de 30 mL/min. Las condiciones empleadas en este fraccionamiento se indican en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Condiciones de la cromatografía tipo Flash con la cual fue realizado el fraccionamiento secundario del extracto del hongo IQ-050.

<b>Muestra inyectada</b>	910 mg
<b>Flujo de la fase móvil</b>	30 mL/min
<b>Solvente A1</b>	Cloroformo
<b>Solvente B1</b>	Hexano
<b>Solvente B2</b>	Metanol

De este fraccionamiento se obtuvieron siete fracciones, con cinco de ellas se realizó un perfil cromatográfico por HPLC utilizando un cromatógrafo Waters, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo, así como la adquisición y manejo de los datos, se efectuó con el programa Empower versión 3.0 Waters. Los análisis se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C18 (5 µm, 250 × 21.0 mm) y como fase móvil un gradiente iniciando con 20% de A (MeCN) y 80% de B (0.1% ácido fórmico en agua) hasta un 100% de A en 35 minutos, con un flujo de 1.0 mL/min.

#### 5.4.4.3. Aislamiento y purificación de los compuestos obtenidos a partir del extracto primario de IQ-051.

En colaboración con la Q.F.B. Diana Arellano Vilchis se trabajaron tres de las fracciones obtenidas del extracto proveniente del hongo IQ-051.

##### 5.4.4.3.1. Fraccionamiento de la fracción 01001-105-3.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Waters, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo, así como la adquisición y manejo de los datos, se efectuó con el programa Empower versión 3.0 Waters. Los análisis a nivel analítico se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C18 (5 µm, 250 × 21.0 mm) y como fase móvil un gradiente de 50 a 60% de MeCN durante 20 min para posteriormente continuar con un 60% de este mismo disolvente durante 10 min, con un flujo de 1.0 mL/min. Los análisis a nivel semipreparativo se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C18 (5 µm, 250 × 10.0 mm) y como fase móvil un gradiente de 50 a 60% de MeCN durante 20 min para posteriormente continuar con un 60% de este mismo disolvente durante 10 min, con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 12**). La detección de los compuestos se realizó a diferentes longitudes de onda (200-800 nm). De este análisis se obtuvieron 14 fracciones.

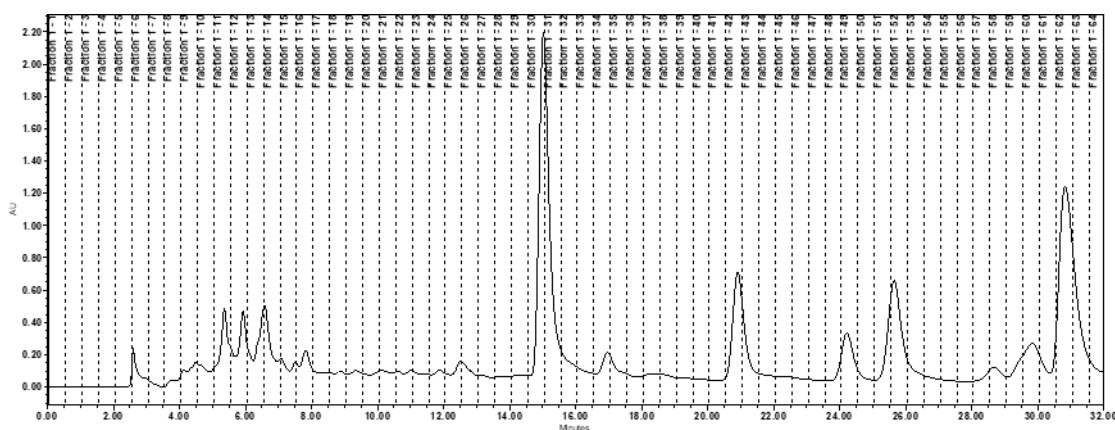
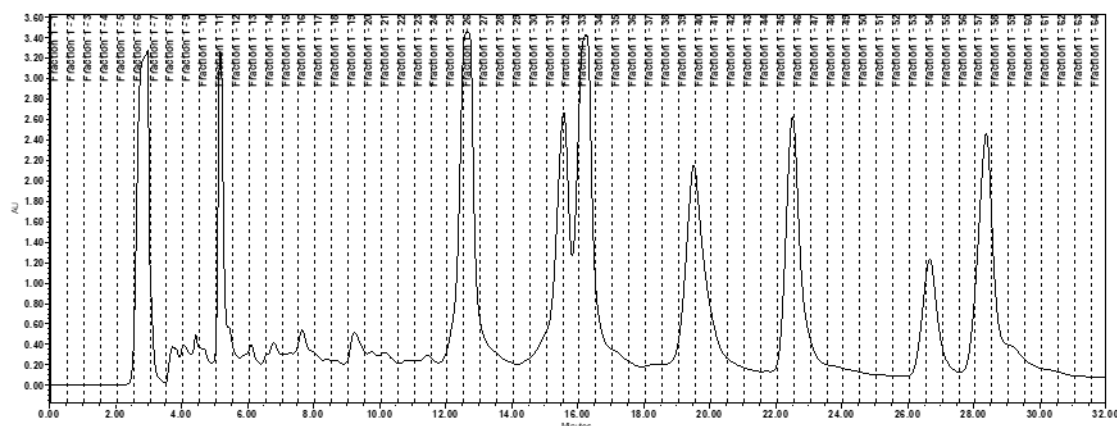


Figura 12. Cromatograma preparativo de la fracción 01001-105-3

##### 5.4.4.3.2. Fraccionamiento de la fracción 01001-105-8.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Waters, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo así como la adquisición y manejo de los datos, se efectuó con el programa Empower versión

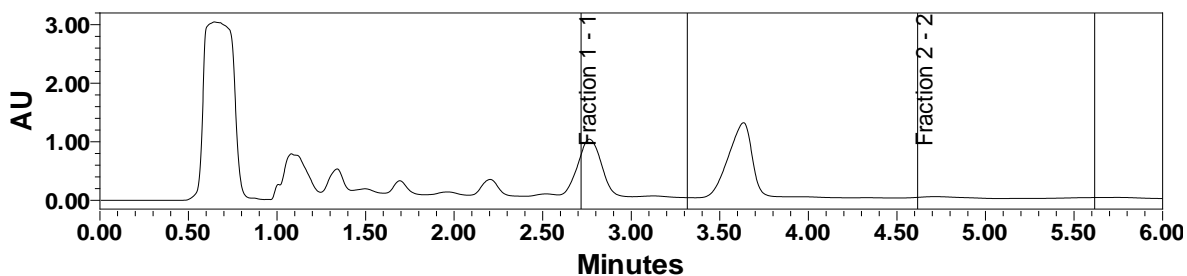
3.0 Waters. Los análisis a nivel analítico se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  21.0 mm) y como fase móvil un gradiente de 50 a 60% de MeCN durante 30 min con un flujo de 1.0 mL/min. Los análisis a nivel semipreparativo se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  10.0 mm) y como fase móvil un gradiente de 50 a 60% de MeCN durante 30 min con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 13**). La detección de los compuestos se realizó a diferentes longitudes de onda (200-800 nm), de este análisis se obtuvieron 24 fracciones.



**Figura 13.** Cromatograma preparativo de la fracción 01001-105-8

#### 5.4.4.3.3. Fraccionamiento de la fracción 01001-105-12.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Waters, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo así como la adquisición y manejo de los datos, se efectuó con el programa Empower versión 3.0 Waters. Los análisis a nivel analítico se realizaron utilizando una columna Symmetry C-18 y como fase móvil en método isocrático MeCN:H<sub>2</sub>O/0.1% ácido fórmico 30% durante 6 minutos con flujo de 1.0 mL/min. Los análisis a nivel semipreparativo se realizaron utilizando una columna Gemini NX-C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  10.0 mm) y como fase móvil un método isocrático MeCN:H<sub>2</sub>O/0.1% ácido fórmico 30% durante 6 minutos con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 14**). La detección de los compuestos se realizó a diferentes longitudes de onda (200-800 nm), de este análisis se obtuvieron tres fracciones.



**Figura 14.** Cromatograma del método analítico de la fracción 01001-105-12.

#### 5.4.5. Caracterización de los productos obtenidos

Las fracciones con compuestos puros elegidos fueron analizadas mediante las técnicas espectroscópicas y espectrométricas correspondientes. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-<sup>1</sup>H 700 MHz) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C, 175 MHz)

se registraron en un equipo de Bruker Ascend III 700, utilizando cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) y dimetilsulfóxido ( $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$ ) deuterados.

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) con un espectrómetro de masas Jeol, AccuTOF JMS-T100LC.

#### **5.4.6. Identificación taxonómica de los microorganismos seleccionados.**

La identificación taxonómica de las cepas seleccionadas se realizó mediante la secuenciación molecular de la región ITS y análisis de homología tipo BLAST utilizando la base de datos *del National Center Biotechnology Information* (NCBI) y se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez, del Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica (IPICYT) del estado de San Luis Potosí.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1. Resultados de la determinación de MIC para la gentamicina frente a las cepas bacterianas de estudio.

Se muestran los valores obtenidos de la determinación de la MIC de gentamicina, el cual es un antibiótico aminoglucósido considerado de amplio espectro debido a su acción bactericida, altamente eficaz contra casi todos los bacilos gramnegativos: *Escherichia coli*, especies de *Enterobacter*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter*, *Providencia* y *Serratia*, también es activa contra diversas especies de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Su actividad se extiende contra algunas bacterias Gram (+) como *S. aureus* y *E. faecalis*. Su mecanismo de acción se basa en su transporte activo, pues atraviesa la membrana celular de las bacterias susceptibles y se une de manera irreversible a las subunidades ribosómicas 30S; esta acción impide el inicio de la síntesis proteínica y al final provoca la muerte celular.<sup>50</sup>

Los resultados de estos experimentos permitieron establecer la concentración requerida a usar para los controles de inhibición contra cada una de las cepas bacterianas de estudio.

Como se observa, el valor de la MIC varía considerablemente entre las cepas ATCC con respecto a las cepas hospitalarias, esto debido a las diferencias genéticas que se presentan entre ellas. Las cepas resistentes muestran distintos factores de virulencia y de resistencia que las hace evadir los tratamientos tradicionales, por ejemplo, dentro del grupo ESKAPE, se encuentran en mayor medida las cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. resistentes a carbapenémicos gracias a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), *E. faecium* resistente a la vancomicina (VRE) y *S. aureus* resistente a la meticilina y a la vancomicina (MRSA y VRSA). Los mecanismos que muestran las cepas multi-farmaco resistentes de este grupo, en general pueden agruparse en tres categorías; 1) inactivación del fármaco, comúnmente mediante una ruptura irreversible catalizada por una enzima, 2) modificación del sitio blanco donde los antibióticos pueden unirse y finalmente 3) poca concentración intracelular del fármaco debido a la disminución en la permeabilidad de la membrana o por el incremento de bombas de eflujo. También pueden formar biopelículas que evaden físicamente la respuesta de las células inmunológicas del hospedero así como la acción de los antibióticos.<sup>51</sup>

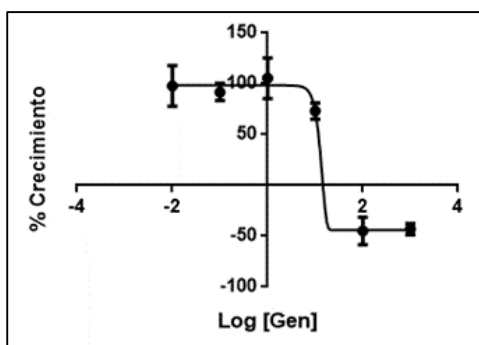
Los resultados presentados (**Tabla 11, Figura 15**) muestran que los microorganismos Gram (+) *E. faecium* 700323 y MRSA presentan un mayor valor de MIC 17.44 y 9.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, mientras que en los Gram (-) tanto en cepas ATCC como hospitalarias, *K. pneumoniae* presenta los valores de MIC más altos. Cabe señalar que para las cepas de *P. aeruginosa* los valores más altos de MIC fueron dados por aquellas cepas en las que se evidencia la producción de piocianina, un factor de virulencia importante de este microorganismo.<sup>52</sup>

**Tabla 11.** Valores de MIC calculados para cada una de las cepas utilizadas en el estudio.

Microorganismos G (+)					
Cepas ATCC			Cepas Hospitalarias		
Bacteria evaluada	MIC $\mu\text{g/mL}$	Cepa	Bacteria evaluada	MIC $\mu\text{g/mL}$	Cepa
<i>E. faecium</i>	17.44	700323	MRSA	9.87	----
<i>S. aureus</i>	0.46	35667			
Microorganismos G (-)					
Cepas ATCC			Cepas Hospitalarias		
Bacteria evaluada	MIC $\mu\text{g/mL}$	Cepa	Bacteria evaluada	MIC $\mu\text{g/mL}$	Cepa
<i>K. pneumoniae</i>	22.96	700603	<i>K. pneumoniae</i>	193.7	1906
<i>A. baumannii</i>	1.43	17178	<i>K. pneumoniae</i>	0.13	1905
<i>P. aeruginosa</i>	1.76	27853	<i>P. aeruginosa</i>	65.04	5676
<i>E. cloacae</i>	3.5	700323	<i>P. aeruginosa</i>	3.03	5687
			<i>E. cloacae</i>	1.57	5312

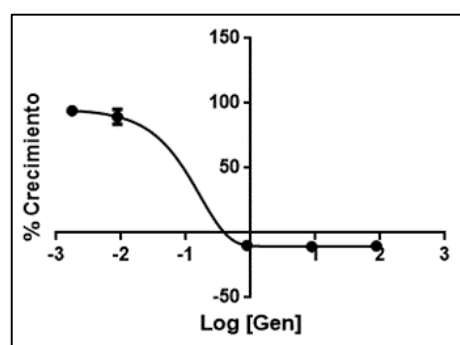
### MIC calculadas para cepas ATCC

*E. faecium* ATCC 700323



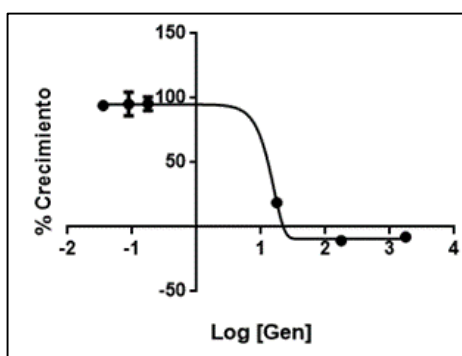
MIC = 17.44  $\mu\text{g/mL}$

*S. aureus* ATCC 35667



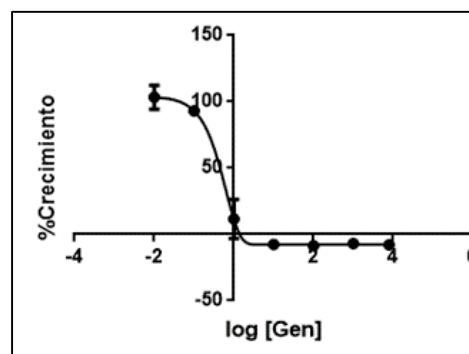
MIC = 0.46  $\mu\text{g/mL}$

*K. pneumoniae* ATCC 700603



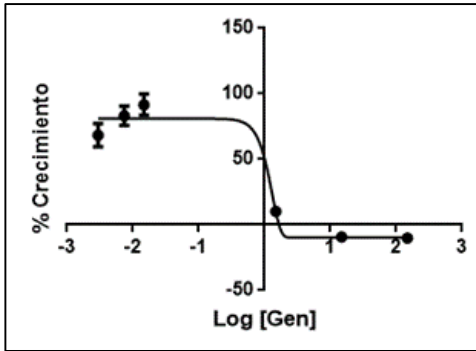
MIC = 22.96  $\mu\text{g/mL}$

*A. baumannii* ATCC 27853



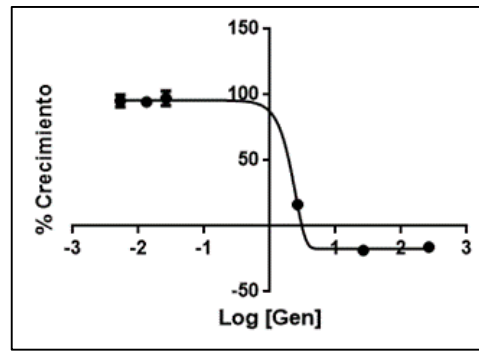
MIC = 1.43  $\mu\text{g/mL}$

*P. aeruginosa* ATCC 27853



MIC = 1.76  $\mu\text{g/mL}$

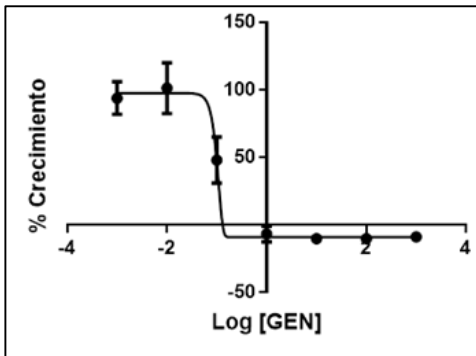
*E. cloacae* ATCC 700323



MIC = 3.5  $\mu\text{g/mL}$

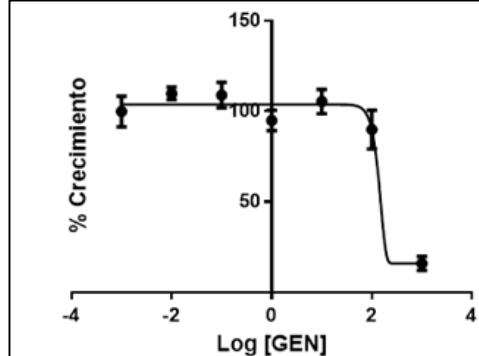
**MIC calculada para cepas hospitalarias**

*K. pneumoniae* 1905



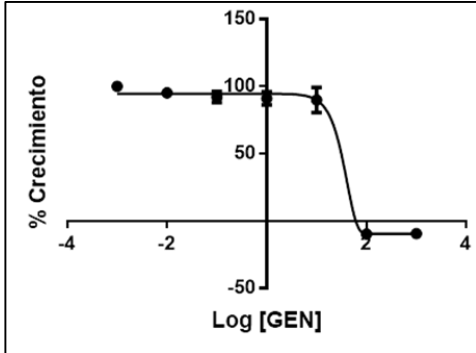
MIC = 0.13  $\mu\text{g/mL}$

*K. pneumoniae* 1906



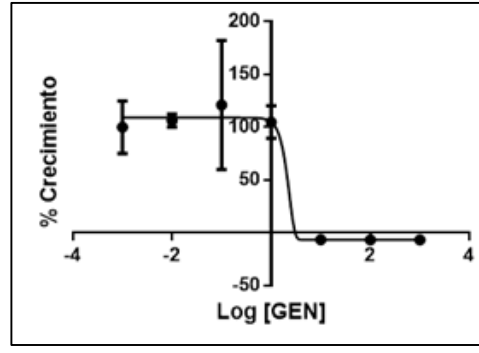
MIC = 193.7  $\mu\text{g/mL}$

*P. aeruginosa* 5676



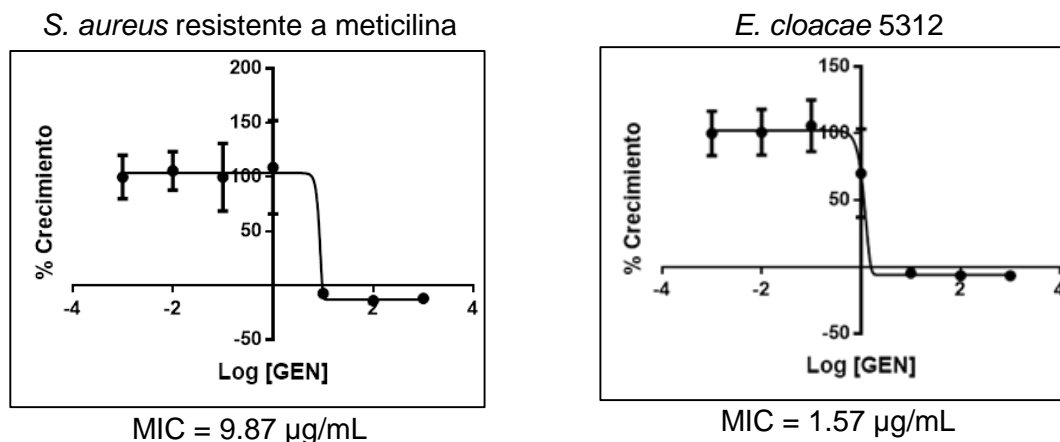
MIC = 65.04  $\mu\text{g/mL}$

*P. aeruginosa* 5687



MIC = 3.03  $\mu\text{g/mL}$





**Figura 15.** Gráficas y valores obtenidos de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de Gentamicina para las cepas de trabajo; microorganismos ATCC y cepas hospitalarias.

