



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE HONGOS DEL GOLFO DE MÉXICO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Rodrigo Villanueva Silva

TUTOR:

Dr. Mario A. Figueroa Saldívar
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, Abril 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE HONGOS DEL GOLFO DE MÉXICO

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

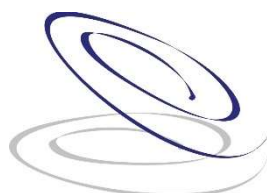
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. RODRIGO VILLANUEVA SILVA

TUTOR:

**DR. MARIO A. FIGUEROA SALDÍVAR
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**



**Posgrado
Ciencias
Químicas**

Ciudad de México, Abril 2022

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Dr. Leovigildo Quijano

VOCAL Dr. Francisco Hernández Luis

VOCAL Dra. Alba Romero Rodríguez

VOCAL Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

SECRETARIO Dra. Berenice Ovalle Magallanes

Lugar donde se desarrolló el proyecto de tesis:

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

Publicación: Rodrigo Villanueva-Silva, Patricia Velez, Meritxell Riquelme, Carlos A. Fajardo-Hernández, Anahí Martínez-Cárdenas, Alejandra Arista-Romero, BaojieWan, Rui Ma, Mallique Qader, Scott G. Franzblau, and Mario Figueroa. Chemical Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Fungi from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Molecules* 2021, 26, 7328. <https://doi.org/10.3390/molecules26237328>

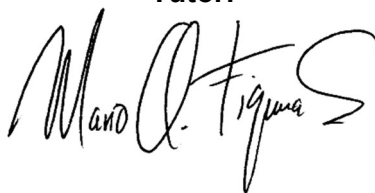
Presentación en congreso: Rodrigo Villanueva-Silva, Patricia Velez and Mario Figueroa. Pharmacological Potential and Chemical Diversity of Marine Sediment Fungi of the Gulf of Mexico. *Vanguards of Natural Product Research 2021, ASP Virtual Meeting (cartel).*

Alumno:



M. en C. Rodrigo Villanueva Silva

Tutor:



Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
Profesor Titular C, TC
Facultad de Química, UNAM

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por permitirme el desarrollo de las actividades académicas y de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado a través de la beca no. 576665 para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN222220) de la UNAM y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9145) de la Facultad de Química (FQ), UNAM por los financiamientos otorgados para la realización de este proyecto.

A mi tutor, el Dr. Mario Figueroa Saldívar por su asesoría y apoyo en el desarrollo del presente proyecto. A la Dra. Patricia Velez Aguilar y al Dr. Francisco Hernández Luis por sus aportaciones y recomendaciones semestrales que permitieron enriquecer la investigación realizada. A las Dras. Alba Ixciuh Romero Rodríguez y Berenice Ovalle Magallanes y los Dres. Leovigildo Quijano y Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa por sus observaciones y comentarios en la revisión del presente manuscrito.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por sus valiosas enseñanzas durante el curso de Productos Naturales de origen microbiano, sus observaciones y comentarios durante mi examen de Candidatura, y por el acceso a los materiales y equipos de su laboratorio. A la Dra. Isabel Rivero Cruz por el apoyo brindado durante el trabajo experimental.

Al Dr. Andrés Navarrete por darme la oportunidad de servir como ayudante de profesor en la asignatura de Farmacología I, por su confianza y sus aportaciones en mi formación como profesor, y a la M. en C. Gloria Melisa González Anduaga por su apoyo durante las sesiones experimentales.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo y en especial al Dr. Carlos Fajardo por su capacitación en el uso de los equipos del laboratorio, sus conocimientos y valiosa amistad. A la Dra. Anahí Martínez Cárdenas por su apoyo y enseñanzas. A las M. en C. Alejandra Arista y Marian López Lovato por compartir su entusiasmo y amistad. A la M. en C. Rubí Yeverino Sánchez por su grata compañía y por acondicionar las cepas de la colección CIGOM y realizar el registro fotográfico de las mismas.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) por el registro de algunos espectros de RMN; al QFB Alejandro Camacho Cruz del Cepario de la FQ, UNAM y al Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las cepas para las evaluaciones antimicrobianas; a las Dras. Patricia Vélez Aguilar y Meritxell Riquelme del Instituto de Biología UNAM y el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California, respectivamente, por proporcionar los organismos fúngicos objeto de estudio; y a los Dres. Nicholas H. Oberlies y Laura Flores Bocanegra de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro (UNCG), Carolina del Norte, EEUU, por el apoyo con el registro de algunos espectros de RMN y EM.

Dedicatoria

Índice

	Página
Agradecimientos	4
Dedicatoria	5
Índice	6
Lista de Figuras	7
Lista de Cuadros	9
Lista de Símbolos y Abreviaturas	10
Resumen	11
Abstract	12
1. Antecedentes	14
1.1. Productos naturales	14
1.2. Medicamentos aprobados por la FDA derivados de organismos marinos	14
1.3. Productos naturales de hongos marinos	17
1.4. Hongos de sedimentos marinos	17
1.5. Golfo de México y colección fúngica de sedimentos marinos CIGOM	18
1.6. Enfoque OSMAC	18
1.7. Metabolómica de hongos de sedimentos marinos	19
1.8. Redes moleculares	21
1.9. Antibióticos y resistencia antimicrobiana	21
2. Hipótesis	24
3. Objetivo general	24
4. Objetivos particulares	24
5. Desarrollo experimental	25
5.1. Acondicionamiento, cultivo y obtención de extractos	25
5.2. Evaluación antimicrobiana	26
5.3. Cultivo en mediana escala de las especies selectas	27
5.4. Estudio químico biodirigido de las especies selectas	28
5.4.1. <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	28
5.4.2. <i>P. echinulatum</i> CONTIG4	30
5.5. Estudio químico convencional de especies selectas	34
5.5.1. <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2	34
5.5.2. <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10	36
5.5.3. <i>Penicillium</i> sp. CIGOM16	38
5.6. Caracterización estructural	39
5.7. LC-MS/MS, estudios de metabolómica no dirigida y redes moleculares de especies selectas del GoM	39
5.8. Estudio químico de <i>Corollospora gracilis</i>	40
5.9. Registro fotográfico y edición de figuras	40
6. Resultados y discusión	41
6.1. Cultivo en pequeña escala y obtención de extractos	41
6.2. Actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala	43
6.3. Cultivo en mediana escala de hongos selectos	44
6.4. Estudio químico biodirigido de hongos con actividad antimicrobiana	44
6.4.1. <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	44
6.4.2. Estudio químico biodirigido de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4	48
6.5. Estudio químico convencional de hongos sin actividad antimicrobiana	53
6.5.1. <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2	53
6.5.2. Estudio químico de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10 y CIGOM16	55
6.6. Estudios de metabolómica	59
6.6.1. Análisis de componentes principales (PCA)	59
6.6.2. Redes moleculares	60
6.7. Actividad biológica de los compuestos 1-8	64

6.7. Estudio químico de <i>Corollospora gracilis</i>	66
7. Conclusiones	67
8. Referencias	68
Anexos	74
Anexo 1. Actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala.	75
Anexo 2. Actividad de los compuestos 1-8 sobre patógenos ESKAPE.	77
Anexo 3. Actividad de los compuestos 1-8 sobre <i>Mycobacterium</i> .	77
Anexo 4. Artículo derivado de este trabajo de investigación.	78
Anexo 5. Resumen y cartel presentado en el congreso virtual Vanguard's of Natural Product Research 2021, ASP.	79

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Medicamentos de origen marino aprobados por la FDA. Creado con BioRender.com	15
Figura 2. Ejemplos de fármacos derivados de productos naturales.	15
Figura 3: Análogos sintéticos de la toxina dolastatina 10 (izquierda). Representación del conjugado fármaco-anticuerpo (ADC) brentuximab vedotin (derecha). Creado con BioRender.com	16
Figura 4. Desarrollo de la plinabulina. Creado con BioRender.com.	17
Figura 5. Enfoque OSMAC. Creado con BioRender.com.	19
Figura 6. Correlación del flujo de información en los hongos marinos y los enfoques basados en <i>omicas</i> . Creado con BioRender.com.	19
Figura 7. Flujo de trabajo en los estudios de metabolómica propuesto por Klassen y colaboradores (2017) [49]. Creado con BioRender.com.	20
Figura 8. Desarrollo de nuevos antibióticos y aparición de resistencia antimicrobiana. Modificado de Hutchings y colaboradores (2019) [2].	22
Figura 9. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de mediana escala de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4 cultivado a 20 °C.	28
Figura 10. Perfiles cromatográficos y espectros de UV y HRMS del alternariol (1) de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4.	29
Figura 11. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de la fracción F4 del extracto de mediana escala de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4 cultivado a 20 °C.	29
Figura 12. Perfiles cromatográficos y espectros de UV y HRMS del metil alternariol (2) de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4.	30
Figura 13. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de mediana escala de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4 cultivado a 20 °C.	31
Figura 14. Perfiles cromatográficos por HPLC de la fracción F5 del extracto de mediana escala de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4 cultivado a 20 °C.	32
Figura 15. Perfiles cromatográficos por HPLC de la fracción F6 del extracto de mediana escala de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4 cultivado a 20 °C.	32
Figura 16. Perfiles cromatográficos por HPLC de la fracción F7 del extracto de mediana escala de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4 cultivado a 20 °C.	33
Figura 17. Perfiles cromatográficos y espectros UV y HRMS de los compuestos 3–6 de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4.	33
Figura 18. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de pequeña escala de <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2 cultivado a TA.	34
Figura 19. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de la fracción F4 del extracto de pequeña escala de <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2 cultivado a TA.	34
Figura 20. Perfiles cromatográficos y espectros de UV y HRMS de la citocalasina D (7) aislada de <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2.	35
Figura 21. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de mediana escala de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10 cultivado a TA.	36
Figura 22. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de la fracción F10 de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10 cultivado a TA.	36
Figura 23. Perfiles cromatográficos y espectros UV y HRMS de la meleagrina A (8) de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10.	37
Figura 24. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM16 cultivado a TA en pequeña escala.	38
Figura 25. Perfiles cromatográficos y espectros UV y HRMS de los compuestos 9 y 10 de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM16.	38
Figura 26. Colección CIGOM [80].	41

Figura 27. A. Cultivos en pequeña escala de hongos selectos en arroz. Morfología de <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2 cultivado en medio arroz en B. TA, luz-oscuridad 12/12, 21 d, y C. 20 °C, oscuridad, 30 d.	42
Figura 28. Perfiles cromatográficos por UPLC-PDA (λ 189-500 nm) de los extractos de mediana escala y las fracciones activas de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4,* tiempo de retención desplazado del compuesto 2 . Medio arroz a A) TA luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d.	46
Figura 29. Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) del alternariol (1) y metil alternariol (2).	47
Figura 30. Perfiles cromatográficos por HPLC (ELSD) de los extractos y fracciones de <i>P. echinulatum</i>	49
Figura 31. Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) de la ciclopenina (3), ciclopeptina (4) y deshidrociclopeptina (5).	50
Figura 32. Confórmeros reportados para la 4'-metoxiciclopeptina [37].	50
Figura 33. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C (400 y 100 MHz) de la viridicatina (6).	51
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de la citocalasina D (7).	54
Figura 35. Representación ORTEP de la estructura cristalina de la citocalasina D (7).	54
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de la meleagrina A (8).	56
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz) de la roquefortina C (9).	57
Figura 38. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz) de la andrastina A (10).	58
Figura 39. A. Efecto de la temperatura de crecimiento sobre el perfil metabólico global de las muestras de las especies fúngicas GoM determinado por el PCA. B. perfiles cromatográficos por UPLC-PDA (λ 180-500 nm) de los extractos de <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2.	59
Figura 40. Análisis por GNPS de los metabolitos producidos por <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4, <i>P. echinulatum</i> CONTIG4, <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2 y <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10 y CIGOM16. El tamaño de las uniones indica la similitud química entre los espectros MS/MS. Los compuestos anotados manualmente y por el GNPS están indicados en los cuadros y señalados con marcadores de color (exactitud de la masa < 5 ppm).Creado con Cytoscape 3.8.1.	60
Figura 41. Comparación de los perfiles por UPLC—PDA de los extractos de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4 obtenidos bajo distintas condiciones de crecimiento y compuestos identificados.	62
Figura 42. Comparación de los perfiles por UPLC—PDA y red molecular de los extractos de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4. Creado con Cytoscape 3.8.1.	63
Figura 43. Comparación de los perfiles por UPLC—PDA y las redes moleculares por GNPS molecular de <i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2. Los extractos se obtuvieron bajo distintas condiciones de crecimiento. Creado con Cytoscape 3.8.1.	64
Figura 44. Comparación de los perfiles por UPLC—PDA y las redes moleculares por GNPS molecular de <i>Penicillium</i> sp. CIGOM10 y CIGOM16. Los extractos se obtuvieron bajo distintas condiciones de crecimiento. Creado con Cytoscape 3.8.1.	64

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Listado de patógenos resistentes y su prioridad para el desarrollo de nuevos antibióticos [66].	23
Cuadro 2. Colección CIGOM.	25
Cuadro 3. Extractos de pequeña escala (mg) de los hongos en estudio.	26
Cuadro 4. Extractos de mediana escala (mg) de los hongos CIGOM selectos.	27
Cuadro 5. Fraccionamiento primario de los extractos de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4.	28
Cuadro 6. Fraccionamiento primario de los extractos de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4.	31
Cuadro 7. Medios empleados para el cultivo en mediana escala de <i>Corollospora gracilis</i> .	40
Cuadro 8. Extractos con actividad antimicrobiana de hongos marinos del GoM.	43
Cuadro 9. Fracciones activas de los extractos de mediana escala y fracciones de <i>Alternaria</i> sp. CIGOM4.	45
Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H del alternariol (1) y metil alternariol (2)	47
Cuadro 11. Extractos de mediana escala y fracciones de <i>P. echinulatum</i> CONTIG4 con actividad antimicrobiana.	48
Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C de los compuestos 3–5.	52
Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C de viridicatina (6).	53
Cuadro 14. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H de la citocalasina D (7).	55
Cuadro 15. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H de la meleagrina A (8).	56
Cuadro 16. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H de la roquefortina C (9).	57
Cuadro 17. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H de la andrastina A (10).	58
Cuadro 18. Anotaciones químicas de compuestos conocidos por el GNPS y por comparación con los compuestos aislados en las redes moleculares de los hongos selectos CIGOM.	61

Lista de Gráficas

	Página
Gráfica 1. Rendimiento de los extractos orgánicos desgrasados de los cultivos en pequeña escala de la colección CIGOM.	42
Gráfica 2. Rendimiento de los extractos de mediana escala de los hongos selectos.	44
Gráfica 3. Rendimiento de los extractos de <i>Corollospora gracilis</i> .	66

Lista de símbolos y abreviaturas

[M+H]⁺ Masa monoisotópica cargada positivamente

[M-H]⁻ Masa monoisotópica cargada negativamente

A

Å Angstrom

ATCC American Type Culture Collection

C

CIGoM Consorcio de Investigación del Golfo de México

E

ELSD Evaporative Light Scattering Detector

F

FDA Food and Drug Administration

G

GNPS Global Natural Product Social molecular networking

GoM Golfo de México

H

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HRMS High Resolution Mass Spectrometry

I

IDH Índice de Deficiencia de Hidrógeno

J

J Constante de acoplamiento

K

KV Kilovoltios

L

LC Liquid Chromatography

M

mbnm Metros bajo el nivel del mar

MIC Concentración Mínima Inhibitoria

MRSA *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MS Mass spectrometry

MSSA *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina

P

PCA Principal Components Analysis

PDA Photodiode Array Detection

PDA Potato Dextrose Agar

PDB Potato Dextrose Broth

PN producto natural

R

RA Resistencia antimicrobiana

RM Redes moleculares

RMN Resonancia Magnética Nuclear

rpm revoluciones por minuto

S

Si-gel Sílica gel

T

TA Temperatura ambiente

t_R Tiempo de retención

U

UPLC Ultra Performance Liquid Chromatography

UV ultravioleta

V

VREF *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina

VSEF *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina

Resumen

En este trabajo se realizó el estudio de la diversidad química y potencial antimicrobiano de una colección fúngica de 29 cepas cultivables aisladas de sedimentos de aguas profundas del Golfo de México, bajo el enfoque OSMAC, One Strain, Many Compounds. Los organismos se cultivaron en tres diferentes condiciones de crecimiento, y de los 90 extractos evaluados, más del 50% mostraron actividad antimicrobiana, y los más activos fueron aquellos que se cultivaron a 4 °C y en oscuridad durante 60 días, condiciones que semejan a las reportadas para el mar profundo.

El análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos por LC-MS de todos los extractos confirmó que la temperatura del cultivo es el factor principal en la variación (21.3 % de la variación) entre los 4462 componentes metabólicos detectados.

El estudio químico biodirigido y convencional de algunas cepas permitió la identificación de distintos metabolitos especializados de diversas clases químicas. Posteriormente, mediante los análisis de metabolómica empleando la plataforma de redes moleculares GNPS (Global Natural Products Social molecular networking) y mediante anotación manual por comparación con lo contenido en bases de datos especializadas, confirmaron el potencial biosintético de estas especies para producir una química diversa. De manera similar, se pudo observar la influencia de la salinidad en el metaboloma del hongo marino *Corollospora gracilis* de Playa Hermosa, Baja California, una zona con importante daño antropogénico.

Finalmente, este trabajo representa el primer reporte sobre el estudio químico y biológico de hongos aislados de sedimentos de aguas profundas del Golfo de México y de zonas dañadas.

Abstract

In this work, the chemical diversity and antimicrobial potential of twenty-nine cultivable fungal isolated from deep-sea sediments of the GoM was investigated under the “one strain, many compounds” (OSMAC) approach. Each strain was cultured using three different growth condition. From the 90 extracts assayed, over 50% showed antimicrobial activity. The most active ones were the ones from cultures grown at 4 °C in darkness for 60 days, resembling deep-sea environmental conditions.

Principal components analysis (PCA) of LC-MS data of all extracts confirmed that culture temperature is the main factor in the variation of the 4462 metabolite features, accounting for 21.3% of the variation.

Bioactivity-guided and conventional chemical studies of selected fungal strains allowed the identification of ten specialized metabolites of various chemical classes. Subsequently, metabolomic analysis by GNPS molecular networking and manual dereplication revealed the biosynthetic potential of these species to produce interesting chemistry. In addition, the effect in the metabolomic profile of *Corollospora gracilis*, a marine fungus isolated from Playa Hermosa, Baja California, an area with important anthropogenic damage, grown under salty conditions was investigated.

Overall, this work represent the first chemical and biological study of marine-derived fungal strains from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico and damaged zones.

1. Antecedentes

1.1. Productos naturales

Los productos naturales (PN) han sido una fuente importante de fármacos o compuestos líderes para la humanidad [1]. De acuerdo con Newman y Cragg, entre 1981 y 2019 los productos naturales, las mezclas botánicas y los derivados de productos naturales contribuyeron con 23.5% del total de fármacos aprobados en ese periodo. Sin duda el alcance de los PN para el desarrollo de nuevos fármacos es mayor debido a que también se han utilizado como inspiración para el desarrollo de fármacos sintéticos [1]. En el caso de los antibióticos que se utilizan en la clínica, la mayoría se derivan de productos naturales [1,2].

A pesar de que en un inicio los PN se aislaban principalmente de organismos terrestres, con el desarrollo tecnológico en la exploración submarina, la recolección de muestras de aguas y sedimentos profundos, y la aplicación de las tecnologías de bioinformática como la metagenómica, se ha logrado el estudio de numerosos organismos marinos y la obtención de PN bioactivos con núcleos estructurales inusuales [3,4].

Sin duda los ambientes marinos representan una fuente potencialmente rica de PN por extensión, debido a que los océanos cubren más de la mitad de la superficie terrestre y por la diversidad biológica, ya que se ha estimado que se conoce un mínimo porcentaje de las especies que habitan los mares [4]. Sin embargo, son ambientes en constante cambio: los océanos están expuestos a perturbaciones naturales de corto plazo como los huracanes y antropogénicas de largo plazo como los derrames petroleros, y de los cuales se desconoce el impacto real en la diversidad de los organismos que lo habitan [5].

1.2. Medicamentos aprobados por la FDA derivados de organismos marinos

En la actualidad existen algunos ejemplos de medicamentos aprobados por la FDA cuyo principio activo es un PN obtenido de un organismo marino, un análogo sintético de éste desarrollado con base en su estudio racional, o un conjugado de un PN con un anticuerpo (Figura 1) [6]. Un ejemplo reciente es el Yondelis, fármaco aprobado en 2015 para el tratamiento del liposarcoma. El principio activo corresponde al metabolito secundario trabectedina, aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata* [7-9]. Cabe destacar que la trabectedina se obtiene en muy pequeñas cantidades a partir de la fuente natural, por lo que actualmente para su comercialización se obtiene por semisíntesis a partir de la cianosafracina B producida por *Pseudomonas fluorescens* [7,8,10]. Otros ejemplos de relevancia son el Cytosar-U, fármaco aprobado por la FDA en 1969 para el tratamiento de la leucemia, y el Arasena A, aprobado en 1976 para la infección por el virus del herpes, los cuales son análogos sintéticos de los nucleósidos de arabinosa, citarabina y vidarabina aislados de *Cryptotethia crypta*, respectivamente [11-13]. En 2010 se aprobó el Halaven para el tratamiento del cáncer de mama que contiene. El principio activo, el mesilato de eribulina, es un análogo sintético de la halicondra B aislado de la esponja *Halichondria okadai* (Figura 2) [6]. [14]. Finalmente, el Farydak, fármaco aprobado para el tratamiento del mieloma múltiple, tiene como principio activo al panobinostat, un análogo del PN psammaplina A aislada originalmente de *Psammaphin aplysilla* (Figura 2) [15,16].

Por otro lado, se han aprobado tres medicamentos para el tratamiento de la hipertrigliceridemia derivados del aceite de pescado, un PN ampliamente conocido por sus propiedades nutricionales [17]. En 2004 se aprobó el fármaco Lovaza, compuesto por ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3, principalmente del eicosapentaenoico (EPA) y del docosahexaenoico (DHA); en 2012 el Vascepa, que contiene únicamente el éster etílico de EPA; y en 2014 el Epanova, que contiene la mezcla de ácidos grasos EPA y DHA.

Asimismo, se han aprobado medicamentos cuyo principio activo es un péptido o un producto biotecnológico [18]. En 2004 se aprobó Prialt para el tratamiento del dolor crónico. El principio activo es la ziconótida, un péptido sintético análogo de la ω -conotoxina aislada del caracol marino *Conus magus* [19]. A partir del año 2011 se aprobaron una serie de medicamentos que contienen conjugados fármaco-anticuerpo (ADC por sus siglas en inglés). Los principios activos, el monometil aristatina E y aristatina F (MMAE y MMAF, respectivamente), son derivados sintéticos de PNs obtenidos de organismos marinos, como la dolastatina 10 aislada por primera vez de la liebre de mar *Dolabella auricularia* (Figura 3) [18,20,21]. Sin embargo, investigaciones posteriores permitieron establecer que la toxina es producida por las cianobacterias *L. majuscula* y *Symploca* spp., y que el molusco acumula como resultado de su alimentación [18,20,22,23].

Otro ejemplo de ADCs de origen marino es el Adcetris (Brentuximab vedotin), que se compone del anticuerpo quimérico IgG1 cAC10 específico para la proteína CD30, un receptor del factor de necrosis tumoral que participa en la multiplicación y la supervivencia celular, y que se encuentra sobre expresado en los linfomas [24]; y cuatro unidades de MMAE enlazadas mediante cadenas peptídicas de valina-citrulina-*p*-aminobenciloxicarbonil (Val-Cit-PABC) y que son susceptibles a la hidrólisis por proteasas endosomales (Figura 3) [20]. Con base en este desarrollo, se han aprobado otros ADCs enlazados a MMAE: el Polivy (polatuzumab vedotin) y el Padcev (enfortumab vedotin) en 2019, y el Blenrep (belantamab mafodotin) en 2020. En el año siguiente se aprobó Tivdak (tisotumab vedotin) que contiene MMAF como agente citotóxico [25].

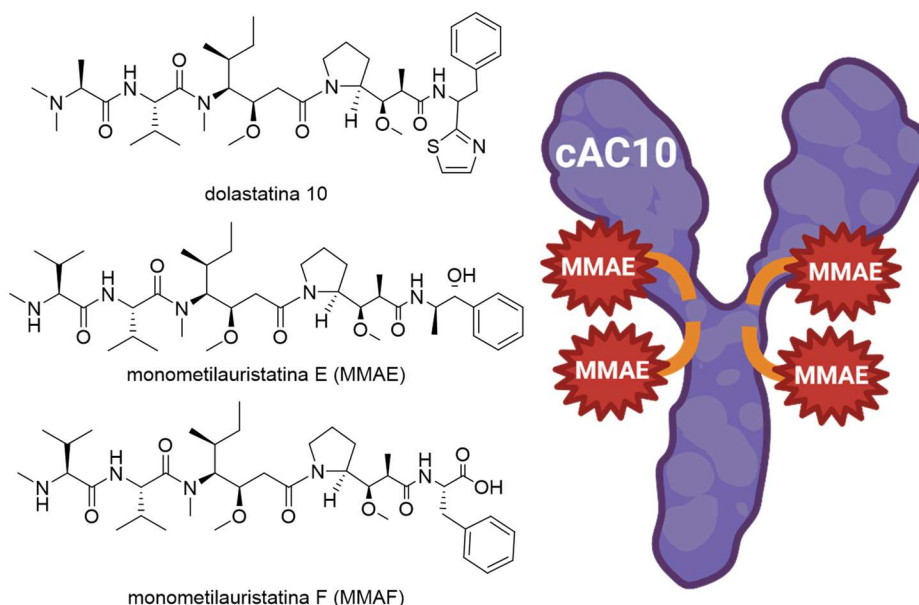


Figura 3: Análogos sintéticos de la toxina dolastatina 10 (izquierda). Representación del ADC brentuximab vedotin (derecha). Creado con BioRender.com

1.3. Productos naturales de hongos marinos

En años recientes, la investigación en productos naturales marinos se ha enfocado en los microorganismos debido a que son reconocidos como las fuentes más sustentables para la obtención de compuestos con esqueletos químicos novedosos y potencialmente útiles en el desarrollo de nuevos fármacos [3,4,26].

En este sentido, la plinabulina (NPI-2358) representa el primer fármaco desarrollado a partir de un organismo fúngico marino. Este fármaco anticancerígeno es un análogo sintético de la halimida (NPI-2350), una dicetopiperacina citotóxica obtenida de *Aspergillus* sp. CNC139 aislado de la alga verde *Halimeda copiosa* colectada en aguas Filipinas por el grupo del Dr. William Fenical (Figura 4) [26,27]. Actualmente, la plinabulina se encuentra en ensayos preclínicos y clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer [28]. En estos ensayos se evaluaron en combinación con nivolumab (anticuerpo humano IgG) para el tratamiento de tumores sólidos y pacientes con cáncer de pulmón avanzado; en combinación con docetaxel (análogo semisintético de paclitaxel, producto natural descubierto de la corteza del árbol tejo del pacífico *Taxus brevifolia*) para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas; y en combinación de pegfilgrastim para reducir la neutropenia causado por otros quimioterápicos [29-31].

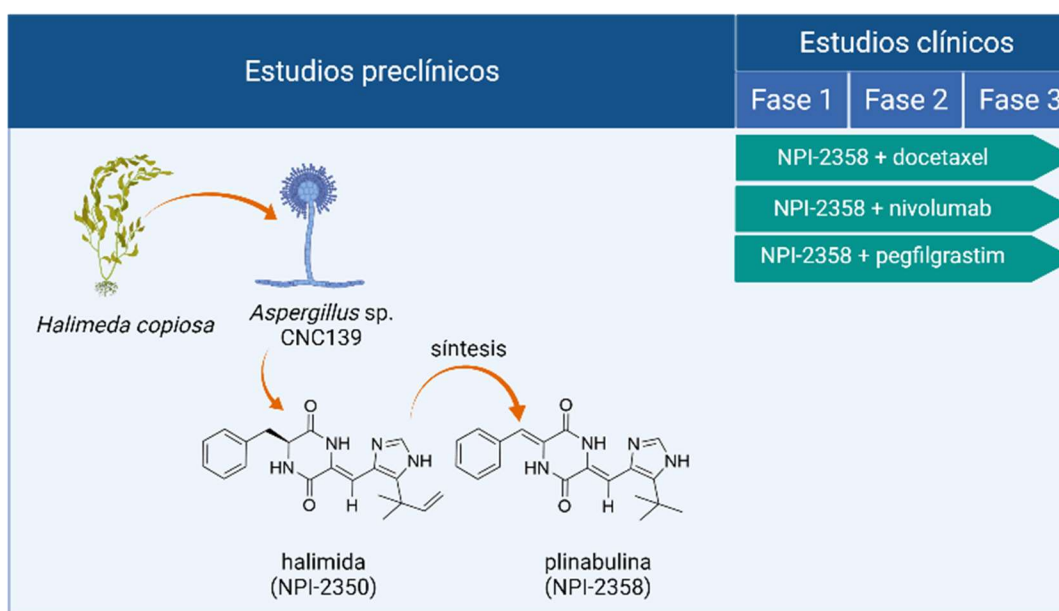


Figura 4. Desarrollo de la plinabulina. Creado con BioRender.com.

1.4. Hongos de sedimentos marinos

Los hongos son organismos que tienen la capacidad de crecer en diversos ambientes terrestres y acuáticos [32]. Pang y colaboradores (2016) proponen una definición de los hongos marinos como aquellos que se aíslan repetidamente de hábitats marinos y que son capaces de crecer y/o esporular en dichos ambientes, de forma libre en la columna de agua, en los sustratos y las superficies inmersas y en los sedimentos; además de que son capaces de formar relaciones simbióticas con otros organismos, o aquellos que se adaptan y evolucionan a nivel genético o que son metabólicamente activos en este ambiente [26].

Los hongos de sedimentos marinos resultan de interés en la investigación de productos naturales debido a su potencial biosintético de moléculas bioactivas [33,34]. Estos microorganismos crecen bajo condiciones extremas como alta presión, baja temperatura y concentración de O₂, oscuridad, salinidad y escasos nutrientes, que pueden condicionar su diversidad y distribución en el fondo marino [35,36].

Los estudios basados en los enfoques *ómicos* de estos microorganismos han permitido comprender como logran adaptarse a su nicho ecológico.

Los grupos fúngicos dominantes en el ambiente marino profundo son los filamentosos y las levaduras de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cadophora*, *Fusarium*, *Mycosphaerella*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Pichia*, *Malassezia*, *Pleurotus* and *Ganoderma* [32], mismos que se aíslan comúnmente en muestras de origen terrestre [26]. El origen probable de estas especies, en especial de los sedimentos menos profundos, puede deberse a la acumulación de micelio y esporas provenientes del lavado de los hábitats terrestres, la desembocadura de los depósitos de agua dulce y la dispersión de esporas por el aire, y que lograron adaptarse al medio marino [26]. Sin embargo, el descubrimiento de especies fúngicas endémicas en capas profundas de sedimentos indica su origen y adaptación desde el ambiente marino [26].

Diferentes grupos de investigación se han dedicado al estudio en el laboratorio de los productos naturales de hongos marinos cultivables y han demostrado el potencial biológico de estos compuestos. Sin embargo, aún falta por establecer la relación entre la actividad biológica observada y su función ecológica [26].

1.5. Golfo de México y colección fúngica de sedimentos marinos CIGOM

El Golfo de México (GoM) es el noveno cuerpo más grande de agua en el planeta que se encuentra limitado por territorio mexicano, estadounidense y cubano [37]. El GoM cuenta con una variedad de biota que se encuentra amenazada y vulnerable por factores antropogénicos como la contaminación por la industria del petróleo, el calentamiento global, la sobrepesca, entre otras [37]. En este sentido, las dos mayores catástrofes en el GoM han ocurrido por la exploración y producción petrolera por México y EUA. Las explosiones de los pozos Ixtoc I de PEMEX (3 de junio de 1979) y Macondo de la plataforma Deepwater Horizon concesionada a la compañía British Petroleum (20 de abril de 2010), ocasionaron el derrame de 3.5 millones de barriles de crudo y 5 millones de aceite, respectivamente. El impacto de estos eventos se ha estudiado desde los desastres, y desde el 2010 los gobiernos mexicanos y norteamericanos han tomado acciones para evitar, mitigar y evaluar futuros accidentes [5,37].

En el 2015, en nuestro país se fundó el Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) como un asociación de investigación científica y de servicios de consultoría, que mediante proyectos multidisciplinarios, evaluaría el impacto ambiental de la industria del gas y petróleo, en los ecosistemas marinos del CoM, además de establecer normas y procedimientos para entender y actuar en caso de futuros derrames de hidrocarburos de gran escala en el GoM [38].

Otras de las líneas de investigación del CIGoM incluyen los estudios sobre la degradación de hidrocarburos por consorcios bacterianos y fúngicos [38]. De manera previa, el estudio mediante enfoques independientes y dependientes del cultivo de los hongos de sedimentos marinos del GoM han permitido establecer, por un lado, su diversidad y los géneros predominantes dentro del hábitat, además de su potencial biotecnológico como agentes de biorremediación [36,39,40].

1.6. Enfoque OSMAC

El análisis genómico de microorganismos marinos ha permitido evidenciar su mayor capacidad biosintética con respecto a los organismos aislados de ambientes terrestres [41,42]. De estos, se han identificado genes responsables de las características fisiológicas que les permiten su supervivencia, y su cultivo en condiciones similares a las de su ambiente natural han demostrado su expresión [43,44]. Asimismo, se han identificado genes biosintéticos de péptidos no-ribosomales (NPRS), policétidos (PKS), terpenos y alcaloides, junto con los transcritos de ARN que confirman la producción de estos metabolitos secundarios *in situ*. Sin embargo, cuando se cultivan en las condiciones de laboratorio tradicionales se observa una baja diversidad de metabolitos secundarios [45-47].

Con el objetivo de activar los genes biosintéticos silenciados y diversificar la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de estos organismos, se han empleado técnicas que siguen el enfoque OSMAC (*One Strain, Many Compounds*). Este enfoque relativamente simple subraya que una sola cepa puede producir diferentes metabolitos secundarios cuando se cultiva en diferentes condiciones ambientales [45,47]. Es decir, el cambio de las condiciones de crecimiento y nutrientes, la estimulación por el crecimiento en co-cultivo y las distintas combinaciones de estos, cambian la fisiología global de una cepa microbiana y su metabolismo secundario (Figura 5) [46,47].

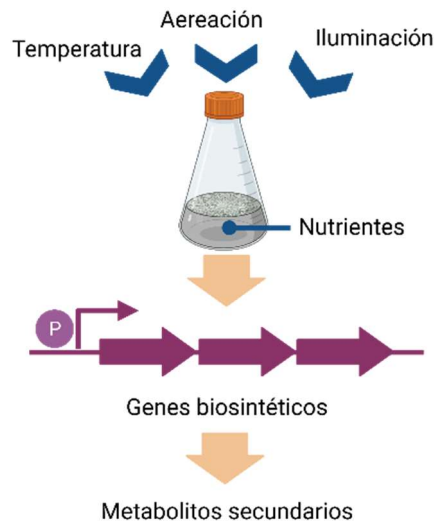


Figura 5.- Enfoque OSMAC. Creado con BioRender.com.

1.7. Metabolómica de hongos de sedimentos marinos.

La metabolómica es una herramienta analítica que permite obtener información del conjunto de metabolitos, el metaboloma, de un organismo en el transcurso de un proceso biológico, es decir, la respuesta metabólica de un organismo a los estímulos químicos y biológicos de su entorno (Figura 6) [48]. De manera breve, el análisis metabolómico consiste en identificar y medir la cantidad relativa del metaboloma en muestras biológicas (tejidos, cultivos, fluidos, células, etc.). Debido a que esta estrategia genera una gran cantidad de información se usan herramientas de bioestadística y bioinformática para el análisis de los resultados [49].

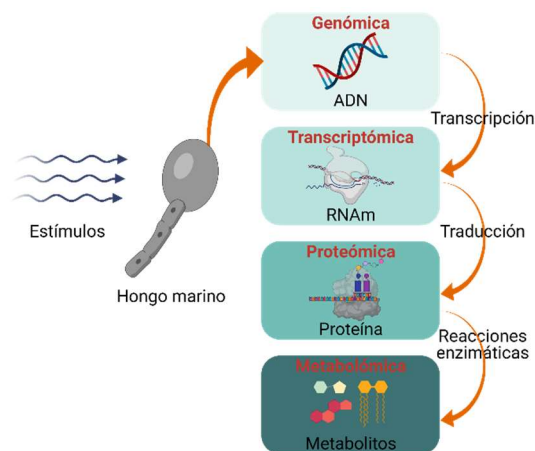


Figura 6. Correlación del flujo de información en los hongos marinos y los enfoques basados en *omics*. Creado con BioRender.com.

La aplicación de la metabolómica no dirigida en el estudio de los organismos marinos ha permitido comprender las interacciones entre estos organismos y su entorno mediadas por metabolitos. Asimismo, se ha podido establecer la diversidad química, que aunado con estudios de actividad biológica, han permitido el descubrimiento de compuestos con núcleos novedosos y bioactivos [50]. Klassen y colaboradores (2017) proponen un flujo de trabajo general para el análisis metabolómico y a manera de ejemplo en la Figura 7 se ejemplifican los pasos que se utilizaron en la presente investigación [49].



Figura 7. Flujo de trabajo en los estudios de metabolómica propuesto por Klassen y colaboradores (2017) [49]. Creado con BioRender.com.

Después de establecer el problema de estudio, el paso más importante para los análisis metabolómicos es la preparación de muestras de manera adecuada, ya que los resultados obtenidos dependerán de cada uno de los pasos involucrados en dicho tratamiento. Posteriormente, las muestras se analizan con alguna técnica analítica adecuada, donde las más utilizadas hoy en día son la espectroscopía de RMN ^1H y la cromatografía de líquidos y de gases acoplada a espectrometría de masas (LC-MS y GC-MS) [49,50]. Con respecto a la separación de los metabolitos, la LC ofrece una ventaja en el tiempo de análisis en comparación con GC, además de que las muestras pueden analizarse sin derivatizarse [50]. Cabe destacar, que las técnicas acopladas a MS ofrecen una mayor sensibilidad con respecto a la RMN, permitiendo detectar los metabolitos presentes en baja concentración o trazas [50]. Sin embargo, debido a las limitaciones de cada plataforma analítica, ningún método puede proporcionar una imagen completa del metaboloma de un organismo [50].

Para el procesamiento de datos, el análisis estadístico y la identificación de los metabolitos, se cuenta con una amplia variedad de programas computacionales y bases de datos [49]. Una de las herramientas más empleadas para este fin es el análisis de componentes principales (PCA), el cual permite reducir la complejidad del análisis estadístico. El PCA tiene como objetivo recopilar la mayor parte de la varianza presente en un conjunto de datos utilizando nuevas variables ortogonales, conocidas como componentes principales [51]. En la identificación de los metabolitos se usan bases de datos especializadas (Dictionary of Natural Products [52]) y no especializadas (Chemical Abstract Service a través del SciFinder [53]) [49,50].

1.8. Redes moleculares

Las redes moleculares (RMs) son una herramienta en el análisis metabolómico basado en MS desarrollada por la plataforma del Global Natural Products Social molecular networking (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu/>) [54]. Esta herramienta se ha popularizado en tiempos recientes y cuenta con sistemas de visualización de la diversidad química e identificación estructural de compuesto dentro del universo de señales detectadas [55-58]. El principio de las RMs se basa en que dos moléculas relacionadas estructuralmente comparten patrones de fragmentación cuando se someten al mismo proceso de ionización. Para su construcción, el conjunto de espectros MS/MS (MS^2) de una muestra se alinean usando un algoritmo de similitud espectral de coseno [55]. En este proceso se comparan entre si los espectros MS^2 con los mismos valores de masa/carga (m/z) y los espectros con diferentes iones precursores. El resultado es un gráfico en el que los espectros de masas de compuestos idénticos se visualizan en nodos que puede conectarse con aquellos compuestos relacionados estructuralmente mediante una línea que representa la diferencia de m/z entre los iones precursores o un puntaje de similitud (cosen score). Cuanto mayor es la similitud de los espectros MS^2 , el puntaje de similitud será más cercano a la unidad, con un umbral mínimo generalmente establecido en 0.7 [50].

Para aumentar el alcance de las redes moleculares en la identificación de moléculas o familias de moléculas, se han implementado opciones avanzadas en el flujo de trabajo de RMs por GNPS como el propagador de anotaciones MS2LDA [59] y MolNETenhancer [60]. De manera adicional, se puede realizar la anotación automática preliminar de los metabolitos presentes en la muestra mediante la comparación de los datos espectrométricos con los reportados dentro de las bases de datos especializadas del GNPS [50,54,55], o de manera manual siguiendo los lineamientos del Chemical Analysis Working Group (QAWG) [56,61].

1.9. Antibióticos y resistencia antimicrobiana

Los antibióticos son medicamentos que combaten infecciones en los seres humanos y los animales causadas por bacterias. Estas sustancias matan a las bacterias o dificultan su crecimiento y multiplicación [62]. Durante la época dorada de los antibióticos, entre los 40s y 60s del siglo pasado, hubo un descubrimiento importante de múltiples clases de antibióticos de origen microbiano y cuyo uso en la clínica permitió mejorar el tratamiento y pronóstico de las infecciones bacterianas (Figura 8). Asimismo, durante este periodo se impulsó el desarrollo de análogos semisintéticos y completamente sintético de estos fármacos, con la finalidad de mejorar la seguridad y eficacia de los mismos [2,62]. Sin embargo, debido a su uso excesivo, comenzaron a reportarse casos de inefectividad farmacológica causada por patógenos resistentes a los distintos tipos de antibióticos disponibles. Este fenómeno de denominó resistencia antimicrobiana (RAM) [2].

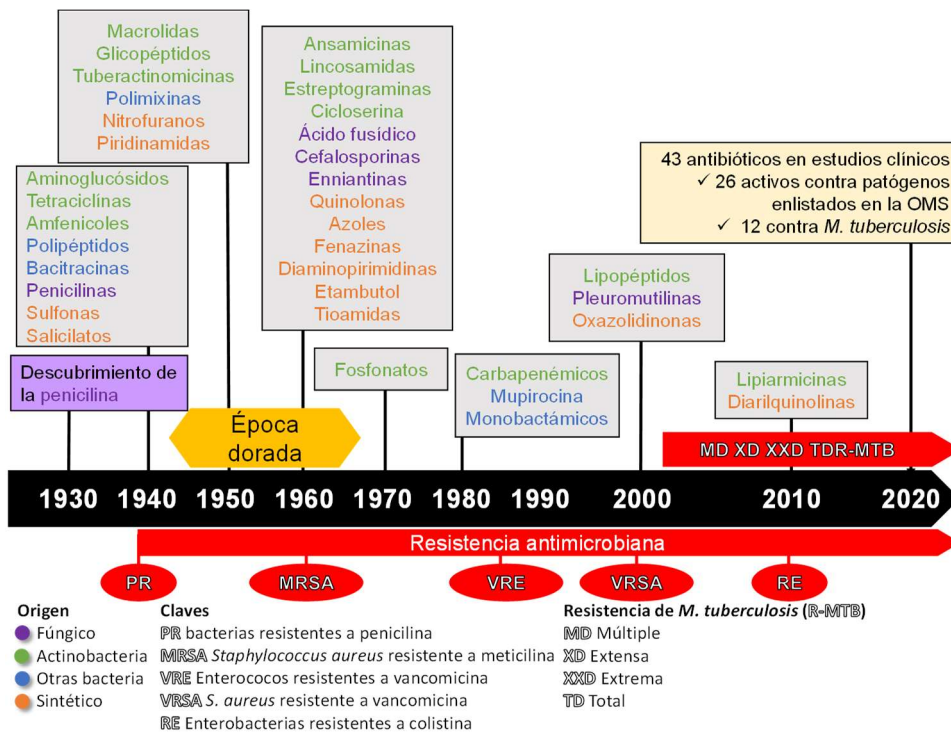


Figura 8. Desarrollo de nuevos antibióticos y aparición de resistencia antimicrobiana. Modificado de Hutchings y colaboradores (2019) [2].

La RAM puede definirse como el fenotipo que causa que un microorganismo tenga una menor susceptibilidad a un antibiótico que otro miembros de su misma especie [62]. En la naturaleza, la resistencia de las bacterias hacia los antibióticos es un proceso evolutivo a largo plazo [62]. Sin embargo, este proceso ocurre de manera acelerada en algunas bacterias patógenas que están en interacción constante a los agentes antimicrobianos, generando un impacto negativo en la atención de la salud, la producción alimentaria y reduciendo la esperanza de vida [63].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la RAM representa una amenaza global creciente [62,63]. Además, durante la epidemia causada por la infección respiratoria por el virus del SARS-CoV 2, se reportaron numerosos casos de pacientes con COVID-19 que presentaron coinfecciones bacterianas [64,65]. Asimismo, en 2020 la OMS actualizó la lista de patógenos y la prioridad con la que se requieren su manejo, y posicionó a *Mycobacterium tuberculosis* y las especies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*, que se agrupan como bacterias ESKAPE, como los patógenos de vigilancia urgente (Cuadro 1) [66]. Estos microorganismos causan infecciones graves como resultado de la evasión de la respuesta inmunológica [67] y el desarrollo de resistencia a los antibióticos de primera línea, e incluso aquellos de última generación [68,69].

Cuadro 1. Listado de patógenos resistentes y su prioridad para el desarrollo de nuevos antibióticos [66].

Prioridad	Patógeno	Resistencia
Crítica	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR ¹ y XDR ²	¹ Rifampicina o isoniazida; ² Fluoroquinolonas
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> spp.	Carbapenémicos y Cefalosporinas de 3 ^a generación
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Metilicina, vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de 3 ^a generación Fluoroquinolonas
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

En nuestro país, el Plan Universitario contra la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), coordinado desde el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) de la UNAM, articula desde el 2017 una Red de hospitales y laboratorios clínicos que proporcionan información sobre la RAM de bacterias ESKAPE aisladas de hemocultivos y urocultivos, con el fin de establecer estrategias que mitiguen la dicho fenómeno de resistencia [70,71]. De los hallazgos encontrados durante el 2018 en hemocultivos, resaltan el aumento de resistencia *A. baumannii* a todos los antibióticos usados en la clínica; el incremento del porcentaje de resistencia de *E. cloacae* a ciprofloxacino y meropenem; y la persistencia de patógenos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de 3^a y 4^a generación. Por otro lado, en los urocultivos, la resistencia de *K. pneumoniae* y *E. coli* fue superior para cefalosporinas de 3^a y 4^a generación. Además, para la segunda bacteria aumentó la resistencia para la trimetoprima, el sulfametoxazol y la ciprofloxacina [71].

Para hacer frente al problema global de RAM, el gobierno de los EUA mediante los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) propusieron un plan de acción para detener la RAM. Una de las estrategias de este plan contempla el apoyo a la investigación básica para identificar nuevos tratamientos prometedores y aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia. [2,63]. En este sentido, en 2020 la OMS reportó que 43 antibióticos y combinaciones de éstos se encontraban en estudios clínicos, y 292 agentes antibacterianos diversos en estudios preclínicos [66]. A pesar de estos avances, el descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas debe mantenerse debido al número reducido de moléculas activas que alcanzan los estudios clínicos y el periodo de tiempo que transcurre en durante el desarrollo de nuevos fármaco.

2. Hipótesis

El estudio químico, metabolómico y biológico de hongos aislados de sedimentos marinos obtenidos del mar profundo del Golfo de México (GoM), permitirá evidenciar el potencial antimicrobiano de estos organismos y que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos.

3. Objetivo general

El objetivo general del proyecto consistió en establecer la diversidad química y el potencial antimicrobiano de una serie de hongos cultivables obtenidos de sedimentos profundos del Golfo de México. Este estudio se realizó mediante el cultivo de las especies siguiendo el enfoque OSMAC, además del empleo de técnicas cromatográficas y espectroscópicas para la purificación y caracterización estructural de los metabolitos. Paralelamente, se realizó su estudio metabolómico mediante el análisis de sus extractos por LC-MS y la comparación de los resultados con lo contenido en bases de datos especializadas y la construcción de redes moleculares en la plataforma del GNPS.

4. Objetivos particulares

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 4.1. Cultivar en pequeña escala a los organismos fúngicos de muestras de sedimentos marinos y de playa en estudio bajo diferentes condiciones de crecimiento.
- 4.2. Obtener los extractos orgánicos mediante la aplicación de técnicas de maceración y de reparto con los disolventes adecuados.
- 4.3. Evaluar la actividad antimicrobiana de todos los extractos y seleccionar a las especies más activas para la obtención de sus metabolitos secundarios.
- 4.4. Cultivar en mediana escala a las especies fúngicas seleccionadas y obtener sus correspondientes extractos orgánicos.
- 4.5. Establecer los perfiles cromatográficos de todos los extractos orgánicos mediante cromatografía de líquidos (HPLC y UPLC) en fase reversa, e identificar los cambios en el contenido metabólico bajo las diferentes condiciones de crecimiento.
- 4.6. Realizar el estudio químico biodirigido de los organismos seleccionados mediante la aplicación de métodos cromatográficos de vanguardia. Una vez aislados los compuestos, caracterizarlos estructuralmente mediante estudios espectroscópicos y espectrométricos.
- 4.7. Realizar los estudios de metabolómica por UPLC-ESI-HRMS-MS/MS y el uso de bases de datos especializadas en productos naturales y la plataforma del GNPS.
- 4.8. Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos puros empleando el mismo bioensayo utilizado para los extractos y sobre microorganismos resistentes a antibióticos y especies de *Mycobacterium* y la línea celular Vero.

5. Desarrollo experimental

5.1. Acondicionamiento, cultivo y obtención de extractos

En este estudio se utilizaron 29 cepas fúngicas aisladas de muestras de sedimentos marinos del Golfo de México (GoM) colectadas de ocho estaciones del GoM durante las campañas Metagenómica-Malla Fina (MET-I) y Metagenómica (MET-II) realizadas en 2016 y 2017, respectivamente, a bordo del buque exploratorio Justo Sierra de la UNAM (Cuadro 2) [39,40]. De manera adicional, se estudió una cepa de Playa Hermosa, Ensenada Baja California, por tratarse de una zona con daño antropogénica [40]. Las cepas fueron proporcionadas por la Dra. Patricia Vélez Aguilar del Laboratorio de Ecología Molecular de Micromicetos en Ecosistemas Amenazados del Instituto de Biología, UNAM.

Cuadro 2. Colección CIGOM.

Estación	Profundidad (m)	Cepa
B7	1191	<i>Cladosporium</i> sp. CONTIG5
C11	860	<i>Cladosporium halotolerans</i> CIGOM1
C12	1290	<i>Stemphylium vesicarium</i> CIGOM3
C14	3240	<i>Penicillium echinulatum</i> CONTIG4
D16	652	<i>Penicillium</i> sp. CIGOM5, 8–17 y 19–27
D17	976	<i>Penicillium brevicompactum</i> CONTIG2
N1	606	<i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2 y CIGOM7
N2	995	<i>Cladosporium ramotenellum</i> CONTIG7
		<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4

En el laboratorio, cada cultivo axénico en caja de Petri con medio PDA se transfirió a tubos Falcon de 50 mL con 15 mL de medio YESD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de soya y 2% de dextrosa) y se colocó en un agitador orbital durante 3-5 d a 100 rpm a temperatura ambiente (TA; 13.1–24.4 °C), con ciclos de luz-oscuridad 12/12 h. Todos los inóculos se vertieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio arroz (15 g o 30 g de arroz con 30 mL o 60 mL de agua desionizada) y se dejaron crecer en tres condiciones diferentes: (1) TA con luz-oscuridad 12/12 h por 21 d; (2) 20 °C en oscuridad por 30 d, y (3) 4 °C en oscuridad por 60 d. Finalizado el tiempo de crecimiento, cada hongo se extrajo con 60 mL de CH₃OH–CHCl₃ (1:1), se filtraron y se mezclaron con 120 mL de agua. Las fases orgánicas se recuperaron en un embudo de separación y se secaron bajo presión reducida. Los residuos se disolvieron en 60 mL de CH₃CN–CH₃OH y desgrasaron con el mismo volumen de *n*-hexano. Los extractos se pesaron y se mantuvieron a temperatura ambiente para su estudio posterior (Cuadro 3).

Cuadro 3. Rendimiento de extractos de pequeña escala (mg) de los hongos en estudio.

Cepa	TA, luz-oscuridad, 12/12, 21 d ^a	20 °C, oscuridad, 30 d ^b	4 °C, oscuridad, 60 d ^b
<i>C. halotolerans</i> CIGOM1	38.4	10.2	20.7
<i>Biatriospora</i> sp. CIGOM2	38.4	36.6	17.3
<i>S. vesicarium</i> CIGOM3	46.9	33.6	34.1
<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	124.7	45.7	8.4
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM5	153.7	63.2	98.2
<i>Biatriospora</i> sp. CIGOM7	71	54.7	20.7
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM8	135.1	47.6	58.8
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM9	192.2	72.3	80.2
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM10	226.6	71.1	84.9
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM11	124.9	64.3	78.8
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM12	196	74.0	65
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM13	203.9	75.4	82.2
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM14	193.7	73.4	97.9
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM15	179	69.2	55.7
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM16	158.5	51.0	65.7
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM17	136.3	62.0	52.2
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM19	122	60.1	65.5
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM20	97.8	52.0	55
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM21	194.4	19.9	102.9
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM22	157.2	61.5	86.8
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM23	194.7	52.9	69.6
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM24	129.5	54.0	86.6
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM25	176.9	62.6	94.2
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM26	182.2	41.4	80.3
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM27	171.4	52.0	80.7
<i>P. brevicompactum</i> CONTIG2	136.2	118.7	39.7
<i>P. echinulatum</i> CONTIG4	119.6	51.8	72.6
<i>Cladosporium</i> sp. CONTIG5	112.1	37.2	35.2
<i>C. ramotenellum</i> CONTIG 7	57.3	30.7	16.2
<i>Corollospora gracilis</i>	37.1	19.6	5.5

^a 30 g de arroz y 60 mL de H₂O; ^b 15 g de arroz y 30 mL de H₂O;

5.2. Evaluación antimicrobiana

Los extractos desgrasados, fracciones y compuestos puros se evaluaron para determinar su actividad antimicrobiana usando el método de dilución en caldo con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) para evaluaciones microbiológicas [72]. Todas las muestras se disolvieron en DMSO (2.0%). Las bacterias blanco usadas en los ensayos fueron *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ATCC 25923 (MRSA) y susceptible a meticilina ATCC 25923 (MSSA), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhi* ATCC 9992V, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina ATCC 51299 (VREF) y *Enterococcus faecalis* susceptible a vancomicina ATCC 29212 (VSEF), *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC 700324, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos (aislamiento clínico 564) y susceptible ATCC 17978 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231. Los bioensayos se realizaron en placas de 96 pozos por triplicado a la concentración de 200 y 20 µg/mL para extractos y fracciones, y 100 µg/mL. Los compuestos **1–8** fueron evaluados sobre *M. tuberculosis* H37Rv bajo condiciones aeróbicas (replicativa) como anaeróbicas (no replicativa) usando los ensayos MABA and LORA [73]. De manera adicional, los compuestos **6** y **8**, con inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* mayor al 90%, fueron evaluados en MABA sobre *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. marinum* ATCC 927, *M. avium* ATCC 15769 y *M. kansasii* ATCC 12478 [73,74], y sobre la línea celular Vero ATCC CCL-81. Para este último bioensayo, se usó el colorante resazurina (0.6 µM) para determinar la viabilidad celular y se midió su absorbancia a 530 nm (excitación) y 590 nm (emisión). Los controles positivos para cada bioensayo se indican en cada cuadro de resultados para cada ensayo.

5.3. Cultivo en mediana escala de las especies selectas

Los organismos selectos *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4 y *C. ramotenellum* CONTIG7 se cultivaron en cinco matraces Fernbach 2.8 L con medio arroz (100 g de arroz/200 mL de agua desionizada) y se dejaron crecer en la condición que demostró la mayor actividad antimicrobiana, con el objetivo de obtener extractos suficientes para el estudio químico biodirigido. Adicionalmente, los hongos se cultivaron en un matraz Fernbach 2.8 L con medio arroz en las otras dos condiciones de crecimiento con fines comparativos (Cuadro 4). Finalmente, las cepas selectas se cultivaron en dos matraces Fernback con medio arroz y caldo Czapek-Dox (100 g de arroz con 200 mL de caldo Czapek-Dox compuesto por sucrosa, 30 g/L; NaNO₃, 2 g/L; K₂HPO₄, 1 g/L; MgSO₄, 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L; y FeSO₄, 0.01 g/L; pH 7.3 a 25 °C) y dos con medio arroz y agua marina artificial (100 g de arroz con 200 mL de agua marina Instant Ocean 32 g/L) a TA con luz-oscuridad 12/12 h por 21 d. Finalizado el tiempo de crecimiento, los extractos orgánicos se obtuvieron mediante maceración y reparto con CHCl₃-CH₃OH y luego se desengrasaron con hexano.

Cuadro 4. Rendimiento de extractos de mediana escala (mg) de los hongos CIGOM selectos.

Cepa	MA, TA, luz-oscuridad 12/12, 21 d	MA, 20 °C, oscuridad, 30 d	MA, 4 °C, oscuridad, 60 d	MA-agua marina artificial ^c	MA-Caldo Czapek-Dox ^c
<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	301.1 ^b	494.0 ^b	636.6 ^a	239.9	120.6
<i>P. echinulatum</i> CONTIG4	437.8 ^b	2069.4 ^a	396.5 ^b	449.5	657.1
<i>C. ramotenellum</i> CONTIG7	342.1 ^b	878.4 ^a	219.6 ^b	271.4	212.1

MA, medio arroz; Cantidad total de medio: ^a 500, ^b 100 y ^c 200 g.

5.4. Estudio químico biodirigido de las especies selectas

5.4.1. *Alternaria* sp. CIGOM4

Los extractos desgrasados de mediana escala de *Alternaria* sp. CIGOM4 se fraccionaron por cromatografía tipo flash usando columnas RediSep RF Gold Si-gel (4.0 g de Si-gel; Teledyne Inc., Thousand Oaks, CA, USA) y mezclas de polaridad creciente con *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-CH₃OH. 26 fracciones se obtuvieron de acuerdo con los perfiles UV y ELSD (Cuadro 5). Alternariol (**1**; 35.5 mg) se obtuvo a partir de la fracción siete del extracto de 20 °C (Figura 9 y 10). Por otro lado, la fracción F4 se sometió a un proceso de purificación por HPLC preparativo (columna Gemini C18, 250 mm x 21.2 mm D.I., 5.0 μm, 100 Å; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) con un sistema en gradiente de 30:70 CH₃CN-ácido fórmico al 0.1% acuoso a 100 de CH₃CN en 15 min a un flujo de 21.24 mL/min, resultando el compuesto metil alternariol (**2**; 2.8 mg, *t_R*=11.8 min, Figura 11 y 12).

Cuadro 5. Fraccionamiento primario de los extractos de *Alternaria* sp. CIGOM4.

Extracto A		Extracto B		Extracto C	
Fracción	Cantidad (mg)	Fracción	Cantidad (mg)	Fracción	Cantidad (mg)
F1	1.7	F1	3.1	F1	1.8
F2	0.4	F2	30.4	F2	279
F3	38.3	F3	53.7	F3	42.5
F4	90.5	F4	81.9	F4	67.4
F5	6.9	F5	6.3	F5	48.4
F6	4.4	F6	12.6	F6	79.4
F7	23.1	F7	35.5	F7	7.5
F8	11.1	F8	126.7		
F9	24.9	F9	42.4		
F10	27.2				
Cantidad total recuperada		Cantidad total recuperada		Cantidad total recuperada	
228.5		392.6		526.0	
% recuperado		% recuperado		% recuperado	
84.6		85.3		87.9	

Medio arroz a A) TA luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d.

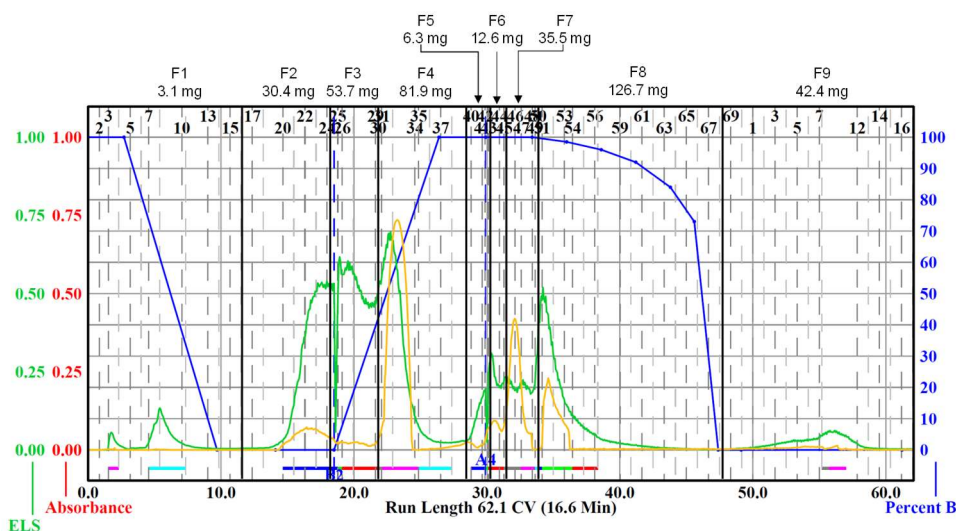


Figura 9. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de mediana escala de *Alternaria* sp. CIGOM4 cultivado a 20 °C.

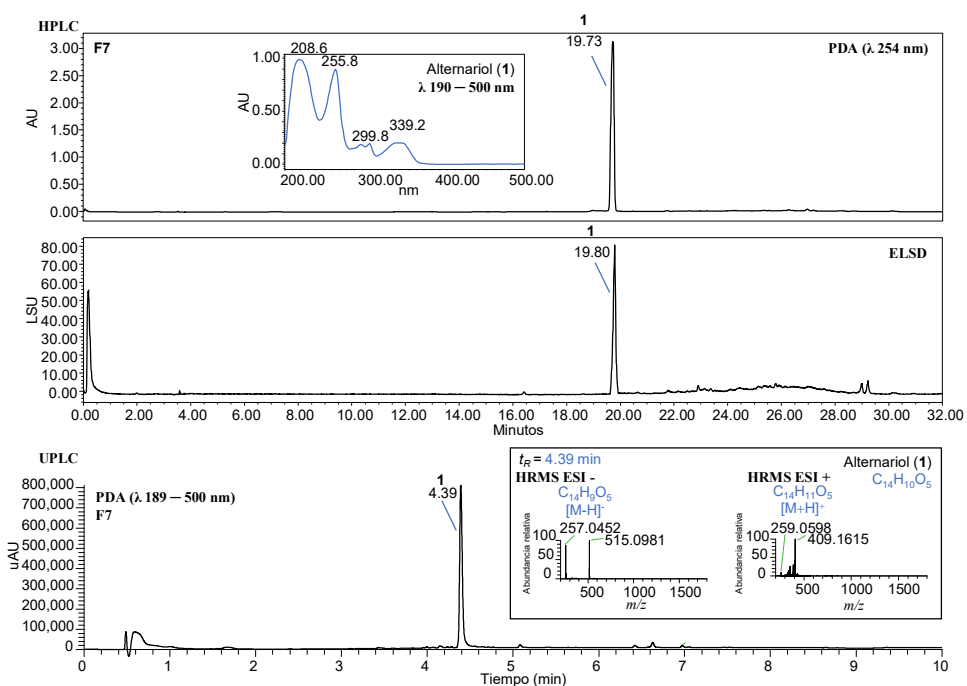


Figura 10. Perfiles cromatográficos y espectros de UV y HRMS del alternariol (1) de *Alternaria* sp. CIGOM4.

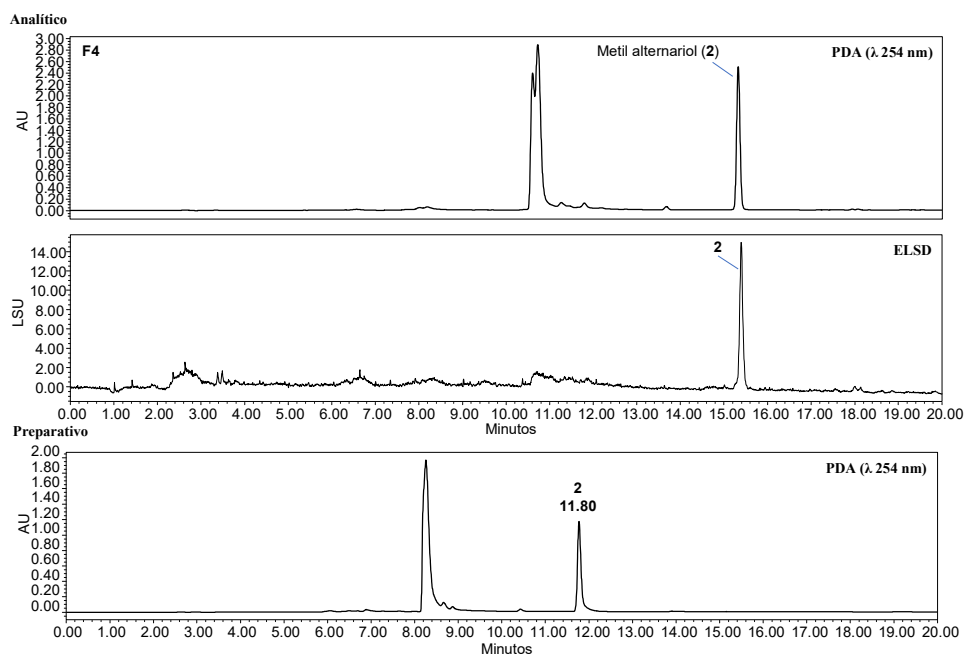


Figura 11. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de la fracción F4 del extracto de mediana escala de *Alternaria* sp. CIGOM4 cultivado a 20 °C.

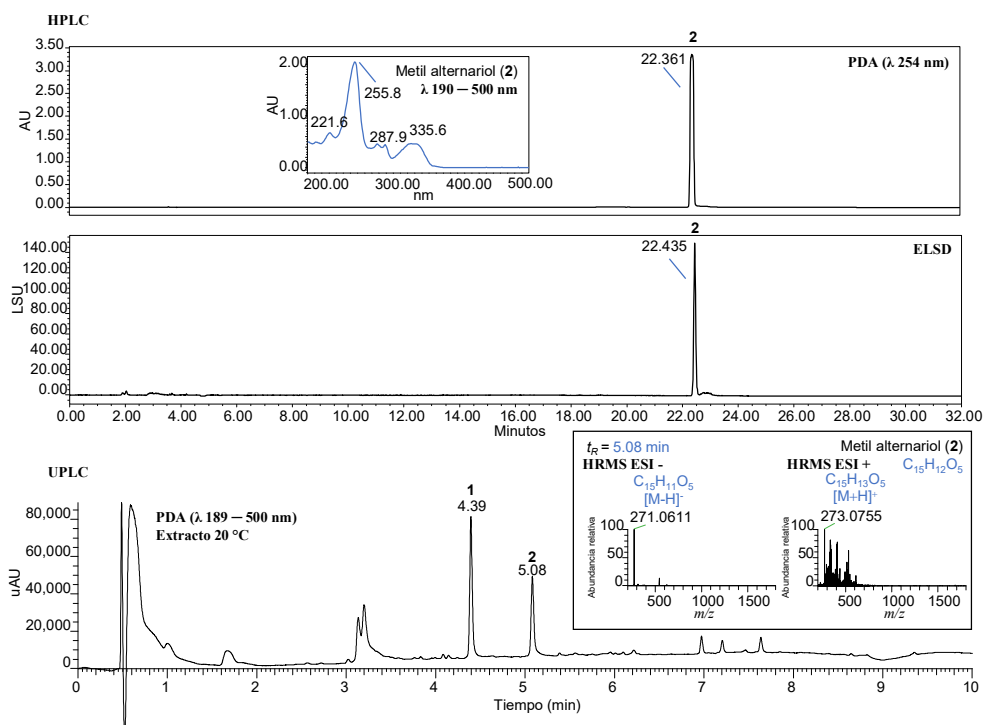


Figura 12. Perfiles cromatográficos y espectros de UV y HRMS del metil alternariol (**2**) de *Alternaria* sp. CIGOM4.