## 6.2. Determinación de la actividad antibacteriana de 160 extractos, evaluados frente a los microorganismos de estudio (cepas ATCC y cepas hospitalarias).

El potencial antimicrobiano de los 160 extractos orgánicos (IQ-001 a IQ-080, crecidos en arroz y Cherrios®) se determinó empleando el método de microdilución en placa (inciso 5.3) utilizando microorganismos Gram (+) y Gram (-).

Los 1920 ensayos realizados se analizaron empleando análisis jerárquico, dicho análisis permite encontrar patrones o grupos dentro de un conjunto de datos, estos grupos se establecen de forma que las observaciones dentro de un grupo sean similares entre ellas y distintas a las observaciones de otros grupos. De acuerdo a esto, los resultados permitieron separar las bacterias Gram (+) de las Gram (-), así como agrupar los extractos en 8 grupos distintos con características similares en cuanto a porcentaje de inhibición frente a las cepas evaluadas. Es importante evidenciar que existe un grupo donde se presentan extractos que no tienen actividad significativa contra ninguna de las cepas evaluadas por lo que se encuentran en un grupo totalmente aislado a los demás. Sin embargo, existe otro grupo (color verde) en donde se encuentran los extractos que presentan una inhibición superior al 60% contra las cepas Gram (+) evaluadas (**Figura 16**).

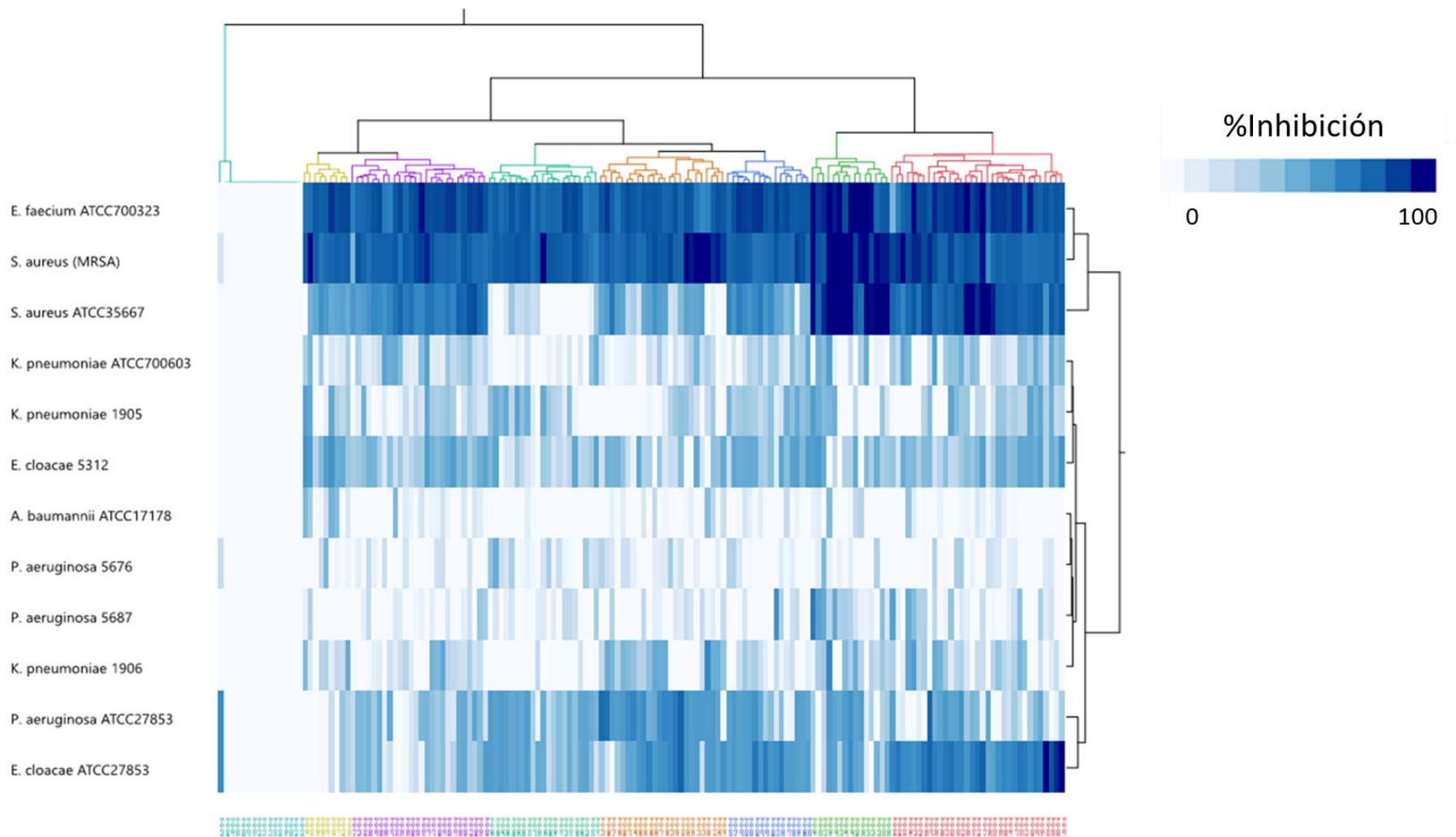
En general, en el análisis se observa que los extractos evaluados presentan una mayor actividad inhibitoria frente a las tres cepas Gram (+) utilizadas en este trabajo, mientras que para las Gram (-) hubo una mínima actividad inhibitoria, hecho que puede ser mediado por factores estructurales y fisiológicos de las distintas cepas evaluadas, además de las diferencias en composición y estructurales presentes en los extractos.

Cabe resaltar que solo el 7% de los 160 extractos evaluados presentaron actividad contra la cepa de *A. baumannii*, sin embargo, no rebasando el 30% de inhibición y todos fueron microorganismos crecidos en Cherrios®, lo que sugiere que esta fuente de carbono contribuye a la producción de estructuras químicas que en arroz no se biosintetizan.

La batería de cepas fúngicas a utilizar en las etapas posteriores del estudio se decidió con base en los resultados obtenidos del cribado de actividad antibacteriana. Así, se eligieron

los microorganismos IQ-013, IQ-050 e IQ-051 para realizar su estudio químico pues los tres pertenecen al 7% de extractos que presentaron actividad inhibitoria contra *A. baumannii*, dando prioridad a este microorganismo debido a que esta bacteria es reconocida como una seria amenaza de salud alrededor del mundo, por la emergente prevalencia de aislados clínicos que son multi-resistentes a los fármacos, esto la hace de suma importancia para la clínica por lo que se encuentra en el primer puesto de la lista de prioridad critica emitida por la OMS para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (**Tabla 1**). Esta bacteria Gram (-) en general es considerada como patógeno oportunista sin preferencia por un nicho en particular debido a que está presente tanto en las infecciones hospitalarias como en las adquiridas en la comunidad lo que la hace muy peligrosa. Las adquiridas en el hospital se presentan en mayor medida en los pacientes con enfermedades críticas; los factores de riesgos específicos para el desarrollo de una infección por *A. baumannii* incluyen las estadías prolongadas en el hospital, supresión del sistema inmunológico, edad avanzada, presencia de comorbilidades, traumas mayores o quemaduras, uso previo de antibióticos, procedimientos invasivos, y presencia de catéter permanente o ventilación mecánica, causando un amplio rango de infecciones incluyendo las de piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario, meningitis, bacteriemia y neumonía, siendo esta ultima la infección más reportada tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad.<sup>53, 54, 55</sup>

Debido al pronóstico ya pobre de los pacientes con enfermedades críticas es difícil atribuir una tasa de mortalidad definitiva de quienes contraen infecciones por esta bacteria, a pesar de ello se ha reportado que la tasa de mortalidad cruda tiene un rango de 23 al 68% en infecciones hospitalarias, mientras que en las adquiridas en la comunidad se presenta como un 64%.<sup>55</sup>



**Figura 16.** Análisis jerárquico del potencial antibacteriano de 160 extractos frente a 12 cepas bacterianas. Los resultados se reportan en función del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

### 6.3. Identificación taxonómica de los microorganismos seleccionados; IQ-013, IQ-050 e IQ-051.

La identificación taxonómica de las especies fúngicas se realizó mediante el análisis filogenético de la secuencia ITS del DNA ribosomal (DNAr) nuclear, esta identificación se basa fundamentalmente en la secuenciación de los espaciadores internos ITS los cuales se encuentran separando los genes 18S, 28S, 5S y 5.8S, estas regiones son fáciles de amplificar y alinear, tienen una alta tasa de mutación y son relativamente pequeñas, por lo que son de gran interés en el estudio de identificación y tipificación de especies.<sup>56, 57</sup>

Los resultados de este análisis permitieron establecer que el microorganismo IQ-013 pertenece al género *Epicoccum*, específicamente, *Epicoccum nigrum* (**Figura 17**), el microorganismo identificado como IQ-050 pertenece al género *Westerdykella* especie *Westerdykella aurantiaca* (**Figura 18**) y por último el microorganismo IQ-051 se identificó como *Aspergillus* sp. Sección Nigri. (**Figura 19**) estos tres microorganismos son hongos endófitos pertenecientes al filo *Ascomycota* distribuidos alrededor del mundo, presentes en ocasiones como patógenos de plantas.<sup>49,42,58</sup>

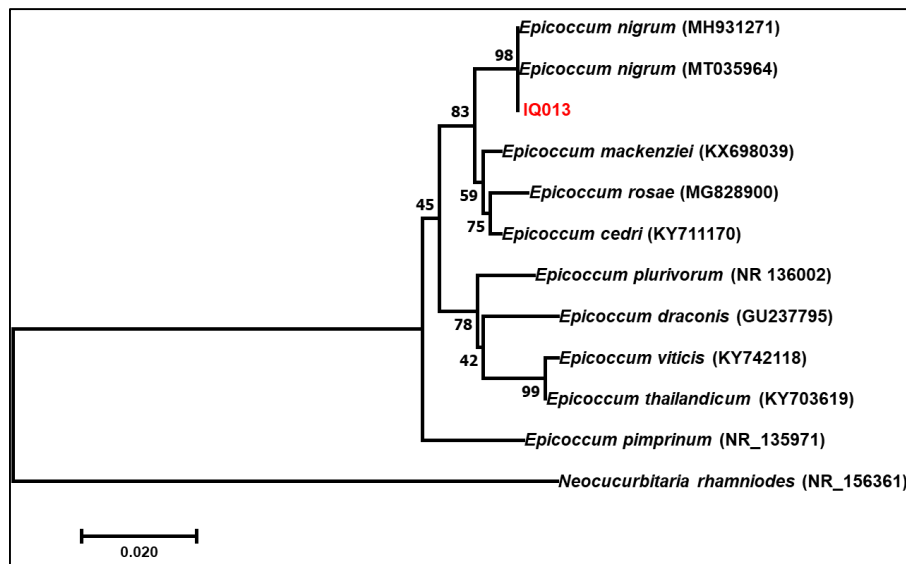


Figura 17. Árbol filogenético del microorganismo IQ-013.

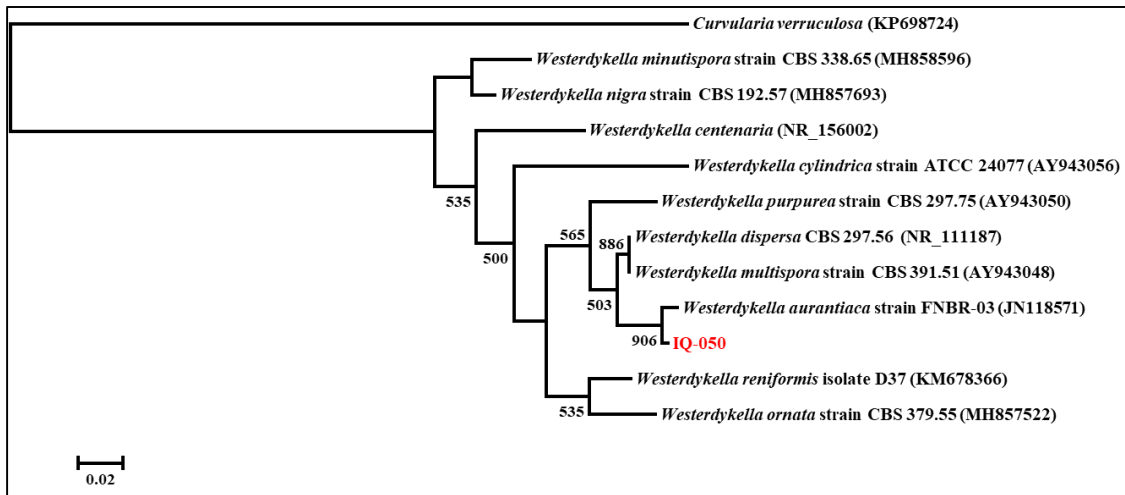


Figura 18. Árbol filogenético del microorganismo IQ-050.

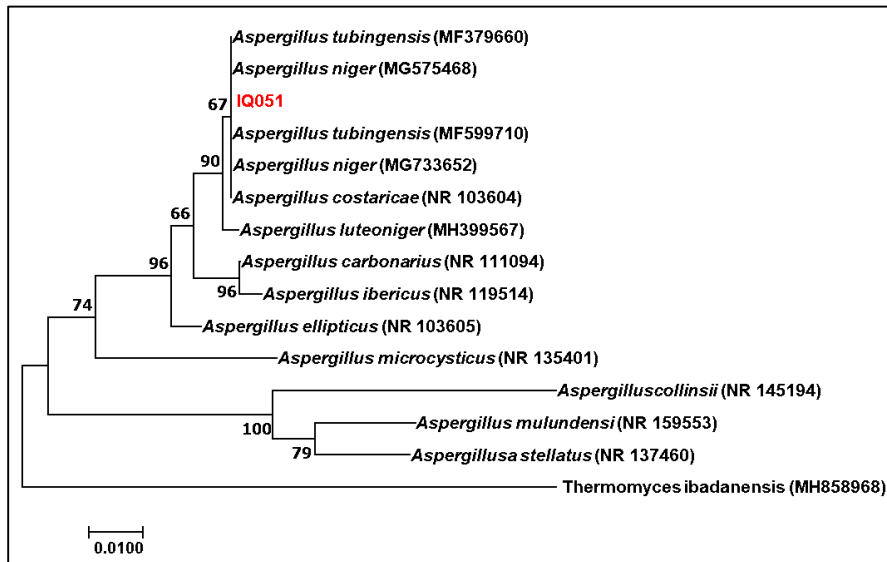
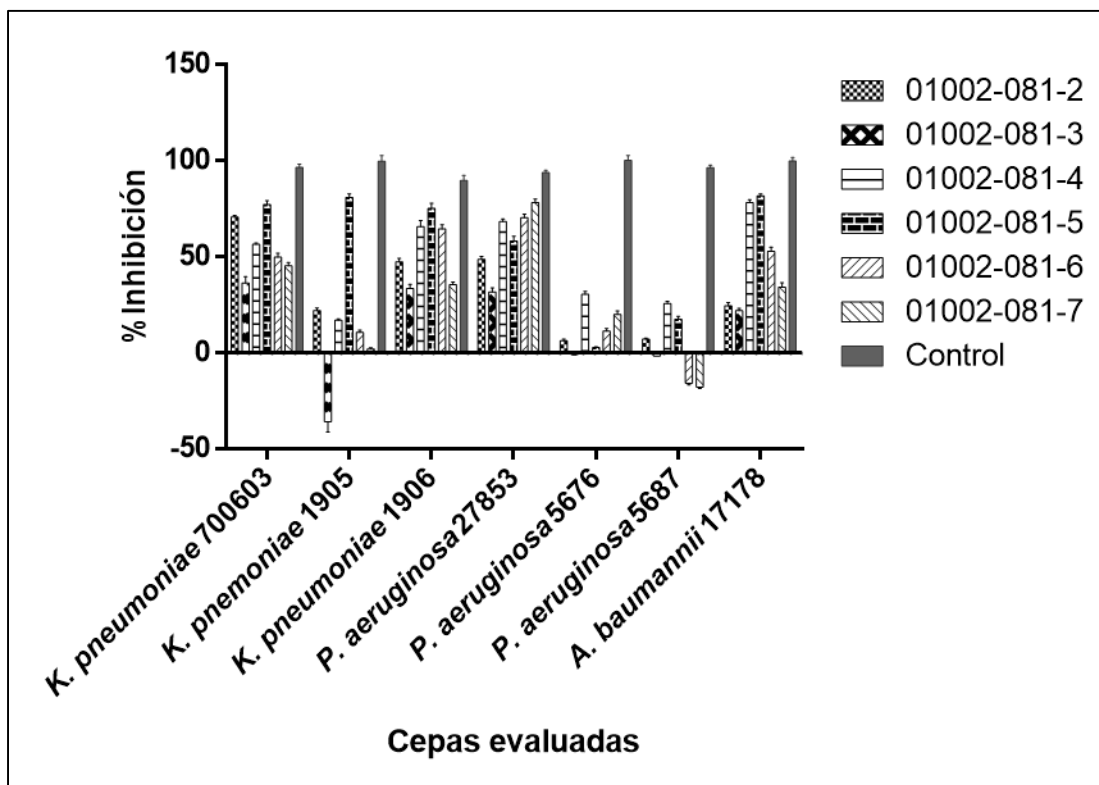


Figura 19. Árbol filogenético del microorganismo IQ-051.

## 6.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana

### 6.4.1. Resultados del ensayo inhibitorio de las fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento de *Epicoccum nigrum* (IQ-013).

Como se observa en la **Figura 20** las fracciones que presentan mayor inhibición contra las cepas de interés fueron la 01002-081-4 y la 01002-081-5. De forma individual, la primera fracción tiene una inhibición del 55% para *K. pneumoniae* ATCC, 700603, 62% para *K. pneumoniae* 1906 y 67% para *P. aeruginosa* ATCC 27853, mientras que la fracción 01002-081-5 posee una actividad por arriba del 75% para las 3 cepas de *Klebsiella*, y un 55% para *P. aeruginosa* ATCC 27853, ambas fracciones tienen una inhibición del 80% para la cepa de *A. baumannii* ATCC 17178. Estas dos fracciones se seleccionaron para continuar con su estudio químico debido a que, de las siete cepas evaluadas, estas fracciones inhibieron el crecimiento de más del 50% de los organismos de prueba.