5.4.2. *P. echinulatum* CONTIG4

Los extractos desgrasados de mediana escala de *P. echinulatum* CONTIG4 se fraccionaron por cromatografía tipo flash con columnas RediSep RF Gold Si-gel (12.0, 40.0 y 4.0 g de Si-gel; Teledyne Inc., Thousand Oaks, CA, USA) y mezclas de polaridad creciente con *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-CH₃OH. A partir del extracto de 20 °C (2.1 g) se obtuvieron 13 fracciones de acuerdo con los perfiles UV y ELSD (Cuadro 6 y Figura 13). Las fracciones 5 (174.8 mg), 6 (109.0 mg) y 7(43.4 mg) se sometieron a un proceso de purificación por HPLC preparativo (columna Gemini C18, 250 mm x 21.2 mm D.I., 5.0 μm, 100 Å) con un sistema en gradiente 30:70 CH₃CN-ácido fórmico al 0.1% acuoso a 100 de CH₃CN en 15 min a un flujo de 21.24 mL/min resultando el compuesto ciclopenina (**3**; 5.5 mg, *t_R*= 9.20 min), ciclopeptina (**4**; 49.6 mg, *t_R*=9.75 min), deshidrociclopeptina (**5**, 6.2 mg, *t_R*=10.24 min) y viridicatina (**6**;14.1 mg, *t_R*=12.04 min) (Figuras 14-17).

Cuadro 6. Fraccionamiento primario de los extractos de *P. echinulatum* CONTIG4.

Extracto A		Extracto B		Extracto C	
Fracción	Cantidad (mg)	Fracción	Cantidad (mg)	Fracción	Cantidad (mg)
F1	1.2	F1	2.9	F1	1.8
F2	160.2	F2	8.9	F2	116.8
F3	21.0	F3	815.7	F3	35.6
F4	22.8	F4	91.1	F4	26.3
F5	35.0	F5	174.8	F5	35.4
F6	12.5	F6	109.0	F6	48.1
F7	58.1	F7	43.4		
		F8	66.4		
		F9	56.6		
		F10	54.4		
		F11	66.5		
		F12	44.4		
		F13	169.6		
Cantidad total recuperada	310.8	Cantidad total recuperada	1703.7	Cantidad total recuperada	264
% recuperado	78.05123	% recuperado	87.7	% recuperado	73.1

Medio arroz a A) TA luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d.

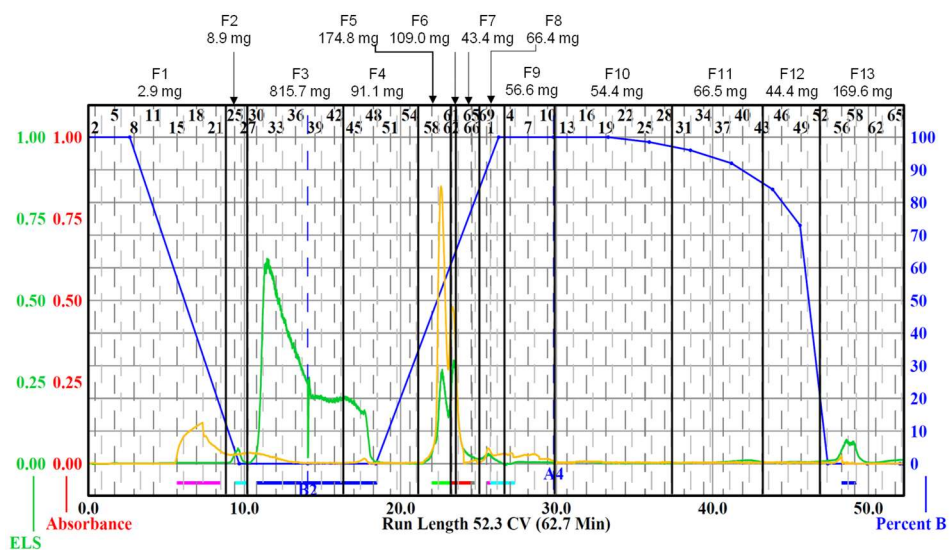


Figura 13. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de mediana escala de *P. echinulatum* CONTIG4 cultivado a 20 °C.

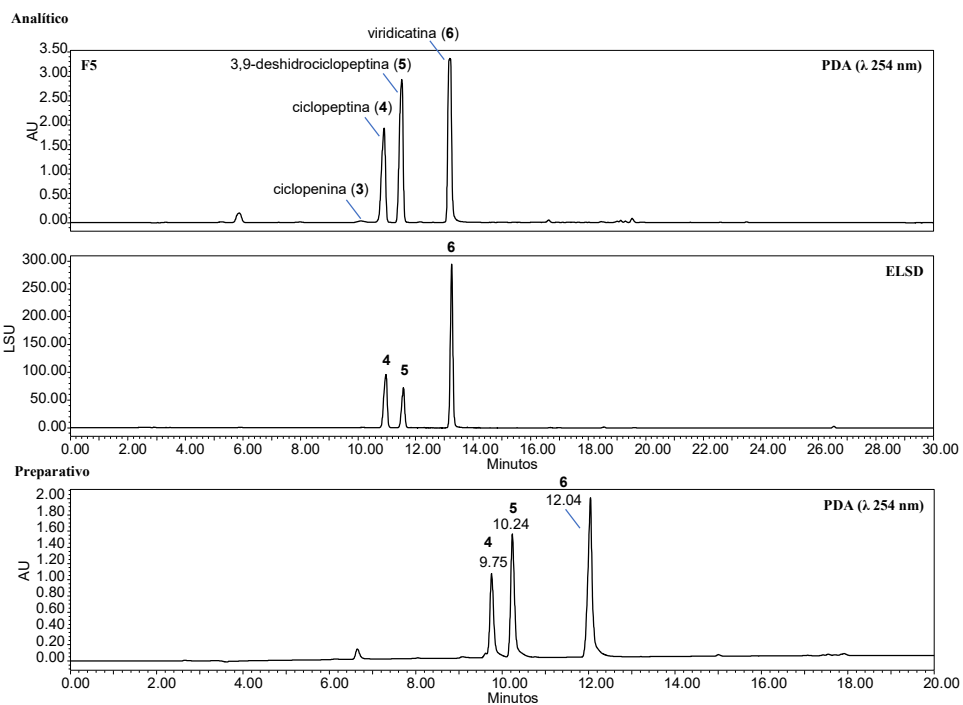


Figura 14. Perfiles cromatográficos por HPLC de la fracción F5 del extracto de mediana escala de *P. echinulatum* CONTIG4 cultivado a 20 °C.

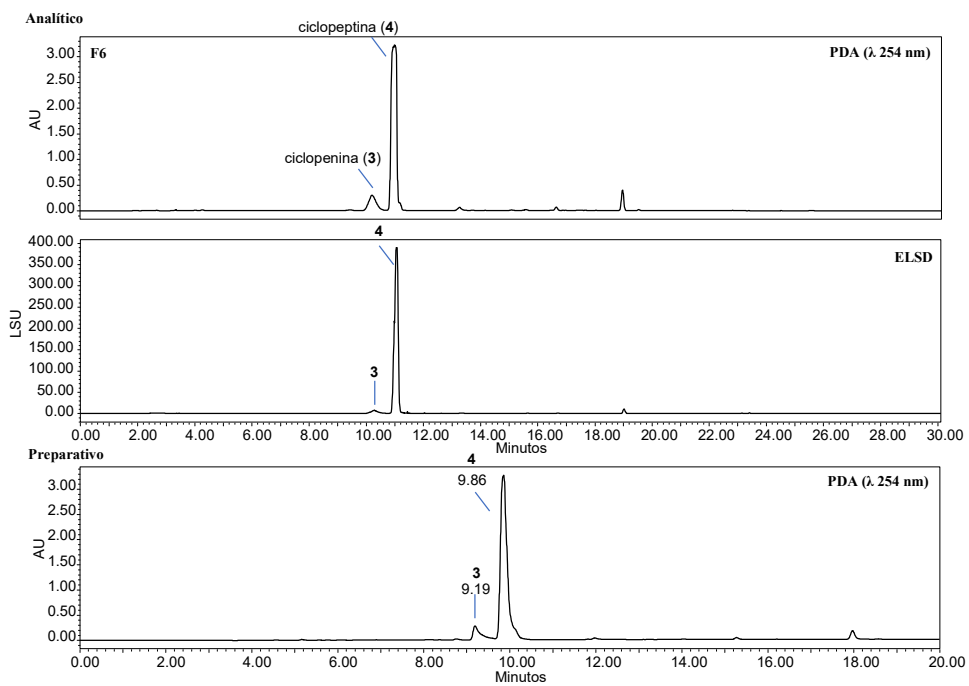


Figura 15. Perfiles cromatográficos por HPLC de la fracción F6 del extracto de mediana escala de *P. echinulatum* CONTIG4 cultivado a 20 °C.

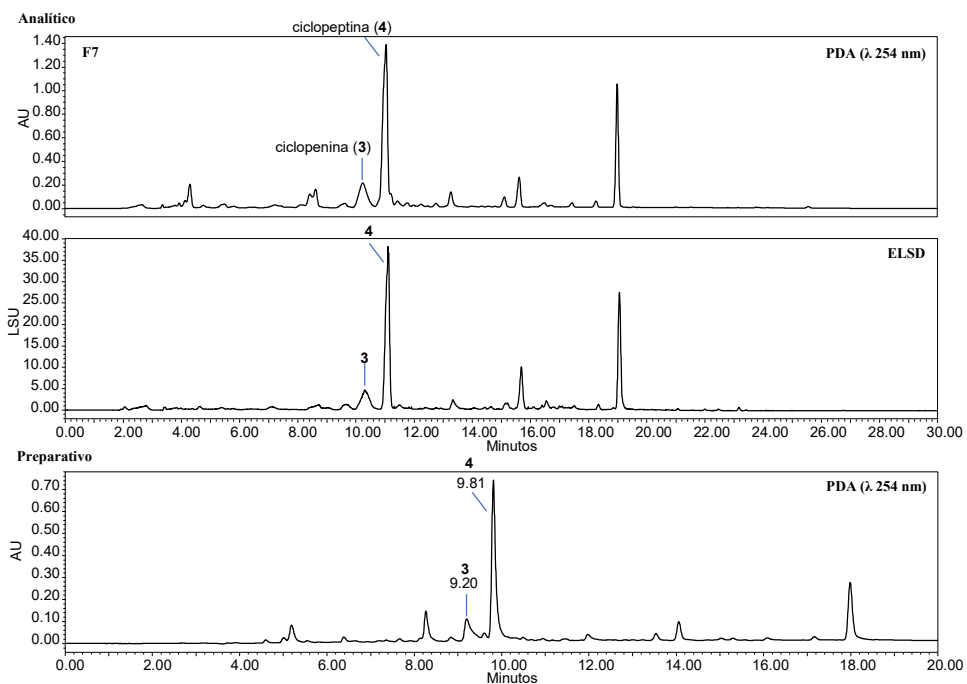


Figura 16. Perfiles cromatográficos por HPLC de la fracción F7 del extracto de mediana escala de *P. echinulatum* CONTIG4 cultivado a 20 °C.

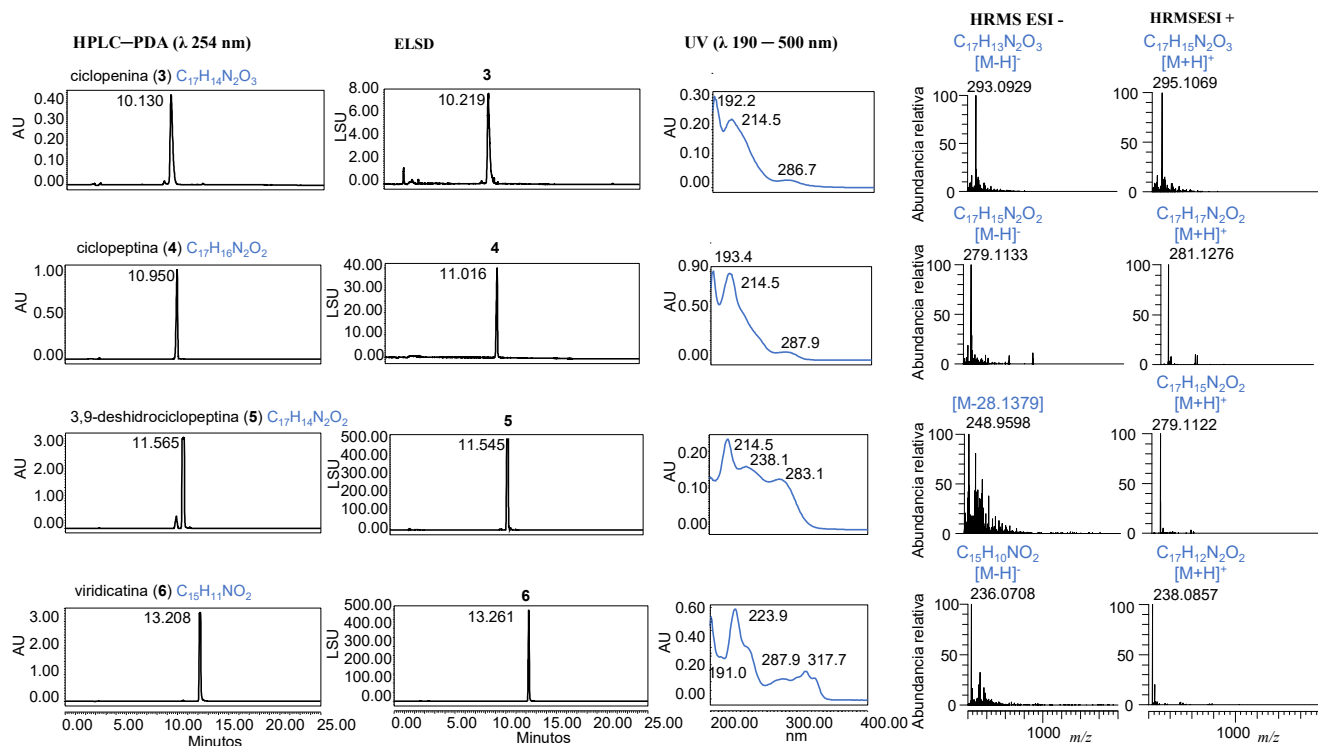


Figura 17. Perfiles cromatográficos y espectros UV y HRMS de los compuestos 3–6 de *P. echinulatum* CONTIG4.

5.5. Estudio químico convencional de especies selectas

5.5.1. *Biatriospora* sp. CIGOM2

El extracto de pequeña escala (38.4 mg) de *Biatriospora* sp. CIGOM2 cultivado a TA se fraccionó por cromatografía tipo flash en una columna RediSep RF Gold Si-gel (4.0 g de Si-gel; Teledyne Inc., Thousand Oaks, CA, USA) y mezclas de polaridad creciente con *n*-hexano-CHCl₃-AcOEt-CH₃OH. Cinco fracciones se obtuvieron de acuerdo con los perfiles UV y ELSD (Figura 18). La fracción F4 (11.7 mg) se sometió a un proceso de purificación por HPLC semipreparativo (columna Gemini C18, 250 mm x 10.0 mm D.I., 5.0 μm, 100 Å) con un sistema en gradiente de 15:85 CH₃CN-ácido fórmico al 0.1% acuoso a 100 de CH₃CN en 15 min con un flujo de 4.72 mL/min, resultando la citocalasina D (7; 1.7 mg, *t*_R = 13.95 min, Figura 19 y 20).

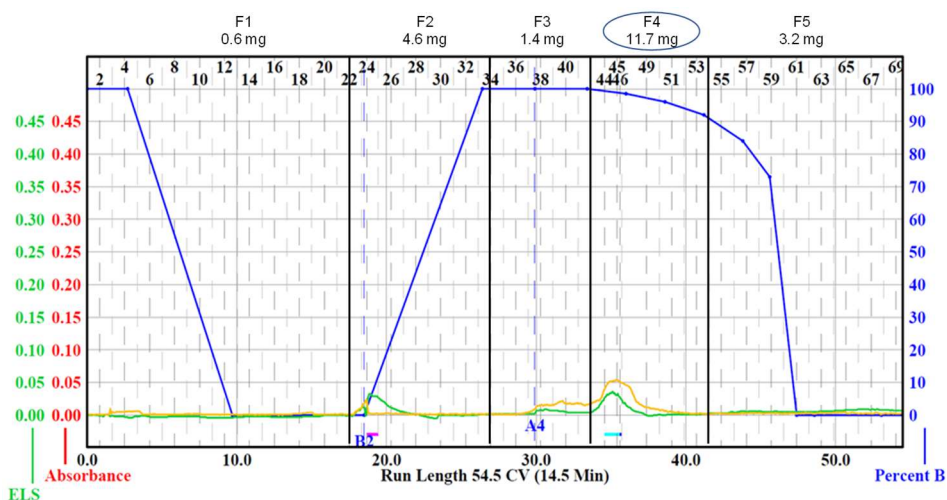


Figura 18. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de pequeña escala de *Biatriospora* sp. CIGOM2 cultivado a TA.

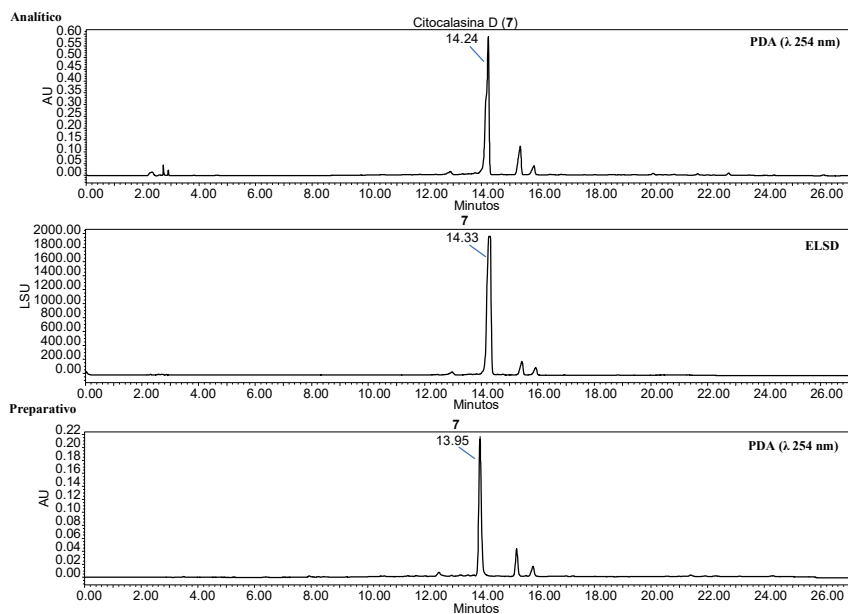


Figura 19. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de la fracción F4 del extracto de pequeña escala de *Biatriospora* sp. CIGOM2 cultivado a TA.

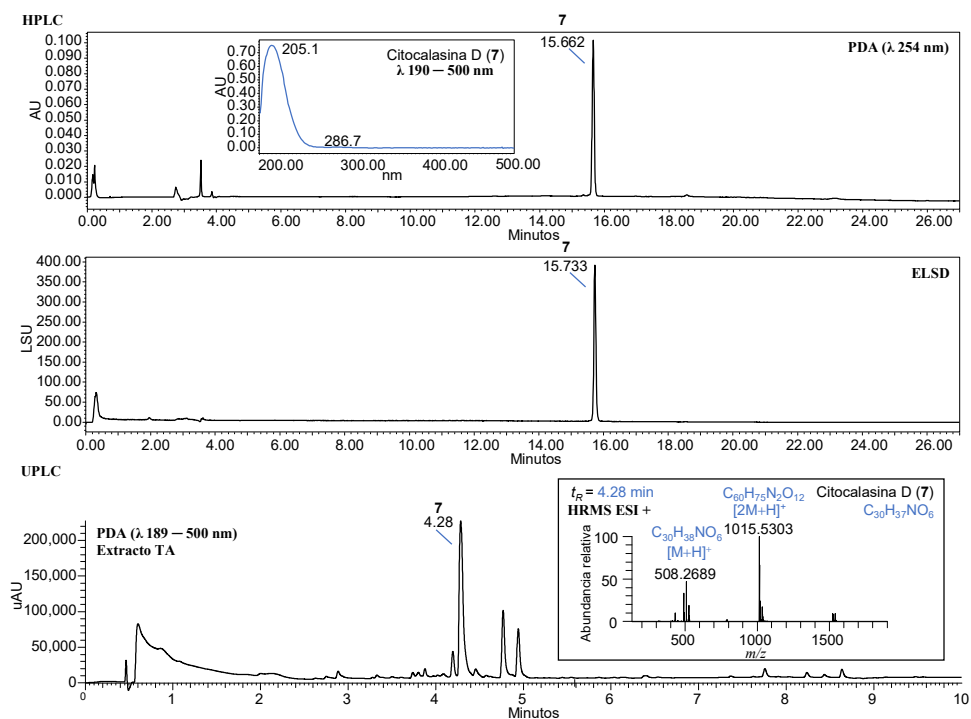


Figura 20. Perfiles cromatográficos y espectros de UV y HRMS de la citocalasina D (7) aislada de *Biatrospora* sp. CIGOM2.

5.5.2. *Penicillium* sp. CIGOM10

El extracto de mediana escala (1.0 g) de *Penicillium* sp. CIGOM10 cultivado a TA en 100 g de medio arroz (10 matraces Erlenmeyer con 10 g de arroz/20 mL de agua desionizada) se fraccionó por cromatografía tipo flash en una columna RediSep RF Gold Si-gel (40.0 g de Si-gel; Teledyne Inc., Thousand Oaks, CA, USA) y mezclas de polaridad creciente con *n*-hexano-CH₃Cl-AcOEt-CH₃OH. 12 fracciones se obtuvieron de acuerdo con los perfiles UV y ELSD (Figura 21). La fracción F10 (83.6 mg) se sometió a un proceso de purificación por HPLC preparativo (columna Gemini C18, 250 mm x 21.2 mm D.I., 5.0 µm, 100 Å) con un sistema en gradiente 15:85 CH₃CN-ácido fórmico al 0.1% acuoso a 100 de CH₃CN en 15 min a un flujo de 21.24 mL/min, resultando el compuesto melegrina A (**8**; 14.4 mg, *t_R* = 6.30 min, Figura 22 y 23).

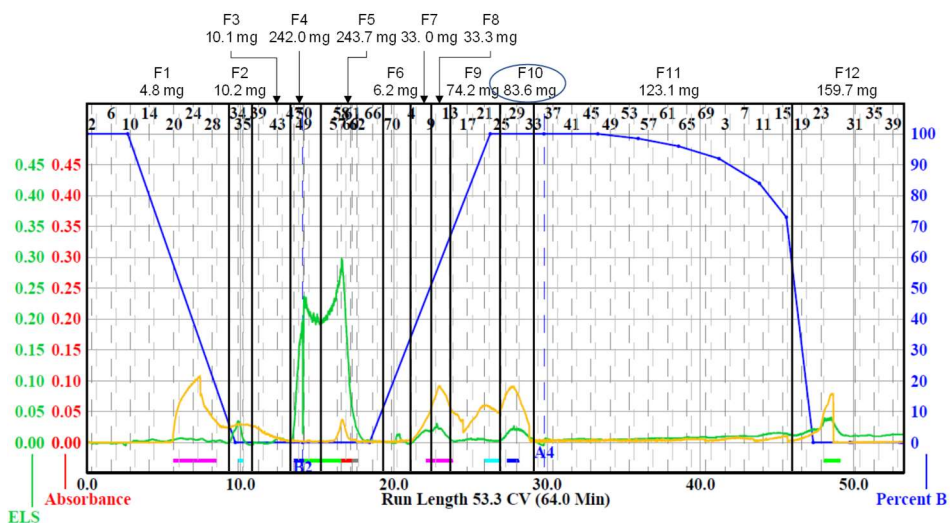


Figura 21. Perfil cromatográfico tipo flash del extracto de mediana escala de *Penicillium* sp. CIGOM10 cultivado a TA.

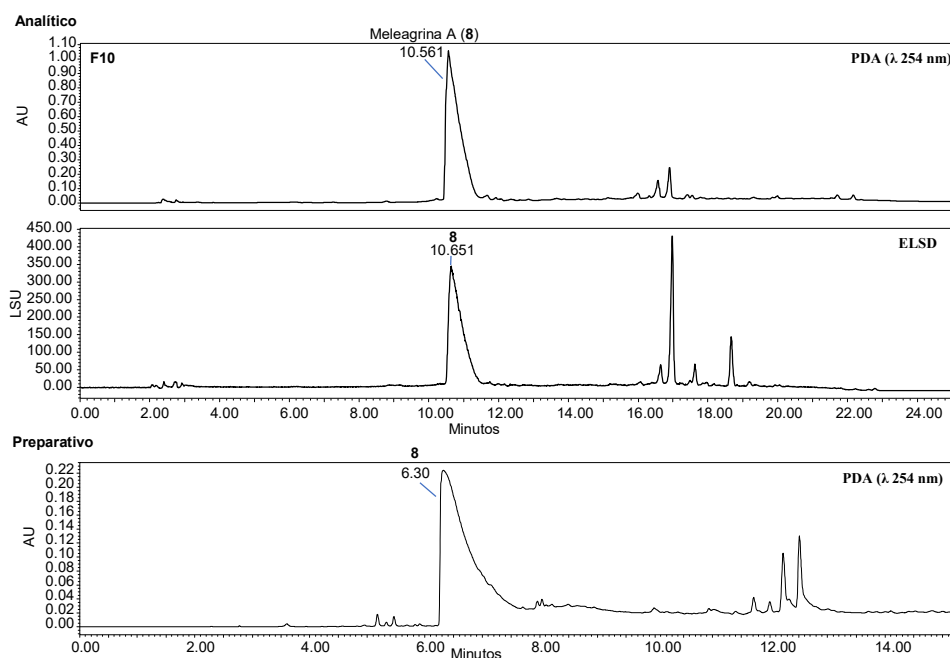


Figura 22. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de la fracción F10 de *Penicillium* sp. CIGOM10 cultivado a TA.

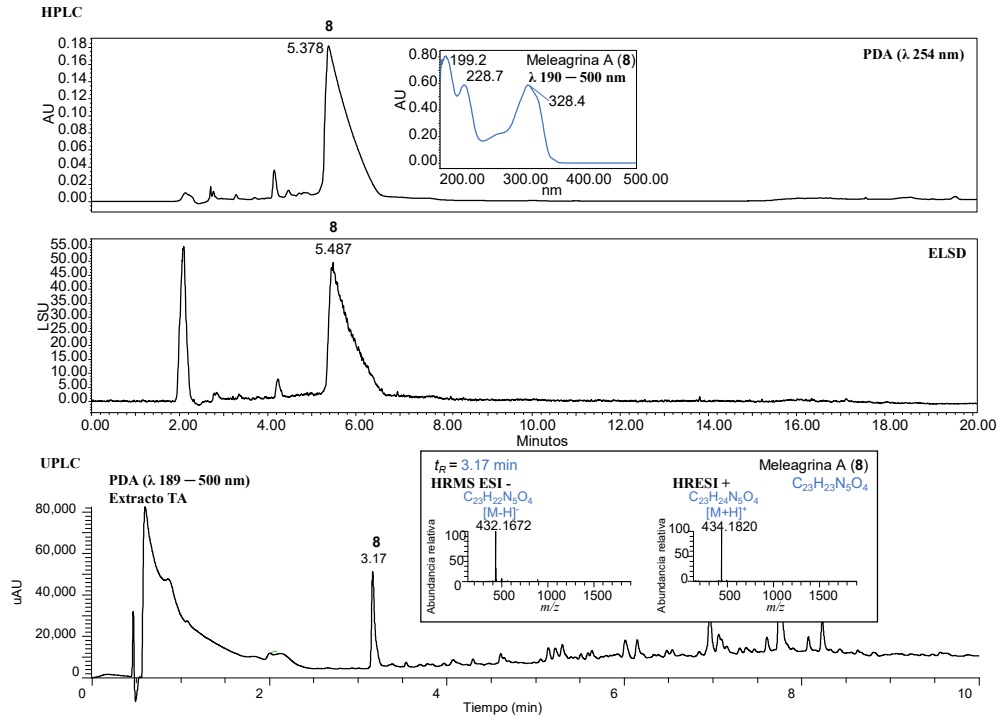


Figura 23. Perfiles cromatográficos y espectros UV y HRMS de la meleagrina A (8) de *Penicillium* sp. CIGOM10.

5.5.3. *Penicillium* sp. CIGOM16

El extracto desgrasado (86.7 mg) de *Penicillium* sp. CIGOM10 cultivado en pequeña escala a TA se sometió a un proceso de purificación por HPLC preparativo (columna Kinetex C18, 250 mm x 21.2 mm D.I., 5.0 μ m, 100 Å) con un sistema en gradiente 30:70 CH₃CN-ácido fórmico al 0.1% acuoso a 100 de CH₃CN en 10 min seguido de 5 min con 100 de CH₃CN y 5 min con las condiciones iniciales, con un flujo de 21.24 mL/min (Figura 24), resultando la roquefortina C (**9**; 0.5 mg, t_R = 5.02 min) y la andrastina A (**10**; 0.7 mg, t_R = 9.39 min, Figura 25).

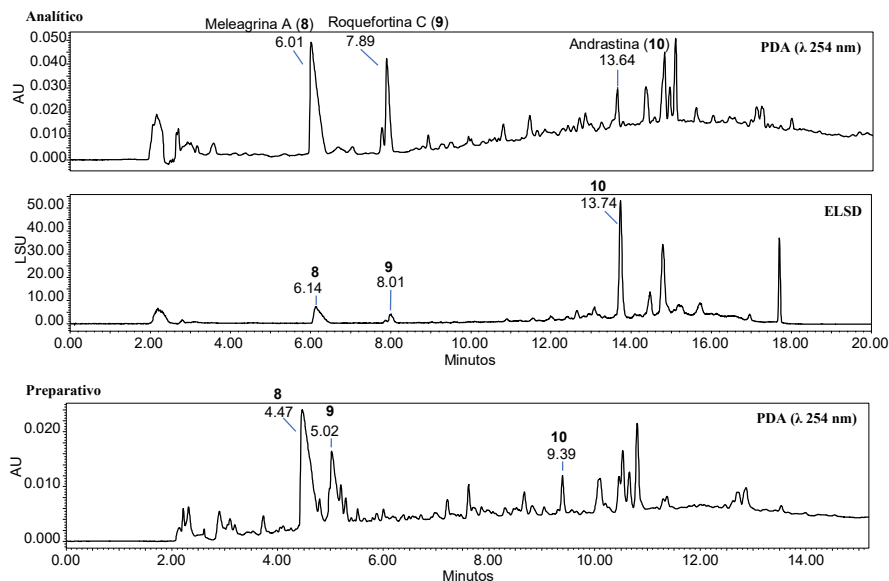


Figura 24. Perfiles cromatográficos por HPLC analítico y preparativo de *Penicillium* sp. CIGOM16 cultivado a TA en pequeña escala.

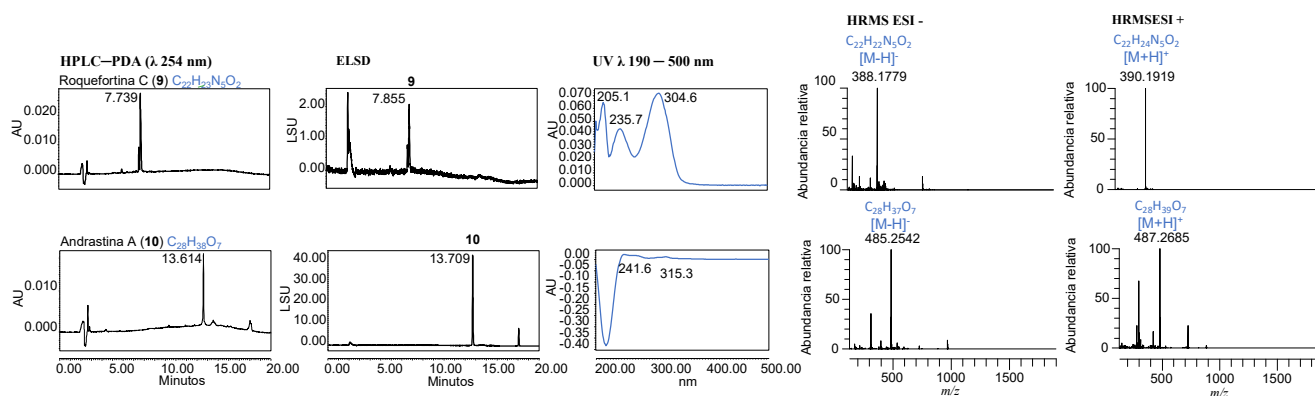


Figura 25. Perfiles cromatográficos y espectros UV y HRMS de los compuestos **9** y **10** de *Penicillium* sp. CIGOM16.

5.6. Caracterización estructural

La caracterización estructural de los compuestos **1–10** se realizó mediante el análisis de los datos espectrométricos y de RMN, y su comparación con los reportados en la literatura especializada. La fórmula molecular de los compuestos se calculó a partir de los aductos $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$ de los espectros HRMS y se calculó el índice de deficiencia de hidrógeno (IDH). Los espectros de RMN 1H se registraron a una frecuencia de 400 y 600 MHz y los de ^{13}C a 100 MHz, en los equipos Varian VNMRS 400 MHz (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) y Bruker Avance III 400MHz (Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA, USA) y Jeol JNM-ECZR 600 MHz (Jeol Ltd., Musashino, Akishima, Tokyo, Japón). De manera adicional, el compuesto citocalasina D (**7**) se analizó por cristalografía de Rayos X de monocristal.