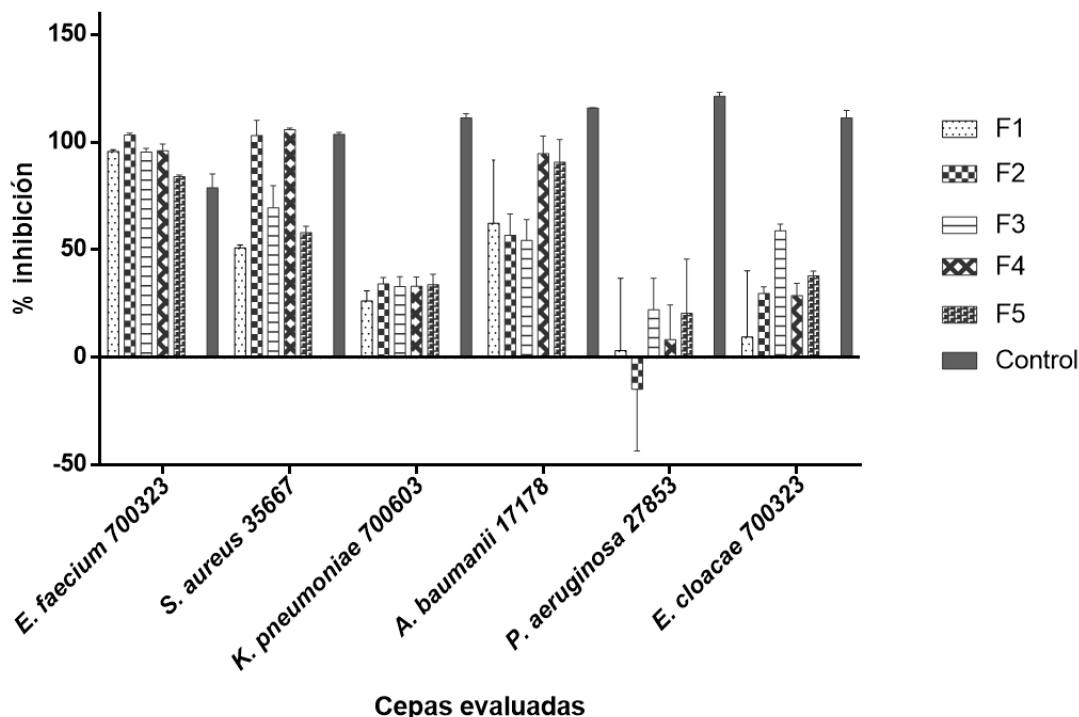


**Figura 20.** Porcentaje de inhibición de las distintas bacterias al ser expuestas a las fracciones obtenidas del extracto IQ-013 a una concentración de 200 µg/mL y utilizando gentamicina como control.

### 6.4.2. Resultados del ensayo inhibitorio de las fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento del IQ-050.

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del microorganismo IQ-050 frente a las cepas ESKAPE ATCC, ya que fue contra estas que presentó mayor porcentaje de inhibición en el ensayo preliminar. Los resultados obtenidos permitieron identificar a las fracciones F-2 y F-4 como agentes antibacterianos contra las

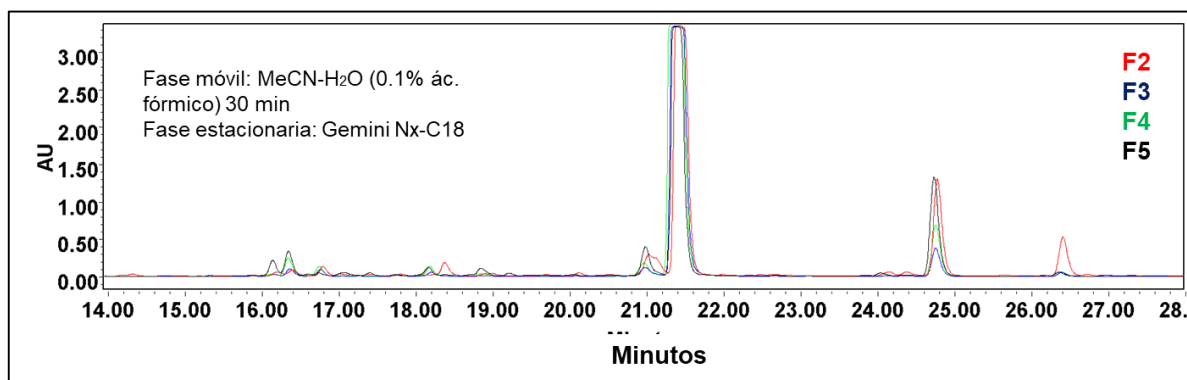
cepas de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii*, las cuales presentaron porcentajes de inhibición superiores al 50% comparados con el control de Gentamicina (**Figura 21**).



**Figura 21.** Porcentaje de inhibición de las distintas bacterias al ser expuestas a las fracciones obtenidas del extracto IQ-050 a una concentración de 200 µg/mL y utilizando gentamicina como control.

### 6.5. Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas de IQ-050.

Se analizó el perfil cromatográfico por HPLC de las fracciones F-2-F-5 (**Figura 22**) el cual hace notar que todas las fracciones presentan características similares, se observa que el tiempo de retención de los productos presentes es prácticamente el mismo y solo difieren en la proporción. Los resultados de este análisis en conjunto con los de actividad antibacteriana permiten proponer al componente mayoritario en los perfiles cromatográficos como el producto bioactivo producido por el aislamiento IQ-050.



**Figura 22.** Espectro de absorción de las fracciones del extracto IQ-050: rojo F2, Azul F3, Verde F4 y negro F5.

## 6.6 Elucidación estructural de productos puros.

### 6.5.1. Compuestos obtenidos de las fracciones del hongo IQ-050.

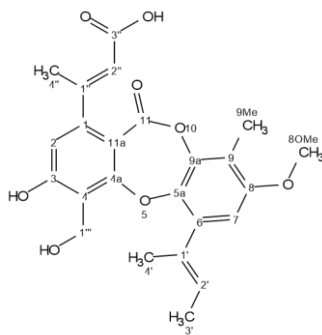
Con la finalidad de conocer la estructura química de los componentes presentes en estas fracciones (compuestos **1** y **2**), los productos se aislaron por HPLC y se caracterizaron usando un conjunto de métodos espectroscópicos (RMN de hidrógeno y carbono) y espectrométricos (espectrometría de masas de alta resolución).

En el caso del compuesto **1**, su fórmula y masa molecular se establecieron como  $C_{24}H_{24}O_8$  y 440.44 uma respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización química utilizando la técnica de análisis directo en tiempo real (EM-DART) (**Figura 23**).

Los desplazamientos químicos registrados en el espectro de RMN- $^1H$  (**Figura 24**) y RMN- $^{13}C$  (**Figura 25**) se muestran en la **Tabla 12**, y son congruentes con los reportados en la literatura,<sup>59</sup> de acuerdo a este análisis y en conjunto con los espectros bidimensionales HSQC (**Figura 26**) y HMBC (**Figura 27**) se estableció la estructura del producto natural como aurantacina A (**1**).

Los espectros de RMN en una dimensión ( $^1H$  y  $^{13}C$ ) mostraron señales para 21 hidrógenos y 24 carbonos, incluyendo:

1. Dos señales simples en  $\delta_H/\delta_C$  6.60/122.9 y 6.57/107.7 ppm correspondientes a los hidrógenos de las posiciones C-2 y C-7, respectivamente.
2. Una señal simple que integra para dos en  $\delta_H/\delta_C$  4.58/52.3, atribuible al metileno de la posición 1'''.
3. Dos señales para protones vinílicos en  $\delta_H/\delta_C$  5.57/125.8 (cuarteto doble) y 5.59/119.4 (señal simple), asignables a los protones de las posiciones H-2' y H-2'', respectivamente.
4. Una señal simple que integra para tres en  $\delta_H/\delta_C$  3.78/5.0, correspondiente al grupo metoxilo en C-8.
5. Cuatro señales con integración triple asignables a los grupos metilo de las posiciones 9-Me ( $\delta_H/\delta_C$  2.10/8.9), C-3' ( $\delta_H/\delta_C$  1.79/17.7), C-4' ( $\delta_H/\delta_C$  2.04/13.9) y C-4'' ( $\delta_H/\delta_C$  2.26/20.0).
6. Siete señales asignables a carbonos  $sp^2$  no protonados y siete señales asignables a carbonos cuaternarios con hibridación  $sp^2$ .



Aurantacina A (**1**)



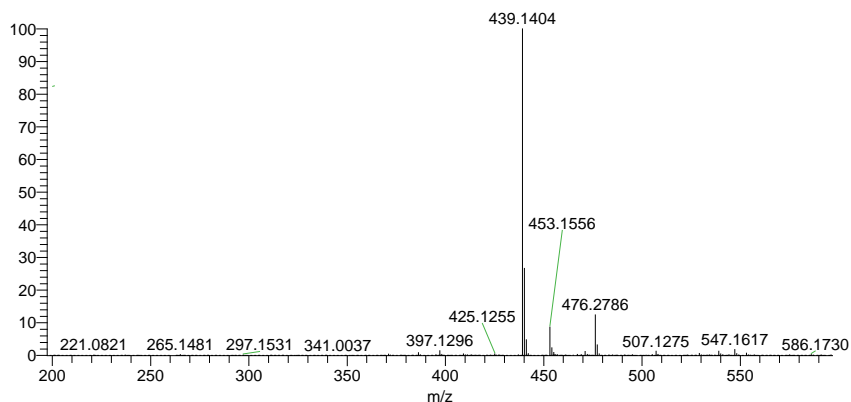


Figura 23. Espectro de masas por DART de la aurantacina A (1).

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C la Aurantacina A (1).

Posición	$\delta_C$ en ppm		$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)	
1	148.2	148.3		
2	112.8	112.9	6.65 (s)	6.60 (1H, s)
3	161.0	161.3		
4	118.6	118.8		
4a	161.8	161.9		
5a	142.3	142.3		
6	135.8	135.9		
7	107.7	107.7	6.65 (s)	6.57 (1H, s)
8	154.2	154.2		
9	116.3	116.3		
9a	142.7	142.8		
11	162.9	162.9		
11a	110.1	110.0		
1'''	52.3	52.3	4.58 (s)	4.57 (1H, s)
8-OMe	55.9	55.9	3.77 (s)	3.78 (3H, s)
9-Me	8.2	8.9	2.10 (s)	2.10 (3H, s)
1'	133.1	133.3		
2'	125.7	125.8	5.55 (qq; 6.8, 1.4)	5.57 (1H, dq; 6.8, 1.5)
3'	17.6	17.6	1.78 (dd; 6.8)	1.79 (1H, dd; 6.8, 1.4)
4'	13.7	13.8	2.05 (brs)	2.04 (1H, m)
1''	154.7	154.9		
2''	119.5	119.4	5.60 (d; 1.3)	5.59 (1H, d; 1.5)
3''	166.8	166.8		
4''	19.9	20.0	2.50 (br s)	2.26 (1H, d; 1.4)

En rojo se presentan los datos espectroscópicos obtenidos de la literatura, RMN-<sup>1</sup>H (360 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (90.7 MHz) de la aurantacina A (1) en C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>OS<sup>59</sup> y en negro los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) en C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>OS obtenidos experimentalmente.

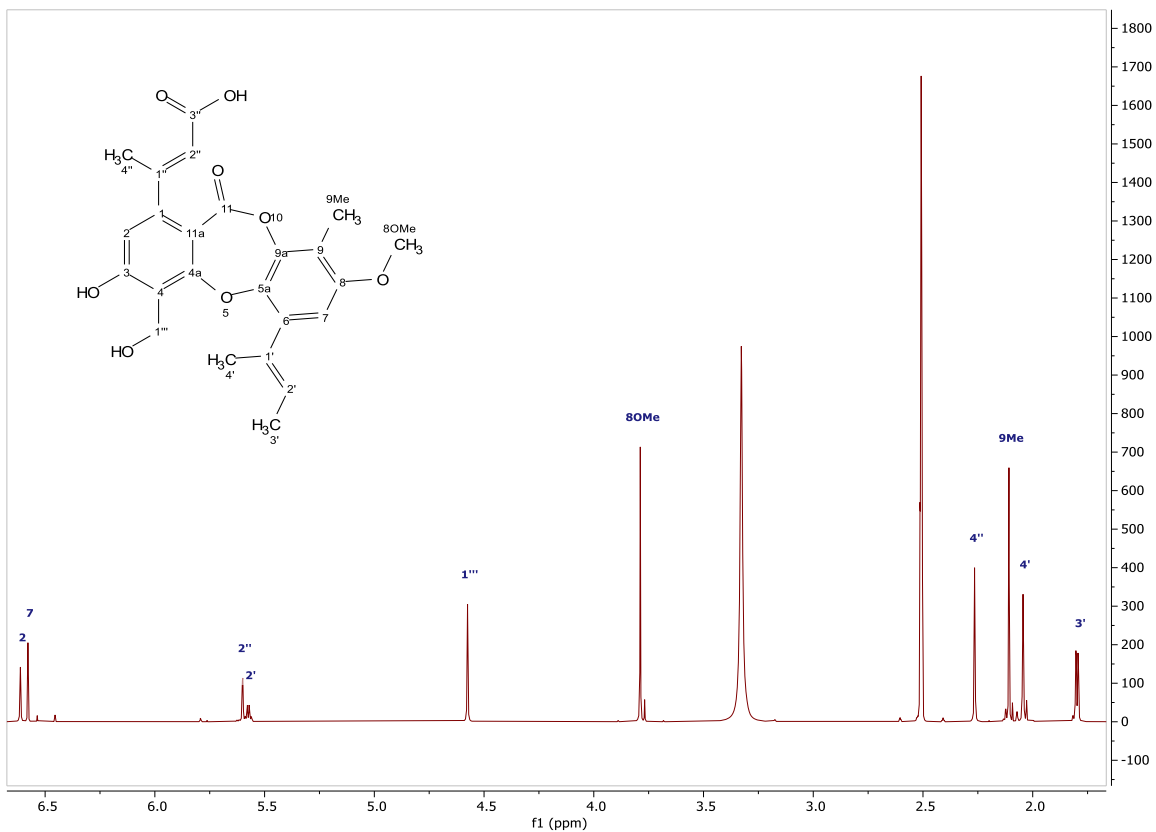


Figura 24. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>OS) de la aurantacina A (1).

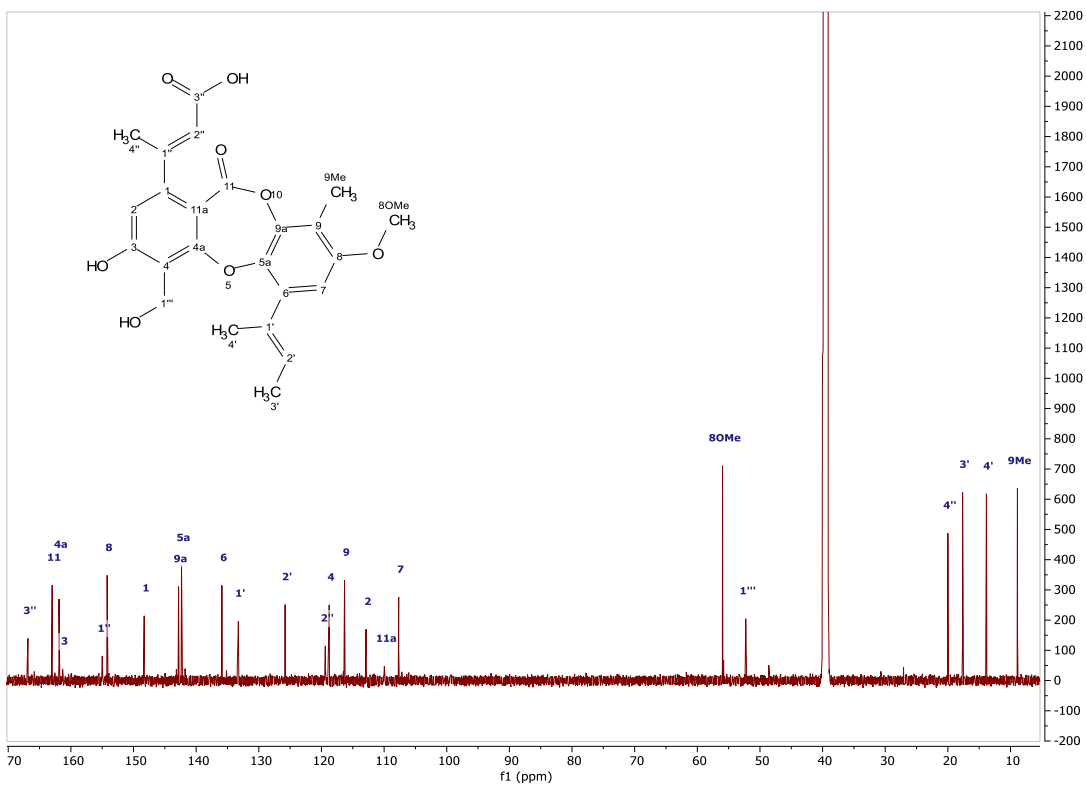


Figura 25. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz, C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>OS) de la aurantacina A (1).

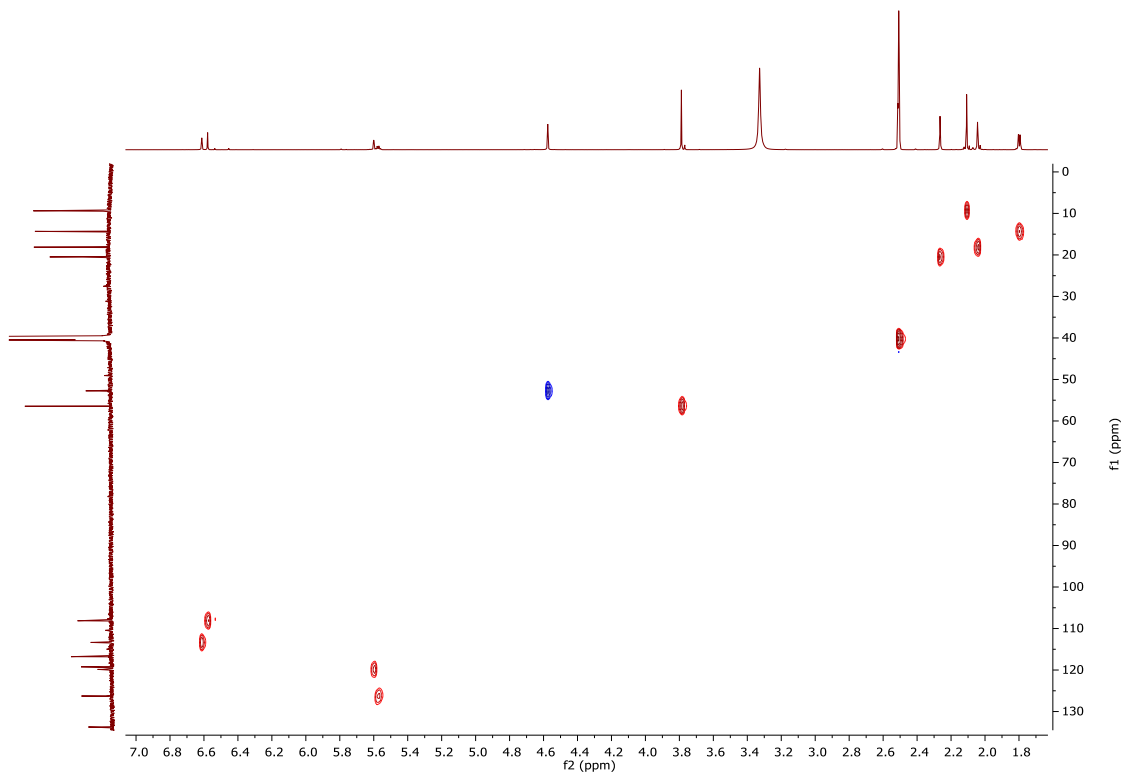


Figura 26. Espectro bidimensional HSQC de la aurantocina A (1).

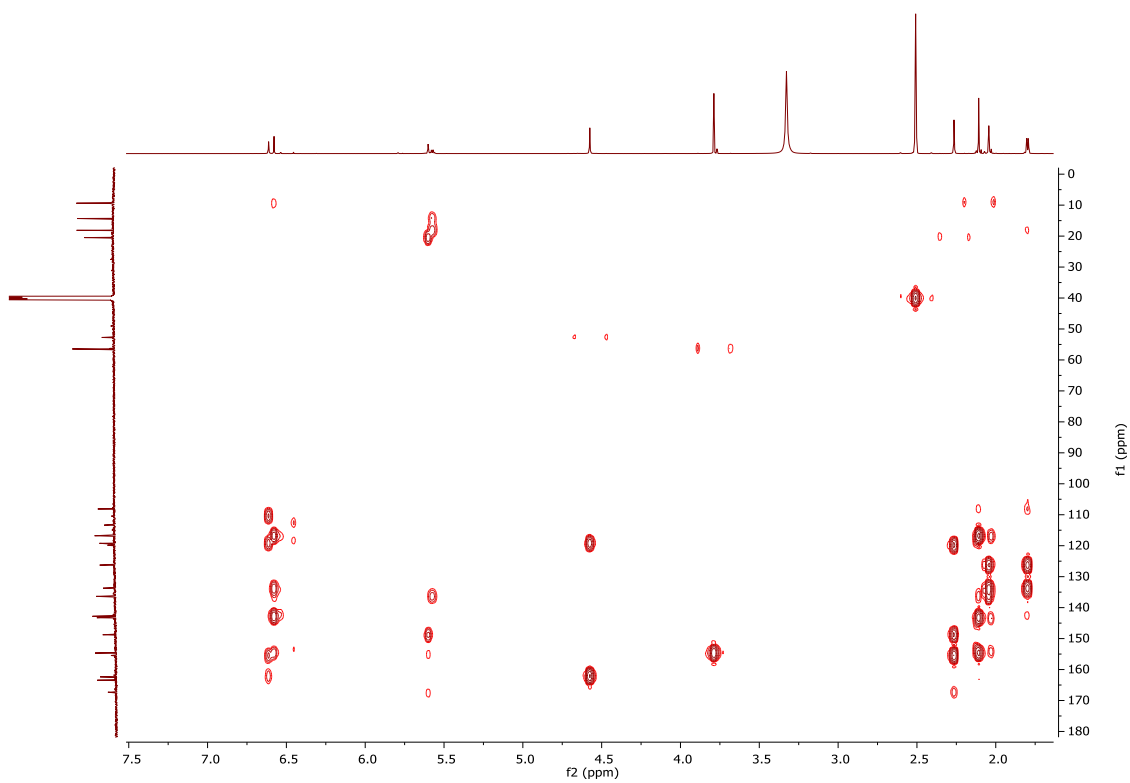
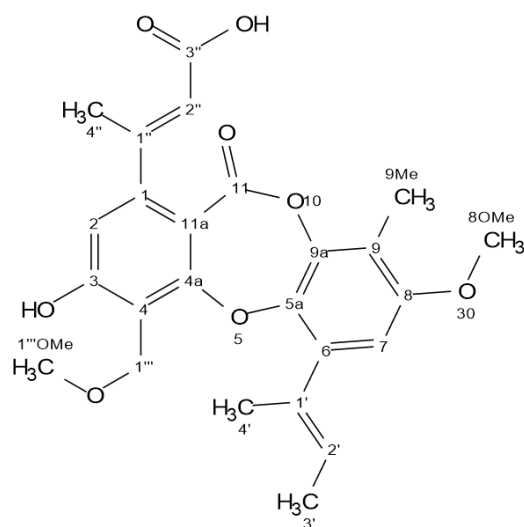


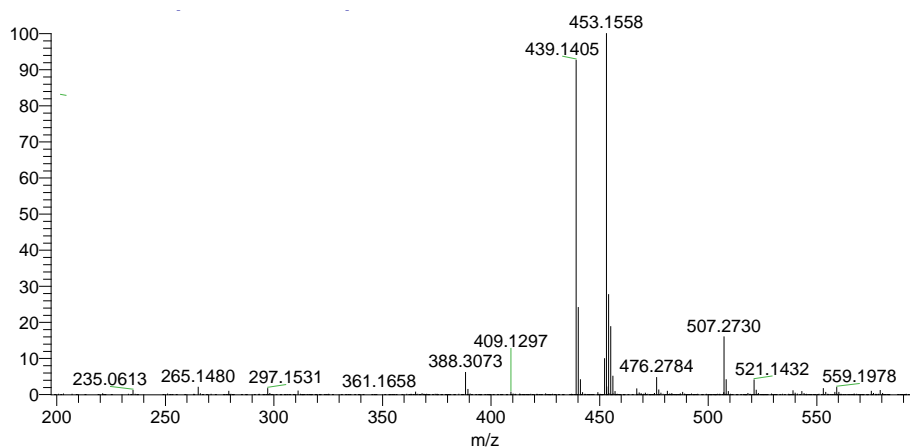
Figura 27. Espectro bidimensional HMBC de la aurantocina A (1).

La fórmula y masa molecular de la pilobolusona C (**2**) se estableció como  $C_{25}H_{26}O_8$  y 454.47 uma, respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización química utilizando la técnica de análisis directo en tiempo real (EM-DART) (**Figura 28**).

En la **Tabla 13** se presentan los desplazamientos registrados en el espectro de RMN- $^1H$  (**Figura 29**) y RMN- $^{13}C$  (**Figura 30**) para el producto **2**, los cuales corresponden con los reportados en la literatura para la pilobolusona C (**2**).<sup>60</sup> La estructura inequívoca de esta sustancia se estableció utilizando los espectros bidimensionales HSQC (**Figura 31**) y HMBC (**Figura 32**).



Pilobolusona C (**2**)



**Figura 28.** Espectro de masas por DART de la pilobolusona C (**2**).

**Tabla 13.** Datos espectroscópicos de RMN-1H (700 MHz) y RMN-13C (175 MHz) de la Pilobolusona C (**2**) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	$\delta_C$ en ppm	$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)
1	150.2	149.3
2	112.3	112.6
3	161.4	160.4
4	114.7	117.8
4a	163.0	160.9
5a	142.6	142.6
6	136.2	135.5
7	107.5	107.5
8	154.9	154.8
9	117.1	114.2
9a	143.0	143.2
11	163.9	163.1
11a	110.9	112.2
9Me	7.7	9.1
1'	133.9	133.9
2'	125.6	125.9
3'	16.7	18.0
4'	12.8	14.1
1''	156.2	158.8
2''	119.1	118.1
3''	167.9	168.1
4''	19.4	20.8
1'''	57.0	58.9
8OCH <sub>3</sub>	55.1	55.9
1'''OCH <sub>3</sub>	62.8	69.0

En rojo se presentan los datos espectroscópicos obtenidos de la literatura, RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) de la pilobolusona C (**2**) en CD<sub>3</sub>OD<sup>60</sup> y en negro los datos espectroscópicos de RMN-1H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) en CDCl<sub>3</sub> obtenidos experimentalmente.

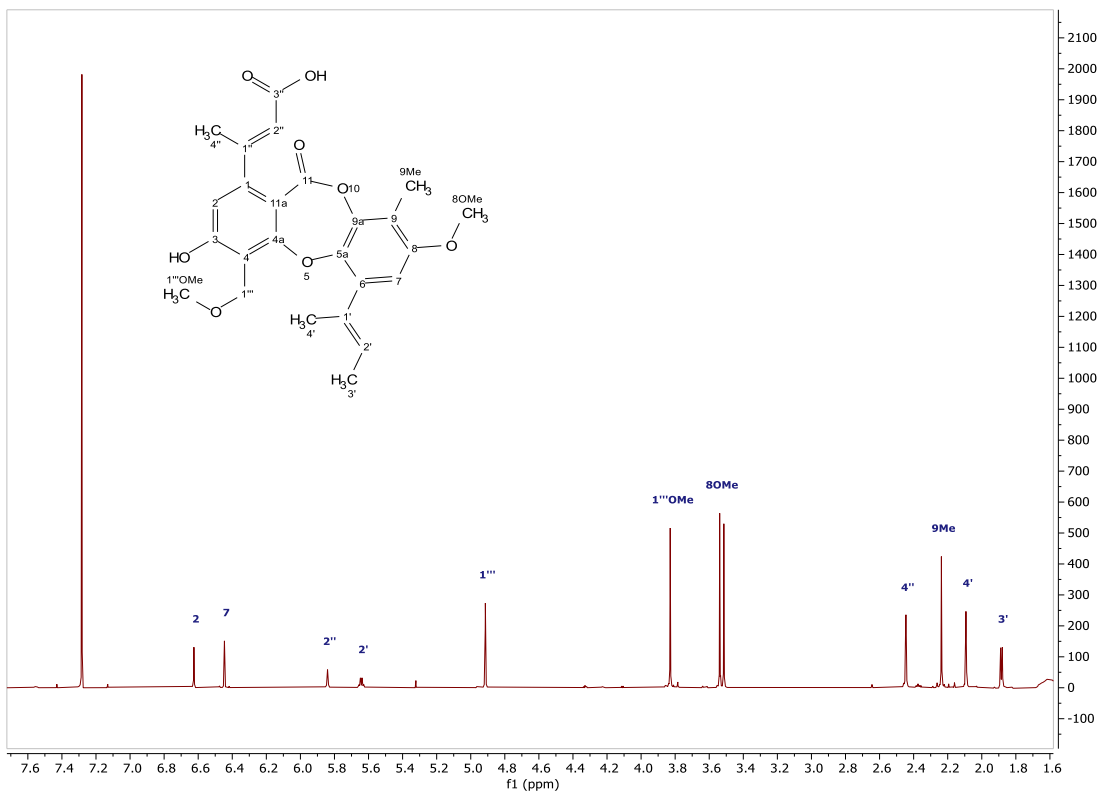


Figura 29. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la pilobolusona C (2).

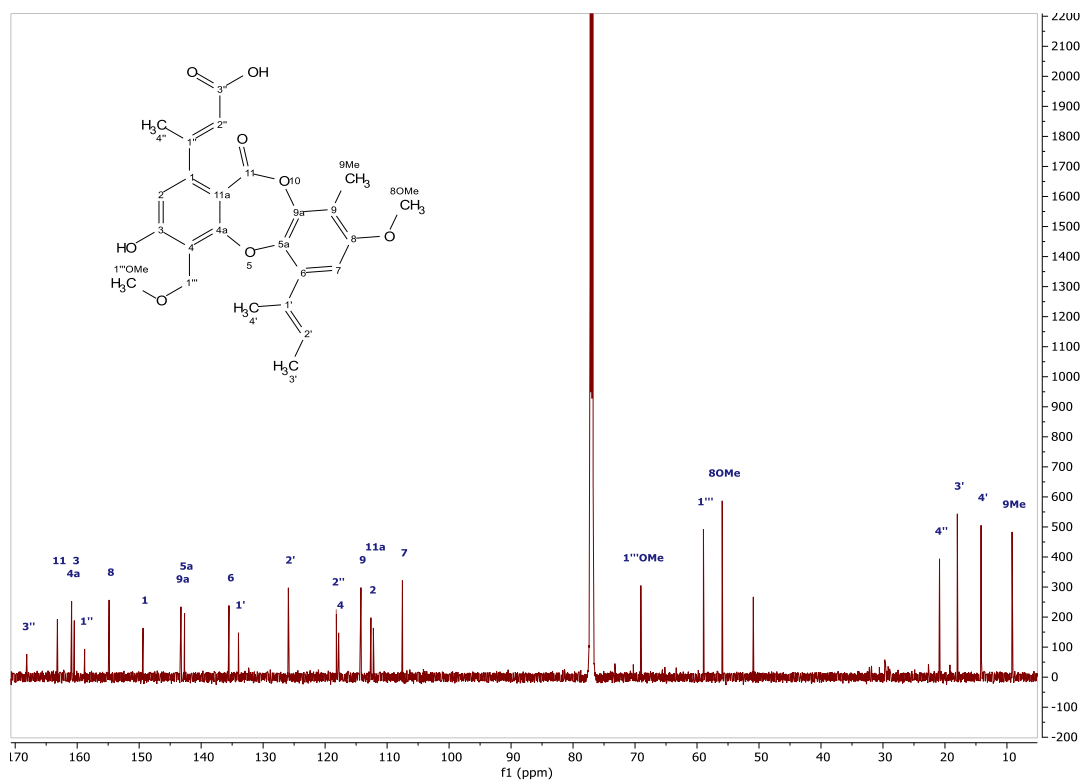
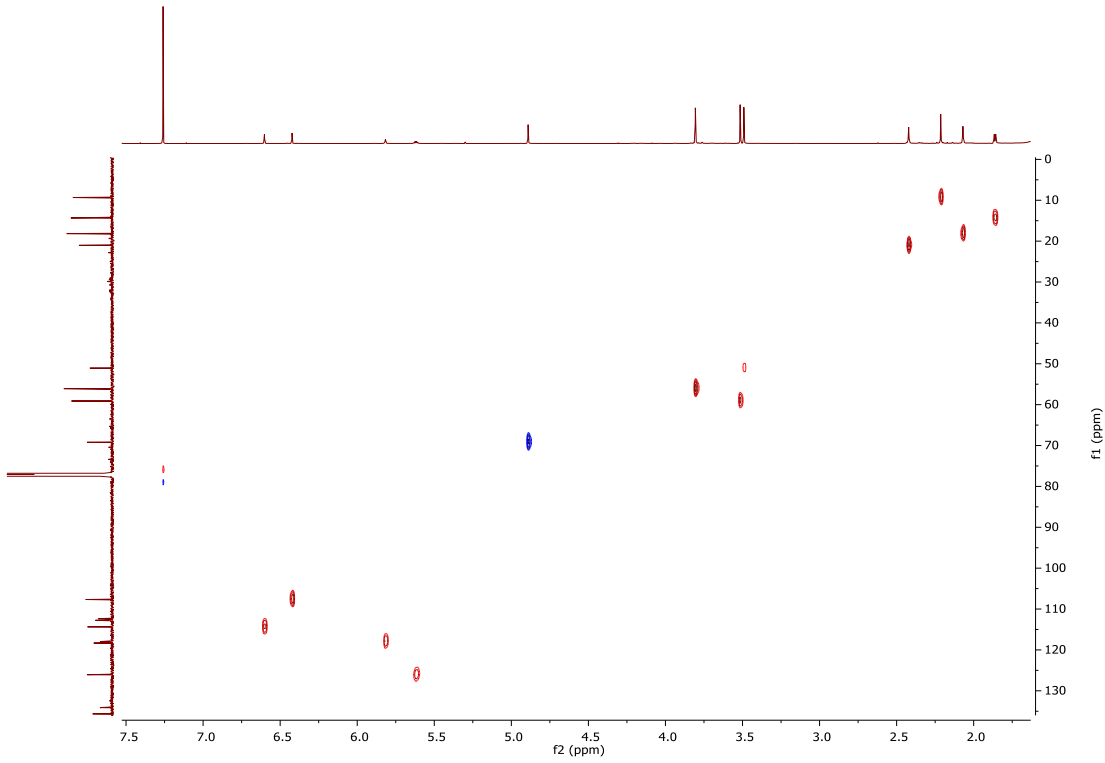
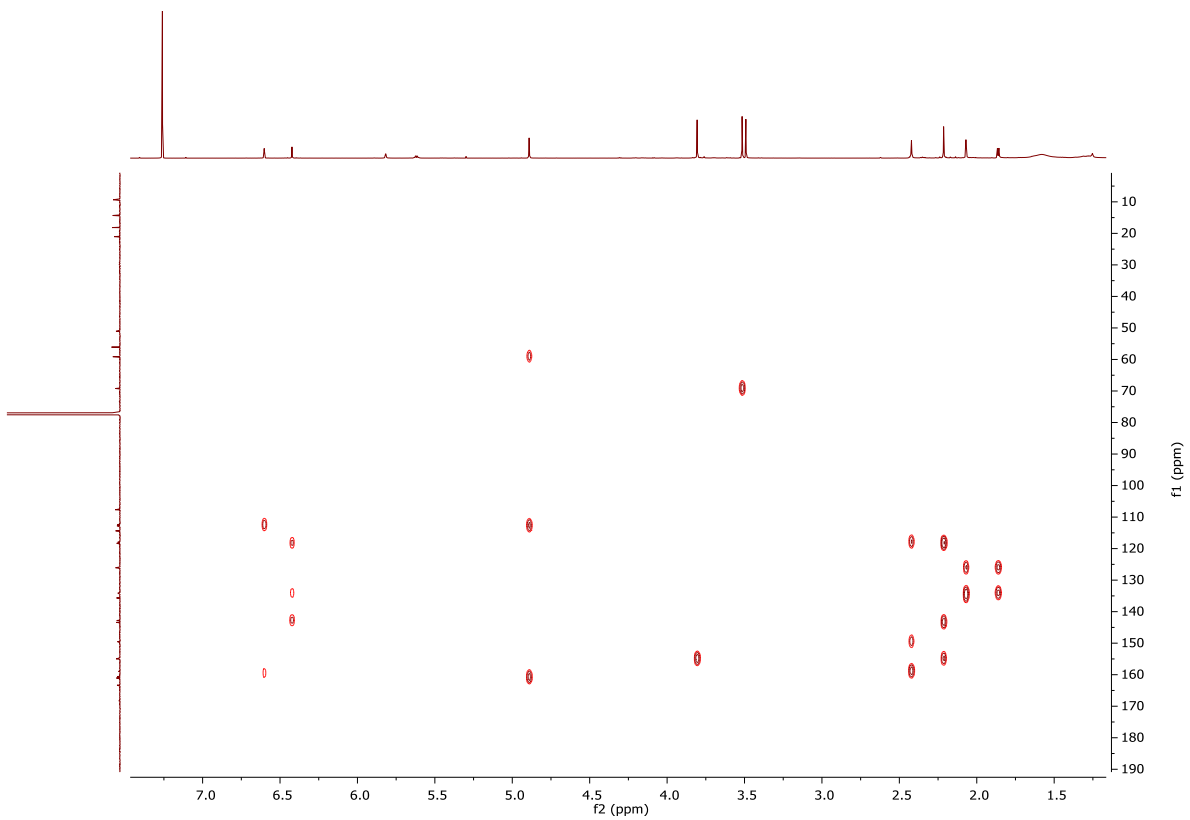


Figura 30. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la pilobolusona C (2).



**Figura 31.** Espectro bidimensional HSQC de la pilobolusona C (2).



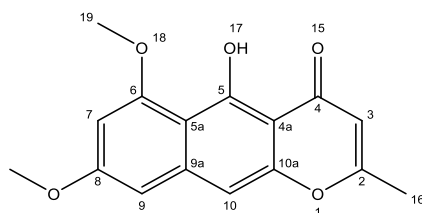
**Figura 32.** Espectro bidimensional HMBC de la pilobolusona C (2).

Ambos productos (**1** y **2**) han sido reportados como antimaláricos. Sin embargo, existe un número limitado de estudios sobre la actividad biológica de la pilobolusona C (**2**) y ninguno hasta el momento ha evaluado su actividad como antibacteriano, en contraste, la aurantacina A (**1**) se ha descrito como antibiótico frente a cepas de *Bacillus sibtillis* y *S. aureus*.<sup>46,61, 62</sup>

### 6.5.2. Compuestos obtenidos de las fracciones del hongo IQ-051.

En colaboración con la Q.F.B. Diana Arellano Vilchis, se realizó el estudio químico del extracto orgánico del aislamiento IQ-051 cultivado en medio sólido. Esta investigación permitió el aislamiento de cuatro metabolitos secundarios. Los productos obtenidos a partir de las fracciones del microorganismo se caracterizaron usando una combinación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los resultados obtenidos de los análisis permitieron identificar a los compuestos como la rubrofusarina B (**3**), aurasperona A (**4**), la fonsecinona A (**5**) y la asperpirona B (**6**), los cuales químicamente se ubican en el grupo de las nafto- $\gamma$ -pironas (NGPs), un importante grupo de policétidos aromáticos que han sido ampliamente reportados de aislamientos de *A. niger* provenientes de una extensa variedad de hábitats.<sup>49</sup>

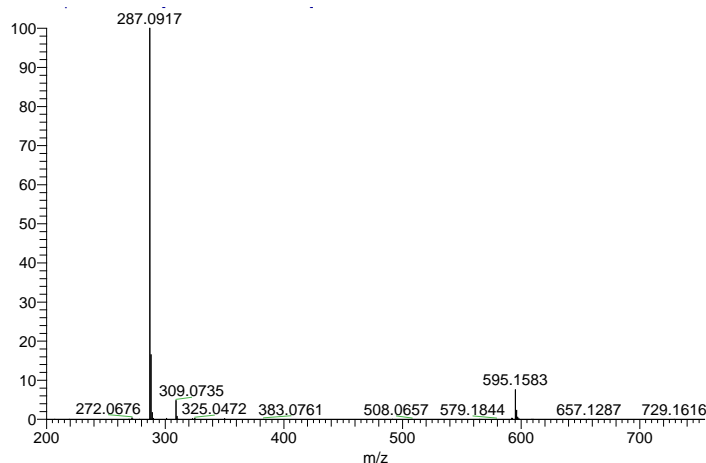
A continuación, se describe la elucidación estructural de los compuestos antes mencionados.