5.7. LC-MS/MS, estudios de metabolómica no dirigida y redes moleculares de especies selectas del GoM

Los extractos (1 mg/mL), fracciones (1 mg/mL) y los compuestos puros (0.1 mg/mL) fueron analizados en un cromatógrafo Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado a un espectro de masas Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El análisis se realizó con una columna Acquity BEH C18 (Waters 50 mm x 2.1 mm d. i., 1.7 μ m, 130 Å) a 40 °C, con un sistema en gradiente de 15:85 CH_3CN —ácido fórmico al 0.1% acuoso a 100% de CH_3CN en 8 min, isocrático con CH_3CN por 1.5 min y de vuelta a las condiciones iniciales, con un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 3.0 μ L. Los datos espectrométricos se obtuvieron con un ionizador por electrospray en modalidad positiva y negativa (ESI +/-) en el rango de m/z 150–2000, con los siguientes parámetros de ionización: voltaje capilar 5 V, temperatura capilar 300 °C, voltaje del tubo objetivo 35 V, voltaje de nebulización 3.80 KV, flujo de gas acarreador 30 unidades [75]. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó con los datos MS después de remover los componentes presentes en el blanco y usando el programa *R* versión 4.0.5 con el paquete estadístico FactoMineR [76]. Posteriormente, los datos de masas de todas las muestras se transformaron de formato MS raw a mzXML mediante el programa ProteoWizard tool MS Convert [55]. El análisis metabolómico por redes moleculares GNPS de todos los extractos de los hongos selectos se llevó a cabo usando el protocolo estándar [54] con los siguientes parámetros: tolerancia en la masa del ion precursor, 0.01 Da; tolerancia en la masa del ion fragmento, 0.02 Da; puntaje mínimo de similitud y del umbral 0.7; mínimo de iones fragmento unidos, tamaño de la agrupación y mínimo de picos de la biblioteca unidos, 4.0; número máximo de nodos conectados y diferencia máxima de masa en la búsqueda de análogos, 100. De manera adicional, la herramienta MolNetEnhancer se aplicó a la red molecular global para establecer la clasificación química [60]. Para la visualización de las redes moleculares se utilizó el programa Cytoscape 3.8.1 [77]. Finalmente, el análisis de metabolómica manual se llevó a cabo comparando los máximos de absorción UV y los datos HRESIMS—MS/MS de los compuestos **1–10** con los reportados en el diccionario de Productos Naturales [52], Scifinder [53] y una base de micotoxinas construida por el grupo de investigación. La anotación de los compuestos aislados **1–10** y los anotados manualmente **11–19** se realizó con los niveles 1 y 2 establecidos por la iniciativa de estándares metabolómicos, respectivamente [61], y la exactitud de las masas < 5 ppm.

5.8. Estudio químico de *Corollospora gracilis*

El hongo *Corollospora gracilis* se cultivó en medios líquidos y sólidos con agua desionizada y en presencia de sales (Cuadro 7). Una vez finalizado el periodo de crecimiento los extractos orgánicos se obtuvieron de la siguiente manera: En los cultivos líquidos, el micelio se separó del medio de cultivo y se extrajeron mediante maceración con $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:1) y posteriormente el medio con AcOEt, y por reparto con CHCl_3 y AcOEt, con lo que se obtuvieron cuatro extractos, dos de micelio y dos del medio de cultivo. Por otro lado, los cultivos sólidos se extrajeron con $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:1) y se realizó un desgrase con hexano.

Cuadro 7. Medios empleados para el cultivo en mediana escala de *Corollospora gracilis*.

Medio	Composición	Cantidad
A1 al 10% (A1-10)	Almidón 0.1 g Extr. de levadura 0.4 g Peptona de soya 0.2 g Agua desionizada 1.0 L	1.0 L
A1-10 en agua marina artificial (A1-10-AMA)	A1-10 Sal marina 35.9 g Agua desionizada 1.0 L	1.0 L
Caldo Papa Dextrosa (PDB) ¹	PDB deshidratado 24.0 g Agua desionizada 1.0 L	1.0 L
PDB en agua marina artificial (PDB-AMA)	PDB deshidratado 24.0 g Sal marina 35.9 g Agua desionizada 1.0 L	1.0 L
PDB-AMA con 3% de NaBr (PDB-AMA-3NaBr)	PDB deshidratado 24.0 g Sal marina 35.9 g NaBr 30.0 g Agua desionizada 1.0 L	1.0 L
PDB-AMA con 1.5% de NaBr (PDB-AMA-1.5NaBr)	PDB deshidratado 24.0 g Sal marina 35.9 g NaBr 15.0 g Agua desionizada 1.0 L	6.0 L
Arroz en agua desionizada (MA)	Arroz 100 g Agua desionizada 0.2 L	100-200g
Arroz en agua marina artificial (MA-AMA)	Arroz 100 g Sal marina 7.2 g Agua desionizada 0.2 L	100 g
MA-AMA con 1.5% NaBr (MA-AMA-1.5NaBr)	Arroz 100 g Sal marina 7.2 g NaBr 3.0 g Agua desionizada 0.2 L	200 g

¹ Sin crecimiento. Todos los inóculos se prepararon en medio PDB con excepción de los cultivos A1-10 y A1-10-AM. Los cultivos se mantuvieron a TA, luz-oscuridad 12/12, los sólidos estáticos y los líquidos en agitación a 100 rpm.

5.9. Registro fotográfico y edición de figuras

El registro fotográfico de los cultivos en caja de Petri y los distintos cultivos de pequeña y mediana escala se realizó con una cámara digital PENTAX Pentax Optio 750Z. Las figuras mostradas en el texto se construyeron con BioRender.com y Microsoft Power Point.

6. Resultados y discusión

6.1. Cultivo en pequeña escala y obtención de extractos

En el presente estudio se realizó el acondicionamiento de 30 cepas fúngicas, 29 fueron obtenidos a partir de muestras de sedimento marino del Golfo de México colectadas en diferentes estaciones y profundidades dentro del rango de 606-3240 m (Figura 26) durante los trayectos exploratorios del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGOM) y una especie colectada de Playa Hermosa, Baja California. Los organismos del GoM en estudio corresponden a los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Biatrispora*, *Stemphylium* y *Alternaria*. Los hongos del género *Penicillium* fueron los más abundantes en las muestras: *P. echinulatum* CONTIG4 se obtuvo en la estación C14 (Coatzacoalcos) a 3240 m de profundidad, siendo la estación con mayor profundidad del derrotero. *P. brevicompactum* CONTIG2 y *Penicillium* spp. CIGOM5, CIGOM8—CIGOM17, y CIGOM19—CIGOM27 se obtuvieron de D16 (Coatzacoalcos) a 652 m. El género *Penicillium* presenta adaptabilidad genómica para desarrollarse en diferentes ambientes y sustratos [78]. De manera adicional, *Cladosporium* sp. CONTIG5, *C. halotolerans* CIGOM1 y *C. ramotenellum* CONTIG7 se obtuvieron de las estaciones B7 (Perdido), C11 (Coatzacoalcos) y N1 (Perdido) a 1191, 860 y 606 m de profundidad, respectivamente. Asimismo, *Biatrispora* spp. CIGOM2 y CIGOM7 de N2 (Perdido) se obtuvieron de D17 (Coatzacoalcos) a 976 m, y *Alternaria* sp. CIGOM4 de N2 (Perdido) a 995 m. Finalmente, el hongo marino *Corollospora gracilis* [42] obtenido de Playa Hermosa, Ensenada Baja California se incorporó a este estudio por tener escasos estudios químicos reportados y ser parte de una de las playas más contaminadas del país [79].

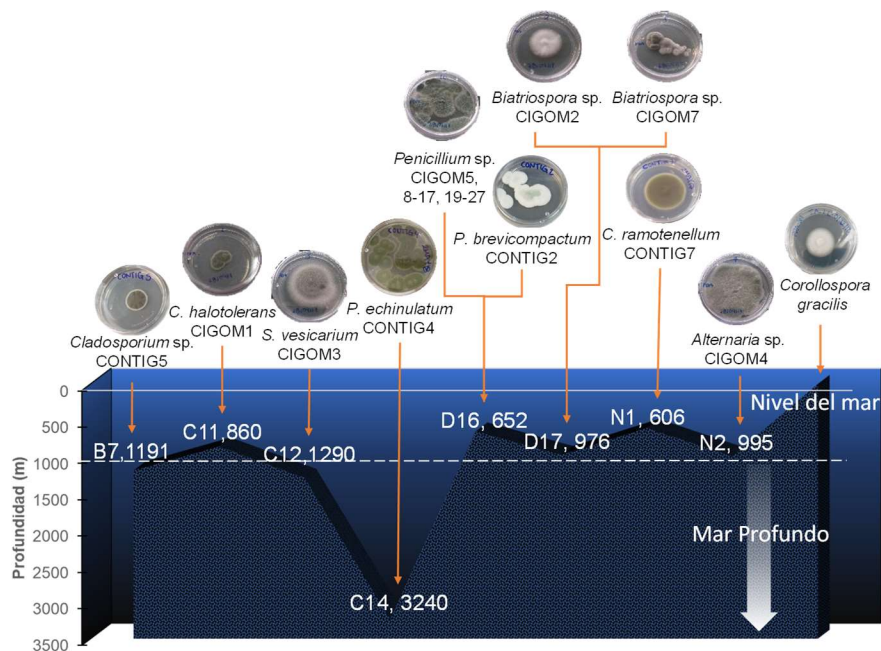


Figura 26. Colección CIGOM [80].

En general, los hongos marinos mostraron cambios morfológicos en las diferentes condiciones de crecimiento (Figura 27). Por ejemplo, *Biatrispora* sp. CIGOM2 desarrolló estructuras de reproducción macroscópicas y una cantidad abundante de micelio abundante a TA (Figura 27. A), en comparación de 20 °C (Figura 27. C) y en 4°C el crecimiento fue escaso. Asimismo, en algunas condiciones se observó la producción de exudado, una matriz biológica líquida que puede contener metabolitos secundarios bioactivos [81]. Cabe destacar que el hongo marino *Corollospora gracilis* presentó crecimiento escaso en las tres condiciones debido a que muchas especies fúngicas marinas requieren condiciones similares a las de su hábitat para su crecimiento (Figura 27. A) [35,41].

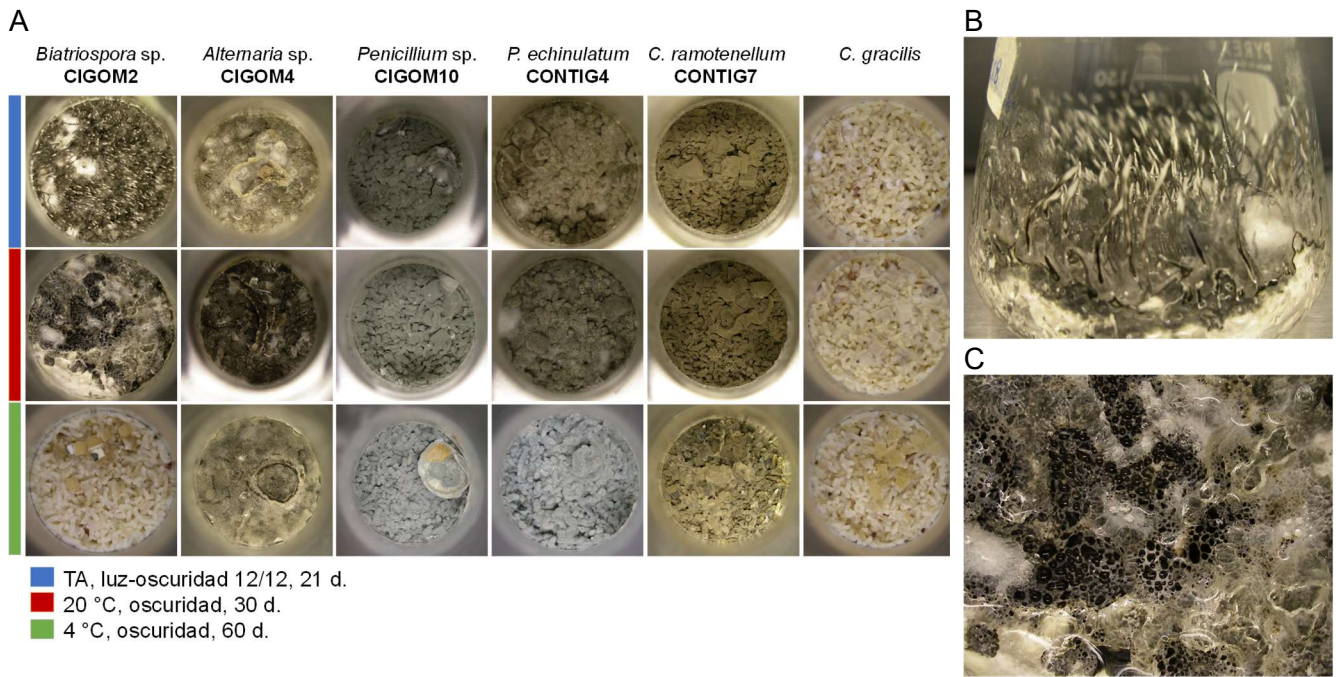
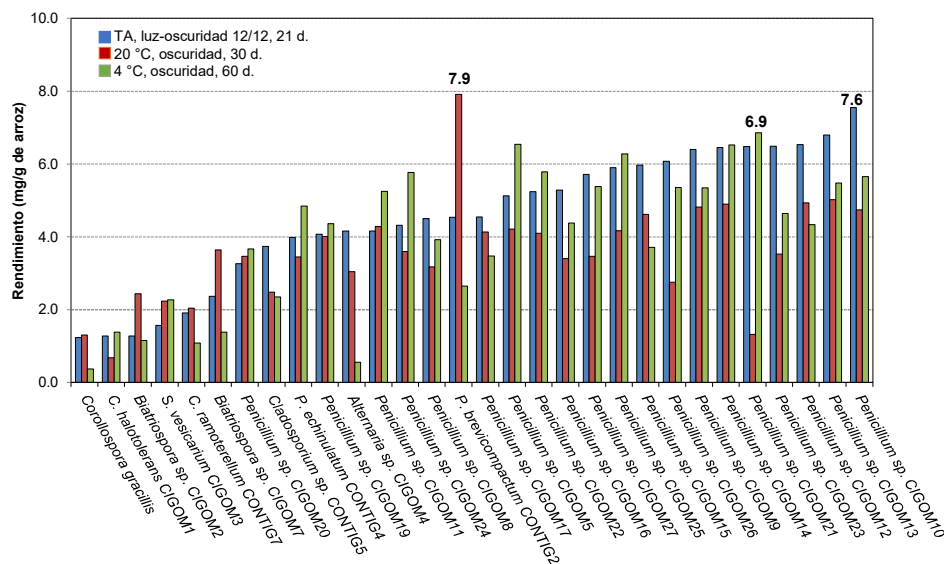


Figura 27. A. Cultivos en pequeña escala de hongos selectos en arroz. Morfología de *Biatrispora* sp. CIGOM2 cultivado en medio arroz en **B.** TA, luz-oscuridad 12/12, 21 d, y **C.** 20 °C, oscuridad, 30 d.

Finalizado el tiempo de crecimiento de las tres condiciones se obtuvieron los extractos desgrasados (Gráfica 1). Los extractos de *P. brevicompactum* CONTIG2, *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM21 cultivados en 20 °C, TA y 4 °C, respectivamente, tuvieron los mayores rendimientos. En general, los extractos se obtuvieron en cantidad suficiente para realizar su evaluación antimicrobiana, y su estudio de metabolómica y químico preliminar.



Gráfica 1. Rendimiento de los extractos orgánicos desgrasados de los cultivos en pequeña escala de la colección CIGOM.

6.2. Actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala

Los 90 extractos desgrasados de pequeña escala se evaluaron sobre las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhi* ATCC 9992V, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 susceptible a meticilina (MSSA) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231, a las concentraciones de 200 y 20 µg/mL.

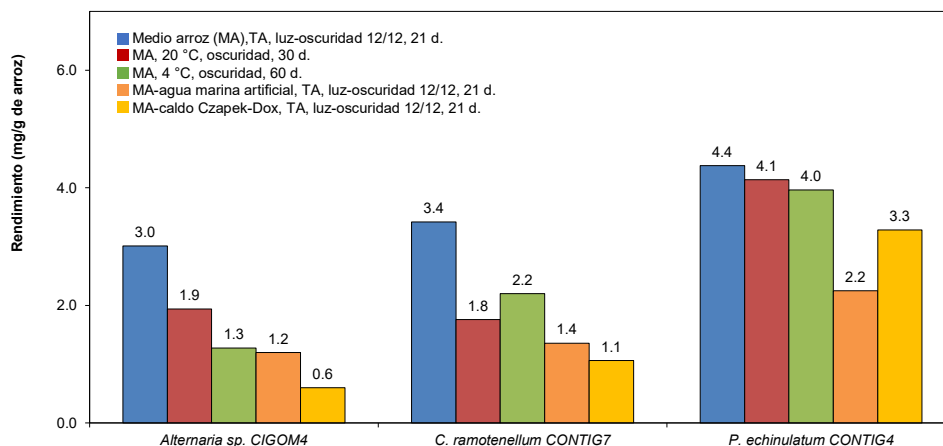
El 63.3 % de hogos mostraron actividad antimicrobiana con al menos un extracto activo a la máxima concentración evaluada (Anexo I). Los aislamientos de *Alternaria* sp. CIGOM 4, *Cladosporium ramotenellum* CONTIG 7 y *Penicillium echinulatum* CONTIG 4 mostraron la mayor actividad antimicrobiana al inhibir a un mayor número de microorganismos en ambas concentraciones de prueba (Cuadro 8). Asimismo, los extractos de la misma cepa preparados bajo diferente condición de crecimiento mostraron diferente actividad antimicrobiana, y esta se incrementó cuando los parámetros de temperatura disminuyeron y se mantuvieron en oscuridad, condiciones semejantes a las descritas para aguas marinas profundas. El extracto obtenido de *Alternaria* sp. CIGOM 4 cultivado a 4°C inhibió de manera total a *B. subtilis* a las dos concentraciones evaluadas y de manera parcial a *S. aureus* a la máxima concentración. De manera adicional, el extracto obtenido del cultivo a 20 °C inhibió a las bacterias Gram-positivas y de parcialmente a *S. typhi* a la máxima concentración. Por otro lado, los extractos de los cultivos en las tres condiciones de *C. ramotenellum* CONTIG7 mostraron actividad en al menos un microorganismo de prueba. Los extractos obtenidos a partir de los cultivos a temperatura ambiente inhibieron a las bacterias Gram-positivas a la máxima concentración evaluada, mientras que el extracto del cultivo a 4 °C inhibió parcialmente a *S. aureus* a la misma concentración. El extracto de *P. echinulatum* CONTIG 4 cultivado a 20 °C en oscuridad inhibió a *E. coli* y *S. typhi* y de manera parcial a *S. aureus* a la máxima concentración. Finalmente, los extractos de *Stemphylium vesicarium* CIGOM 3, *Penicillium* sp. 14, 21, 22, 23 y 24 presentaron actividad antimicrobiana parcial a las concentraciones de 20 y 200 µg/mL, mientras que los aislamientos *Corollospora gracilis*, *Cladosporium* CONTIG 5, *Biatrispora* sp. CIGOM 7 y *Penicillium* 12, 13, 16, 17, 19, 20, 23 y 24 inhibieron parcialmente un microorganismo.

Cuadro 8. Extractos de hongos marinos del GoM con actividad antimicrobiana.

Cepa	Condición del Extracto	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>S. typhi</i> ATCC 9992V	MSSA	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
<i>P. echinulatum</i> CONTIG4	B	[Inhibición total a 200 µg/mL y 20 µg/mL]		[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>C. ramotenellum</i> CONTIG7	A	[Inhibición total a 200 µg/mL]		[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
	B	[Inhibición total a 200 µg/mL]		[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>S. vesicarium</i> CIGOM3	A	[Inhibición total a 200 µg/mL]		[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]		[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	B	[Inhibición parcial a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
<i>Biatrispora</i> sp. CIGOM7	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM16	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM17	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM20	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM21	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM22	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Sin inhibición]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM24	A	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM26	A	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
	C	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]	[Inhibición total a 200 µg/mL]
MIC ampicilina (µg/mL)		1.6	0.4	0.1	16.3
Nivel de inhibición					
[Inhibición total a 200 µg/mL y 20 µg/mL]	Inhibición total a 200 µg/mL y 20 µg/mL.				
[Inhibición total a 200 µg/mL]	Inhibición total a 200 µg/mL.				
[Inhibición parcial a 200 µg/mL y 20 µg/mL]	Inhibición parcial a 200 µg/mL y 20 µg/mL.				
[Inhibición parcial a 200 µg/mL]	Inhibición parcial a 200 µg/mL.				
[Sin inhibición]	Sin inhibición.				
Medio arroz a A) TA con luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d.					

6.3. Cultivo en mediana escala de hongos selectos

Con el objetivo de aislar los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana se realizó el cultivo a mayor escala de los organismos con potencial antimicrobiano *Alternaria* sp. CIGOM4, *Cladosporium* sp. CONTIG7 y *P. echinulatum* CONTIG4, empleando 500 g de arroz en la condición con mayor actividad. Asimismo, con el objetivo de evidenciar los posibles cambios en los perfiles metabólicos, los hongos selectos se cultivaron en 100 g de medio arroz en las demás condiciones y en los medio arroz con agua marina artificial y caldo Czapek-Dox, que se han descrito para favorecer el crecimiento de microorganismos marinos y de especies del género *Penicillium*, respectivamente [82-84]. En la Gráfica 2 se comparan los rendimientos de los extractos desgrasados. En general, *P. echinulatum* CONTIG4 tuvo el mayor rendimiento en las diferentes condiciones de crecimiento. Asimismo, los extractos de los tres hongos cultivados a TA tuvieron los mayores rendimientos. Con respecto a los extractos de los medios con diferentes sales, el extracto de *P. echinulatum* CONTIG4 en medio arroz con caldo Czapek-Dox tuvo mayor rendimiento que el medio con agua marina artificial. De manera contraria, el rendimiento de los extractos de medio arroz con agua marina artificial de *Cladosporium* sp. CONTIG7 y *Alternaria* sp. CIGOM4 resultaron mayores.



Gráfica 2. Rendimiento de los extractos de mediana escala de los hongos selectos.

6.4. Estudio químico biodirigido de hongos con actividad antimicrobiana

6.4.1. *Alternaria* sp. CIGOM4

El fraccionamiento primario de los extractos de *Alternaria* sp. CIGOM4 permitió la obtención de 26 fracciones, 24 de estas se obtuvieron con la cantidad suficiente para su evaluación biológica y 15 resultaron activas (Cuadro 9). La actividad antimicrobiana se localizó en la fracción F7 y F6 del extracto de TA Y 4 °C al inhibir el crecimiento de las bacterias Gram-positivas a las concentraciones de 200 y 20 µg/mL, y a *C. albicans* de manera total a la máxima concentración. Asimismo, la fracción F7 del extracto de 20 °C inhibió de manera parcial a las bacterias Gram-positivas a la máxima concentración evaluada. Una vez seleccionadas las fracciones más activas se comenzó el proceso de purificación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica observada.

Cuadro 9. Fracciones activas de los extractos de mediana escala y fracciones de *Alternaria* sp. CIGOM4.

	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	MSSA	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. typhi</i> ATCC 9992V
Extracto A				
F3				
F4				
F6				
F7				
F8				
F9				
Extracto B				
F2				
F3				
F4				
F5				
F7				
Extracto C				
F2				
F3				
F4				
F6				
MIC (µg/mL)	1.25 ¹	0.05 ²	20 ³	1.25 ¹
Nivel de inhibición				
	Inhibición total a 200 y 20 µg/mL.			
	Inhibición total a 200 µg/mL y parcial a 20 µg/mL.			
	Inhibición parcial a 200 µg/mL.			
	Sin inhibición.			

Medio arroz a A) TA luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d. ¹ Vancomicina; ² Ampicilina; ³ Nistatina.

El análisis por HPLC de la fracción F7 obtenida por cromatografía tipo flash (35.5 mg) del extracto de 20 °C permitió determinar que la fracción se componía de un compuesto mayoritario (Figura 10). Posteriormente, el análisis comparativo de los perfiles cromatográficos por UPLC de las fracciones activas permitió evidenciar al compuesto **1** ($t_R = 4.39$ min) como metabolito mayoritario, junto con un segundo metabolito ($t_R = 5.08$ min) (Figura 28). La fracción F4, enriquecida del segundo metabolito, se purificó por HPLC preparativo y se obtuvieron 2.8 mg del compuesto **2** (Figura 28). El análisis de los espectros HRMS de los compuestos **1** y **2** permitió calcular sus fórmulas moleculares como $C_{14}H_{10}O_5$ y $C_{15}H_{12}O_5$, respectivamente, ambos con un IDH de 10 (Figura 10 y 12). Asimismo, el análisis de los valores espectroscópicos de RMN y su comparación con los reportados en la literatura especializada permitieron caracterizar los metabolitos como el alternariol (**1**) y su derivado metilado (**2**), respectivamente (Figura 29 y Cuadro 10).

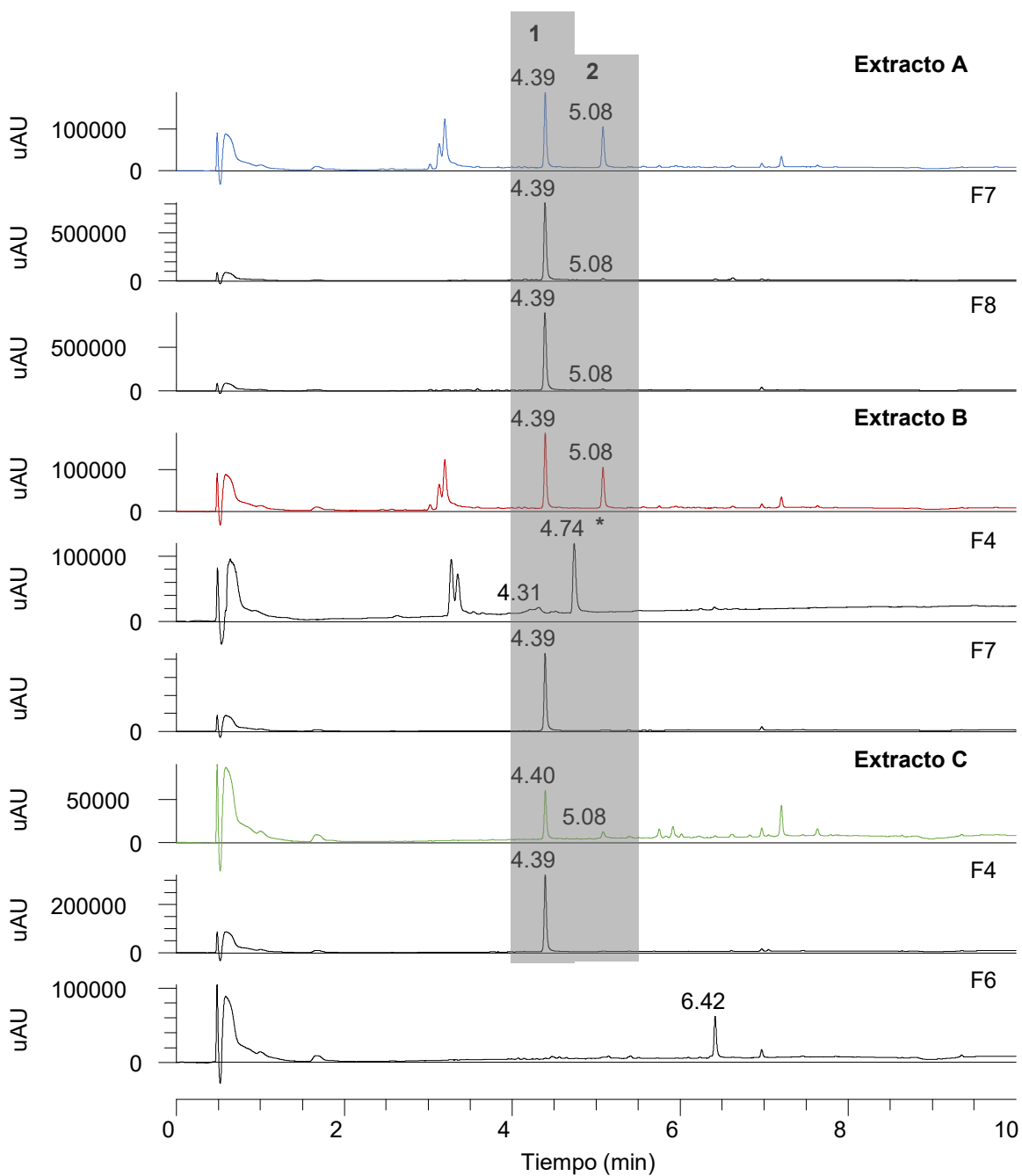


Figura 28. Perfiles cromatográficos por UPLC-PDA (λ 189-500 nm) de los extractos de mediana escala y las fracciones activas de *Alternaria* sp. CIGOM4,* tiempo de retención desplazado del compuesto 2. Medio arroz a A) TA luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d.

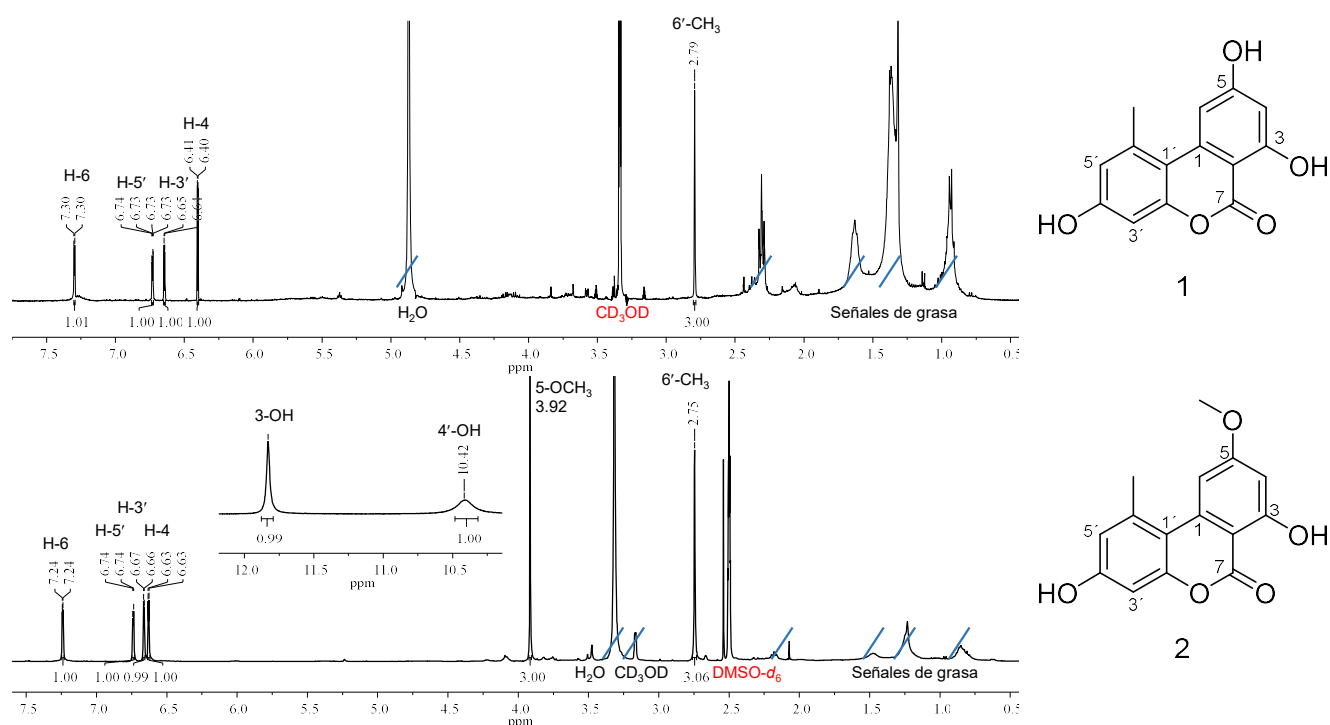


Figura 29. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) del alternariol (1) y metil alternariol (2).

Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN ^1H del alternariol (1) y metil alternariol (2).

Posición	Alternariol (1)		Metil alternariol (2)	
	Experimental ^{a, c} δ_{H} mult. (J Hz)	Ref. [85] ^{b, c} δ_{H} mult. (J Hz)	Experimental ^{a, d} δ_{H} mult. (J Hz)	Ref. [86] ^{b, d} δ_{H} mult. (J Hz)
4	6.38 d (2.1)	6.32 d (2.0)	6.63 d (2.1)	6.59 d (2.5)
6	7.28 d (2.2)	7.20 d (2.0)	7.24 d (2.0)	7.20 d (2.5)
3'	6.63 d (2.6)	6.55 d (2.5)	6.66 d (2.4)	6.63 d (2.0)
5'	6.71 d (2.7)	6.65 d (2.5)	6.74 d (2.4)	6.71 d (2.0)
6'-CH ₃	2.77 s	2.71 s	2.75 s	2.72 s
5-OCH ₃			3.92 s	3.90 s
4'-OH			10.41 s	10.28 s
3-OH			11.83 s	11.79

^a 400 MHz y ^b 500 MHz, ^c CD₃OD y ^d DMSO-*d*₆.

6.4.2. Estudio químico biodirigido de *P. echinulatum* CONTIG4

El fraccionamiento primario de los extractos de *P. echinulatum* CONTIG4 permitió la obtención de 26 fracciones, 24 de estas se obtuvieron con la cantidad suficiente para su evaluación biológica y 15 resultaron activas (Cuadro 11). En general, los extractos y fracciones inhibieron a las bacterias Gram-positivas y *S. typhi* de manera parcial y total a la máxima concentración de 200 µg/mL (Cuadro 10).

Cuadro 11. Extractos de mediana escala y fracciones de *P. echinulatum* CONTIG4 con actividad antimicrobiana.

	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	MSSA	<i>S. typhi</i> ATCC 9992V
Extracto A			
F2			
F3			
Extracto B			
F3			
F4			
F5			
Extracto C			
F2			
F3			
F4			
MIC (µg/mL)	1.25 ¹	0.05 ²	1.25 ¹
Niveles de inhibición			
Inhibición total a 200 µg/mL.			
Inhibición parcial a 200 µg/mL.			
Sin inhibición.			

Medio arroz a A) TA luz-oscuridad 12/12 h por 21 d.; B) 20 °C en oscuridad por 30 d. y C) 4 °C en oscuridad por 60 d. ¹ Vancomicina; ¹ Ampicilina.

A partir del análisis comparativo por LC de las fracciones activas e inactivas, se observó la presencia de cuatro metabolitos mayoritarios en diferentes proporciones (Figura 30). Las fracciones F5 (174.8 mg), F6 (109.0 mg) y F7 (43.4 mg) del extracto (Figura 26), se sometieron a procesos de purificación por HPLC preparativo resultando el aislamiento de los compuestos **3** (5.5 mg), **4** (49.6 mg), **5** (6.2 mg) y **6** (14.1 mg). De manera adicional, la purificación por HPLC semipreparativo de las fracciones F3 y 4 del extracto 1 y F4 del extracto 3 permitió la obtención de 2.6 mg de del compuesto **3**, 7.9 mg del **4**, 1.6 mg del **5** y 4.3 mg del **6**. Generando un rendimiento total de 8.1, 57.6, 7.8 y 18.4 mg de los compuestos **3-6**, respectivamente.