Rubrofusarina B (**3**)

La fórmula y masa molecular de la rubrofusarina B (**3**) se estableció como  $C_{16}H_{14}O_5$  y 286 una respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por electrospray (EM-ESI) (**Figura 33**).





**Figura 33.** Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) la rubrofusarina B.

Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 34**) y RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 35**) se muestran en la **Tabla 14** y son congruentes con los reportados en la literatura<sup>63</sup>. La estructura inequívoca del producto **3** se corroboró a través del análisis de los espectros de RMN bidimensionales de HSQC (**Figura 36**) y HMBC.

**Tabla 14.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de la rubrofusarina B (**3**) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	$\delta_C$ en ppm		$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)	
<b>2</b>	167.4	167.4		
<b>3</b>	107.4	107.4	6.00 (1H, s)	6.00 (1H, s)
<b>4</b>	184.3	184.3		
<b>5-OH</b>	162.7	162.7	14.96 (1H, s)	14.96 (1H, s)
<b>6</b>	160.6	160.7		
<b>7</b>	97.3	97.3	6.40 (1H, d, 2.2)	6.40 (1H, d, 2.2)
<b>8</b>	161.5	161.6		
<b>9</b>	97.8	97.9	6.59 (1H, d, 2.2)	6.59 (1H, d, 2.2)
<b>10</b>	101.1	104.1	6.97 (1H, s)	6.97 (1H, s)
<b>10a</b>	153.3	153.4		
<b>4a</b>	104.4	104.4		
<b>5a</b>	108.4	108.5		
<b>9a</b>	141.1	141.1		
<b>2-Me</b>	20.7	20.8	2.37 (3H, s)	2.36 (3H, s)
<b>6-MeO</b>	56.1	56.1	4.00 (3H, s)	4.00 (3H, s)
<b>8-MeO</b>	55.4	55.4	3.93 (3H, s)	3.92 (3H, s)

En rojo se presentan los datos obtenidos de la literatura, datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz)<sup>64</sup> y RMN-<sup>13</sup>C (20.1 MHz)<sup>63</sup> de la rubrofusarina B (**3**) en CDCl<sub>3</sub> y en negro los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz) en CDCl<sub>3</sub> obtenidos experimentalmente.

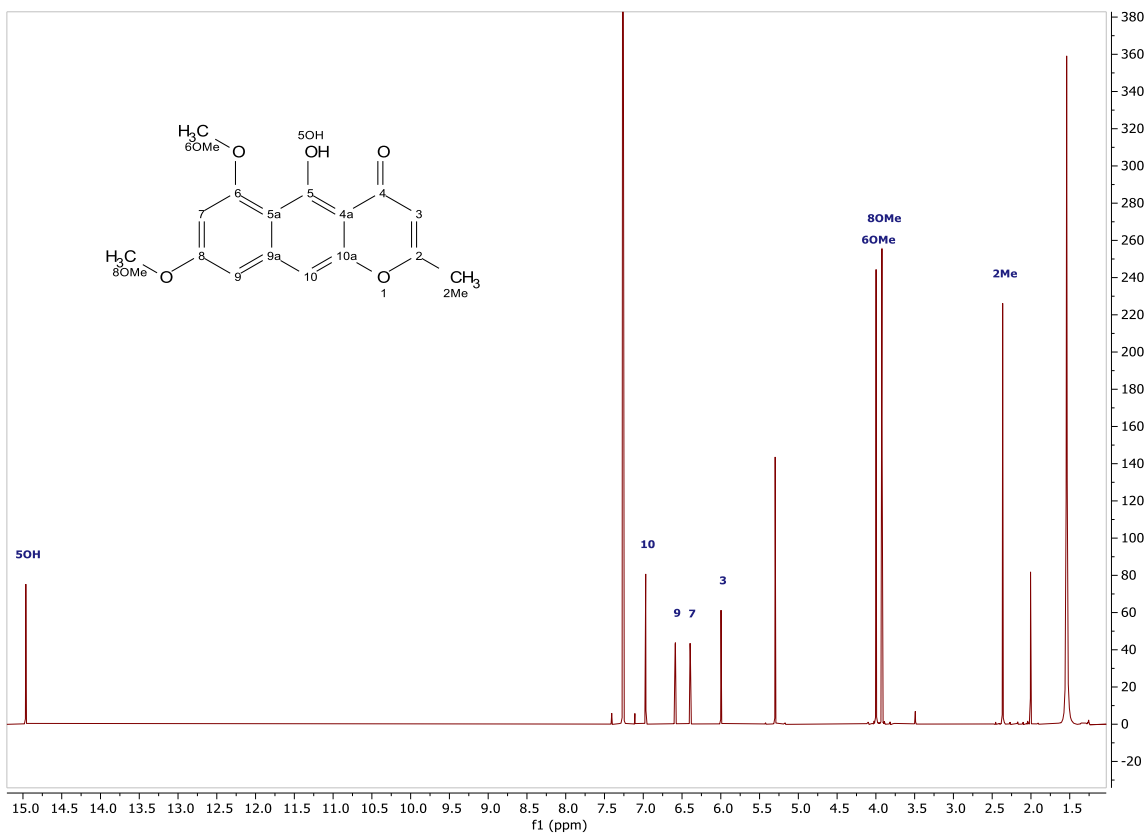


Figura 34. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la rubrofusarina B (3).

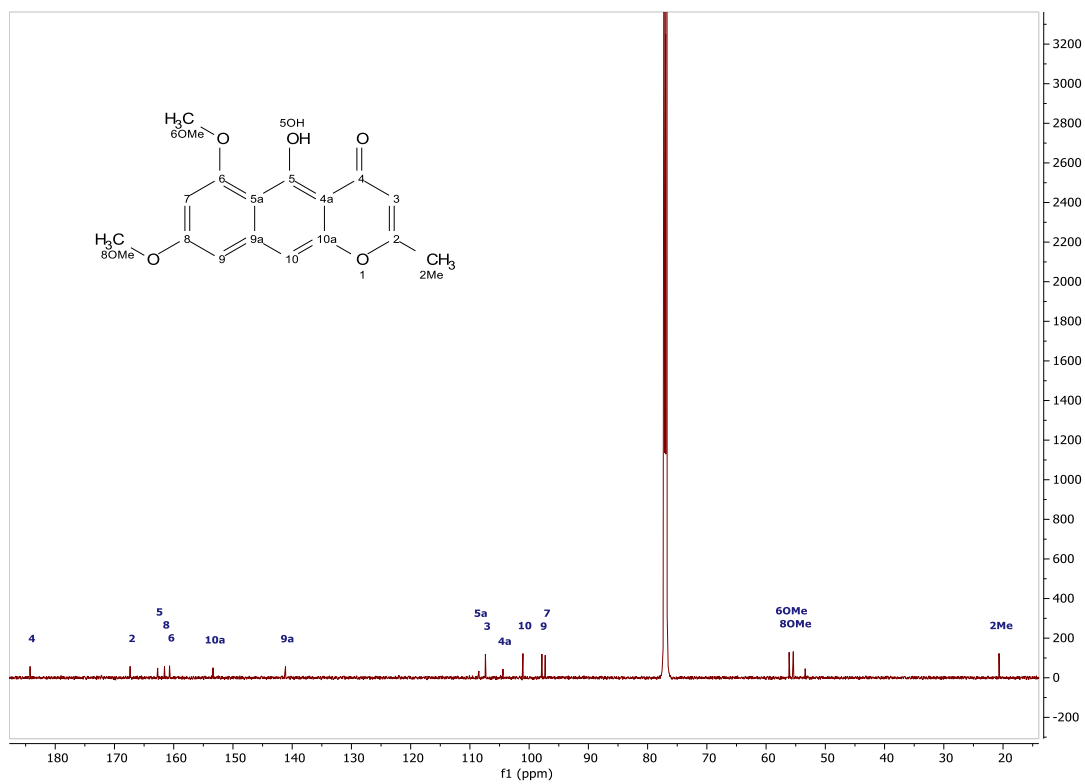
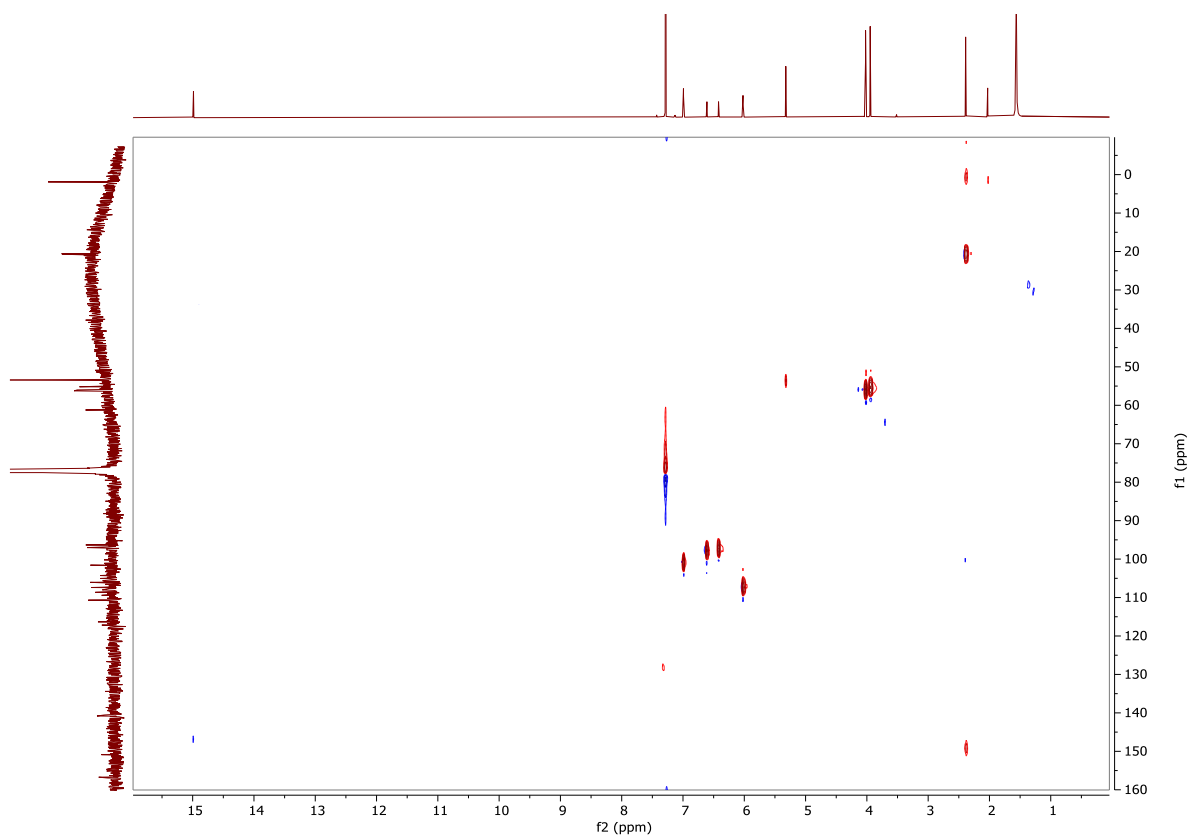
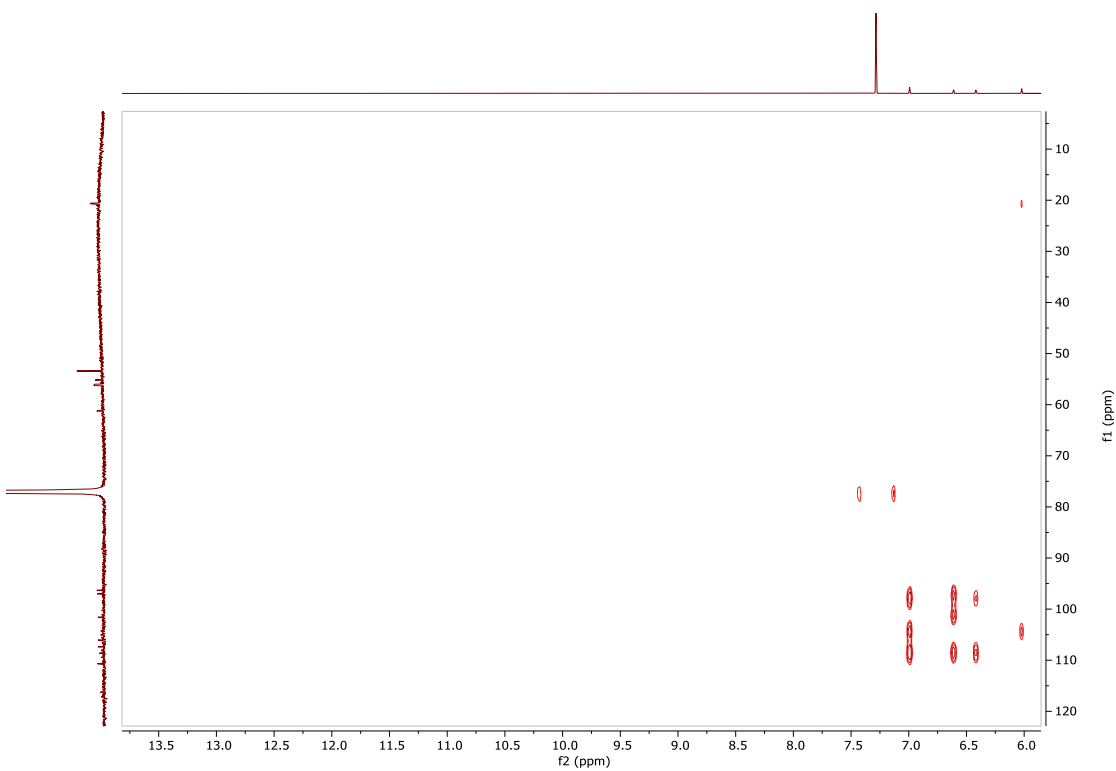


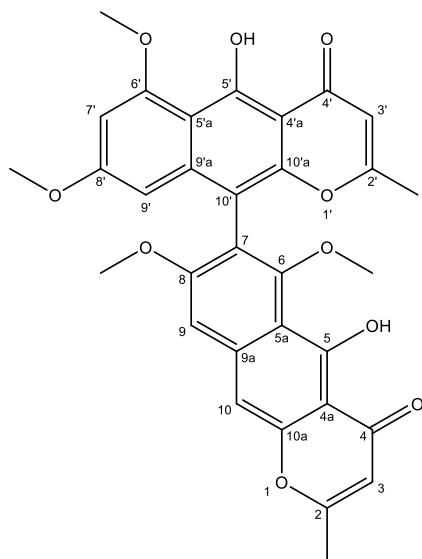
Figura 35. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la rubrofusarina B (3).



**Figura 36.** Espectro bidimensional HSQC de la rubrofusarina B (3).

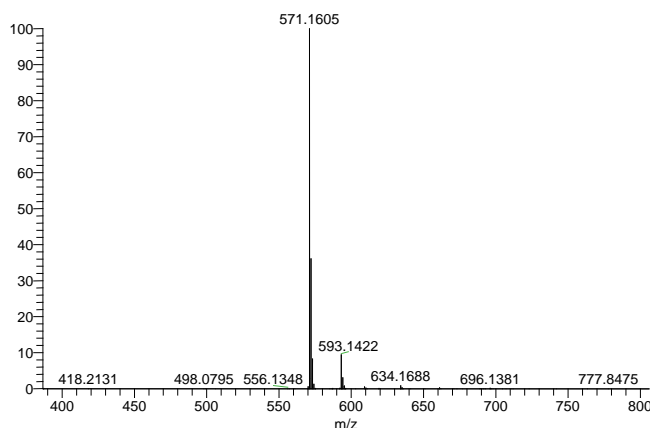


**Figura 37.** Espectro bidimensional HMBC de la rubrofusarina B (3).



Aurasperona A (**4**)

La fórmula y masa molecular de la aurasperona A (**4**) se estableció como  $C_{32}H_{26}O_{10}$  y 570 una respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por electrospray (EM-ESI) (**Figura 38**).



**Figura 38.** Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) para la aurasperona A (**4**).

Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- $^1H$  (**Figura 39**) y RMN- $^{13}C$  (**Figura 40**) se muestran en la **Tabla 15** y son congruentes con los reportados en la literatura<sup>65</sup>, de acuerdo a este análisis y en conjunto con los espectros bidimensionales HSQC (**Figura 30**) y HMBC (**Figura 31**) se llegó a la estructura del producto natural elucidado como la aurasperona A (**4**).

**Tabla 15.** Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de la aurasperona A (**4**).

Posición	$\delta_C$ en ppm		$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)	
	Rojo	Negro	Rojo	Rojo
<b>2</b>	167.6	167.6		
<b>2-CH<sub>3</sub></b>	20.8	20.8	2.42 (3H, s)	2.42 (3H, s)
<b>3</b>	107.4	107.4	6.06 (1H, s)	6.05 (1H, s)
<b>4</b>	184.5	184.4		
<b>4a</b>	104.6	104.7		
<b>5-OH</b>	161.9	162.0	14.84 (1H, s)	14.83 (1H, s)
<b>5a</b>	111.4	111.5		
<b>6</b>	158.4	158.6		
<b>6-OCH<sub>3</sub></b>	61.9	62.0	3.46 (3H, s)	3.46 (3H, s)
<b>7</b>	117.6	117.6		
<b>8</b>	160.1	160.2		
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	55.8	55.9	3.79 (3H, s)	3.79 (3H, s)
<b>9</b>	101.3	101.3	6.97 (1H, s)	6.97 (1H, s)
<b>9a</b>	140.8	140.7		
<b>10</b>	101.2	101.2	7.16 (1H, s)	7.15 (1H, s)
<b>10a</b>	153.3	153.4		
<b>2'</b>	167.5	167.5		
<b>2'-CH<sub>3</sub></b>	20.6	20.7	2.12 (3H, s)	2.12 (3H, s)
<b>3'</b>	107.2	107.3	5.98 (1H, s)	5.98 (1H, s)
<b>4'</b>	184.6	184.6		
<b>4'a</b>	104.2	104.3		
<b>5'-OH</b>	162.6	162.7	15.26 (1H, s)	15.23 (1H, s)
<b>5'a</b>	108.5	108.6		
<b>6'</b>	160.9	161.1		
<b>6'-OCH<sub>3</sub></b>	56.2	56.2	4.03 (3H, s)	4.03 (3H, s)
<b>7'</b>	96.8	96.9	6.41 (1H, d, 2.2)	6.21 (1H, d, 2.2)
<b>8'</b>	161.4	161.4		
<b>8'-OCH<sub>3</sub></b>	55.1	55.1	3.62 (3H, s)	3.62 (3H, s)
<b>9'</b>	96.4	96.5	6.20 (1H, d, 2.2)	6.41 (1H, d, 2.2)
<b>9'a</b>	140.5	140.6		
<b>10'</b>	105.1	105.2		
<b>10'a</b>	150.7	150.8		

En rojo se presentan los datos obtenidos de la literatura, datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup>H (400 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) de la aurasperona A (**4**) en CDCl<sub>3</sub><sup>65</sup> y en negro los datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) en CDCl<sub>3</sub> obtenidos experimentalmente.