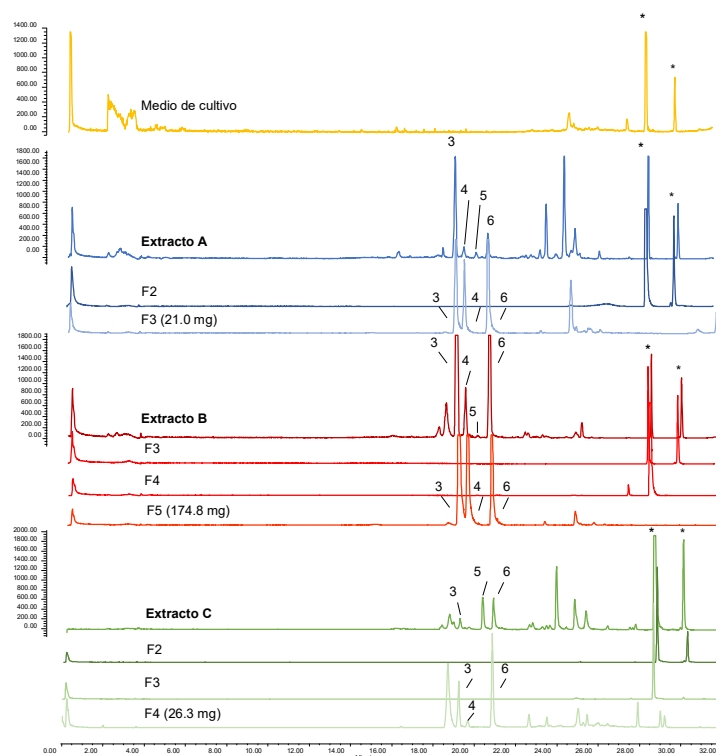


Figura 30. Perfiles cromatográficos por HPLC (ELSD) de los extractos y fracciones de *P. echinulatum*.

Con respecto a la caracterización estructural, el cálculo de las fórmulas moleculares de compuestos **3-6** (Figura 17) y el análisis de los datos espectroscópicos de RMN (Figuras 31 y 33) y su comparación con los reportados con la literatura (Cuadro 12 y 13) permitieron caracterizarlos como ciclopenina **3**, ciclopeptina **4**, deshidrociclopeptina **5** y viridicatina **6**. En el caso de la ciclopeptina **4**, y en concordancia con lo establecido para este tipo de benzodiazepinas, se observa un equilibrio entre dos posibles conformémeros con respecto al anillo de siete miembros (Figura 32) [87,88]. Para este compuesto, se utilizaron como modelo los desplazamientos reportados del derivado 4'-metoxiciclopeptina [87]. Por otra parte, el compuesto **9** también está en un equilibrio tautomérico, pero desplazado hacia el producto más estable [89].

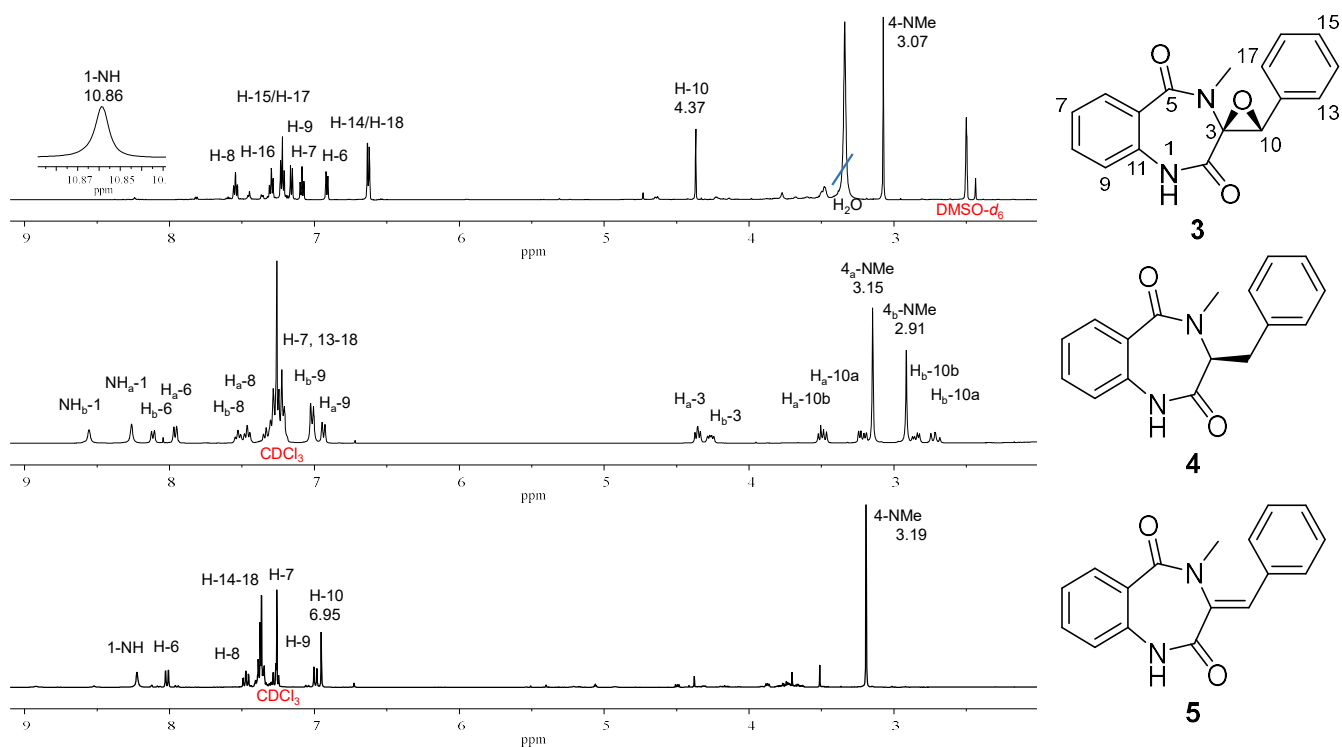


Figura 31. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) de la ciclopentina (3), cicloptina (4) y deshidrocicloptina (5).

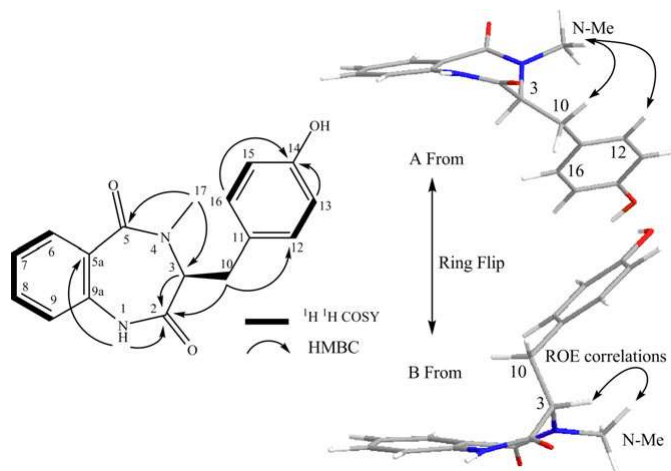


Figura 32. Confórmers reportados para la 4'-metoxicicloptina [88].

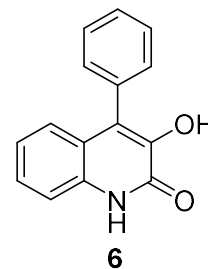
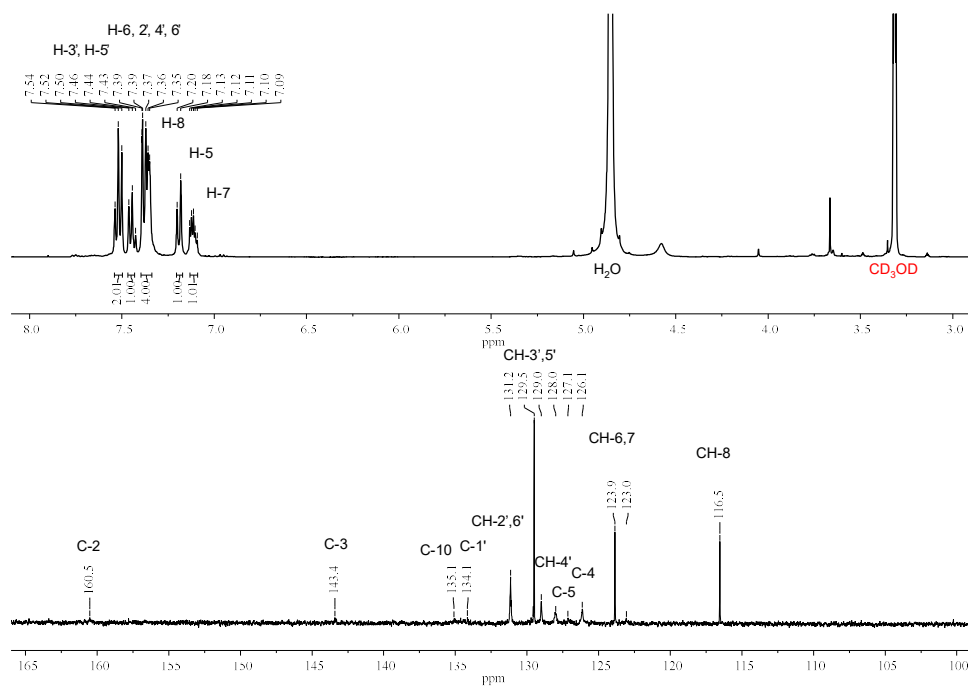


Figura 33. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C (400 y 100 MHz) de la viridicatina (**6**).

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos **3–5**.

Posición	Ciclopenina (3)		Ciclopeptina (4)		4'-Metoxiciclopeptina		3,10-Desdihrociclopeptina (5)					
	Experimental ^{a, c}		Ref. [87] ^{b, d}		Experimental ^{a, d}		Ref. [87] ^{a, d}		Experimental ^{a, d}		Ref. [90] ^{a, e}	
	δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{C}	Conf. a δ_{H} mult. (J Hz)	Conf. b δ_{H} mult. (J Hz)	Conf. a δ_{H} mult. (J Hz)	Conf. b δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{C}
1-NH	10.86 s		8.95 s		8.26 sa	8.56 (sa)	8.48 sa	8.81 sa	8.22 s			
2		165.9		167.5						171.5		172.4
3		70.1		70.2	4.35 m	4.26 (m)	4.28 dd (8.7, 6.2)	4.21 m		132.1		133.6
4												
5		165.3		165.9						166.8		169.0
6	6.91 dd (7.7, 1.4)	121.2	7.09-7.39 m	121.3	7.96 d (7.4)	8.11 d (7.7)	7.96 d (7.8)	8.11 d (7.8)	8.02 dd (7.87, 1.53)	132.8	7.91 da (8.0)	135.3
7	7.09 t (7.5)	124.2	7.09-7.39 m	125.5	7.25 m	7.25 m	7.28 m	7.33 m	7.27 m	131.6	7.28 ta (7.50)	131.8
8	7.54 m	132.4	7.09-7.39 m	132.6	7.46 t (7.3)	7.53 t (7.4)	7.46 m	7.53 m	7.47 td (8.0, 8.0, 1.6)	131.6	7.54 ta (7.50)	131.8
9	7.16 d (8.0)	131.0	7.09-7.39 m	130.9	6.94 d (7.9)	7.02 d (7.5)	6.94 d (7.8)	7.02 d (7.8)	6.99 dd (8.1, 0.9)	125.3	7.13 da (8.0)	125.9
10	4.02 s	63.7	4.02 s	64.8	3.22 m; 3.49 m	2.71 m; 2.85 m	3.15 (m); 3.44 dd (12.9, 8.7)	2.66 m; 2.79 m	6.95 s	120.5	6.92 s	122.0
11		135.2		133.9						135.5		137.9
12		126.4		127.2						125.7		126.7
13		130.5		130.2			3.13 s			133.4		135.3
14	6.63 d (7.6)	127.9	6.66 d (7.2)	128.2	7.25 m	7.25 m	7.14 d (8.5)	6.93 d (8.5)	7.37 m	129.6	7.35 d (8.0)	130.2
15	7.22 t (7.6)	126.1	7.09-7.39 m	126.0	7.25 m	7.25 m	6.79 d (8.5)	6.81 d (8.5)	7.37 m	129.1	7.39 d (8.0)	130.2
16	7.30 m	128.7	7.09-7.39 m	129.2	7.25 m	7.25 m			7.37 m	130.0	7.42 t (7.50)	130.9
17	7.22 t (7.6)	126.1	7.09-7.39 m	126.0	7.25 m	7.25 m	6.79 d (8.5)	6.81 d (8.5)	7.37 m	129.1	7.39 d (8.0)	130.2
18	6.63 d (7.6)	127.9	6.66 d (7.2)	128.2	7.25 m	7.25 m	7.14 d (8.5)	6.93 d (8.5)	7.37 m	129.6	7.35 d (8.0)	130.2
4-NMe	3.07 s	30.8	3.24 s	29.6	3.15 s	2.91 s	3.15 s	2.93 s	3.19 s	36.2	3.13 s	36.1
16-OMe							3.76 s	3.76 s				

^a 400 MHz y 100 MHz; ^b 270 y 67.5 MHz; ^c DMSO- d_6 ; ^d CDCl_3 ; ^e CD_3OD .

Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de la viridicatina (**6**).

Posición	Experimental ^{a, b}		Ref. [90] ^{a, c}	
	δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J Hz)	δ_{C}
1-NH			12.24 sa	
2		160.5		158.3
3		143.4		142.5
4		129.0		127.7
5	7.19 d (8.1)	128.0	7.03-7.06 m	126.4
6	7.37 m	123.9	7.31-7.34 m	122.1
7	7.11 m	123.9	7.03-7.06 m	124.0
8	7.45 d (7.3)	116.5	7.50 d (7.8)	115.3
9		123.0		120.9
10		135.1		133.2
1'		134.1		133.8
2'	7.37 m	131.2	7.31-7.34 m	129.9
3'	7.52 t (7.3)	129.5	7.49-7.51 m	128.3
4'	7.37 m	126.1	7.31-7.34 m	124.3
5'	7.52 t (7.3)	129.5	7.49-7.51 m	128.3
6'	7.37 m	131.2	7.31-7.34 m	129.5
3-OH			9.21 sa	

^a 400 MHz y 100 MHz; ^b CD_3OD ; ^c $\text{DMSO}-d_6$.

6.5. Estudio químico convencional de hongos sin actividad antimicrobiana

Con el objetivo de explorar la diversidad química de las especies fúngicas de la colección CIGOM se realizó el estudio químico convencional de los hongos sin actividad antimicrobiana *Biatrispora* sp. CIGOM2 y *Penicillium* sp. CIGOM10 y 16 para el aislamiento de sus metabolitos secundarios mayoritarios.

6.5.1. *Biatrispora* sp. CIGOM2

El extracto de pequeña escala (38.4 mg) de *Biatrispora* sp. CIGOM2 cultivado a TA se fraccionó por cromatografía tipo flash de fase normal y elución en gradiente de polaridad creciente. La fracción F4 (11.7 mg) se sometió a un proceso de purificación mediante HPLC semipreparativo y se obtuvieron 1.7 mg del compuesto **7** con apariencia cristalina y de color blanco. El análisis del espectro HRMS del compuesto **7** permitió calcular su fórmula molecular como $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_6$ con base en los iones observados en m/z 508.2689 y 1015.5303 correspondientes a las formas $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[2\text{M}+\text{H}]^+$, respectivamente, y un IDH de 13 (Figura 20). Por otra parte, el espectro de RMN ^1H (Figura 34) reveló la presencia de señales características de un producto con núcleo de tipo citocalasina. De manera adicional, el análisis por cristalografía de rayos X (Figura 35), junto conjunto los resultados antes descritos, permitió concluir que **7** corresponde a la citocalasina D (Cuadro 14).

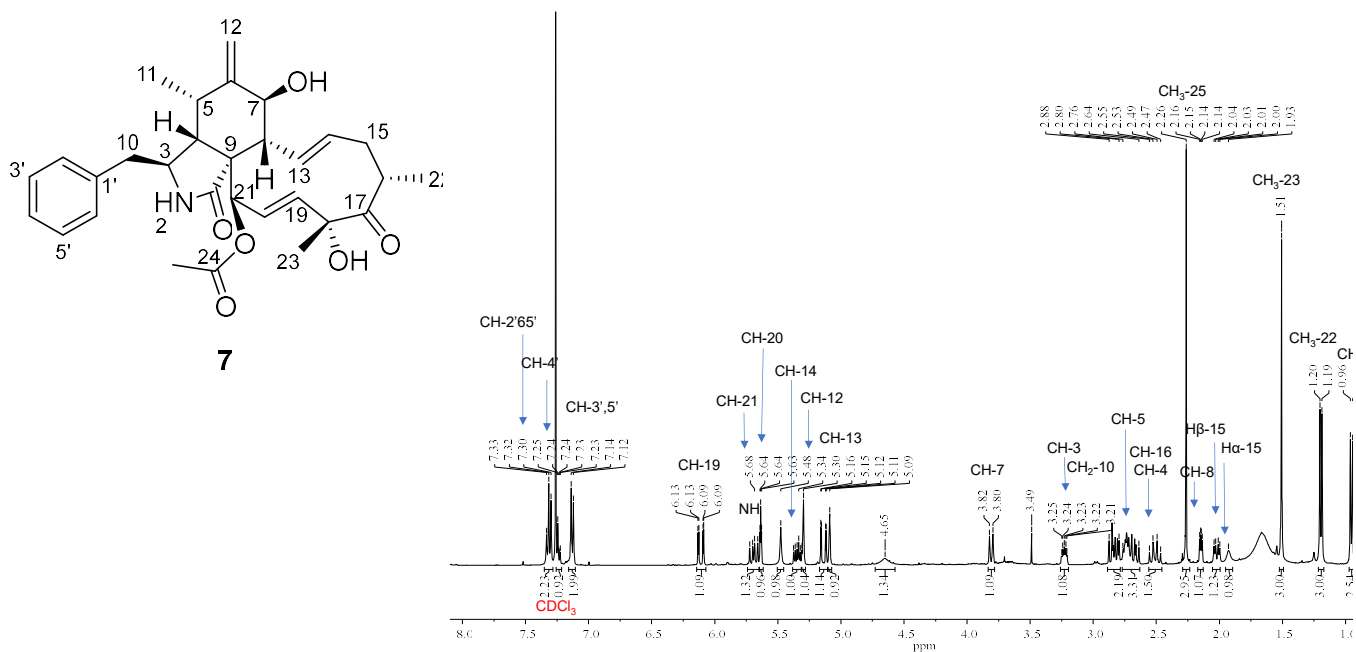


Figura 34. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de la citocalasina D (7).

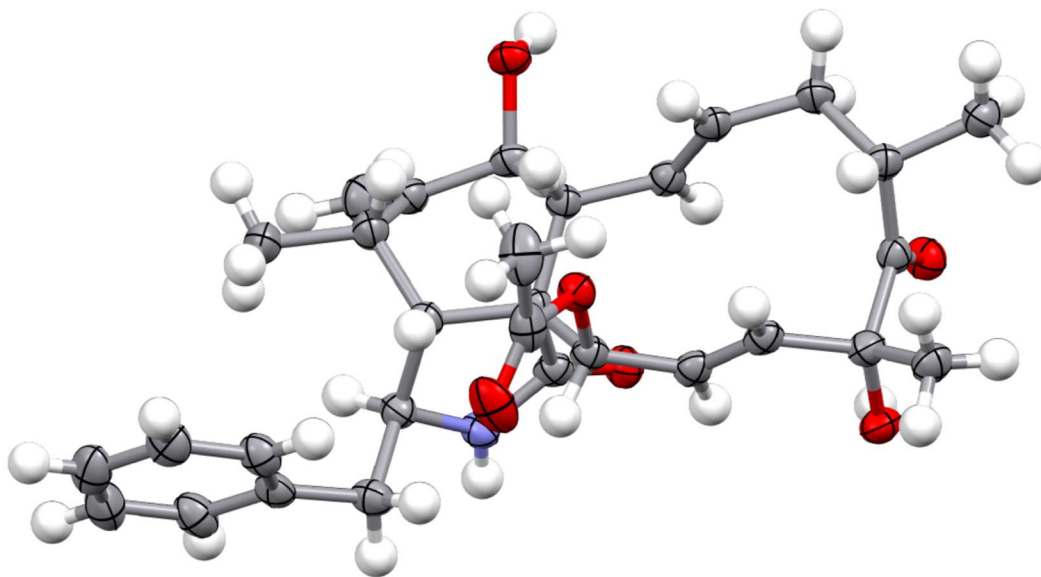


Figura 35. Representación ORTEP de la estructura cristalina de la citocalasina D (7).

Cuadro 14. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de la citocalasina D (7).

Posición	Experimental ^a δ_{H} mult. (J Hz)	Ref. [91] ^a δ_{H} mult. (J Hz)
2-NH	5.48 sa	
3	3.23 dt (8.4, 3.7)	3.20 m
4	2.51 m	2.50 m
5	2.70 m	2.73 m
7	3.81 d (10.5)	3.80 d (10.5)
8	2.14 dd (4.5, 3.5)	2.15 m
10	2.83 m	2.82 m
11	0.95 d (6.7)	0.94 d (6.8)
12	5.09 sa, 5.30 sa	5.08 sa, 5.29 sa
13	4.65 sa	4.64 s
14	5.14 dd (15.8, 2.3)	5.13 dd (15.7, 2.3)
15	2.02 dd (12.9, 5.1)	2.02 dd (13.0, 5.1)
16	2.51 dt (13.0, 11.0)	2.50 m
19	6.11 dd (15.7, 2.7)	6.11 dd (15.7, 2.7)
20	5.33 dt (10.0, 5.1)	5.32 m
21	5.69 dd (15.6, 9.8)	5.62 dd (15.7, 9.8)
22	1.19 d (6.8)	1.19 d (6.8)
23	1.51 s	1.51 s
25	2.26 s	2.26 s
2',6'	7.31 t (7.6)	7.32 m
4'	7.24 m	7.26 m
3',5'	7.13 d (6.9)	7.13 m

^a 400 MHz y CDCl_3 .

6.5.2. Estudio químico de *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM16

El estudio químico de los hongos *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM 16 se realizó a partir del extracto de mediana y pequeña escala, respectivamente. Los perfiles cromatográficos de ambas cepas cultivadas en pequeña escala a TA resultaron similares. En el caso del estudio químico del hongo CIGOM10 cultivado en pequeña escala no se obtuvieron cantidades adecuadas de los compuestos puros para su caracterización por RMN, por lo que se cultivó en mediana escala. El fraccionamiento primario del extracto de mediana escala de CIGOM10 por cromatografía tipo flash de fase normal permitió la obtención de 12 fracciones. La fracción F10 se sometió a un proceso de purificación por HPLC preparativo y se obtuvo el compuesto **8**. El análisis detallado de los espectros de masas de HRMS y de baja resolución del extracto de pequeña escala y del compuesto **8** puro, respectivamente, permitieron calcular su fórmula molecular como $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4$, con base en los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$ con m/z 434.8 y 432.5, respectivamente, y un IDH de 15 (Figura 23). En el espectro de RMN ^1H de este producto (Figura 36) se observaron señales características de un derivado indólico-imidazólico, además de la presencia de un grupo isopreno. A pesar de solo contar con el espectro de RMN ^1H y los de masas, se logró identificar al compuesto **8** como la meleagrina A, por comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura especializada (Cuadro 15).

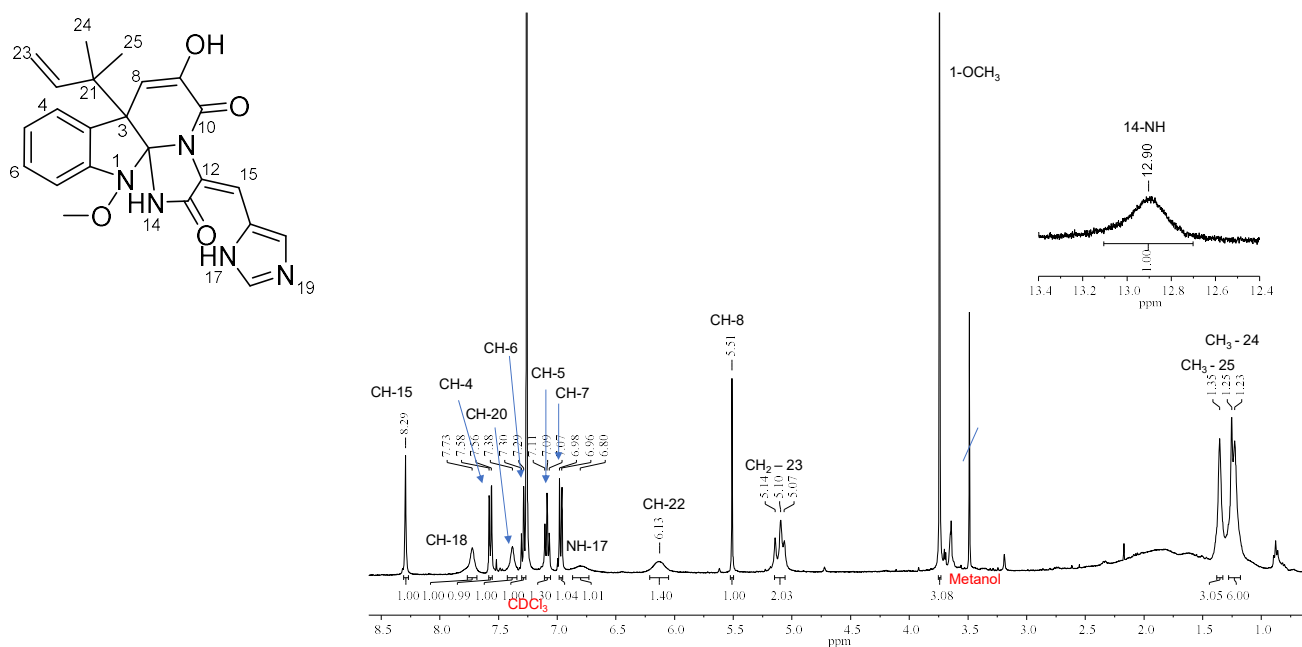


Figura 36. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de la melegrina A (**8**).

Cuadro 15. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de la melegrina A (**8**).

Posición	Experimental ^{a, c} δ_{H} mult. (J Hz)	Ref. [92] ^{b, c} δ_{H} mult. (J Hz)
4	7.57 d (7.8)	7.58 d (7.5)
5	7.09 t (7.6)	7.07 t (7.5)
6	7.29 t (7.6)	7.30 t (7.5)
7	7.97 d (7.8)	6.96 d (7.5)
8	5.51 s	5.50 s
15	8.29 s	8.27 s
18	7.73 s	7.61 s
20	7.38 s	7.25 s
22	6.13 sa	6.12 dd (17.2, 10.6)
23	5.08 d (13.0)	5.06 d (10.6)
24	1.25 s	1.24 s
25	1.35 s	1.35 s
1-OCH ₃	3.74 s	3.73 s
17-NH	6.80 sa	6.30
14-NH	12.90 sa	12.72 sa

^a 400 MHz y ^b 500 MHz, ^c CDCl₃.

Por otro lado, el extracto desgrasado (86.7 mg) de *Penicillium* sp. CIGOM16 cultivado a TA se sometió a un proceso de purificación por HPLC preparativo y se obtuvieron 0.5 y 0.7 mg de los compuestos **9** y **10**, respectivamente. El análisis de los espectros de HRMS de los compuestos **9** y **10** permitió calcular su fórmula molecular como C₂₂H₂₃N₅O₂ y C₂₈H₃₈O₇ con base en los iones observados en m/z 390.1919 y 487.2685, respectivamente, que corresponden a los aductos [M+H]⁺ (Figura 25). El espectro de RMN ^1H del compuesto **9** reveló señales similares a las observadas para el núcleo indólico-imidazólico y la unidad de isopreno del compuesto **8** (Figura 37). De manera adicional, en el espectro del compuesto **10** se observaron seis señales de metilos, de las cuales, dos características de posiciones geminales, dos señales de metoxilos, siete señales de metinos y metilenos y dos señales de hidrógenos unidos a carbonos insaturados (Figura 38). El análisis de los datos espectrométricos y espectroscópicos, y su

comparación con los descritos en la literatura aunado al análisis biogenético y permitió la identificación del compuesto **9** como roquefortina C y el compuesto **10** como andrastina A (Cuadro 16 y 17).

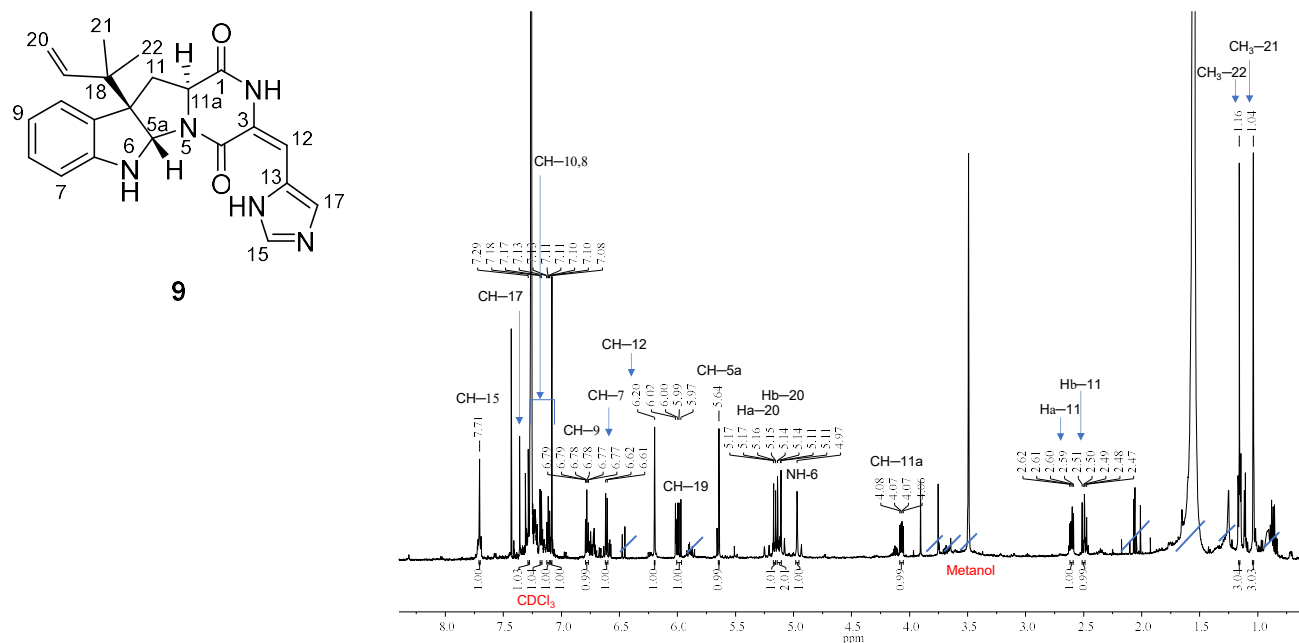


Figura 37. Espectro de RMN ¹H (600 MHz) de la roquefortina C (**9**).

Cuadro 16. Datos espectroscópicos de RMN ¹H de la roquefortina C (**9**).

Posición	Experimental ^{a, c} δ _H mult. (J Hz)	Ref. [93] ^{b, c} δ _H mult. (J Hz)
2		8.87 sa
5a	5.64 s	5.65 s
6	4.97 s	4.99 s
7	6.61 d (7.8)	6.61 d (7.6)
8	7.11 t (7.8)	7.11 t (7.6)
9	6.78 t (7.8)	6.78 t (7.6)
10	7.18 d (7.8)	7.19 d (7.2)
11	2.49 m	2.48 dd (12.3, 11.6)
	2.60 dd (12.6, 6.0)	2.61 dd (12.4, 6.0)
11a	4.07 dd (11.4, 6.0)	4.07 dd (11.4, 6.0)
12	6.20 s	6.33 s
15	7.71 s	7.70 s
17	7.28 s	7.28 s
19	5.99 dd (17.1, 10.8)	5.99 dd (17.3, 10.8)
20	5.12 d (17.4)	5.12 d (17.1)
	5.16 d (10.8)	5.16 d (10.8)
21	1.04 s	1.04 s
22	1.16 s	1.16 s

^a 600 MHz y ^b 360 MHz, ^c CDCl₃

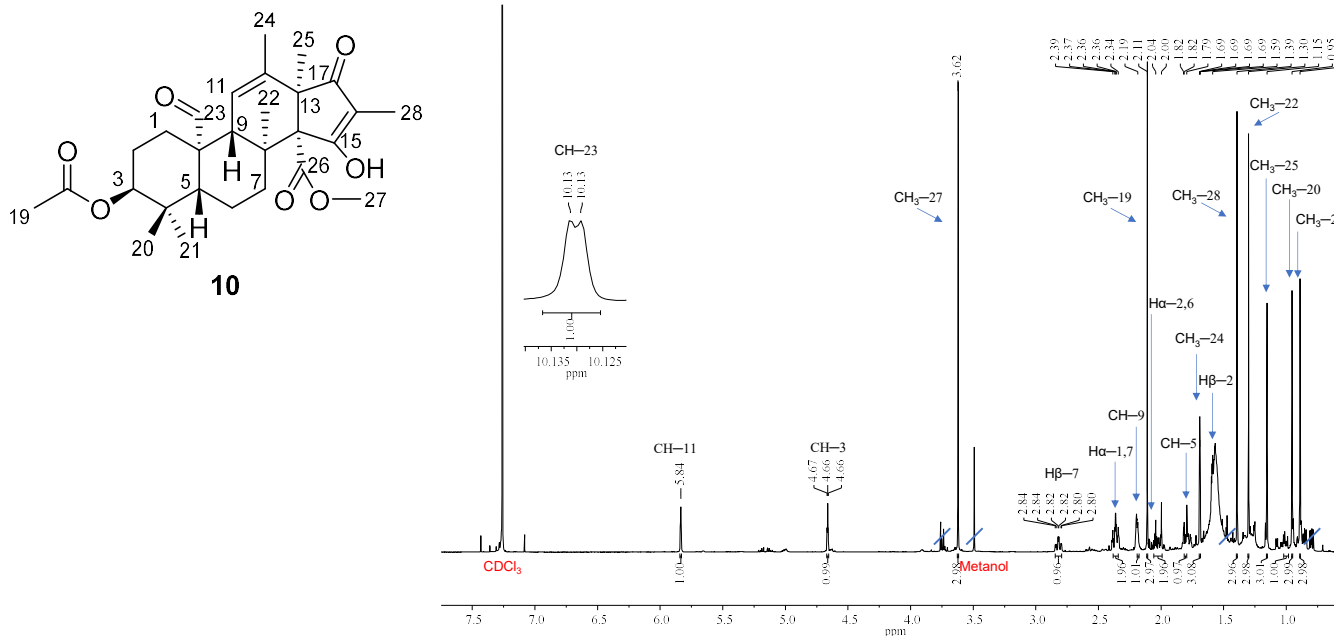


Figura 38. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) de la andrastina A (**10**).