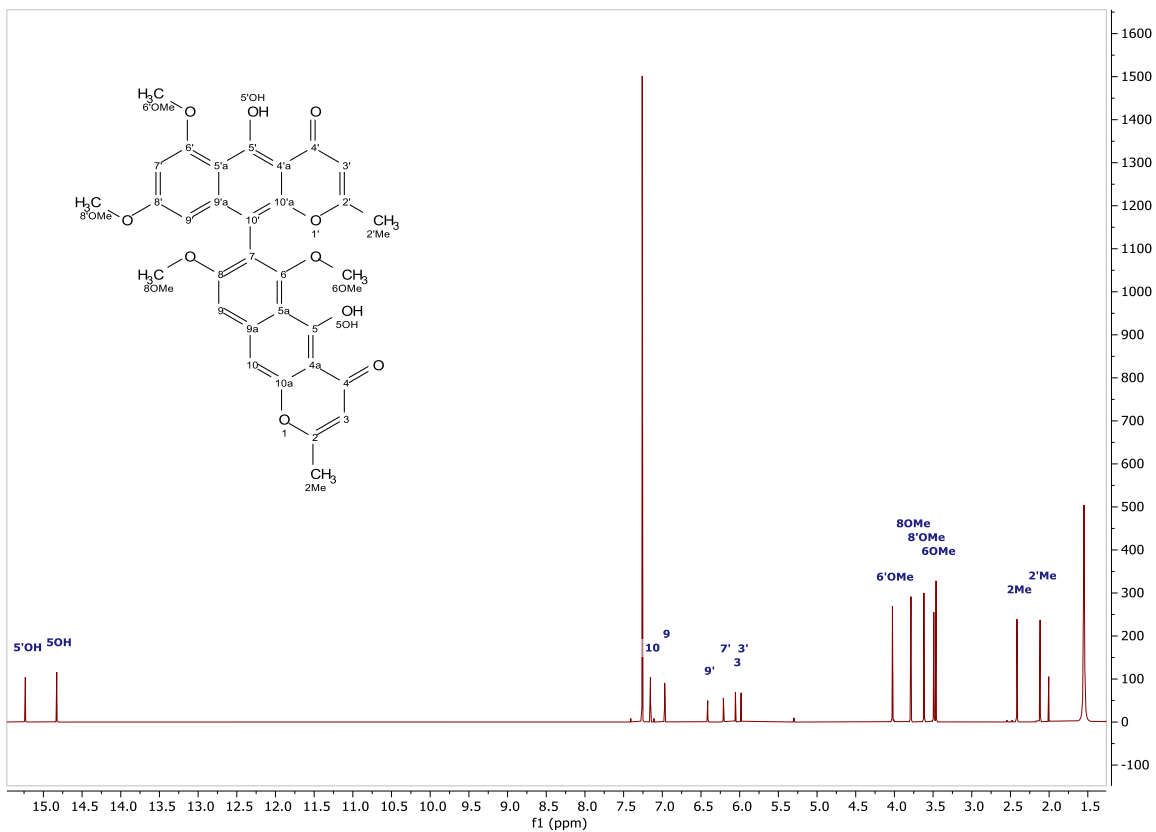


Figura 39. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la aurasperona A (4).

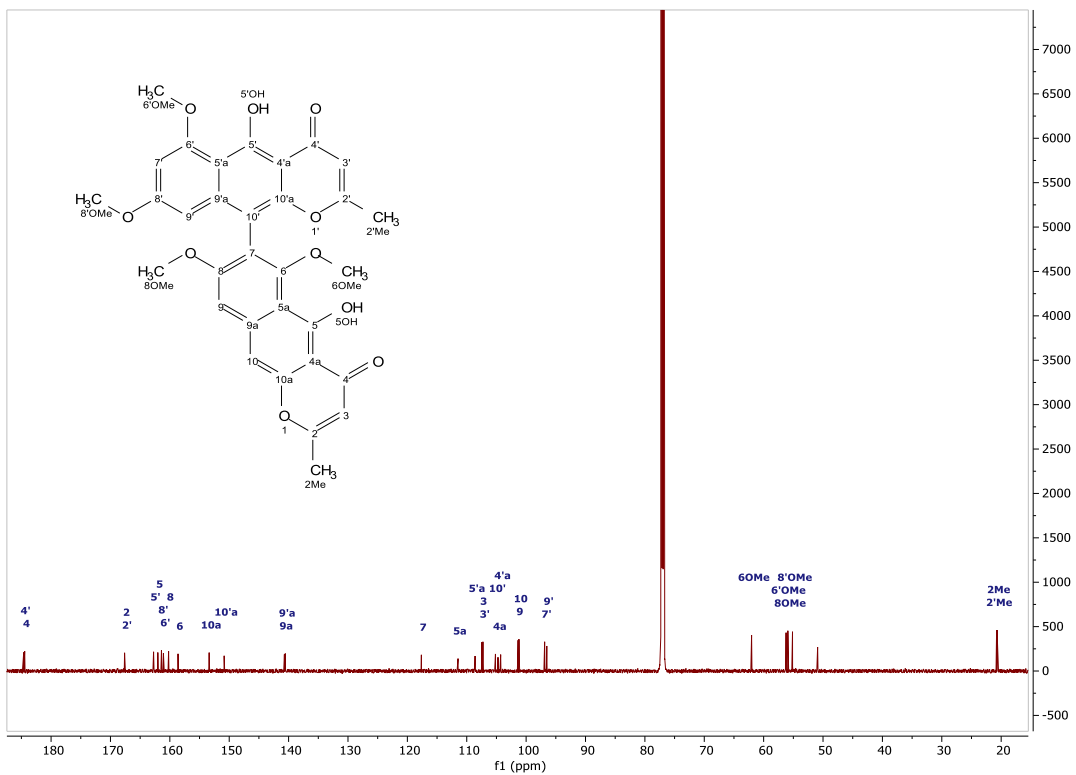
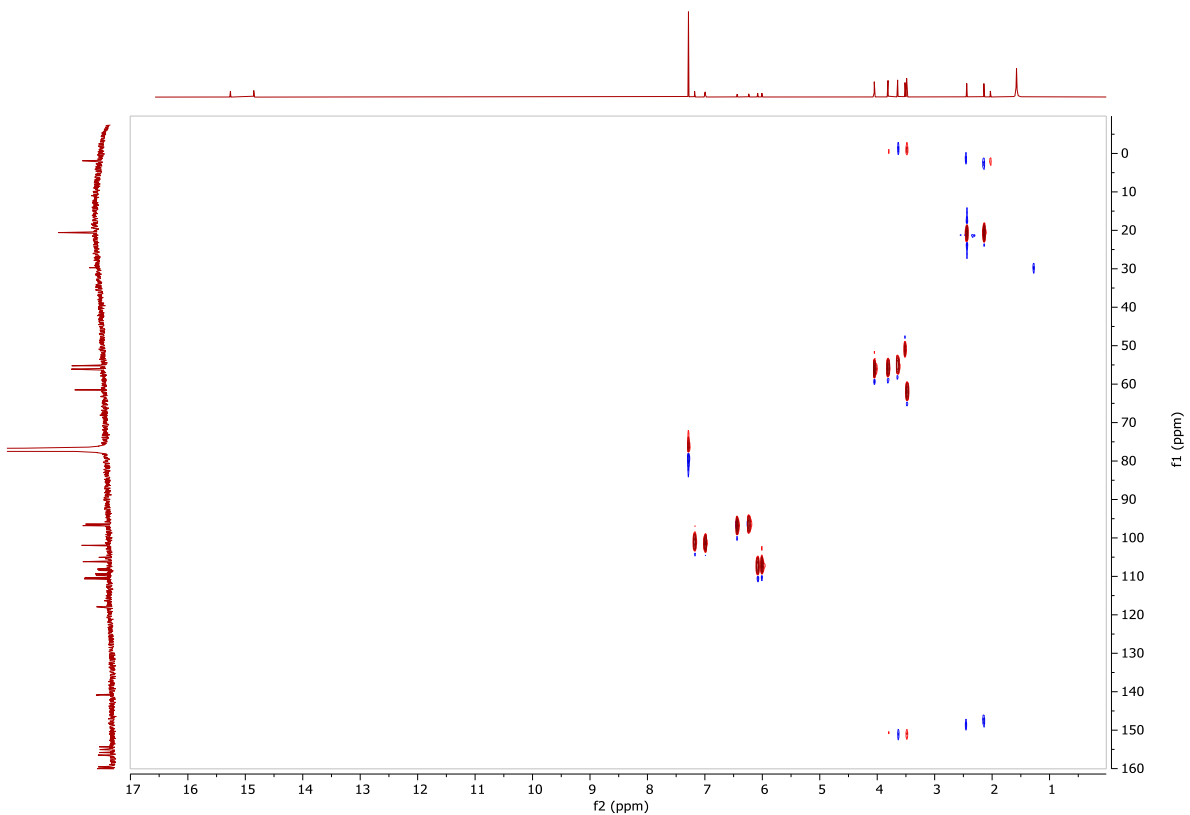
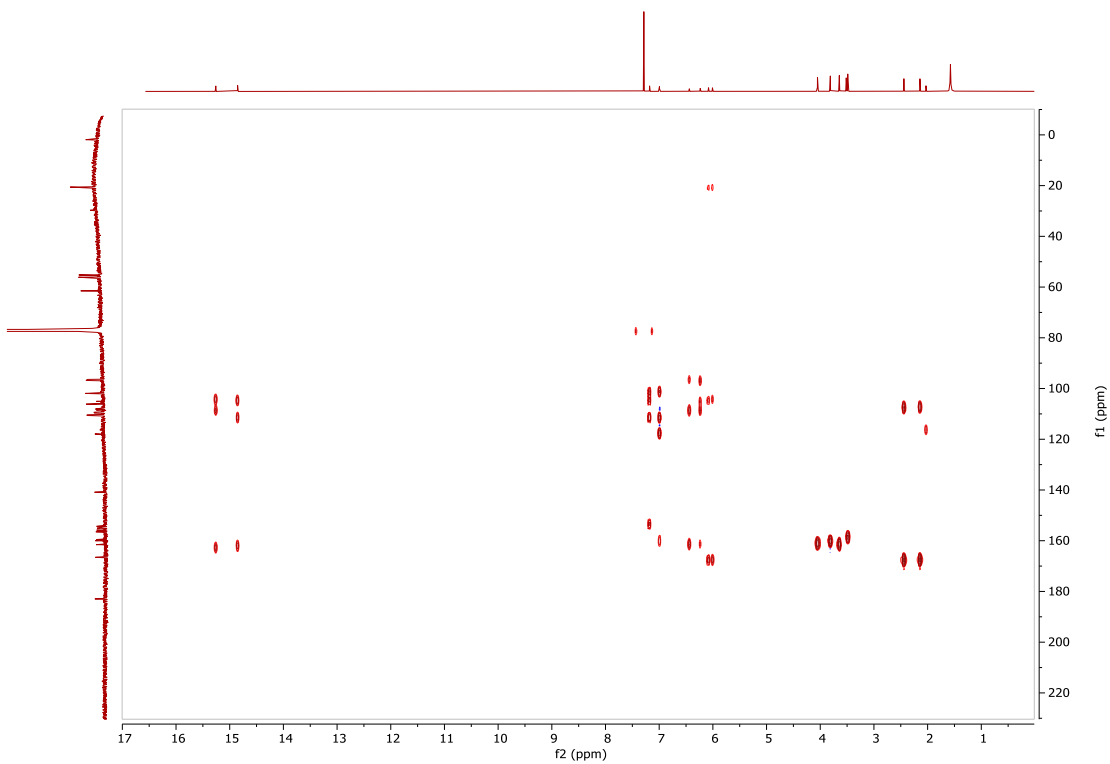


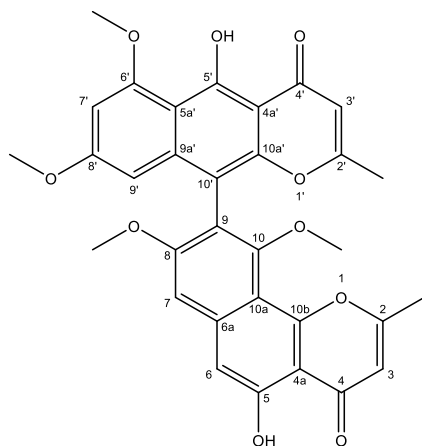
Figura 40. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la aurasperona A (4).



**Figura 41.** Espectro bidimensional HSQC de la aurasperona A (4).



**Figura 42.** Espectro bidimensional HMBC de la aurasperona A (4).



Fonsecinona A (5)

La fórmula y masa molecular de la fonsecinona A (5) se estableció como  $C_{32}H_{26}O_{10}$  y 570 una respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por electrospray (EM-ESI) (Figura 43).

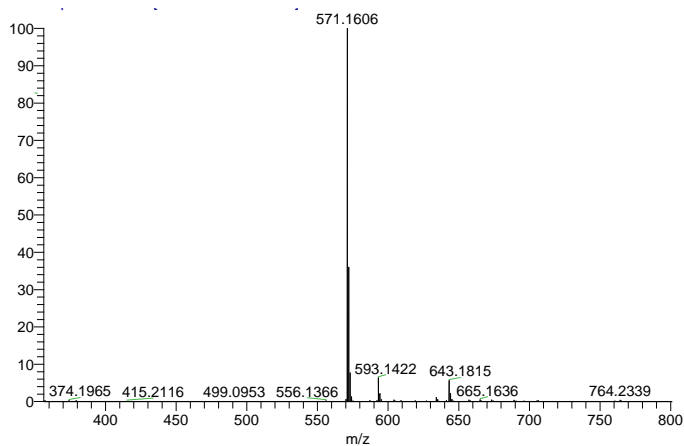


Figura 43. Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) para la fonsecinona A (5).

Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- $^1H$  (Figura 44) y RMN- $^{13}C$  (Figura 45) se muestran en la Tabla 16, y son congruentes con los reportados en la literatura, de acuerdo a este análisis y en conjunto con los espectros bidimensionales HSQC (Figura 46) y HMBC (Figura 47) se llegó a la estructura del producto natural elucidado como la fonsecinona A (5).



**Tabla 16.** Datos espectroscópicos de RMN-1H y RMN-<sup>13</sup>C de la fonsecinona A (**5**).

Posición	$\delta_C$ en ppm		$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)	
<b>2</b>	167.5	167.5		
<b>2-CH<sub>3</sub></b>	20.6	20.6	2.48 (3H, s)	2.48 (3H, s)
<b>3</b>	110.7	110.7	6.33 (1H, s)	6.33 (1H, s)
<b>4</b>	183.0	183.0		
<b>4a</b>	109.4	109.4		
<b>5-OH</b>	156.7	156.7	12.83 (1H, s)	12.83 (1H, s)
<b>6</b>	106.1	106.0	7.06 (1H, s)	7.05 (1H, s)
<b>6a</b>	140.8	140.8		
<b>7</b>	101.6	101.6	6.97 (1H, s)	6.97 (1H, s)
<b>8</b>	160.0	160.0		
<b>8-OCH<sub>3</sub></b>	56.0	56.0	3.78 (3H, s)	3.78 (3H, s)
<b>9</b>	117.2	117.2		
<b>10</b>	156.9	156.9		
<b>10-OCH<sub>3</sub></b>	61.3	61.2	3.42 (3H, s)	3.43 (3H, s)
<b>10a</b>	108.0	108.0		
<b>10b</b>	155.1	155.1		
<b>2'</b>	166.9	166.8		
<b>2'-CH<sub>3</sub></b>	20.7	20.7	2.13 (3H, s)	2.12 (3H, s)
<b>3'</b>	107.4	107.4	6.00 (1H, s)	6.00 (1H, s)
<b>4'</b>	184.6	184.6		
<b>4'a</b>	104.3	104.4		
<b>5'-OH</b>	162.8	162.8	15.24 (1H, s)	15.24 (1H, s)
<b>5'a</b>	108.6	108.6		
<b>6'</b>	161.1	161.1		
<b>6'-OCH<sub>3</sub></b>	56.3	56.3	4.03 (3H, s)	4.03 (3H, s)
<b>7'</b>	97.0	97.0	6.17 (1H, d, 2.2)	6.19 (1H, d, 2.2)
<b>8'</b>	161.6	161.6		
<b>8'-OCH<sub>3</sub></b>	55.2	55.2	3.61 (3H, s)	3.62 (3H, s)
<b>9'</b>	96.3	96.3	6.42 (1H, d, 2.2)	6.43 (1H, d, 2.2)
<b>9'a</b>	140.6	140.7		
<b>10'</b>	105.0	105.0		
<b>10'a</b>	150.8	150.8		

En rojo se presentan los datos obtenidos de la literatura, datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) de la fonsecinona A (**5**) en CDCl<sub>3</sub><sup>65</sup> y en negro los datos espectroscópicos de RMN-1H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) en CDCl<sub>3</sub> obtenidos experimentalmente.

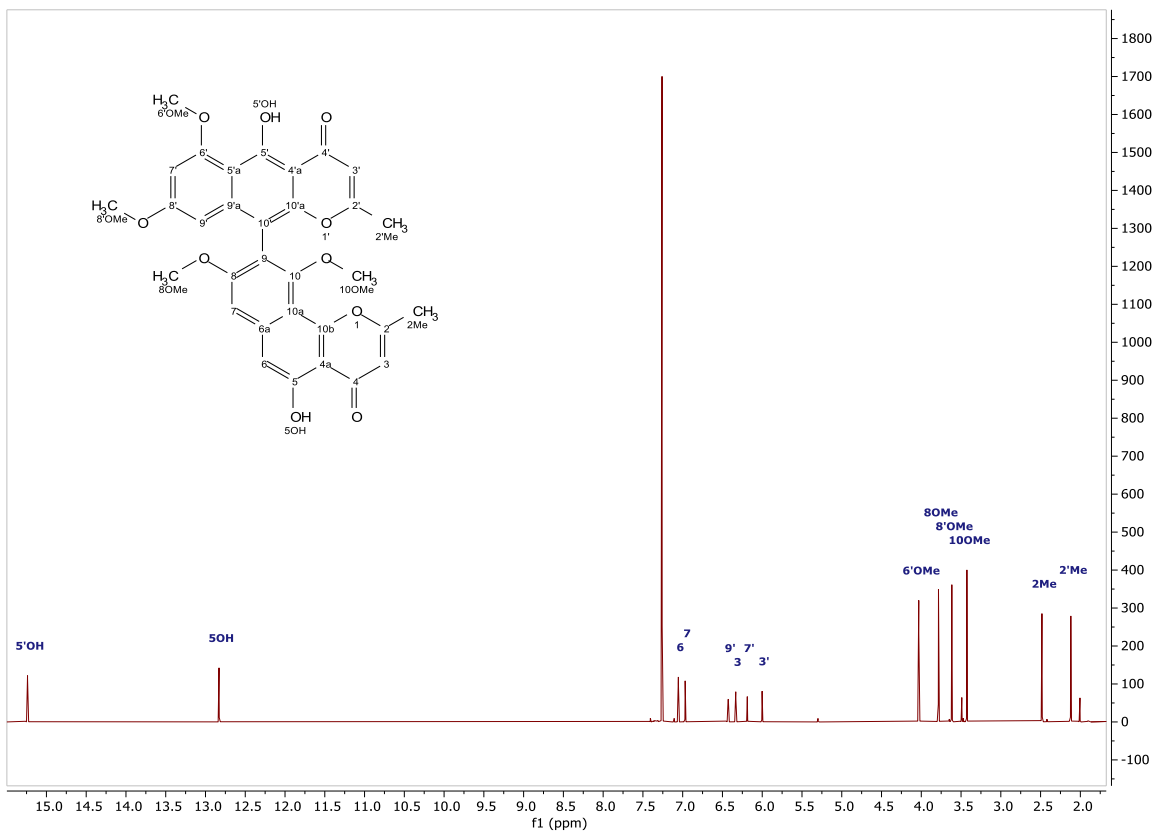


Figura 44. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la fonsecinona A (5).

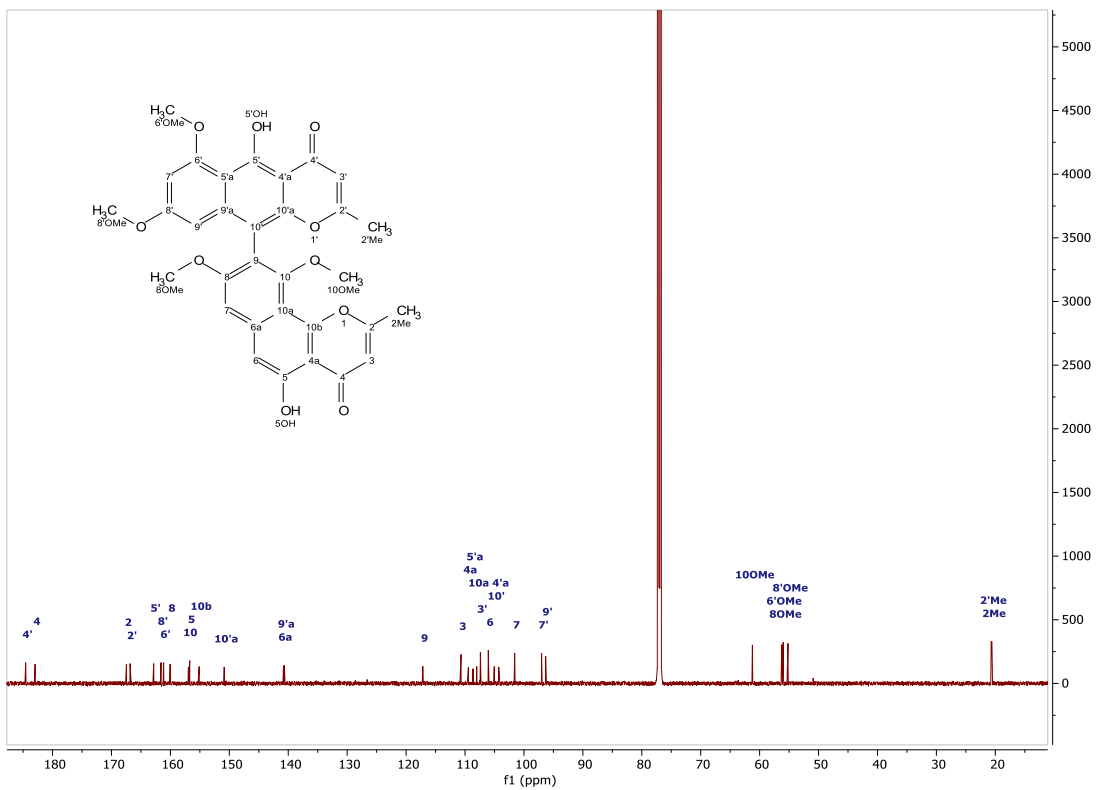
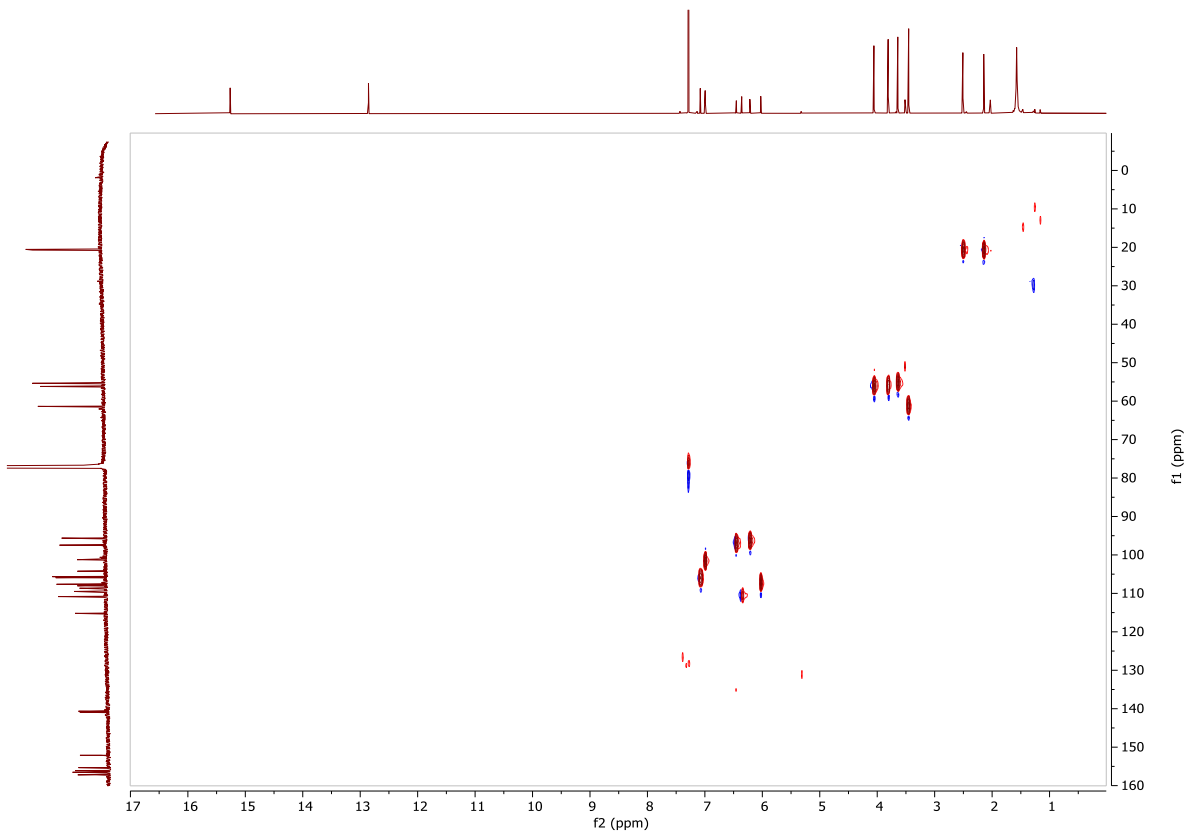
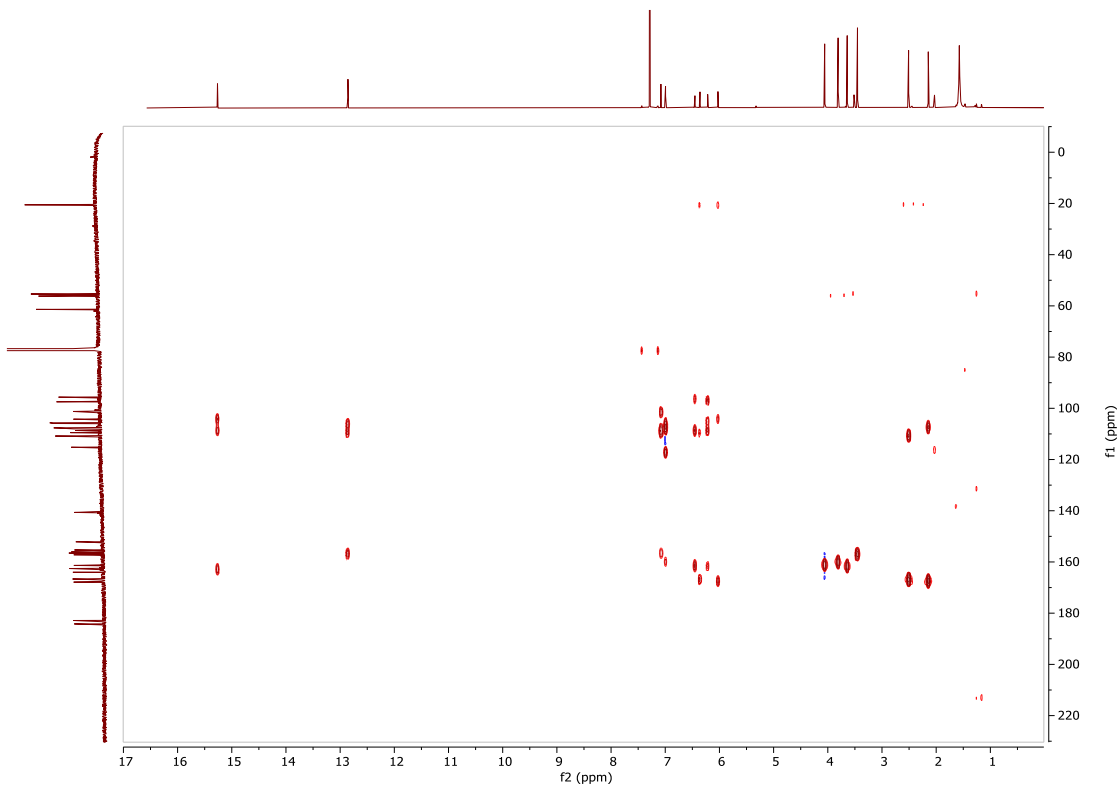


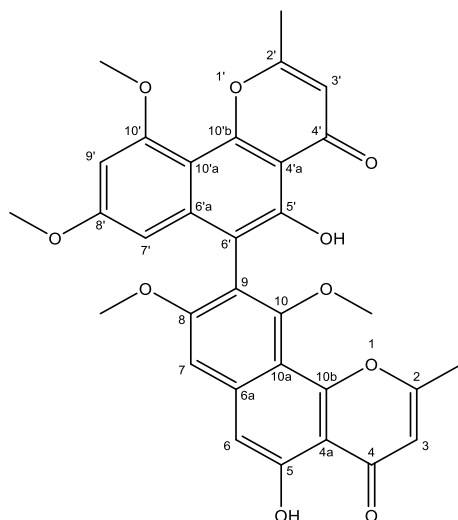
Figura 45. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la fonsecinona A (5).



**Figura 46.** Espectro bidimensional HSQC de la fonsecinona A (5).

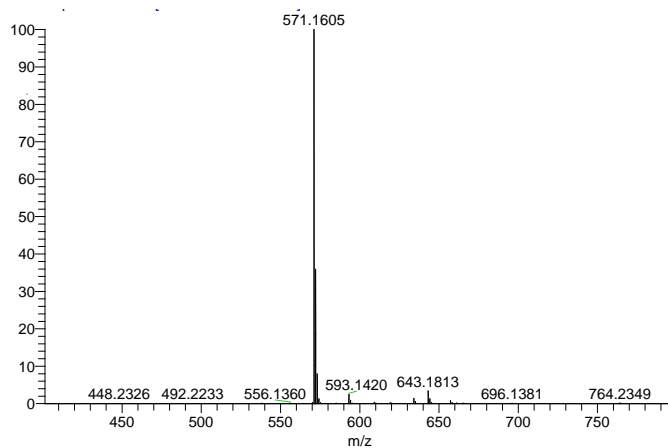


**Figura 47.** Espectro bidimensional HMBC de la fonsecinona A (5).



Asperpirona B (**6**)

La fórmula y masa molecular de la asperpirona B (**6**) se estableció como  $C_{32}H_{26}O_{10}$  y 570 una respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por electrospray (EM-ESI) (**Figura 48**).



**Figura 48.** Espectro de masas por electrospray (EM-ESI) para la asperpirona B (**6**).

Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- $^1H$  (**Figura 49**) y RMN- $^{13}C$  (**Figura 50**) se muestran en la **Tabla 17**, y son congruentes con los reportados en la literatura,<sup>66</sup> de acuerdo a este análisis y en conjunto con los espectros bidimensionales HSQC (**Figura 51**) y HMBC (**Figura 52**) se llegó a la estructura del producto natural elucidado como la asperpirona B (**6**).

**Tabla 17.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de la asperpirona B (**6**) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	$\delta_C$ en ppm		$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)	
	Rojo	Negro	Rojo	Rojo
2	166.8	166.8		
3	110.6	110.6	6.29 (1H, s)	6.31 (1H, s)
4	182.9	182.9		
4a	109.3	109.3		
5	156.4	156.4		
6	106.1	106.1	7.02 (1H, s)	7.04 (1H, s)
6a	140.7	140.7		
7	101.9	101.9	6.96 (1H, s)	6.98 (1H, s)
8	159.9	160.0		
9	117.8	117.9		
10	156.5	156.6		
10a	108.1	108.1		
10b	155.0	155.1		
2-CH <sub>3</sub>	20.6	20.5	2.46 (3H, s)	2.48 (3H, s)
5-OH			12.79 (1H, s)	12.79 (1H, s)
8-OCH <sub>3</sub>	56.1	56.1	3.78 (3H, s)	3.80 (3H, s)
10-OCH <sub>3</sub>	55.2	55.2	3.59 (3H, s)	3.61 (3H, s)
2'	166.5	166.5		
3'	110.3	110.3	6.31 (1H, s)	6.33 (1H, s)
4'	183.0	182.9		
4a'	108.4	108.4		
5'	154.3	154.3		
6'	109.6	109.7		
6a'	140.8	140.8		
7'	96.3	96.4	6.18 (1H, d, 2.1)	6.20 (1H, d, 2.2)
8'	161.5	161.5		
9'	96.7	96.8	6.42 (1H, d, 2.1)	6.44 (1H, d, 2.2)
10'	159.5	159.5		
10a'	105.0	105.0		
10b'	155.8	155.8		
2'-CH <sub>3</sub>	20.6	20.5	2.53 (3H, s)	2.55 (3H, s)
5'-OH			13.18 (1H, s)	13.16 (1H, s)
8'-OCH <sub>3</sub>	61.5	61.4	3.59 (3H, s)	3.61 (3H, s)
10'-OCH <sub>3</sub>	56.0	56.0	3.99 (3H, s)	4.01 (3H, s)

En rojo se presentan los datos obtenidos de la literatura, datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) de la asperpirona B (**6**) en CDCl<sub>3</sub><sup>66</sup> y en negro los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) en CDCl<sub>3</sub> obtenidos experimentalmente

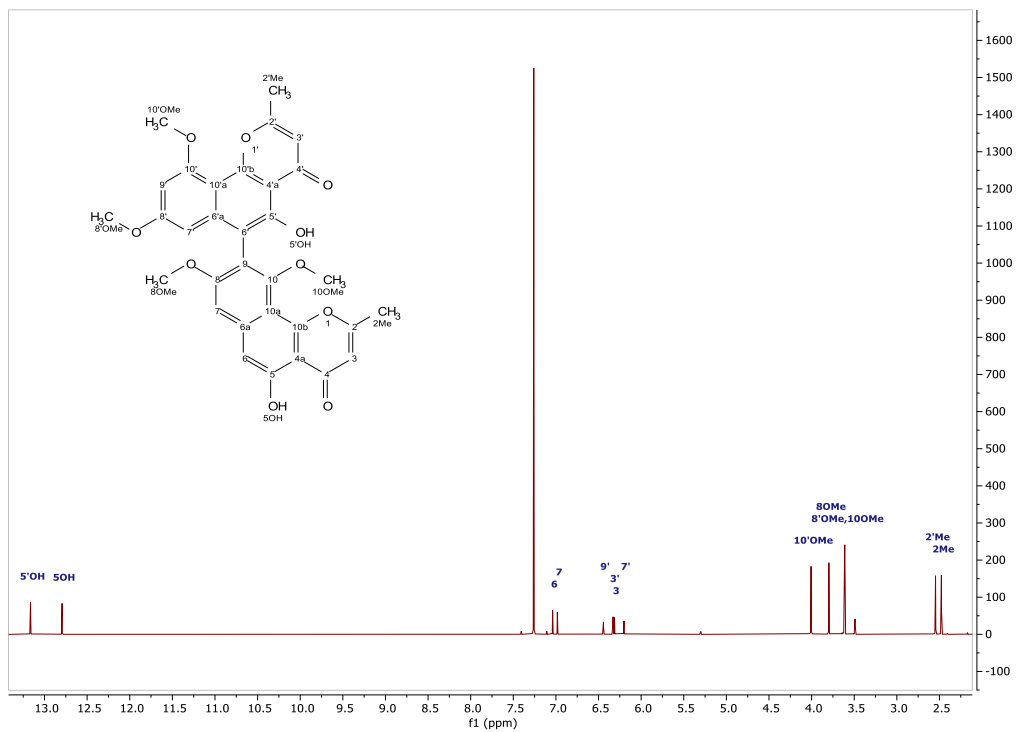


Figura 49. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la asperipirona B (6).