Cuadro 17. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de la andrastina A (**10**).

Posición	Experimental ^{a, c} δ_{H} mult. (J Hz)	Ref. [94] ^{b, d} δ_{H} mult. (J Hz)
1	1.00 m 2.36 ttt (3.1, 3.1, 13.0, 13.0)	0.98 m 2.27 m
2	1.59 m 2.02 m	1.59 m 2.05 m
3	4.66 t (2.4)	4.62 t (2.3)
5	1.80 m	1.84 dd (2.3, 12.9)
6	1.80 m 2.02 m	1.70 m 2.07 m
7	2.36 ttt (3.1, 3.1, 13.0, 13.0) 2.82 td (4.2, 13.0)	2.25 m 3.02 td (3.9, 12.9)
9	2.19 sa	2.13 sa
11	5.84 s	5.38 sa
19	2.11 s	2.05 s
20	0.95 s	0.95 s
21	0.89 s	0.87 s
22	1.30 s	1.24 s
23	10.13 s	10.18 s
24	1.69 m	1.75 sa
25	1.15 s	1.16 s
27	3.62 s	3.58 s
28	1.39 s	1.59 s

^a 600 MHz y ^b 500 MHz, ^c CDCl_3 y ^d CD_3OD .

En total se obtuvieron 10 compuestos puros, el alternariol (**1**) y su derivado metilado (**2**) se obtuvieron de *Alternaria* sp. CIGOM4. Las benzodiazepinas ciclopenina (**3**), ciclopeptina (**4**) y 9,10-deshidrociclopeptina (**5**) y la hidroxiquinolona viridicatina (**6**) se aislaron de *P. echinulatum* CONTIG4. Finalmente, la micotoxina citocalasina D (**7**) de *Biatriospora* sp. CIGOM2, los alcaloides meleagrina A (**8**) y roquefortina C (**9**) de *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM16, respectivamente, y el meroterpenoide andrastina A (**10**) de *Penicillium* sp. CIGOM16.

6.6. Estudios de metabolómica

6.6.1. Análisis de componentes principales (PCA)

Con el objetivo de explorar el impacto relativo de las condiciones de crecimiento en la producción de metabolitos, los 87 extractos de los hongos de sedimentos marinos CIGOM fueron analizados por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS seguido del análisis de componentes principales (PCA) utilizando la temperatura como variable determinante en colaboración de la Dra. Patricia Velez (Figura 39). El PCA se realizó con 4462 iones de metabolitos conservados después de la eliminación de los iones presentes en blanco (medio de cultivo). En la Figura 39. A se puede observar el agrupamiento de los datos en función de la temperatura del cultivo, y que representa el 21.3% de la variación química general. Los hongos cultivados a 4 °C (puntos rojos) se agruparon y se separaron de los obtenidos de las mismas cepas cultivadas a 20 °C (puntos negros) y TA (puntos verdes; Figura 39. A). En el caso de *Biatrispora* sp. CIGOM2 (CM_2) cultivado a 20 °C y TA, existe una agrupación distinta al resto de las especies evaluadas, lo que indica diferencias notables en su perfil químico (Figura 39. B). Como se puede observar en la Figura 39. B la producción de la citocalasina D (7) y otros metabolitos presentes a TA y 20°C disminuyó cuando se cultivó a 4°C.

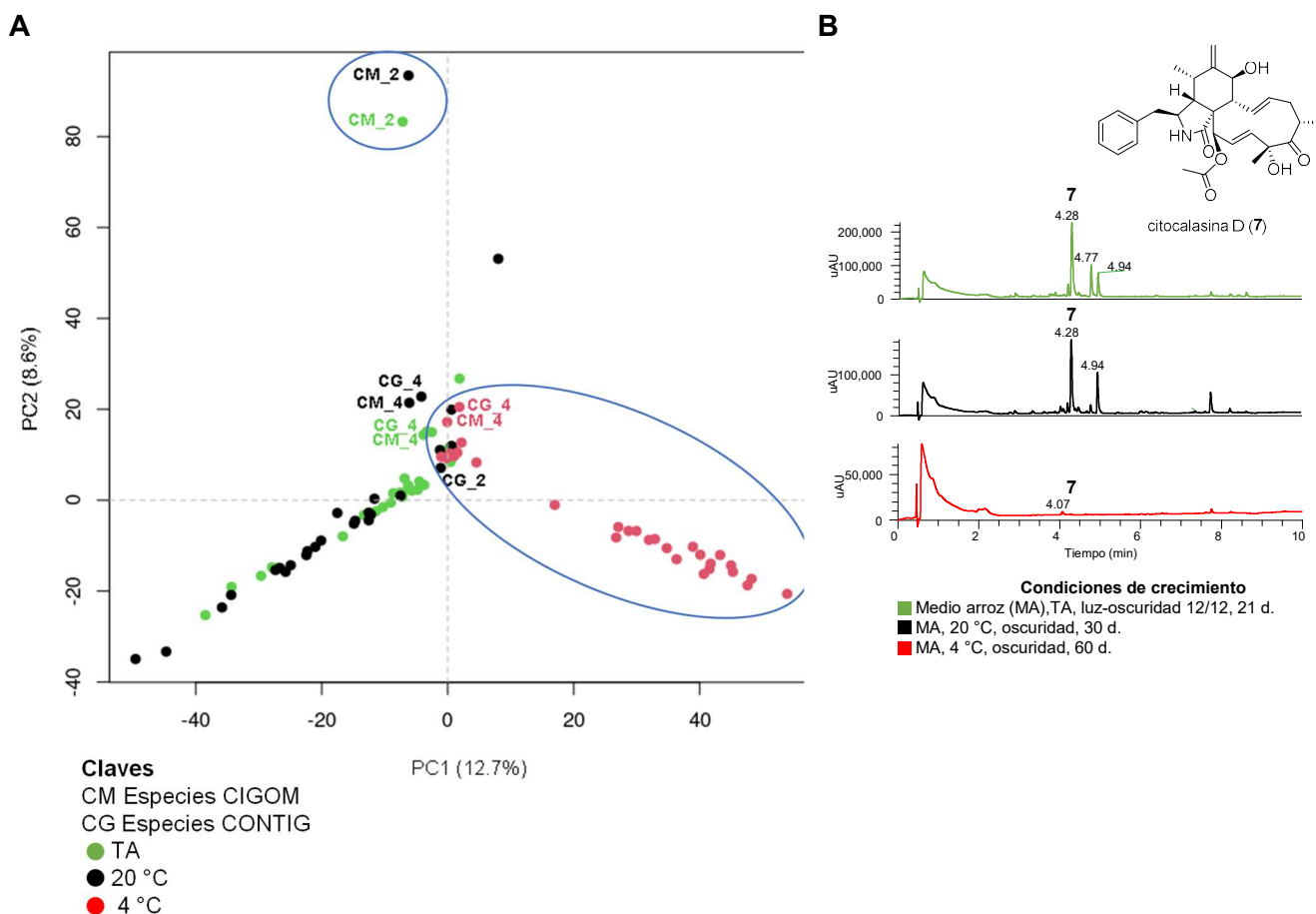


Figura 39. A. Efecto de la temperatura de crecimiento sobre el perfil metabólico global de las muestras de las especies fúngicas GoM determinado por el PCA. **B.** perfiles cromatográficos por UPLC-PDA (λ 180-500 nm) de los extractos de *Biatrispora* sp. CIGOM2.

6.6.2. Redes moleculares

Con el objetivo de explorar la diversidad metabólica de las especies selectas *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4, *Biatrispora* sp. CIGOM2 y *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM16, cultivadas

bajo el enfoque OSMAC [47], se construyeron y analizaron redes moleculares. Los datos espectrométricos por UPLC–HRESIMS–MS/MS de los extractos fueron tratados en la plataforma del GNPS y de manera paralela se realizó el análisis metabolómico manual con las bases de datos del DPNs, el Scifinder y la base de micotoxinas del grupo de investigación. El resultado consistió en una red molecular conformada por 38 agrupaciones con al menos tres nodos organizados en cuatro subclases (Figura 40). De esta, 26 agrupaciones no coincidieron con alguna subclase, lo que probablemente esté relacionado con la química característica de estos organismos. En cambio, los compuestos heterocíclicos y los lípidos y metabolitos similares a estos contribuyeron con siete y cuatro agrupaciones, respectivamente; una agrupación se identificó como alcaloides y derivados, y una como compuestos orgánicos nitrogenados (Figura 40). Asimismo, el GNPS anotó de manera automática los compuestos ciclopenina (3) y ciclopeptina (4) aislados de *P. echinulatum* sp. CONTIG4, la citocalasina D (7) de *Biatrispora* sp. CIGOM2 y la andrastina A (15) de *Penicillium* sp. CIGOM10. Adicionalmente, los siguientes compuestos se anotaron de manera manual: metil alternariol (2), meleagrina A (8), ácido tenuazónico (10), altersetina (11), ciclopenol (12), viridicatol (13) y roquefortina C (14), comparando los máximos de absorción UV y los datos de HRMS–MS/MS con los reportados, usando los nivel 1 y 2 de confianza recomendados por la iniciativa de estándares metabolómicos, y una masa exacta < 5 ppm (Cuadro 18) [46,61,75].

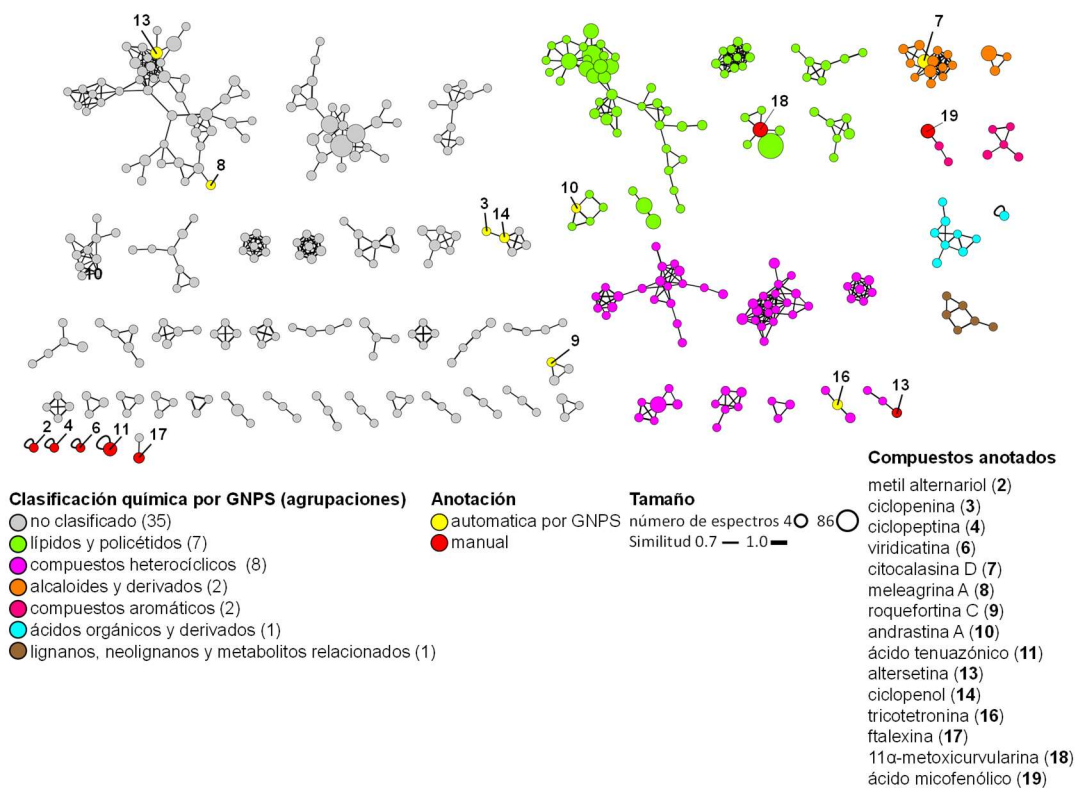


Figura 40. Análisis por GNPS de los metabolitos producidos por *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4, *Biatrispora* sp. CIGOM2 y *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM16. El tamaño de las uniones indica la similitud química entre los espectros MS/MS. Los compuestos anotados manualmente y por el GNPS están indicados en los cuadros y señalados con marcadores de color (exactitud de la masa < 5 ppm). Creado con Cytoscape 3.8.1.

Cuadro 18. Anotaciones químicas de compuestos conocidos por el GNPS y por comparación con los compuestos aislados en las redes moleculares de los hongos selectos CIGOM.

Compuesto	Aducto	Ion observado ^a	Fórmula molecular	Masa exacta ^d	Exactitud de la masa (ppm)
Alternariol (1) ^b	[M-H] ⁻	257.045	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	257.0452	-1.3
Metil alternariol (2) ^b	[M+H] ⁺	273.076	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.0755	-0.9
Cicloopenina (3) ^c	[M+H] ⁺	295.108	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	295.1074	-1.10
Ciclopeptina (4) ^b	[M+H] ⁺	281.128	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	281.1282	-0.9
Deshidrociclopeptina (5) ^c	[M+H] ⁺	279.113	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	279.1126	-0.7
Viridicatina (6) ^b	[M+H] ⁺	238.086	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	238.0860	-1.1
Citocalasina D (7) ^c	[M+H] ⁺	508.270	C ₃₀ H ₃₇ NO ₆	508.2689	-0.7
Meleagrina A (8) ^c	[M+H] ⁺	434.182	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₄	434.1820	-0.6
Roquefortina C (9) ^c	[M-H] ⁻	388.178	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	388.1781	+0.5
Andrastina A (10) ^c	[M+H] ⁺	487.269	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	487.2689	-3.0
Altenueno (11) ^b	[M+H] ⁺	293.102	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	293.1017	-0.9
Ácido tenuazónico (12) ^b	[M+H] ⁺	198.113	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	198.1123	-0.9
Altersetina (13) ^b	[M+H] ⁺	400.248	C ₂₄ H ₃₃ NO ₄	400.2479	-0.8
Ciclopenol (14) ^c	[M+H] ⁺	311.102	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄	311.1023	-1.1
Viridicatol (15) ^b	[M+H] ⁺	254.081	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	254.0811	-0.3
Tricotetronina (16) ^c	[M+H] ⁺	497.218	C ₂₈ H ₃₂ O ₈	497.2167	-0.6
Ftalexina (17) ^b	[M+H] ⁺	337.128	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	337.1276	-1.7
11-Metoxicurvularina (18) ^b	[M+H] ⁺	323.149	C ₁₇ H ₂₂ O ₆	323.1485	-1.3
Ácido micofenólico (19) ^b	[M+H] ⁺	321.133	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	321.1329	-1.1

^a Valores tomados del análisis por GNPS; ^b anotados manualmente; ^c anotados por el GNPS; ^d datos obtenidos del análisis por HRMS de los compuestos puros.

Los cambios en la producción de los metabolitos secundarios de los hongos selectos cultivados se estudiaron por comparación de los perfiles cromatográficos por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS y el análisis de las redes moleculares del GNPS de las diferentes condiciones de crecimiento. En el caso de *Alternaria* sp. CIGOM4, los metabolitos mayoritarios alternariol (1) y su derivado metilado (2) se observaron en todas las condiciones de crecimiento (Figura 41). En el cultivo a 20 °C se observó la mayor concentración de los compuestos en una proporción relativa 1:1. Cabe mencionar que el hongo produjo el compuesto 2 como único mayoritario, mientras que, a 4 °C, la altersetina (13) y el compuesto 1 se produjeron como metabolitos mayoritarios. Asimismo, los metabolitos minoritarios altenueno (11) y el ácido tenuazónico (12) no se produjeron en el medio arroz con caldo Czapek-Dox o agua marina artificial (Figura 41).

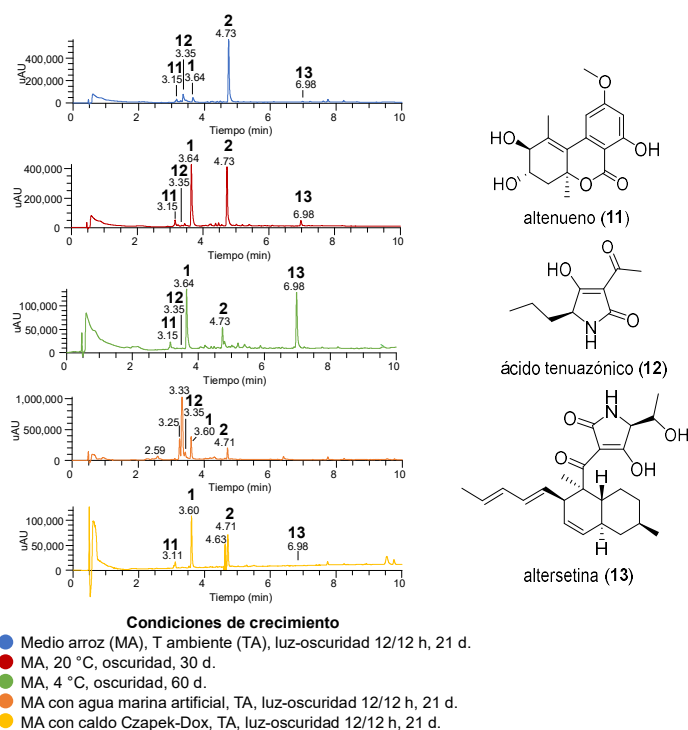


Figura 41. Comparación de los perfiles por UPLC–PDA de los extractos de *Alternaria* sp. CIGOM4 obtenidos bajo distintas condiciones de crecimiento y compuestos identificados.

Por otro lado, *P. echinulatum* CONTIG4 demostró un potencial biosintético importante ya que produjo las benzodiacepinas **3–5** y la quinolona **6**. De manera adicional a los metabolitos aislados, la derreplicación manual de los extractos permitió la identificación del ciclopenol (**12**) y el viridicatol (**13**), derivados fenólicos de los compuestos **3** y **6**, respectivamente (Figura 42). La comparación de los perfiles por UPLC–PDA–HRMS–MS/MS de los extractos reveló que la viridicatina (**6**) fue producida como metabolito mayoritario en todas las condiciones. En cambio, el metabolito 9,10-deshidrociclopeptina (**5**) se produjo en mayor proporción cuando el microorganismo se cultivó a 4 °C o en presencia de salinidad. A diferencia de lo anterior, la producción del compuesto **3** disminuyó en presencia de sales (Figura 42). El análisis por GNPS de los extractos agrupó los metabolitos en tres agrupaciones, en las que los nodos conectados pueden corresponder a compuestos relacionados (Figura 42).

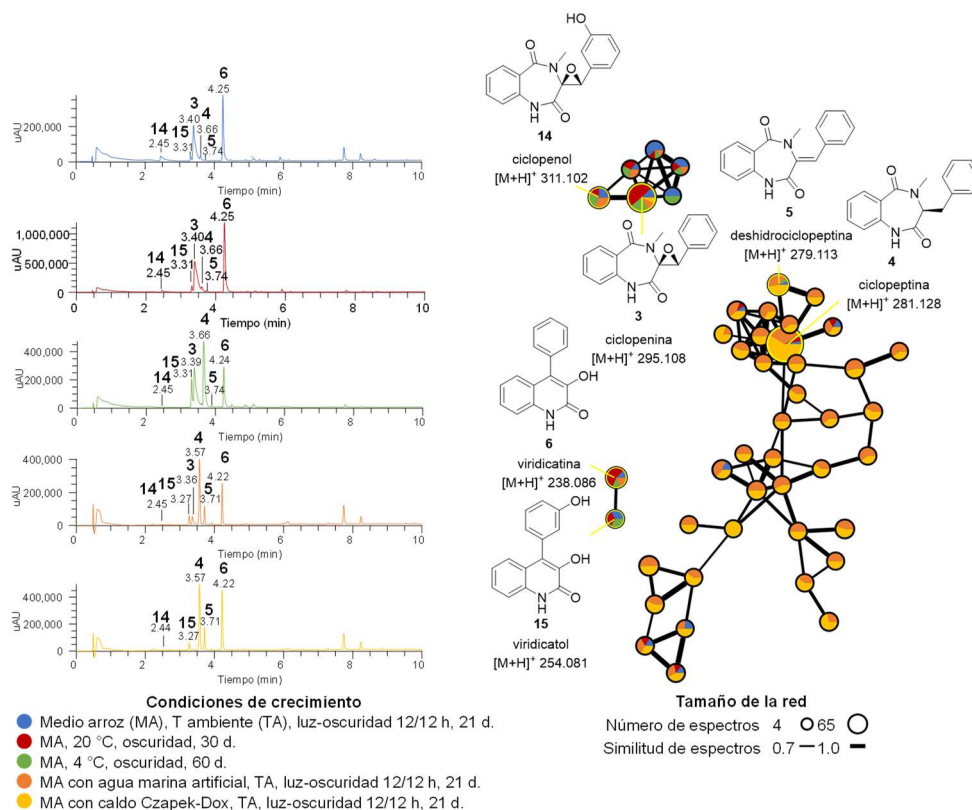


Figura 42. Comparación de los perfiles por UPLC–PDA y red molecular de los extractos de *P. echinulatum* CONTIG4. Creado con Cytoscape 3.8.1.

Finalmente, se compararon los extractos de las diferentes condiciones de *Biatrispora* sp. CIGOM 2 y *Penicillium* sp. CIGOM 10 y CIGOM 16 (Figura 43 y 44). El hongo CIGOM2 produjo la micotoxina D (**7**) como metabolito mayoritario. Sin embargo, cuando el hongo se cultivó en 4 °C se observó de manera cualitativa que el metabolito se produjo de manera escasa (Figura 43). Adicionalmente, en los extractos de TA y 20 °C se observaron picos con tiempos de retención (t_R) de 4.77 y 4.94 min con los mismos iones moleculares que el compuesto **7** que podrían representar isómeros de este metabolito. En el caso de los hongos *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM 16 (Figura 43), la meleagrina A (**8**) se produjo como el metabolito mayoritario en todas las condiciones. De manera adicional, se anotaron manualmente algunos metabolitos reportados para *Penicillium* spp.

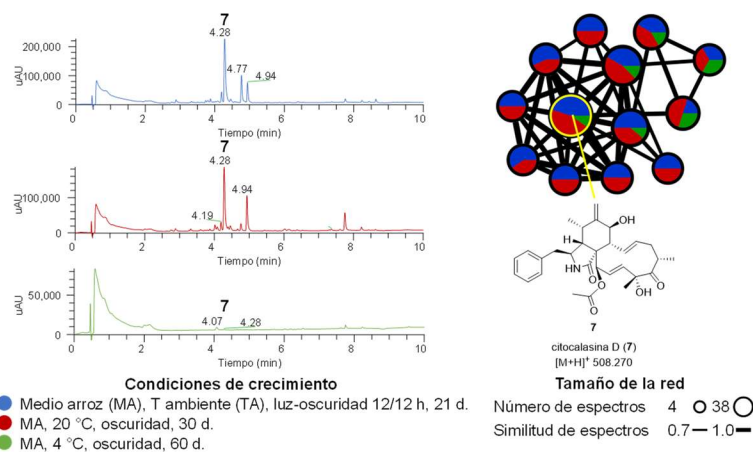


Figura 43. Comparación de los perfiles por UPLC–PDA y las redes moleculares por GNPS molecular de *Biatrispora* sp. CIGOM2. Los extractos se obtuvieron bajo distintas condiciones de crecimiento. Creado con Cytoscape 3.8.1.

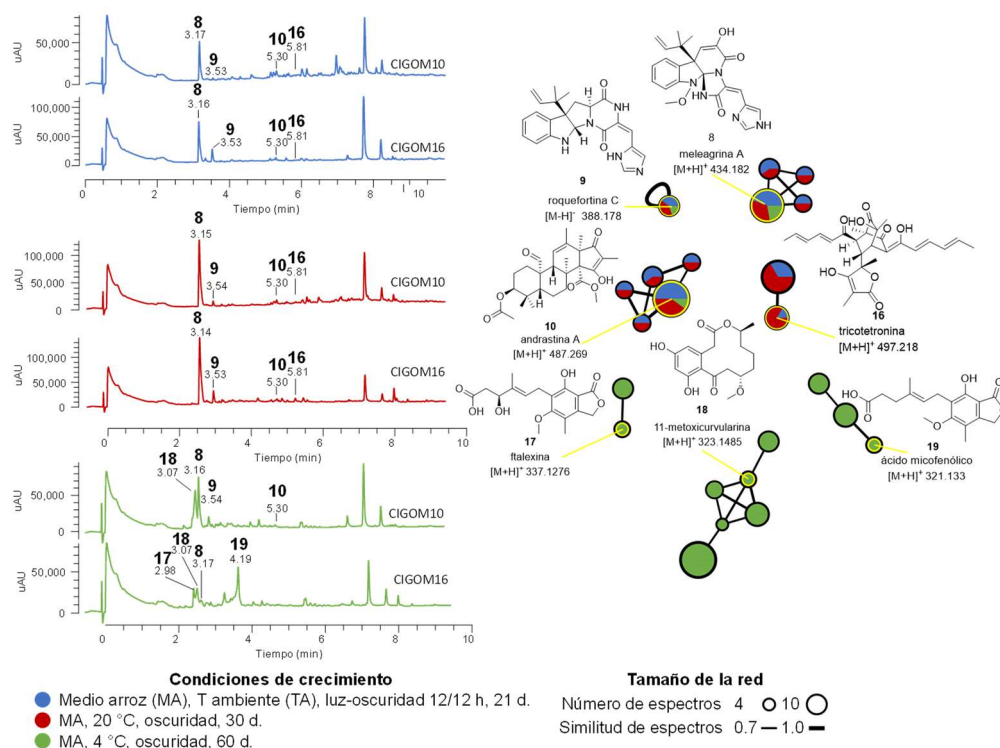





Figura 44. Comparación de los perfiles por UPLC–PDA y las redes moleculares por GNPS molecular de *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM16. Los extractos se obtuvieron bajo distintas condiciones de crecimiento. Creado con Cytoscape 3.8.1.




6.7. Actividad biológica de los compuestos 1-8

Los compuestos aislados **1-8** se evaluaron sobre un panel de patógenos ESKAPE usando el método de microdilución con MTT (Anexo 2). De manera adicional y en colaboración con el College of Pharmacy, University of Illinois Chicago, los compuestos fueron evaluados sobre especies de *Mycobacterium* tuberculosas y no tuberculosas usando los bioensayos en placa de azul de alamar (MABA) y de recuperación de hipoxia (LORA, Anexo 3). Asimismo, se evaluó su potencial citotóxico sobre la línea celular Vero (Anexo 3). Los compuestos **1**, **6** y **8** demostraron actividad antimicrobiana (Cuadro 19).

Cuadro 19. Actividad biológica de los compuestos **1**, **6** y **8**.

Compuesto	MSSA	MRSA	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. avium</i> ATCC 15769	Vero ATCC
			MABA ⁴	LORA ⁵	MABA ⁴	CCL-81 ⁶
Alternariol (1)			87 (ND)	>50	ND	ND
Viridicatina (6)			100 (43.8)	>50	>50	>50
Meleagrina A (8)			101 (48.0)	>50	12.3	>50
MIC control (μM)	572.41 ¹	0.86 ²	100 (0.03) ³	0.08 ³	0.05 ³	>100 ³

Nivel de inhibición

	Inhibición total a 100 μg/mL y parcial a 10 μg/mL.
	Inhibición total a 100 μg/mL.
	Inhibición parcial a 100 μg/mL.
	Sin inhibición.

¹ Ampicilina; ² Vancomicina; ³ Rifampicina; ⁴ % de inhibición a la concentración de 50 μg/mL (MIC μM); ⁵ MIC μM; ⁶ CC₅₀, Concentración Citológica 50, concentración del compuesto que inhibió el 50 % del crecimiento de la línea celular [95]; ND no determinado.

El alternariol (**1**) inhibió el crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) de manera total a la concentración de 387.3 μM y resultó 10 veces más potente (38.7 μM) con la cepa susceptible a meticilina (MSSA) (Cuadro 19). Asimismo, el compuesto **1** demostró el 87% de inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv cuando se evaluó a 50 μg/mL. Con base en lo descrito en la literatura especializada, **1** ha demostrado actividad antibacteriana sobre *B. subtilis* ATCC 6633 no resistente con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 33.3 μM [96]. Con base en estos resultados, la actividad antimicrobiana observada en los extractos de *Alternaria* sp. CIGOM4 (Cuadro 8) se deba probablemente debido al alternariol (**1**).

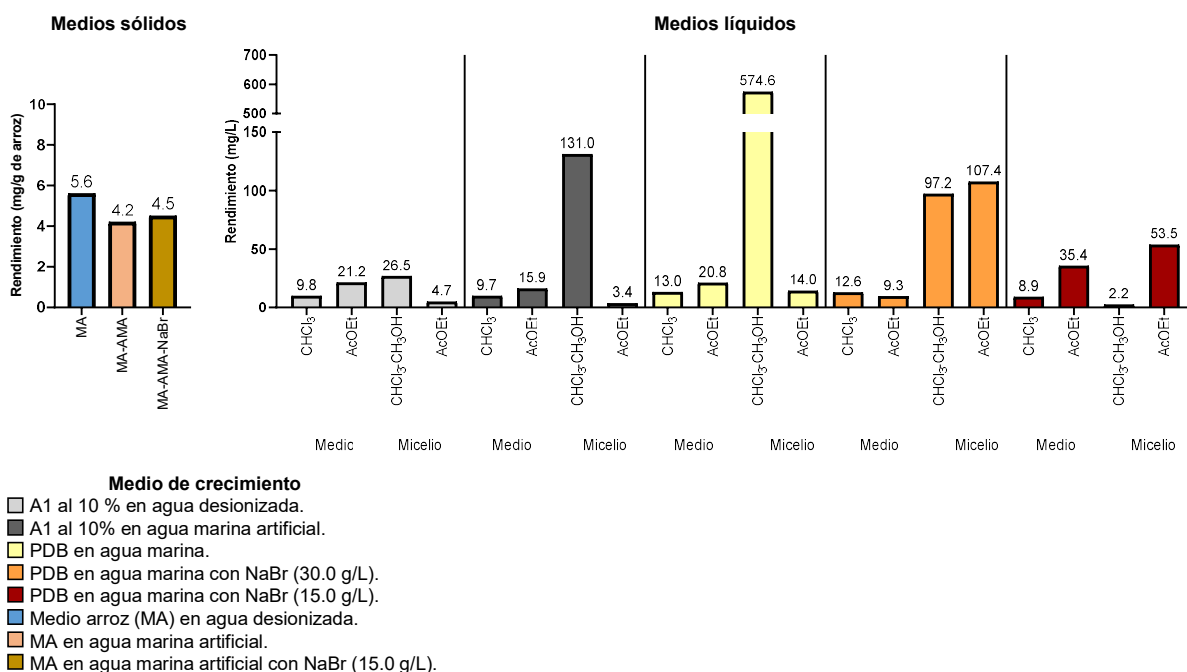
La viridicatina (**6**), el único compuesto con actividad biológica de los cuatro aislados de *P. echinulatum* CONTIG4 inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* con un valor de MIC de 43.8 μM (Cuadro 19). Por el contrario, no demostró actividad sobre los patógenos ESKAPE (Anexo 1). A pesar de lo anterior, se ha reportado que **6** inhibe el crecimiento de *B. cereus*, *Vibrio anguillarum* y *V. parahemolyticus* con una MIC de 25 μM [97]. Este compuesto resultó inactivo sobre la línea celular Vero a la concentración evaluada (Cuadro 19).

Finalmente, la meleagrina A (**8**) aislada de *Penicillium* sp. CIGOM10 inhibió el crecimiento de manera parcial sobre MSSA a la mayor concentración evaluada (Cuadro 19). El compuesto **8** ha demostrado inhibir la capacidad de formación de biopelículas en *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA), con un 87.1 % de inhibición a la concentración de 69.2 μM [98]. De manera adicional, se ha reportado como inhibidor de FabI, una isoforma de la enzima enoil-ACP reductasa que participa en la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias con resistencia a múltiples antibióticos (MDR) [99], y actividad antimicrobiana sobre diferentes microorganismos en el bioneso de difusión con discos de papel [98]. Finalmente, este compuesto ha demostrado actividad antimicrobiana baja sobre *Micrococcus luteus* DSMZ 1605 [98]. En contraste, **8** inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. avium* con MIC de 48.0 y 12.3 μM, respectivamente, y no se observó actividad citotóxica sobre la línea celular Vero (Cuadro 19).

6.8. Estudio químico de *Corollospora gracilis*

El hongo marino *Corollospora gracilis* se cultivó en pequeña escala y se obtuvieron los extractos orgánicos con las mismas condiciones que los hongos de sedimentos CIGOM. El crecimiento del microorganismo en las diferentes condiciones fue escaso y la comparación de los perfiles metabólicos por UPLC–PDA evidenció la escasa producción de metabolitos. Sin embargo, el extracto de 4 °C demostró potencial antimicrobiano al inhibir de manera parcial a *S. aureus* a la concentración de 200 µg/mL. Considerando la actividad biológica observada y los escasos reportes químicos del género y la especie, el hongo se cultivó en mediana escala usando medios líquidos y sólidos en presencia y ausencia de sales con base en los requerimientos especiales que tienen algunos microorganismos marinos [35,77].

En la Gráfica 3 se comparan los rendimientos de los extractos de los cultivos de mediana escala en medios sólidos y líquidos, respectivamente. El rendimiento del extracto de medio arroz con agua desionizada resultó mayor que los extractos de medio arroz con agua marina. Por otro lado, los extractos CHCl₃-CH₃OH de micelio de los cultivos líquidos A1 al 10 % y PDB con agua marina resultaron con los mayores rendimientos, por lo que se infirió que el crecimiento de *C. gracilis* en los medios líquidos depende de requerimientos nutricionales específicos proporcionados por el agua marina [35,77]. De manera adicional, en los extractos de los cultivos enriquecidos con NaBr se observó que el rendimiento de los extractos de micelio es mayor en presencia de 30 g/L que con la mitad de la concentración.



Gráfica 3. Rendimiento de los extractos de *Corollospora gracilis*.

7. Conclusiones

Los 29 aislamientos de sedimentos marinos y el hongo *C. gracilis* se cultivaron empleando el enfoque OSMAC bajo tres condiciones distintas. Los 90 extractos resultantes se evaluaron sobre una serie de bacterias Gram positivas y negativas y *C. albicans*, donde el 63% de los extractos resultaron activos. Los extractos de los cultivos fúngicos a 4 °C, temperatura reportada en el mar profundo, fueron los que mostraron mayor actividad antimicrobiana.

Se seleccionaron a los hongos *Alternaria* sp. CIGOM4 y *P. echinulatum* CONTIG4 para su cultivo en mayor escala con base en los resultados de actividad biológica y a los hongos *Biatriospora* sp CIGOM2, *Penicillium* sp. CIGOM10 y CIGOM16 para su estudio químico. De éstos, se aislaron y caracterizaron el alternariol (1) y su derivado metilado (2) de CIGOM4, las benzodiazepinas ciclopenina (3), ciclopeptina (4) y 9,10-deshidrociclopeptina (5), y la hidroxiquinolona viridicatina (6) de CONTIG4, la micotoxina citocalasina D (7) de CIGOM2, los alcaloides meleagrina A (8) de CIGOM10 y la roquefortina C (9) y el meroterpenoide andrastina A (10) de CIGOM16.

El análisis metabolómico no dirigido de los extractos de hongos selectos CIGOM permitió determinar la diversidad metabólica de estos organismos. Este trabajo se realizó mediante la anotación automática y manual de compuestos conocidos y análisis de PCA, mismos que confirmaron que la temperatura del cultivo es el factor principal de la variación química. Por otra parte, el estudio de *C. gracilis* permitió evidenciar el efecto de la salinidad del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios.

Finalmente, este trabajo representa el primer acercamiento al conocimiento químico de hongos cultivables de sedimentos marinos del Golfo de México.

8. Referencias

1. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770-803, doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
2. Hutchings, M.I.; Truman, A.W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* **2019**, *51*, 72-80, doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
3. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play". *Planta Med.* **2016**, *82*, 775-789, doi:10.1055/s-0042-101353.
4. Jiménez, C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *9*, 959-961, doi:10.1021/acsmchemlett.8b00368.
5. Passow, U.; Overton, E.B. The Complexity of Spills: The Fate of the Deepwater Horizon Oil. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2021**, *13*, 109-136, doi:10.1146/annurev-marine-032320-095153.
6. Ghareeb, M.A.; Tammam, M.A.; El-Demerdash, A.; Atanasov, A.G. Insights about clinically approved and Preclinically investigated marine natural products. *Current Research in Biotechnology* **2020**, *2*, 88-102, doi:<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.09.001>.
7. Larsen, A.K.; Galmarini, C.M.; D'Incalci, M. Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2016**, *77*, 663-671, doi:10.1007/s00280-015-2918-1.
8. Cuevas, C.; Francesch, A. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Product Reports* **2009**, *26*, 322-337, doi:10.1039/B808331M.
9. Trabectedin. *Drugs in R & D* **2006**, *7*, 317-328, doi:10.2165/00126839-200607050-00005.
10. Cuevas, C.; Pérez, M.; Martín, M.J.; Chicharro, J.L.; Fernández-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de la Calle, F.; et al. Synthesis of Ecteinascidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from Cyanosafracin B. *Organic Letters* **2000**, *2*, 2545-2548, doi:10.1021/ol0062502.
11. Saeed, A.F.U.H.; Su, J.; Ouyang, S. Marine-derived drugs: Recent advances in cancer therapy and immune signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2021**, *134*, 111091, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111091>.
12. Sagar, S.; Kaur, M.; Minneman, K.P. Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges. *Marine Drugs* **2010**, *8*, 2619-2638.
13. Han, B.-N.; Hong, L.-L.; Gu, B.-B.; Sun, Y.-T.; Wang, J.; Liu, J.-T.; Lin, H.-W. Natural Products from Sponges. In *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*, Li, Z., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2019; pp. 329-463.
14. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Kingston, D.G.I. Chapter 5 - Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures**Note: This chapter reflects the opinions of the authors, not necessarily those of the US Government. In *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*, Wermuth, C.G., Aldous, D., Raboisson, P., Rognan, D., Eds.; Academic Press: San Diego, 2015; pp. 101-139.
15. Kim, D.H.; Shin, J.; Kwon, H.J. Psammaphin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Experimental & Molecular Medicine* **2007**, *39*, 47-55, doi:10.1038/emm.2007.6.
16. Raedler, L.A. Farydak (Panobinostat): First HDAC Inhibitor Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Am Health Drug Benefits* **2016**, *9*, 84-87.
17. (NIH), N.I.o.H. Omega-3 Fatty Acids. Available online: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-HealthProfessional/#en3> (accessed on
18. Newman, D.J. The "Utility" of Highly Toxic Marine-Sourced Compounds. *Marine drugs* **2019**, *17*, 324, doi:10.3390/md17060324.
19. Safavi-Hemami, H.; Brogan, S.E.; Olivera, B.M. Pain therapeutics from cone snail venoms: From Ziconotide to novel non-opioid pathways. *Journal of Proteomics* **2019**, *190*, 12-20, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.05.009>.
20. Senter, P.D.; Sievers, E.L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nature Biotechnology* **2012**, *30*, 631-637, doi:10.1038/nbt.2289.

21. Khongorzul, P.; Ling, C.J.; Khan, F.U.; Ihsan, A.U.; Zhang, J. Antibody–Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Molecular Cancer Research* **2020**, *18*, 3-19, doi:10.1158/1541-7786.Mcr-19-0582.
22. Garson, M.J. 4.12 - Marine Natural Products as Antifeedants. In *Comprehensive Natural Products II*, Liu, H.-W., Mander, L., Eds.; Elsevier: Oxford, 2010; pp. 503-537.
23. Luesch, H.; Moore, R.E.; Paul, V.J.; Mooberry, S.L.; Corbett, T.H. Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue Symplostatin 1. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 907-910, doi:10.1021/np010049y.
24. van der Weyden, C.A.; Pileri, S.A.; Feldman, A.L.; Whisstock, J.; Prince, H.M. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood Cancer Journal* **2017**, *7*, e603-e603, doi:10.1038/bcj.2017.85.
25. Deeks, E.D. Polatuzumab Vedotin: First Global Approval. *Drugs* **2019**, *79*, 1467-1475, doi:10.1007/s40265-019-01175-0.
26. Pang, K.-L.; Overy, D.P.; Jones, E.B.G.; Calado, M.d.L.; Burgaud, G.; Walker, A.K.; Johnson, J.A.; Kerr, R.G.; Cha, H.-J.; Bills, G.F. 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. *Fungal Biology Reviews* **2016**, *30*, 163-175, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.08.001>.
27. Fenical, W.; Jensen, P.R.; Cheng, X.C. Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof. 1999.
28. BeyondSpring. Plinabulin pipeline. Available online: (accessed on 6 de abril 2022).
29. Natoli, M.; Herzig, P.; Pishali Bejestani, E.; Buchi, M.; Ritschard, R.; Lloyd, G.K.; Mohanlal, R.; Tonra, J.R.; Huang, L.; Heinzelmann, V.; et al. Plinabulin, a Distinct Microtubule-Targeting Chemotherapy, Promotes M1-Like Macrophage Polarization and Anti-tumor Immunity. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.644608.
30. Mohanlal, R.; Lelorier, Y.; Mitchell, D.; Huang, L.; Blayney, D.W. Impact of adding plinabulin to pegfilgrastim for the prevention of TAC chemotherapy (Chemo) induced neutropenia (CIN), on patient quality of life (QoL). *Journal of Clinical Oncology* **2021**, *39*, e24031-e24031, doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e24031.
31. Blayney, D.W.; Mohanlal, R.; Adamchuk, H.; Kirtbaya, D.V.; Chen, M.; Du, L.; Ogenstad, S.; Ginn, G.; Huang, L.; Zhang, Q. Efficacy of Plinabulin vs Pegfilgrastim for Prevention of Docetaxel-Induced Neutropenia in Patients With Solid Tumors: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open* **2022**, *5*, e2145446-e2145446, doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.45446.
32. Grossart, H.-P.; Van den Wyngaert, S.; Kagami, M.; Wurzbacher, C.; Cunliffe, M.; Rojas-Jimenez, K. Fungi in aquatic ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 339-354, doi:10.1038/s41579-019-0175-8.
33. Yurchenko, A.N.; Girich, E.V.; Yurchenko, E.A. Metabolites of Marine Sediment-Derived Fungi: Actual Trends of Biological Activity Studies. *Marine drugs* **2021**, *19*, 88, doi:10.3390/md19020088.
34. Imhoff, J.F. Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 19, doi:10.3390/md14010019.
35. Rédou, V.; Vallet, M.; Meslet-Cladière, L.; Kumar, A.; Pang, K.-L.; Pouchus, Y.-F.; Barbier, G.; Grovel, O.; Bertrand, S.; Prado, S.; et al. Marine Fungi. In *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*, Stal, L.J., Cretoiu, M.S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp. 99-153.
36. Vargas-Gastélum, L.; Chong-Robles, J.; Lago-Lestón, A.; Darcy, J.L.; Amend, A.S.; Riquelme, M. Targeted ITS1 sequencing unravels the mycodiversity of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 4046-4061, doi:<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14754>.
37. Herzka, S.Z., Zaragoza Álvarez, R.A., Peters, E.M., y Hernández Cárdenas, G. *Atlas de línea base ambiental del Golfo de México*; Consorcio de Investigación del Golfo de México: México, 2021.
38. CIGOM. Available online: <https://cigom.org/> (accessed on 27 de mayo de 2022).
39. Romero-Hernández, L.; Velez, P.; Betanzo-Gutiérrez, I.; Camacho-López, M.D.; Vázquez-Duhalt, R.; Riquelme, M. Extra-Heavy Crude Oil Degradation by *Alternaria* sp. Isolated from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6090, doi:10.3390/app11136090.

40. Velez, P.; Gasca-Pineda, J.; Riquelme, M. Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* **2020**, *153*, 104816, doi:10.1016/j.marenvres.2019.104816.
41. Vargas-Gastélum, L.; Riquelme, M. The Mycobiota of the Deep Sea: What Omics Can Offer. *Life* **2020**, *10*, 292.
42. Walker, A.K.; Robicheau, B.M. Fungal diversity and community structure from coastal and barrier island beaches in the United States Gulf of Mexico. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3889, doi:10.1038/s41598-021-81688-5.
43. Velez, P.; Alejandri-Ramírez, N.D.; González, M.C.; Estrada, K.J.; Sanchez-Flores, A.; Dinkova, T.D. Comparative Transcriptome Analysis of the Cosmopolitan Marine Fungus *Corollospora maritima* Under Two Physiological Conditions. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **2015**, *5*, 1805-1814, doi:10.1534/g3.115.019620.
44. Peng, Q.; Li, Y.; Deng, L.; Fang, J.; Yu, X. High hydrostatic pressure shapes the development and production of secondary metabolites of Mariana Trench sediment fungi. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11436, doi:10.1038/s41598-021-90920-1.
45. Baral, B.; Akhgari, A.; Metsä-Ketelä, M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology* **2018**, *3*, 163-178, doi:<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>.
46. Bode, H.B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem.* **2002**, *3*, 619-627, doi:[https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9).
47. Romano, S.; Jackson, S.A.; Patry, S.; Dobson, A.D.W. Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 244, doi:10.3390/md16070244.
48. Oliver, S.G.; Winson, M.K.; Kell, D.B.; Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 373-378, doi:[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1).
49. Klassen, A.; Faccio, A.T.; Canuto, G.A.B.; da Cruz, P.L.R.; Ribeiro, H.C.; Tavares, M.F.M.; Sussulini, A. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. In *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*, Sussulini, A., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 3-17.
50. Bayona, L.M.; de Voogd, N.J.; Choi, Y.H. Metabolomics on the study of marine organisms. *Metabolomics* **2022**, *18*, 17, doi:10.1007/s11306-022-01874-y.
51. Worley, B.; Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics* **2013**, *1*, 92-107, doi:<http://dx.doi.org/10.2174/2213235X11301010092>.
52. Dictionary of Natural Products 30.1. Available online: <https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml> (accessed on 13 October 2021).
53. SciFinder - CAS. Available online: <https://scifinder.cas.org> (accessed on 13 October 2021).
54. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kaponov, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828-837, doi:10.1038/nbt.3597.
55. Aron, A.T.; Gentry, E.C.; McPhail, K.L.; Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J.M.; Sikora, N.; Vargas, F.; et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 1954-1991, doi:10.1038/s41596-020-0317-5.
56. Oppong-Danquah, E.; Passaretti, C.; Chianese, O.; Blümel, M.; Tasdemir, D. Mining the Metabolome and the Agricultural and Pharmaceutical Potential of Sea Foam-Derived Fungi. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 128, doi:10.3390/md18020128.
57. Oppong-Danquah, E.; Budnicka, P.; Blümel, M.; Tasdemir, D. Design of Fungal Co-Cultivation Based on Comparative Metabolomics and Bioactivity for Discovery of Marine Fungal Agrochemicals. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 73, doi:10.3390/md18020073.

58. Oppong-Danquah, E.; Parrot, D.; Blümel, M.; Labes, A.; Tasdemir, D. Molecular Networking-Based Metabolome and Bioactivity Analyses of Marine-Adapted Fungi Co-cultivated With Phytopathogens. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.02072.
59. Hoof, J.J.v.d.; Wandy, J.; Barrett, M.P.; Burgess, K.E.V.; Rogers, S. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 13738-13743, doi:10.1073/pnas.1608041113.
60. Ernst, M.; Kang, K.B.; Caraballo-Rodríguez, A.M.; Nothias, L.-F.; Wandy, J.; Chen, C.; Wang, M.; Rogers, S.; Medema, M.H.; Dorrestein, P.C.; et al. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. *Metabolites* **2019**, *9*, 144, doi:10.3390/metabo9070144.
61. Sumner, L.W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M.H.; Beger, R.; Daykin, C.A.; Fan, T.W.M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J.L.; et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3*, 211-221, doi:10.1007/s11306-007-0082-2.
62. Sengupta, S.; Chattopadhyay, M.; Grossart, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4*, doi:10.3389/fmicb.2013.00047.
63. CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States*; Department of Health and Human Services, CDC: Atlanta, GA. U.S., 2019.
64. Langford, B.J.; So, M.; Raybardhan, S.; Leung, V.; Westwood, D.; MacFadden, D.R.; Soucy, J.-P.R.; Daneman, N. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, *26*, 1622-1629, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.016>.
65. Rawson, T.M.; Moore, L.S.P.; Zhu, N.; Ranganathan, N.; Skolimowska, K.; Gilchrist, M.; Satta, G.; Cooke, G.; Holmes, A. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clinical Infectious Diseases* **2020**, *71*, 2459-2468, doi:10.1093/cid/ciaa530.
66. Organization, W.H. *2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis*; Organization, W.H., Ed.; Geneva, 2021.
67. Pai, M.; Behr, M.A.; Dowdy, D.; Dheda, K.; Divangahi, M.; Boehme, C.C.; Ginsberg, A.; Swaminathan, S.; Spigelman, M.; Getahun, H.; et al. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* **2016**, *2*, 16076, doi:10.1038/nrdp.2016.76.
68. Zumla, A.; Nahid, P.; Cole, S.T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 388-404, doi:10.1038/nrd4001.
69. Oliveira, D.M.P.D.; Forde, B.M.; Kidd, T.J.; Harris, P.N.A.; Schembri, M.A.; Beatson, S.A.; Paterson, D.L.; Walker, M.J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* **2020**, *33*, e00181-00119, doi:10.1128/CMR.00181-19.
70. Miranda-Novales, M.G.; Flores-Moreno, K.; López-Vidal, Y.; Rodríguez-Álvarez, M.; Solórzano-Santos, F.; Soto-Hernández, J.L.; Ponce de León-Rosales, S.; Network, U. Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de México* **2019**, *62*, 42-49, doi:10.21149/10543.
71. Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), U.N.A.d.M. *Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antimicrobianos*; Ciudad de México, 2019.
72. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71-79, doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
73. Cho, S.H.; Lee, H.S.; Franzblau, S. Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for *Mycobacterium tuberculosis*. In *Mycobacteria Protocols*, Parish, T., Roberts, D.M., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2015; pp. 281-292.
74. Gao, W.; Kim, J.-Y.; Anderson, J.R.; Akopian, T.; Hong, S.; Jin, Y.-Y.; Kandrór, O.; Kim, J.-W.; Lee, I.-A.; Lee, S.-Y.; et al. The Cyclic Peptide Ecumicin Targeting ClpC1 Is Active against *Mycobacterium tuberculosis* In Vivo. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **2015**, *59*, 880-889, doi:10.1128/AAC.04054-14.
75. El-Elmat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B.M.; Cech, N.B.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. High-Resolution MS, MS/MS, and UV Database of Fungal Secondary Metabolites as a Dereplication

- Protocol for Bioactive Natural Products. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1709-1716, doi:10.1021/np4004307.
76. Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* **2008**, *25*, 1 - 18, doi:10.18637/jss.v025.i01.
 77. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504, doi:10.1101/gr.1239303.
 78. Ropars, J.; Rodriguez De La Vega, R.; López-Villavicencio, M.; Gouzy, J.; Dupont, J.; Swennen, D.; Dumas, E.; Giraud, T.; Branca, A. Diversity and Mechanisms of Genomic Adaptation in *Penicillium*. In *Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era*, Ronald, P.d.V., Isabelle Benoit, G., Mikael Rørdam, A., Eds.; Caister Academic Press: 2016.
 79. Político, R.A. 5 playas de México no son aptas para nadar por sus niveles de contaminación. *Animal Político* 2021.
 80. Villanueva-Silva, R.; Velez, P.; Riquelme, M.; Fajardo-Hernández, C.A.; Martínez-Cárdenas, A.; Arista-Romero, A.; Wan, B.; Ma, R.; Qader, M.; Franzblau, S.G.; et al. Chemical Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Fungi from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Molecules* **2021**, *26*, 7328.
 81. Sica, V.P.; Raja, H.A.; El-Elimat, T.; Kertesz, V.; Van Berkel, G.J.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. Dereplicating and Spatial Mapping of Secondary Metabolites from Fungal Cultures in Situ. *Journal of Natural Products* **2015**, *78*, 1926-1936, doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00268.
 82. Atlas, R.M. *Handbook of Microbiological Media*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010.
 83. Shang, Z.; Raju, R.; Salim, A.A.; Khalil, Z.G.; Capon, R.J. Cytochalasins from an Australian Marine Sediment-Derived *Phomopsis* sp. (CMB-M0042F): Acid-Mediated Intramolecular Cycloadditions Enhance Chemical Diversity. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 9704-9709, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01793>.
 84. Smith, G. The effect of adding trace elements to Czapek-Dox medium. *Transactions of the British Mycological Society* **1949**, *32*, 280-283, doi:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(49\)80018-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(49)80018-0).
 85. Aly, A.H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I.D.; Wray, V.; Müller, W.E.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schächtele, C.; Kubbutat, M.H.; Lin, W. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972-980.
 86. Tan, N.; Tao, Y.; Pan, J.; Wang, S.; Xu, F.; She, Z.; Lin, Y.; Gareth Jones, E.B. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 296-300, doi:10.1007/s10600-008-9046-7.
 87. Kusano, M.; Koshino, H.; Uzawa, J.; Fujioka, S.; Kawano, T.; Kimura, Y. Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2559-2568.
 88. Zhou, X.; Fang, P.; Tang, J.; Wu, Z.; Li, X.; Li, S.; Wang, Y.; Liu, G.; He, Z.; Gou, D. A novel cyclic dipeptide from deep marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSLOW2. *Natural product research* **2016**, *30*, 52-57.
 89. Bracken, A.; Pocker, A.; Raistrick, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 93. Cyclophenin, a nitrogen-containing metabolic product of *Penicillium cyclopium* Westling. *Biochem. J.* **1954**, *57*, 587-595, doi:10.1042/bj0570587.
 90. Abdel-Hadi, A.; Awad, M.; Abo-Dahab, N.; El-Shanawany, A.; Abdelkader, M.; Abo-Kadoum, M.V. Viridicatin and dehydrocycloheptine, two bioactive alkaloids isolated from marine derived fungus *Penicillium aurantiogriseum* AUMC 9759. *IBSPR* **2015**, *3*, 115-122.
 91. Jikai, L.; Jianwen, T.; Zejun, D.; Zhihui, D.; Xianghua, W.; Peigui, L. Neoengleromycin, a novel compound from *Engleromyces goetzii*. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1439-1442.
 92. Kawai, K.; Nozawa, K.; Nakajima, S.; Iitaka, Y. Studies on fungal products. VII. The structures of meleagrins and 9-*O*-bromobenzoylmeleagrins. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 94-98.
 93. Shanguan, N.; Hehre, W.J.; Ohlinger, W.S.; Beavers, M.P.; Joullié, M.M. The Total Synthesis of Roquefortine C and a Rationale for the Thermodynamic Stability of Iso-roquefortine C over Roquefortine C. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 6281-6287, doi:10.1021/ja800067q.

94. Matsuda, Y.; Awakawa, T.; Abe, I. Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8199-8204, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.029>.
95. Choules, M.P.; Wolf, N.M.; Lee, H.; Anderson, J.R.; Grzelak, E.M.; Wang, Y.; Ma, R.; Gao, W.; McAlpine, J.B.; Jin, Y.-Y.; et al. Rufomycin Targets ClpC1 Proteolysis in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e02204-02218, doi:10.1128/AAC.02204-18.
96. Wang, Y.; Yang, M.-H.; Wang, X.-B.; Li, T.-X.; Kong, L.-Y. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Fitoterapia* **2014**, *99*, 153-158, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.015>.
97. Zhang, C.-C.; Ding, S.-S.; Shi, W.-S.; Cao, F.; Zhu, H.-J.; Wen, M.-L. A new quinolinone from freshwater lake-derived fungus *Myrothecium verrucaria*. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 99-103, doi:10.1080/14786419.2016.1212030.
98. Hamed, A.; Abdel-Razek, A.S.; Araby, M.; Abu-Elghait, M.; El-Hosari, D.G.; Frese, M.; Soliman, H.S.; Stammler, H.G.; Sewald, N.; Shaaban, M. Meleagrins from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: crystal structure and diverse biological activity studies. *Nat. Prod. Res.* **2020**, 1-9.
99. Zheng, C.J.; Sohn, M.-J.; Lee, S.; Kim, W.-G. Meleagrins, a new FabI inhibitor from *Penicillium chrysogenum* with at least one additional mode of action. *PLoS One* **2013**, *8*, e78922, doi:10.1371/journal.pone.0078922.

ANEXOS

Anexo 1. Actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala.

Anexo 2. Actividad de los compuestos **1-8** sobre patógenos ESKAPE.

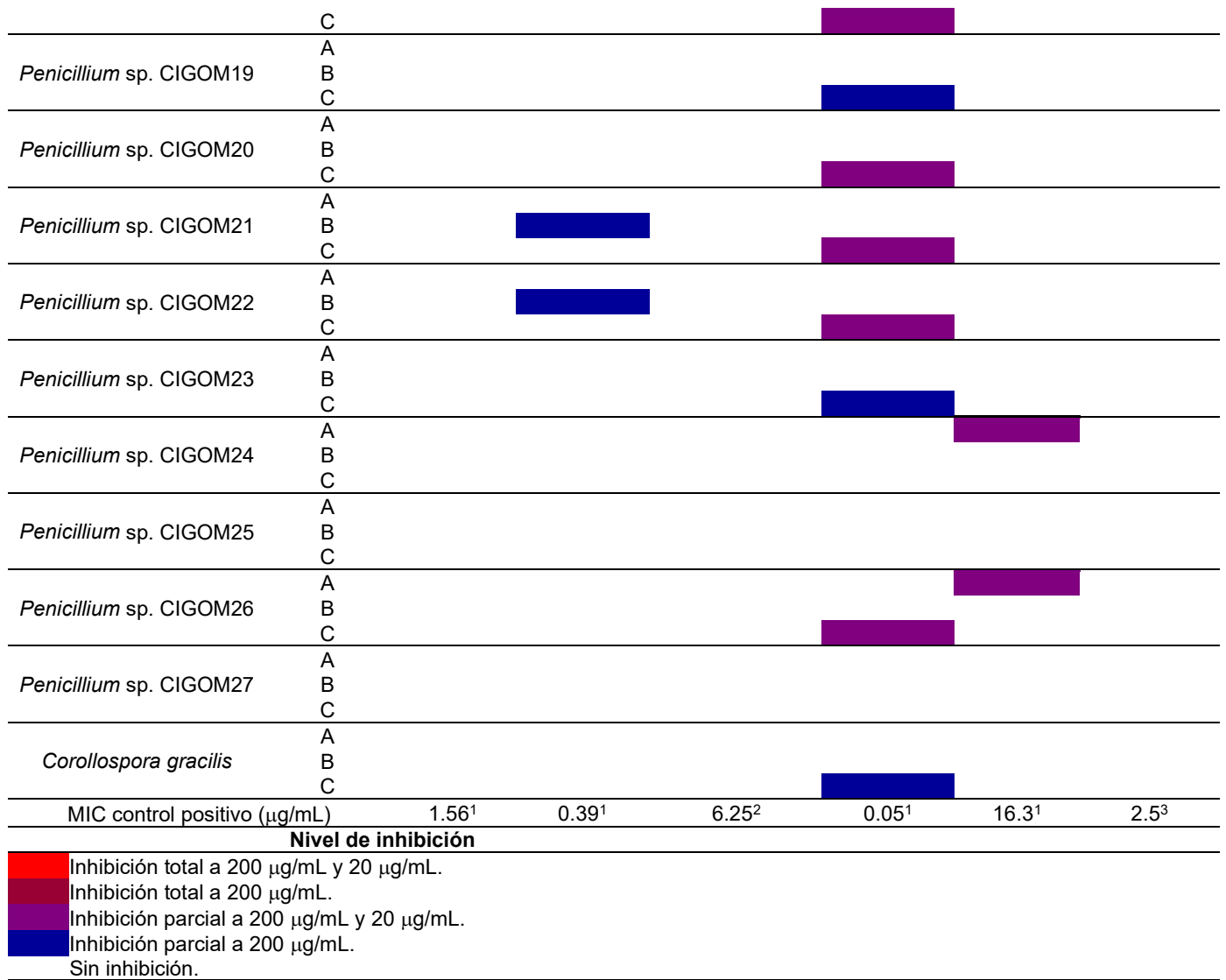
Anexo 3. Actividad de los compuestos **1-8** sobre *Mycobacterium*.

Anexo 4. Artículo derivado de este trabajo de investigación.

Anexo 5. Resumen y cartel presentado en el congreso virtual Vanguard's of Natural Product Research 2021, ASP.

Anexo 1. Actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala.

Cepa	Condición	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>S. typhi</i> ATCC 9992V	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<i>P. brevicompactum</i> CONTIG2	A						
	B						
	C						
<i>P. echinulatum</i> CONTIG4	A						
	B	■			■		
	C						
<i>Cladosporium</i> sp. CONTIG5	A						
	B						
	C				■		
<i>C. ramotenellum</i> CONTIG7	A						
	B				■	■	
	C				■		
<i>C. halotolerans</i> CIGOM1	A						
	B						
	C						
<i>Biatrispora</i> sp. CIGOM2	A						
	B						
	C						
<i>S. vesicarium</i> CIGOM3	A						
	B						
	C				■	■	
<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	A						
	B		■		■	■	
	C				■	■	■
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM5	A						
	B						
	C						
<i>Biatrispora</i> sp. CIGOM7	A						
	B						
	C				■		
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM8	A						
	B						
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM9	A						
	B						
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM10	A						
	B						
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM11	A						
	B						
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM12	A						
	B						
	C				■		
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM13	A						
	B		■				
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM14	A						
	B		■		■		
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM15	A						
	B						
	C						
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM16	A						
	B						
	C				■		
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM17	A						
	B						




¹ Ampicilina; ² Gentamicina, ³ Nistatina.


Medio arroz A. TA, luz-oscuridad 12/12 h, 21 d; B. 20 °C, oscuridad, 30 d; y C. 4 °C, oscuridad, 60 d.


Anexo 2. Actividad de los compuestos 1-8 sobre patógenos ESKAPE.

Compuesto	MSSA	MRSA	VREF	VSRF	<i>K. aerogenes</i> ATCC 13048	<i>E. cloacae</i> ATCC 700324	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>A. baumannii</i> cepa 564	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978
Alternariol (1)									
Metil alternariol (2)									
Ciclopenina (3)									
Ciclopectina (4)									
Deshidrociclopectina (5)									
Viridicatina (6)									
Citocalasina D (7)									
Meleagrina A (8)									
Roquefortina C (9)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Andrastina A (10)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MIC control positivo (µg/mL)	572.41 ¹	0.86 ²	4.31 ²	2.59 ²	2.62 ³	2.09 ³	39.26 ³	>7328.31 ³	5.23 ³

Nivel de inhibición

 Inhibición total a 100 µg/mL y parcial a 10 µg/mL.

 Inhibición total a 100 µg/mL.

 Inhibición parcial a 100 µg/mL.

Sin inhibición.

ND no determinado. ¹ Ampicilina; ² Vancomicina; ³ Gentamicina.

Anexo 3. Actividad de los compuestos 1-8 sobre *Mycobacterium*.

Compuesto	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>		<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	<i>M. marinum</i> ATCC 927	<i>M. avium</i> ATCC 15769	<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	Células Vero ATCC CCL-81 ³
	MABA ¹	LORA ²			MABA ¹			
Alternariol (1)	87 (ND)	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metil alternariol (2)	68 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciclopenina (3)	29 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciclopectina (4)	20 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deshidrociclopectina (5)	30 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Viridicatina (6)	100 (43.8)	>50	>50 (0)	>50 (37)	>50 (10)	>50 (21)	>50 (48)	>50
Citocalasina D (7)	29 (ND)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Meleagrina A (8)	101 (48.0)	>50	>50 (0)	>50 (18)	>50 (81)	12.25	>50 (19)	>50
MIC Rifampicina (µg/mL)	100 (0.03)	0.08	>8.0	4.25	0.09	0.05	0.41	>8.0

¹ % Inhibición a 50 µg/mL (MIC µM); ² MIC µM; ³ CC₅₀, Concentración Citotóxica 50, concentración del compuesto que inhibió el 50 % del crecimiento de la línea celular [95]; ND no determinado.

Article

Chemical Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Fungi from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico

Rodrigo Villanueva-Silva ¹, Patricia Velez ², Meritxell Riquelme ³, Carlos A. Fajardo-Hernández ¹, Anahí Martínez-Cárdenas ¹, Alejandra Arista-Romero ¹, Baojie Wan ⁴, Rui Ma ⁴, Mallique Qader ⁴, Scott G. Franzblau ⁴ and Mario Figueroa ^{1,*}

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; code_rodvil@comunidad.unam.mx (R.V.-S.); cfajardo@quimica.unam.mx (C.A.F.-H.); amartinez@quimica.unam.mx (A.M.-C.); aleaar@comunidad.unam.mx (A.A.-R.)

² Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; pvelez@ib.unam.mx

³ Departamento de Microbiología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) Ensenada, Baja California 22860, Mexico; riquelme@cicese.mx

⁴ Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA; baojie@uic.edu (B.W.); rma20@uic.edu (R.M.); mallique@uic.edu (M.Q.); sgf@uic.edu (S.G.F.)

* Correspondence: mafiguer@unam.mx; Tel.: +52-55-5622-5290



Citation: Villanueva-Silva, R.; Velez, P.; Riquelme, M.; Fajardo-Hernández, C.A.; Martínez-Cárdenas, A.; Arista-Romero, A.; Wan, B.; Ma, R.; Qader, M.; Franzblau, S.G.; et al. Chemical Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Fungi from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Molecules* **2021**, *26*, 7328. <https://doi.org/10.3390/molecules26237328>

Academic Editors: Hendrik Luesch and Bryan T. Murphy

Received: 26 October 2021

Accepted: 28 November 2021

Published: 2 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A collection of 29 cultivable fungal strains isolated from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico were cultivated under the “one strain, many compounds” approach to explore their chemical diversity and antimicrobial potential. From the 87 extracts tested, over 50% showed antimicrobial activity, and the most active ones were those from cultures grown at 4 °C in darkness for 60 days (resembling deep-sea temperature). PCA analysis of the LC-MS data of all the extracts confirmed that culture temperature is the primary factor in the variation of the 4462 metabolite features, accounting for 21.3% of the variation. The bioactivity-guided and conventional chemical studies of selected fungal strains allowed the identification of several active and specialized metabolites. Finally, metabolomics analysis by GNPS molecular networking and manual dereplication revealed the biosynthetic potential of these species to produce interesting chemistry. This work uncovers the chemical and biological study of marine-derived fungal strains from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico.

Keywords: marine fungi; deep-sea sediments; chemical diversity; metabolomics; antimicrobial activity

1. Introduction

Microorganisms are the most abundant and diverse living organisms on the planet, contributing to around 60% of the total of Earth's biomass [1]. Marine microbial diversity plays an important role in the global cycling of nutrients, matter, and energy [2]. Although the number of marine microorganisms is still unknown, especially due to the complications of laboratory cultivation, new methodologies (multi-omics) have emerged to address this question and others related to the different types of organisms, their functional roles, global distribution, and adaptation to varying environmental conditions [2].

Microbes are true master chemists, capable of carrying out the most diverse and complex chemical reactions, and microbial natural products continue to be an important source of new drugs and structural prototypes for the development of new therapeutic agents [2,3].

Endemic fungi and other ubiquitous deep-sea species are adapted to constant darkness, high hydrostatic pressures, microaerophilic conditions, low temperatures (2–4 °C, except for vent systems), low pH, limited nutrients, and the combination of these parameters [4–6]. In addition, it is probable that these microorganisms produce structural molecules such as lipids, enzymes, and biopolymers with unique properties that allow them to thrive under

extreme conditions [6]. There are about 10,000 species of marine fungi belonging mainly to the *Ascomycota* and *Basidiomycota*, estimated in sediments, water columns, driftwood, sessile and mobile invertebrates, algae, and marine mammals [7]. This number is underestimated, as many locations and habitats remain unexplored.

The Gulf of Mexico (GoM) is a large reservoir of scantily studied marine microorganisms [8]. In the last decade, culture-dependent and -independent analyses have been carried out to explore the microbial diversity of the waters and sediments of the GoM. Moreover, the role of these microorganisms in the bioremediation of the ocean is of great importance, e.g., in water and sediments contaminated with mono and polycyclic aromatic hydrocarbons, intermediate chain alkanes, methane, and other gases released during accidental oil spills, mainly by synthesizing enzymes that transform these products into harmless and less persistent molecules [8–15]. Marine fungi have also shown the ability to produce secondary metabolites that allow them to survive against predators [5]. Finally, the potential ecological participation of these microorganisms as pathogens of animals with commercial importance has been revised [16].