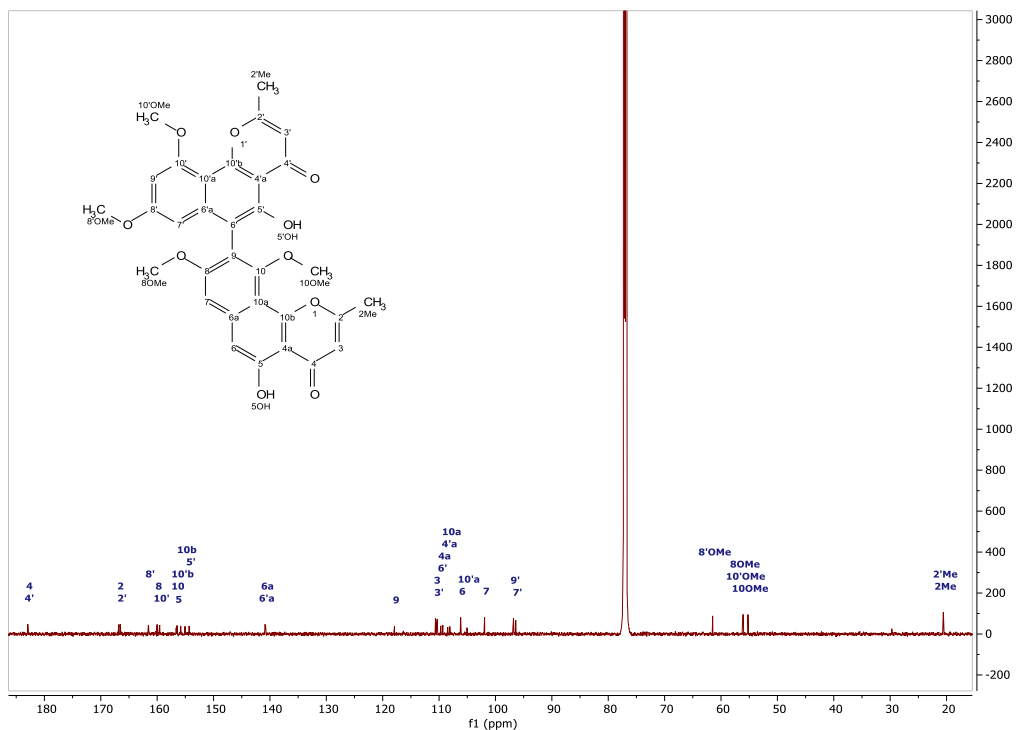
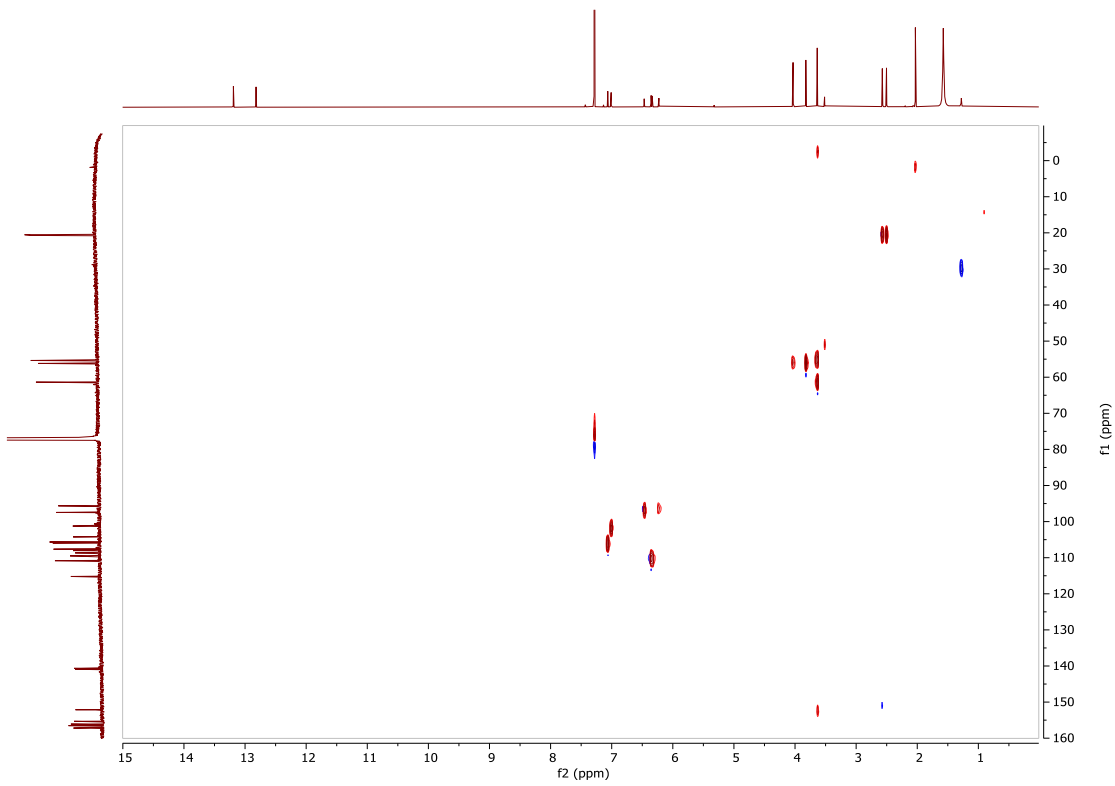
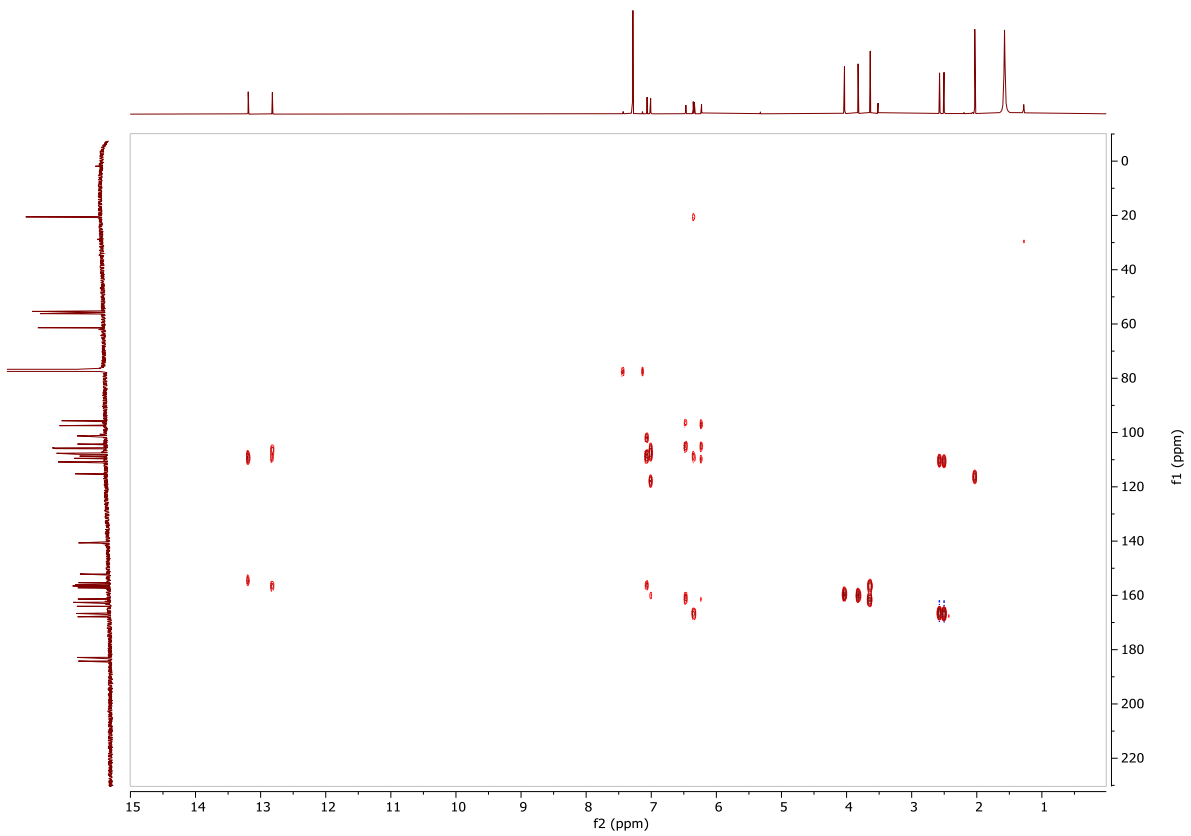


Figura 50. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la asperipirona B (6).



**Figura 51.** Espectro bidimensional HSQC de la asperpirona B (6).



**Figura 52.** Espectro bidimensional HMBC de asperpirona B (6).

Los compuestos antes descritos han sido evaluados frente a distintas cepas bacterianas entre las que se encuentran *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* y *B. cereus*. Sin embargo, la rubrofusarina B (3), aurasperona A (4) y la fonsecinona A (5) han tenido mayor efectividad contra cepas de *E. coli* con valores de MIC que van de 1.95 a 8.56 µg/mL,<sup>61</sup> así como para distintas cepas de *S. aureus* y *Bacillus* sp., donde el rango de MIC se reporta entre 25 y 50 µg/mL.<sup>67,68</sup>

Cabe destacar que no se encontraron reportes de la evaluación como antibacteriano de la asperpirona B (6), sin embargo entre los estudios de sus aplicaciones biológicas se encuentran la actividad antioxidante e inmunomoduladora.<sup>69</sup>



## 7. Conclusiones

Este proyecto demostró que a partir de distintas muestras como hojarasca, musgo, corteza de árbol, maleza y tallos sumergidos en depósitos de agua dulce, obtenidos de diversos nichos ecológicos se pueden obtener una gran diversidad de microorganismos fúngicos útiles para la obtención de compuestos bioactivos, algunos de los cuales podrían emplearse en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de infecciones intrahospitalarias causadas por bacterias resistentes a los antibióticos de primera elección en la terapéutica.

Se establecieron los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de gentamicina para cada una de las cepas bacterianas a utilizar durante este proyecto.

Se logró establecer un ensayo biológico de microdilución en placa para la evaluación de la actividad antibacteriana de 160 extractos orgánicos previamente obtenidos en el equipo de trabajo.

A partir de los resultados de evaluación de actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución en placa sobre una batería de 12 microorganismos, se seleccionaron 3 microorganismos fúngicos que presentaron la mejor actividad para su estudio químico. Se realizó el acondicionamiento de estas especies y a partir de los cultivos en medios sólidos a pequeña escala, se prepararon los correspondientes extractos orgánicos mediante técnicas de maceración y reparto.

Se logró la identificación taxonómica de las tres especies, IQ-013, IQ-050 e IQ-051, las cuales pertenecen a los géneros *Epicoccum*, *Westerdykella* y *Aspergillus*, respectivamente.

El estudio químico de las especies IQ-050 e IQ-051, condujo al aislamiento de diversas moléculas, mismas que se caracterizaron empleando diversas técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Con base en lo descrito en la literatura, los productos obtenidos de IQ-050 (aurantacina A (1) y pilobolusona C (2)) así como los obtenidos del microorganismo IQ-051 rubrofusarina B (3), aurasperona A (4), fonsecinona A (5) y asperpirona B (6) son los responsables o deben contribuir significativamente a la actividad antimicrobiana observada en los extractos fúngicos.

Finalmente, cabe resaltar la importancia de este trabajo para dar pauta a desarrollar investigación básica que contribuya con el conocimiento de alternativas estructurales para tratar la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos. En este sentido, con los resultados presentados se muestra que los productos naturales derivados de microorganismos, especialmente de hongos microscópicos, son una fuente promisoriosa para la búsqueda de prototipos estructurales, ya que debido a sus procesos metabólicos y de competencia con otros microorganismos, producen metabolitos secundarios con potencial antibacteriano.

## 8. Perspectivas

- 👤 Aislar e identificar los metabolitos presentes en el extracto de la especie fúngica IQ-013, identificada como *Epicoccum nigrum* para complementar su estudio químico.
- 👤 Una vez identificados los metabolitos pertenecientes a IQ-013 evaluar su actividad antibacteriana contra las cepas pertenecientes al grupo ESKAPE.
- 👤 Realizar el ensayo antibacteriano con los compuestos obtenidos a partir del microorganismo IQ-050, perteneciente al género *Westerdykella* y determinar la MIC de estos compuestos frente a las cepas bacterianas.
- 👤 Realizar el ensayo de microdilución en placa de los compuestos obtenidos a partir del microorganismo IQ-051, identificado como *Aspergillus* sp. Sección Nigri, para evaluar su porcentaje inhibitorio y determinar el valor de MIC contra las cepas de estudio.
- 👤 Continuar con el estudio biodirigido de los extractos presentados en el análisis jerárquico para aislar nuevos esqueletos carbonados con potencial antibacteriano.

## 9. Referencias

1. WHO. La resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>.
2. O' Neil J. *Review on Antibiotic Resistance. Antimicrobial Resistance : Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations.*; 2014. [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR\\_Review\\_Paper\\_-\\_Tackling\\_a\\_crisis\\_for\\_the\\_health\\_and\\_wealth\\_of\\_nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf).
3. Universidad Nacional Autónoma de México U. *Plan Universitario de Control de La Resistencia Antimicrobiana (Plan UCRA)*. Ciudad de México; 2018. [http://www.puis.unam.mx/slider\\_docs/plan-ucradigital.pdf](http://www.puis.unam.mx/slider_docs/plan-ucradigital.pdf).
4. Frieden T. Antibiotic resistance threats. 2013;22-50. doi:CS239559-B
5. Pogue JM, Kaye KS, Cohen DA, Marchaim D. Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(4):302-312. doi:10.1016/j.cmi.2014.12.025
6. Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(10):692-699. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004
7. OMS. Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>.
8. WHO. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Vol 10.; 2015. doi:10.1128/microbe.10.354.1
9. WHO. *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.*; 2017. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
10. Wang W, Arshad MI, Khurshid M, et al. Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018:1645-1658.
11. Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-Secretaría de Salud. NORMA OFICIAL MEXICANA N. 2009. [http://www.ssm.gob.mx/portal/page/vig\\_epid/1/normas/NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiologica, prevencion y control de las infecciones nosocomiales.pdf](http://www.ssm.gob.mx/portal/page/vig_epid/1/normas/NOM-045-SSA2-2005,Para%20la%20vigilancia%20epidemiologica,%20prevencion%20y%20control%20de%20las%20infecciones%20nosocomiales.pdf).
12. Organización Mundial de la Salud. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. OMS. 2017:1-2. [http://www.who.int/gpsc/country\\_work/burden\\_hcai/es/](http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/).
13. Ducel, G. Fabry, J. Nicolle, L. Girard, R. Perraud, M. Prüss, A. Savey a.

Prevención de las infecciones nosocomiales. *Who.int*. 2009;2:70.

14. Secretaría de Salud. *Dirección General de Epidemiología. Informe Anual 2015*. Vol 1.; 2016. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>.
15. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079-1081. doi:10.1086/533452
16. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/2475067
17. Demers DH. *Chemical Investigations of Fungal Natural Products for Drug Discovery*.; 2017. <http://scholarcommons.usf.edu/etd/6825>.
18. Gutiérrez-Muñoz J, Ramírez-Corona A, Martínez-Bustamante ME, Coria-Lorenzo JJ, Armenta-Gallegos L, Ayala-Franco JR et al. Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Lat Infect Pediatr*. 2017;30:68-75. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)<http://www.medigraphic.com/rlip>.
19. Stubbings W, Labischinski H. *New Antibiotics for Antibiotic-Resistant Bacteria*.; 2009. doi:10.3410/B1-40
20. Hauser AR, Mecsas J, Moir DT. *Beyond Antibiotics : New Therapeutic Approaches for Bacterial Infections*. Vol 63.; 2016. doi:10.1093/cid/ciw200
21. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 2017;10(4):369-378. doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007
22. OMS. Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos. *Who*. <https://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms%0Ahttp://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/es/%0Ahttps://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-i>. Published 2017.
23. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1 : Causes and Threats. *P&T*. 2015;40(4):277-283.
24. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. 2019. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
25. Wright GD. Crystal Ball Unlocking the potential of natural products in drug discovery. 2019;12:55-57. doi:10.1111/1751-7915.13351
26. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(6):3670-3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008

27. Huang T, Lin S, Lin S. Microbial Natural Products: A Promising Source for Drug Discovery. *J Appl Microbiol Biochem*. 2017;1(25):3-5.
28. Chávez R, Fierro F, García-Rico RO, Vaca I. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Front Microbiol*. 2015;6(SEP):1-7. doi:10.3389/fmicb.2015.00903
29. Wright GD. Natural Product Reports Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. *Nat Prod Rep*. 2017;34:694-701. doi:10.1039/C7NP00019G
30. Blackwell M. The Fungi: 1,2,3 ... 5.1 million species? *Am J Bot*. 2011;98(3):426-438. doi:10.3732/ajb.1000298
31. Cortés-Sánchez, A. Mosqueda-Olivares T. Una mirada a los organismos fúngicos : Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico . *Química Viva*. 2013;12(2):64-90.
32. Jiang Z, An Z. Bioactive Fungal Natural Products Through Classic and Biocombinatorial Approaches. 2020:4-6.
33. Harvey AL. Natural products in drug discovery. 2008;13(October). doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004
34. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics : past , present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019;51:72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
35. Gaynes R. The Discovery of Penicillin — New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. 2017;23(5).
36. Nathan C, Cars O. *Antibiotic Resistance-Problems, Progress, and Prospects*.; 2014.
37. Kavanagh K. Capítulo 5: Antibiotics, Enzymes and Chemical Commoties from Fungi. In: *Fungi: Biology and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, . ; 2005:113-143.
38. Nighat, F. Tariq I et al. EPICOCCUM SP., AN EMERGING SOURCE OF UNIQUE BIOACTIVE METABOLITES. *ACTA Pol Pharm*. 2016;73(1).
39. Muniba JNF et al. PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES BY EPICOCCUM SP . NFW1 : AN ENDOPHYTE OF TAXUS FAUNA. 2016;73(6):1555-1563.
40. Perveen I, Asam M, Iqbal T, Naz I, Sehar S. Microbial Pathogenesis Isolation of anticancer and antimicrobial metabolites from *Epicoccum nigrum* ; endophyte of *Ferula sumbul*. *Microb Pathog*. 2017;110:214-224. doi:10.1016/j.micpath.2017.06.033
41. Elkhateeb WA, Daba GM. *Epicoccum* Species as Potent Factories for the Production of Compounds of Industrial , Medical , and Biological Control Applications. *Biomed J Sci Technical Res*. 2019:10616-10620.

doi:10.26717.BJSTR.2019.14.002541

42. Ebead GA, Overy DP, Berru  F, et al. *Westerdykella reniformis* sp . nov ., producing the antibiotic metabolites melinacidin IV and chetracin B. 2012;3(2):189-201. doi:10.5598/imafungus.2012.03.02.11
43. Xu D, Pang X, Zhao T, Xu L, Yang X. Fitoterapia New alkenylated tetrahydropyran derivatives from the marine sediment- derived fungus *Westerdykella dispersa* and their bioactivities. *Fitoterapia*. 2017;122(August):45-51. doi:10.1016/j.fitote.2017.08.010
44. Eo JH, Ark JP, Oo SW, Ho JR, Ee HL, Im SK. Dykellic Acid Inhibits Cell Migration and Tube Formation by RhoA-GTP. 2006;29(11):2256-2259.
45. Lee H, Chung M, Lee C, Yun B, Chun H, Kho Y. Gelastatins A and B, New Inhibitors of Gelatinase A from *Westerdykella multispora* F50733. *J Antibiot (Tokyo)*. 1996;50(4):357-359.
46. Song YC, Li H, Ye YH, Shan CY, Yang YM, Tan RX. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase , SW1116 cell and some microbial growths. 2004;241:67-72. doi:10.1016/j.femsle.2004.10.005
47. Xu D, Luo M, Liu F, et al. Cytochalasan and Tyrosine- Derived Alkaloids from the Marine Sediment-Derived Fungus *Westerdykella dispersa* and Their Bioactivities. *Sci Rep*. 2017;(September):1-9. doi:10.1038/s41598-017-12327-1
48. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Micol*. 2014:141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
49. Lima MASE al. *Aspergillus niger* : A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. *JBCS*. 2019;30(10):2029-2059.
50. Rodolfo RC. Gentamicina: Antibiot ico. In: *Vadem cum Acad mico de Medicamentos*. ; 2013. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552&sectionid=90370876>.
51. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance : A Review. 2019;10(April). doi:10.3389/fmicb.2019.00539
52. Hall S, Mcdermott C, Anoopkumar-dukie S, et al. Cellular Effects of Pyocyanin , a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)*. 2016:1-14. doi:10.3390/toxins8080236
53. Venanzio G Di, Flores-mireles AL, Calix JJ, et al. Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid baumannii chromosomal genes. *Nat Commun*. 2019:1-13. doi:10.1038/s41467-019-10706-y

54. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* : Emergence of a Successful Pathogen. 2008;21(3):538-582. doi:10.1128/CMR.00058-07
55. Morris FC, Dexter C, Kostoulas X, Uddin MI. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019;10(July). doi:10.3389/fmicb.2019.01601
56. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. 2017. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085
57. Pérez-valencia LI, Santerre A, Villalobos-arámula AR, et al. Extracción de ADN y amplificación de secuencias del ITS del ADNr de. 2012;31(1).
58. Perveen I, Asam M, Iqbal T, Naz I, Sehar S. Microbial Pathogenesis Isolation of anticancer and antimicrobial metabolites from *Epicoccum nigrum* ; endophyte of *Ferula sumbul*. 2017;110:214-224. doi:10.1016/j.micpath.2017.06.033
59. Poch, G y Gloer J. AURANTICINS A AND B : TWO NEW DEPSIDONES. *J Nat Prod.* 1991;54(1):213-217.
60. Rajachan O et al. Bioactive Depsidones from the Fungus *Pilobolus heterosporus*. *Planta Med.* 2014;80:1635-1641.
61. He Y, Tian J, Chen X, et al. Fungal naphtho-  $\gamma$  -pyrones : Potent antibiotics for drug-resistant microbial pathogens. *Sci Rep.* 2016:1-10. doi:10.1038/srep24291
62. Papers O. Bioactive Depsidones from the Fungus *Pilobolus heterosporus*. 2014:1635-1640.
63. Prestap HA. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of Naphtho- $\gamma$ -pyrones. *Magn Reson Chem.* 1986;24:875-878.
64. JIANG Wei et. al. 海洋真菌 *Aspergillus niger* XJJ-3 中萘并吡喃酮类化合物结构及生物活性 Structures and activities of naphthopyrones from marine fungus. 2018;45(9):1897-1903. doi:10.13344/j.microbiol.china.180148
65. Campos FR, Barison A, Daolio C, et al. Spectral Assignments and Reference. Data Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A , two. *Magn Reson Chem.* 2005;43:962-965. doi:10.1002/mrc.1654
66. Akiyama K, Teraguchi S, Hamasaki Y, et al. New Dimeric Naphthopyrones from *Aspergillus niger*. *J Nat Prod.* 2003;66(1):136-139. doi:10.1021/np020174p
67. Ma Y, Li T, Ma C. A new pyrone derivative from an endophytic *Aspergillus tubingensis* of *Lycium ruthenicum*. *Nat Prod Res.* 2016;6419:0. doi:10.1080/14786419.2015.1114939

68. Xiao J, Zhang Q, Gao Y, Shi X, Gao J. Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus* sp . associated with *Melia azedarach*. 2014;6419. doi:10.1080/14786419.2014.904308
69. Cai X, Yu Y, Li Q, Chen B, Huang Y, Zou X. Asperpyrone F , a new dimeric naphtho-  $\gamma$  -pyrone from the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. *Nat Prod Res*. 2019;6419:1-8. doi:10.1080/14786419.2018.1481844