Metagenomic analysis has shown that the GoM contains an unusual fungal diversity compared to marine sediments from other regions in the world. Interestingly, metabolically active fungi have not been studied as deeply as marine bacteria [8,9,17,18]. Recently, a series of cultivable fungi from sediments of two oil-drilling deep-sea oil reserves in the GoM were studied for their capacity to grow in media with hexadecane and 1-hexadecene as the only source of carbon [17]. These organisms showed different gene expression profiles. Key hydrocarbonoclastic taxa displayed up-regulated genes involved in transmembrane transport, metabolism of carbohydrates, and nitric oxide pathways. Based on these findings, the GoM represents an important source of fungi with potential for the discovery of active specialized metabolites [17,19].

With this study, we investigated the chemical diversity and antimicrobial potential of 29 cultivable fungi isolated from deep-sea sediments of the GoM. Their extracts obtained from cultures prepared under the “one strain, many compounds” (OSMAC) approach were screened against a set of clinically relevant pathogens. Two active and two inactive species were selected for bioactivity-guided and conventional chemical analysis, respectively. This resulted in the isolation of two benzochromenones, four benzodiazepines, one cytochalasin, and one benzylisoquinoline alkaloid. Additionally, metabolomic analysis by Global Natural Products Social (GNPS) molecular networking and manual dereplication, using the high-resolution mass spectrometry (HRMS-MS/MS) data of their extracts, resulted in the annotation of 15 secondary metabolites. Finally, some of the isolated compounds showed activity against ESKAPE pathogens and tuberculous and non-tuberculous *Mycobacteria*.

2. Results and Discussion

As a part of a program to explore the chemical diversity and antimicrobial potential of fungal species isolated from unexplored areas of Mexico, a series of 29 cultivable fungal strains from marine sediments of the GoM [17] were grown under laboratory conditions. These organisms belong to the genera *Penicillium*, *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Biatrispora*, and *Alternaria* (Figure 1 and Table 1). Fungi of the *Penicillium* genus were the most abundant in the samples: *P. echinulatum* CONTIG4 was obtained from the C14 (Coatzacoalcos) site at a depth of 3240 m, the deepest sampled station. *P. brevicompactum* CONTIG2 and *Penicillium* spp. CIGOM5, CIGOM8–CIGOM17, and CIGOM19–CIGOM27 were obtained from the D16 (Coatzacoalcos) site at a depth of 652 m. In addition, *Cladosporium* sp. CONTIG5, *C. halotolerans* CIGOM1, and *C. ramotenellum* CONTIG7 were obtained from the B7 (Perdido), C11 (Coatzacoalcos), and N1 (Perdido) stations at 1191, 860, and 606 m, respectively. Finally, *Biatrispora* spp. CIGOM2 and CIGOM7 were obtained from the D17 (Coatzacoalcos) station at 976 m, and *Alternaria* sp. CIGOM4 from N2 (Perdido) at 995 m. All strains were maintained in potato dextrose agar (PDA) medium at room temperature (RT, between 18–22 °C) until being used for small- and large-scale cultures.

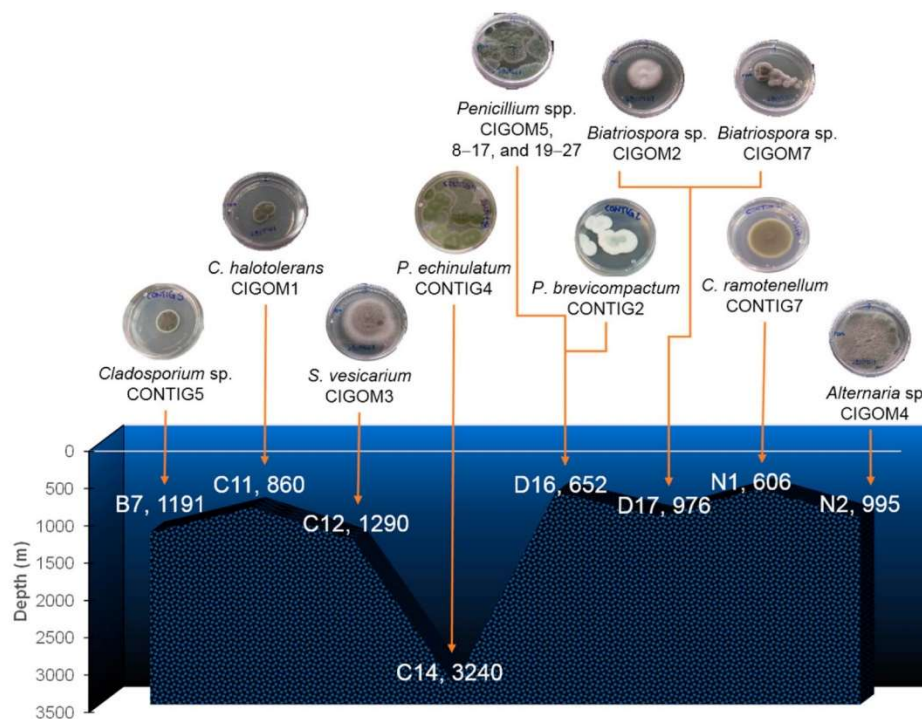


Figure 1. Marine fungi from deep-sea sediments of the GoM.

Table 1. Sampling stations and depths of sediments collection in the GoM.


Station	Depth (m)	Strain
B7 (Perdido)	1191	<i>Cladosporium</i> sp. CONTIG5
C11 (Coatzacoalcos)	860	<i>Cladosporium halotolerans</i> CIGOM1
C12 (Coatzacoalcos)	1290	<i>Stemphylium vesicarium</i> CIGOM3
C14 (Coatzacoalcos)	3240	<i>Penicillium echinulatum</i> CONTIG4
D16 (Coatzacoalcos)	652	<i>Penicillium</i> spp. CIGOM5, 8–17, and 19–27
D17 (Coatzacoalcos)	976	<i>P. brevicompactum</i> CONTIG2
N1 (Perdido)	606	<i>Biatrospora</i> sp. CIGOM2 y CIGOM7
N2 (Perdido)	995	<i>Cladosporium ramotenellum</i> CONTIG7
		<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4

2.1. Antimicrobial Screening of the Fungal Collection and Effects of Culture Conditions

In the “one strain, many compounds” (OSMAC) approach, the growth conditions of fungal strains (medium composition, pH, O₂, temperature, etc.) are modified to activate cryptic or silent biosynthetic pathways [20]. Different temperatures (RT, 20 °C, and 4 °C) and light/darkness ratios were used for the growth of the 29 strains in rice medium (for details, see Section 3). The defatted CHCl₃-MeOH (1:1) extracts of the small-scale cultures were tested against the bacteria *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhi* ATCC 9992V, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 methicillin-susceptible (MSSA), and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and the yeast *Candida albicans* ATCC 10231, at 200 µg/mL and 20 µg/mL. From the 87 extracts evaluated, 54 (62%) showed antimicrobial activity (Table 2 and Table S1). The most active ones (12 extracts) were from cultures grown at 20 °C in darkness for 30 d or 4 °C in darkness for 60 d. Extracts from *Alternaria* sp. CIGOM4, *C. ramotenellum* CONTIG7, and *P. echinulatum* CONTIG4 showed

the highest antimicrobial potential. *Alternaria* sp. CIGOM4, cultivated at 4 °C in darkness for 60 d, completely inhibited *B. subtilis* at 20 µg/mL, the lowest evaluated concentration, and MSSA at 200 µg/mL, while the extract obtained from the 20 °C darkness 30 d culture, was active against both bacteria at 200 µg/mL. Similarly, the extract of *P. echinulatum* CONTIG4 grown at 20 °C in darkness for 30 d showed antimicrobial activity against *E. coli*, *S. typhi*, and MSSA at 200 µg/mL. Finally, *C. ramotenellum* CONTIG7 showed antimicrobial activity on Gram-positive bacteria when grown at 20 °C in darkness for 30 d and at RT with light/darkness 12/12 h for 21 d (Table 2).

Table 2. Active antimicrobial extracts of marine fungi from the GoM.

Strain	Extract Condition	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>S. typhi</i> ATCC 9992v	MSSA	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
<i>P. echinulatum</i> CONTIG4	B	Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.		Total inhibition at 200 µg/mL.	Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.
<i>C. ramotenellum</i> CONTIG7	A				
	B	Partial inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.		Partial inhibition at 200 µg/mL.	Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.
<i>S. vesicarium</i> CIGOM3	C				
	B	No inhibition.		Total inhibition at 200 µg/mL.	Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.
<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	C				
<i>Biatriospora</i> sp. CIGOM7	C	No inhibition.		Total inhibition at 200 µg/mL.	No inhibition.
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM16	C				
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM17	C	No inhibition.		Total inhibition at 200 µg/mL.	No inhibition.
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM20	C				
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM21	C	No inhibition.		Total inhibition at 200 µg/mL.	No inhibition.
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM22	C				
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM24	A	No inhibition.		Total inhibition at 200 µg/mL.	Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.
	C				
<i>Penicillium</i> sp. CIGOM26	A	No inhibition.		Total inhibition at 200 µg/mL.	Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.
	C				
MIC ampicillin (µg/mL)		1.6	0.4	0.1	16.3
Inhibition level					
		Total inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.			
		Total inhibition at 200 µg/mL.			
		Partial inhibition at 200 µg/mL and 20 µg/mL.			
		Partial inhibition at 200 µg/mL.			
No inhibition.					

Rice medium at (A) RT with light/darkness 12/12 h for 21 d; (B) 20 °C in darkness for 30 d; and (C) 4 °C in darkness for 60 d.

Interestingly, fungal extracts of a single strain prepared under different growth conditions showed different antimicrobial activity. In marine environments, temperature and light decrease with depth. As observed in Table 2, the antimicrobial activity of the evaluated fungal extracts increased when growth parameters resembled the undersea conditions. To explore the relative impact of the culture conditions in metabolite production, the 87 extracts were subjected to ultra-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray ionization tandem high resolution mass spectrometry (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS) analysis followed by principal component analysis (PCA), using temperature as the determinant variable (Figure 2).

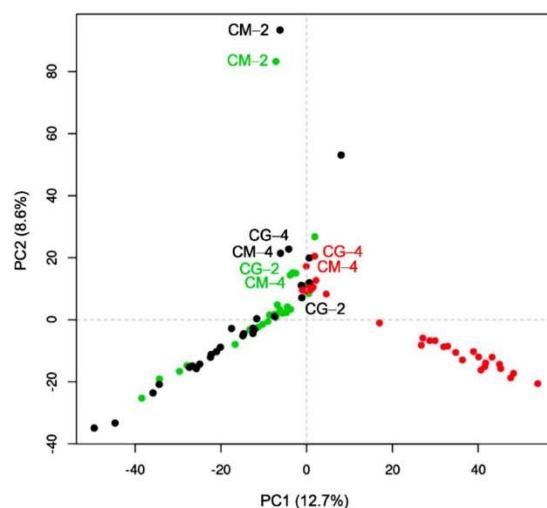


Figure 2. Effect of incubation temperature on the overall metabolites profile determined by PCA analysis of all GoM fungal samples (strains CIGOM (CM) and CONTIG (CG)); colors represent growth temperature: red, 4 °C; black, 20 °C; green, RT).

PCA was performed with 4462 metabolite features retained after blank removal (Table S2). Data showed statistically significant clustering depending on the culture temperature, which is a primary factor in the metabolite's profiles and accounts for 21.3% of the overall chemical variation (Figure 2). Cultures grown at 4 °C had very slow growth rates, and as expected, metabolites with distinctive features were grouped together (red points) and separated from those obtained from the same strains grown at 20 °C (black points) and RT (green points; Figure 2). For *Biatrispora* sp. CIGOM2 (CM–2) cultivated at 20 °C and RT, there is a grouping separated from the rest of the evaluated species, indicating notable differences in its chemical profile (Figure 2).

For the bioactivity-guided chemical study, scaled-up cultures of two of the most active fungi, *Alternaria* sp. CIGOM4 and *P. echinulatum* CONTIG4, were grown at 4 °C and 20 °C in darkness for 60 and 30 d, respectively. These strains were also cultivated in rice medium supplemented with a Czapek-Dox solution or artificial marine water to explore their metabolic profile under salty conditions. Salinity is a known abiotic factor that can trigger secondary metabolite production [5]. In addition, to further explore the chemical diversity of the fungal collection in addition to the biological potential, the species *Biatrispora* sp. CIGOM2 and *Penicillium* sp. CIGOM10 were subjected to chemical analysis. For all selected species, changes in their main secondary metabolites were established by UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS analysis, and their chemical diversity was explored using the Global Natural Products Social (GNPS) molecular networking platform and manual dereplication analysis [21].

2.2. Chemical Study of Selected Fungal Strains

The bioactivity-guided chemical analysis of the scaled-up extracts of *Alternaria* sp. CIGOM4 and *P. echinulatum* CONTIG4, and the conventional chemical study of *Biatrispora* sp. CIGOM2, and *Penicillium* sp. CIGOM10, yielded eight compounds (Figure 3). Briefly, the extracts were fractionated by flash chromatography using normal-phase columns and a mobile phase composed of *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, and CH₃OH mixtures. The antimicrobial activity of the fractions was assessed against the same panel of microorganisms (Table S3). Active and some non-active fractions were separated by reverse-phase HPLC (preparative and semipreparative level) on CH₃CN-0.1% aqueous formic acid gradient mobile phase

(for details, see Section 3). All compounds were characterized by comparison of their spectroscopic (NMR) and spectrometric (HRESIMS-MS/MS) data with those reported in literature (Table S4 and Figures S1–S11, see Supplementary Materials) [22–28].

Benzochromenone alternariol (1) and its methyl-derivative (2) were obtained from *Alternaria* sp. CIGOM4 antimicrobial fractions, F7 and F4, respectively. The benzodiazepines cyclopenin (3), cyclopeptin (4), and 9,10-dehydrocyclopeptin (5), and the hydroxyquinolone, viridicatin (6) were isolated from the antimicrobial fraction F5 and the inactive fraction F6 of *P. echinulatum* CONTIG4. Finally, the mycotoxin cytochalasin D (7) and the benzyloquinoline alkaloid, meleagrins A (8) were isolated from the inactive extracts of *Biatrispora* sp. CIGOM2 and *Penicillium* sp. CIGOM10, respectively (Figure 3; for details, see Section 3).

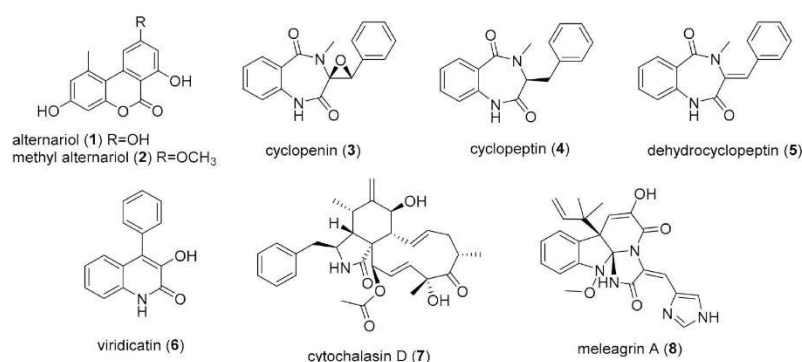


Figure 3. Compounds isolated from strains *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4, *Biatrispora* sp. CIGOM2, and *Penicillium* sp. CIGOM10.

2.3. Metabolomic Study of Selected GoM Fungal Strains

To explore the metabolic diversity of the selected fungi *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4, *Biatrispora* sp. CIGOM2, and *Penicillium* sp. CIGOM10, cultivated under different conditions, UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS data of their extracts were subjected to GNPS molecular networking and manual dereplication analysis. First, the molecular network of all four strains displayed 38 clusters containing at least three nodes grouped in four subclasses (Figure 4). From this, 26 non-matching clusters were observed, which probably correlates to the unique chemistry of these strains. Clusters 7 and 4 were annotated as heterocyclic and lipids/lipid-like molecules, respectively; one in the alkaloids and derivatives category; and one in the organic nitrogen compounds category (Figure 4). GNPS automatically annotated compounds (Table 3) were cyclopenin (3) and cyclopeptin (4), isolated from *P. echinulatum* CONTIG4; cytochalasin D (7), isolated from *Biatrispora* sp. CIGOM2; and andrastin A (15), a farnesyltransferase inhibitor isolated from several *Penicillium* species. Furthermore, methyl alternariol (2), meleagrins A (8), tenuazonic acid (10), altersetin (11), cyclophenol (12), viridicatol (13), and roquefortine C (14) were manually dereplicated and annotated by comparison of their UV-absorption maxima and HRMS-MS/MS data against isolated or previously reported compounds, at confidence levels 1 and 2 according to the metabolomics standards initiative and exact mass accuracy < 5 ppm [20,29,30].

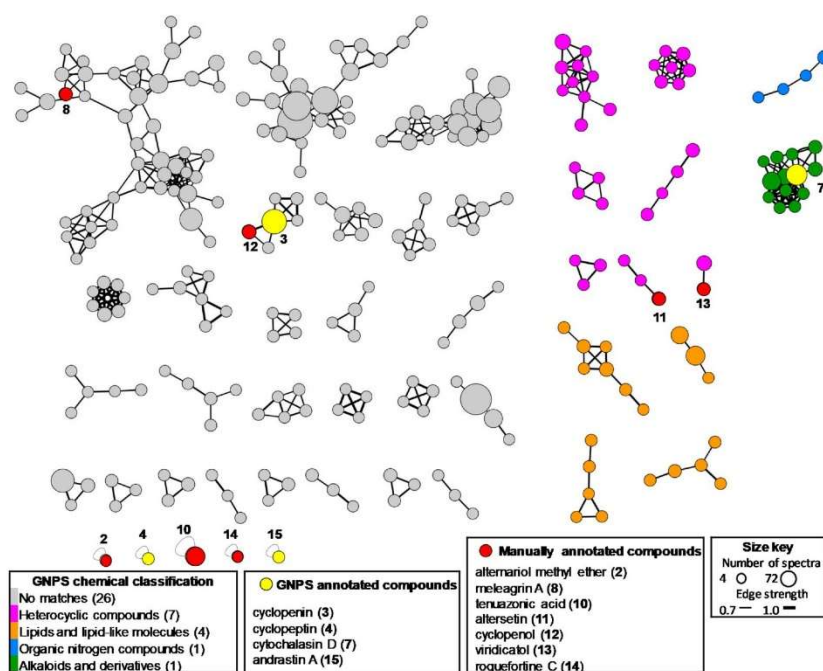


Figure 4. Feature-based GNPS analysis of the metabolites produced by *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4, *Biatrispora* sp. CIGOM2 and *Penicillium* sp. CIGOM10. Edge strength indicates the chemical similarity between MS/MS spectra. Compounds annotated manually and by GNPS are indicated in boxes with arrows pointing to the corresponding node (mass accuracy < 5 ppm).

Table 3. Chemical annotation by GNPS and by comparison with isolated compounds from selected GoM fungal strains in the molecular networking.

Compound	Adduct	Observed Ion ^a	Molecular Formula	Exact Mass ^d	Mass Accuracy (ppm)
Alternariol (1)	[M – H] [–]	257.045	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	257.0452	–1.3
Alternariol methyl ether (2)	[M + H] ⁺	273.076	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.0755	–0.9
Cycloperin (3)	[M + H] ⁺	295.108	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	295.1074	–1.10
Cyclopeptin (4)	[M + H] ⁺	281.128	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	281.1282	–0.9
Dehydrocyclopeptin (5)	[M + H] ⁺	279.113	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	279.1126	–0.7
Viridicatin (6)	[M + H] ⁺	238.086	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	238.0860	–1.1
Cytochalasin D (7)	[M + H] ⁺	508.270	C ₃₀ H ₃₇ NO ₆	508.2689	–0.7
Meleagrins A (8)	[M + H] ⁺	434.182	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₄	434.1820	–0.6
Altenuene (9) ^b	[M + H] ⁺	293.102	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	293.1017	–0.9
Tenuazonic acid (10) ^b	[M + H] ⁺	198.113	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	198.1123	–0.9
Altersetin (11) ^b	[M + H] ⁺	400.248	C ₂₄ H ₃₃ NO ₄	400.2479	–0.8
Cycloperin (12) ^b	[M + H] ⁺	311.102	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄	311.1023	–1.1
Viridicatol (13) ^b	[M + H] ⁺	254.081	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	254.0811	–0.3
Roquefortine C (14) ^b	[M – H] [–]	388.178	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	388.1781	+0.5
Andrastin A (15) ^c	[M + H] ⁺	487.269	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	487.2689	–3.0

^a Values taken from GNPS analysis; ^b manually annotated; ^c annotated by GNPS; ^d data obtained from pure compounds HRMS analysis.

Next, changes in the production of secondary metabolites for the selected fungal strains under the OSMAC cultivation-based approach [31], were assessed by comparison

with the UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS profiles and by GNPS molecular networking analysis of the extracts obtained from each growth condition.

In the case of *Alternaria* sp. CIGOM4, the main metabolites alternariol (1) and its methyl ether derivative (2) were observed in all growth conditions (Figure 5). The culture grown at 20 °C contained the highest concentration of these compounds at a 1:1 ratio. Interestingly, at RT, the fungus produced compound 2 almost exclusively, while at 4 °C, altersetin (11) and 1 were the main products. In addition, minor metabolites altenuene (9) and tenuazonic acid (10) were produced in rice medium, but they were not observed when the fungus was grown with artificial sea water or Czapek-Dox media (Figure 5).

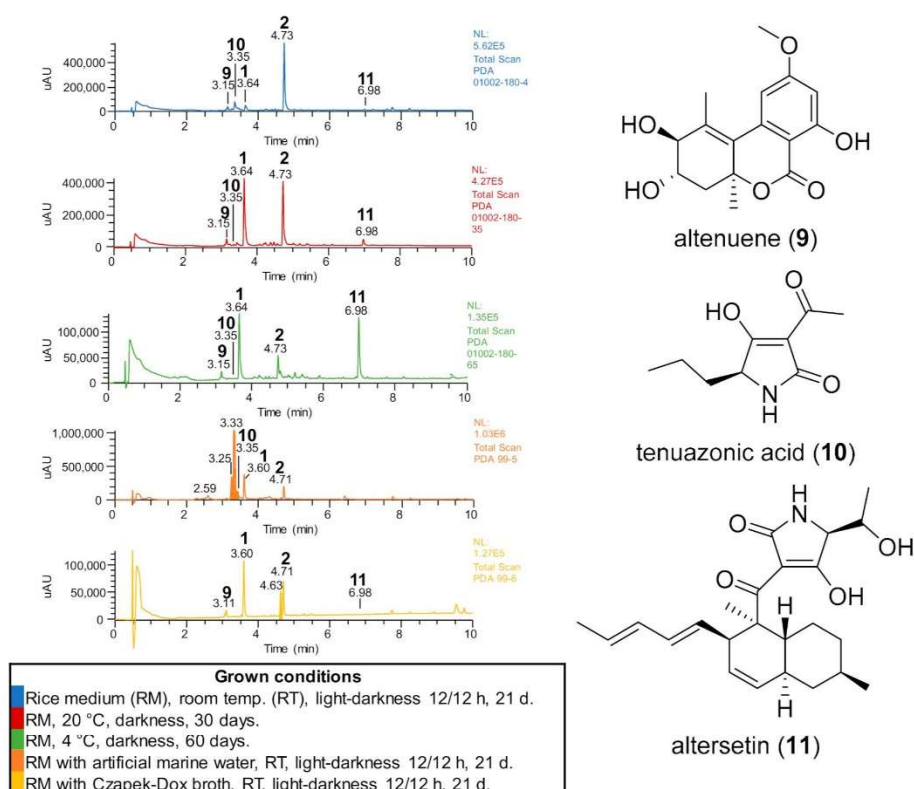


Figure 5. UPLC-PDA profiles comparison of *Alternaria* sp. CIGOM4 extracts obtained under different growth conditions (left). Compounds identified by manual dereplication (right).

The strain *P. echinulatum* CONTIG4 showed notable biosynthetic potential as it produced benzodiazepines 3–5 and the quinolone 6. In addition to these compounds, manual dereplication of the extracts allowed to identify cyclophenol (12) and viridicatol (13), phenolic derivatives of 3 and 6, respectively (Figure 6). Comparison of the UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS profiles of the extracts revealed that viridicatin (6) was produced at high levels in all conditions, and 9,10-dehydrocyclopeptin (5) was overproduced when the strain was grown at 4 °C or in salty conditions. Compound 5 was also produced in salty medium, while 3 decreases in these extracts to undetectable levels (Figure 6). GNPS analysis of these extracts grouped all these biological active alkaloids into three clusters, where nodes connected to each other correspond to structurally related compounds (Figure 6).

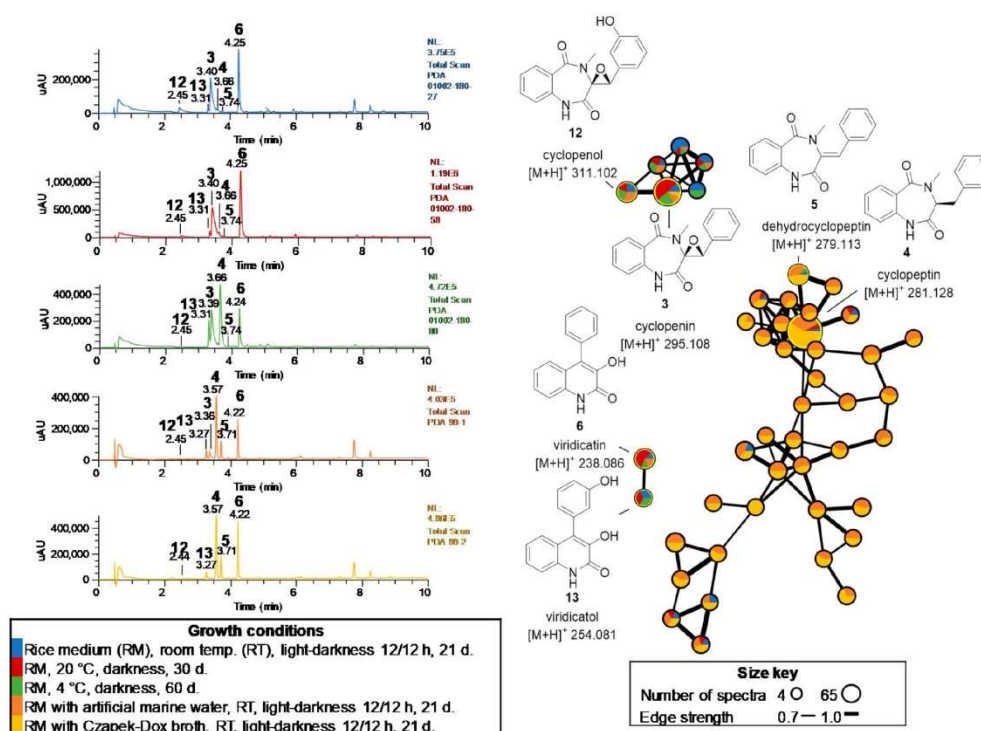


Figure 6. UPLC-PDA profiles comparison and GNPS molecular networking of *P. echinulatum* CONTIG4 extracts obtained under different growth conditions.

Finally, a comparison of the extracts of *Biatrispora* sp. CIGOM 2 and *Penicillium* sp. CIGOM10 obtained under different growth conditions is shown in Figure 7. The strain CIGOM2 yielded the mycotoxin cytochalasin D (7) as its main product; however, when the fungus was grown at 4 °C, this compound was barely produced (Figure 7a). Additionally, peaks observed in the RT and 20 °C extracts at a retention time (t_R) of 4.77 min (this peak disappeared fungus was grown at 20 °C) and 4.94 min had the same molecular ion as 7. In the Dictionary of Natural Products, there are nine isomeric cytochalasins derivatives with this weight: cytochalasin C, M and Q, 19,20-epoxy-18-deoxycytochalasin C, 19,20-epoxy-18-deoxycytochalasin Q, xylobovatin, chaetoconvosin B, and phomopsichalasin D, that could be correlate to compounds at t_R 4.77 min and 4.94 min. In addition, the GNPS cluster of the annotation of 7, showed all MS/MS fragments reported on the MassBank (record FIO00864; <https://massbank.eu/MassBank/>, accessed on 26 November 2021) for this product (Figure 7a). In the case of *Penicillium* sp. CIGOM10 (Figure 7b), meleagrins A (8) was the major metabolite in all conditions. By manual dereplication and GNPS annotation, andrastin A (15) was detected only in the RT extract, while roquefortine C (14), a meleagrins A (8) precursor, was detected when the strain was grown at lower temperatures (Figure 7b).

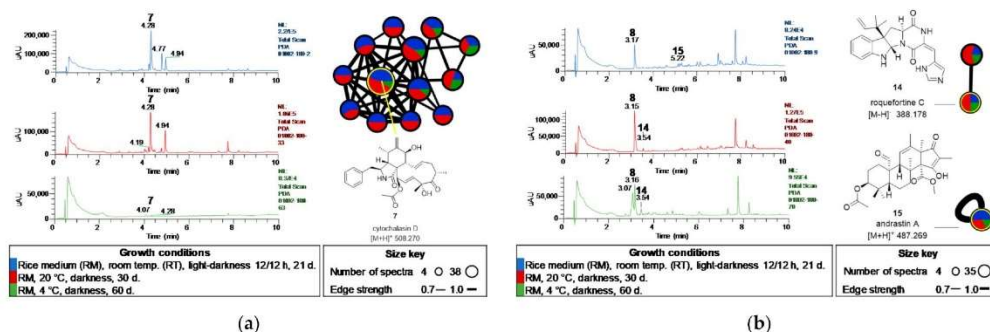


Figure 7. UPLC-PDA profiles comparison and GNPS molecular networkings of (a) *Biatrispora* sp. CIGOM 2 (b) and *Penicillium* sp. CIGOM10 extracts obtained under different growth conditions.

2.4. Biological Activity of 1–8

The *in vitro* antibacterial activity of isolated compounds 1–8 was assessed against a panel of ESKAPE pathogens using the microdilution assay (Table S5) [32], and tuberculous and non-tuberculous *Mycobacteria* using the microplate Alamar blue (MABA) and low oxygen recovery (LORA) assays (Table S6) [33,34]. Additionally, their cytotoxicity was established against Vero cell lines (Table S6) [35]. From this, only compounds 1, 6, and 8 showed biological activity (Table 4).

Table 4. *In vitro* activity of compounds 1, 6, and 8.

Compound	MSSA	MRSA	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. avium</i> ATCC 15769	Vero Cell ATCC CCL-81 ⁶
			MABA ⁴	LORA ⁵	MABA ⁴	
Alternariol (1)			87 (ND)	>50	ND	ND
Viridicatin (6)			100 (43.8)	>50	>50	>50
Meleagrins A (8)			101 (48.0)	>50	12.3	>50
MIC positive control (μM)	572.41 ¹	0.86 ²	100 (0.03) ³	0.08 ³	0.05 ³	>100 ³
Inhibition level						
Total inhibition at 100 μg/mL and partial at 10 μg/mL.						
Total inhibition at 100 μg/mL.						
Partial inhibition at 100 μg/mL.						
No inhibition.						

¹ Ampicillin; ² Vancomycin; ³ Rifampicin; ⁴ % Inhibition at 50 μg/mL (MIC μM); ⁵ MIC μM; ⁶ CC₅₀, cytotoxic concentration to 50% inhibition of the cell line. ND, not determined.

Alternariol (1) showed total inhibition of *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA) strain when tested at 387.3 μM, and it was 10 times more potent (38.7 μM) when tested against a methicillin-susceptible strain (Table 4). This compound also showed 87% growth inhibition of *M. tuberculosis* at 50 μg/mL. In previous reports, 1 showed important activity against a non-resistant *Bacillus subtilis* ATCC 6633 with minimum inhibition concentration (MIC) of 33.3 μM [36]. Thus, the activity observed in *Alternaria* sp. CIGOM4 extracts of cultures incubated at 4 °C and 20 °C (Table 2) is most likely due to the alternariol (1).

Viridicatin (6) did not show antimicrobial activity against *S. aureus* strains but inhibited the growth of *M. tuberculosis* with MIC of 43.8 μM (Table 2) [37,38]. This compound was inactive against Vero cell lines at the tested concentration (Table 4).

Finally, meleagrins A (8), isolated from CIGOM 10, showed partial inhibition against MSSA at the highest concentration tested (Table 4). In previous studies, this compound demonstrated antibiofilm activity vs. *S. aureus* ATCC 29213, with 87.1% of inhibition at 69.2 μM [39]. It also inhibited FabI, an isoform of enoyl-ACP reductase that participates

in the fatty acid biosynthesis in multidrug-resistant bacteria [40], and antimicrobial activity against different microorganisms in the paper-disk diffusion assay [39]. Lastly, this compound was weakly active against *Micrococcus luteus* DSMZ 1605 [39]. In our assays, meleagrins A (8) displayed anti-*M. tuberculosis* and *M. avium* activity with MIC of 48.0 and 12.3 μ M, respectively, and no cytotoxic activity against Vero cell line was observed (Table 4).

3. Materials and Methods

3.1. Strains, Cultures, and Extract Preparations

Twenty-nine fungal strains were isolated from deep-sea sediment samples collected from eight stations of the GoM during the Metagenomica-Malla Fina cruise (MET-I) and Metagenomics (MET-II) campaigns in 2016 and 2017, respectively, onboard the research vessel Justo Sierra of UNAM (Table 1) [17,18]. Each axenic culture in the PDA plates was transferred to (1% of yeast extract, 2% of soy peptone, 2% of dextrose) medium and incubated for 5 d at RT in a shaker at 120 rpm. All inoculums were transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks with rice medium (15 g/30 mL of deionized water) and maintained under three different conditions: (1) RT with light-darkness 12/12 h for 21 d; (2) 20 °C in darkness for 30 d; and (3) 4 °C in darkness for 60 d. After growth, each fungus was extracted with 60 mL of 1:1 CH₃OH-CHCl₃, shaken on an orbital shaker at 100 rpm, and filtered. Then, 60 mL of CHCl₃ and 120 mL of H₂O were added to the filtrates and mixed again. The organic layers were separated in a separatory funnel and dried under reduced pressure. The residues were dissolved in 60 mL of 1:1 CH₃CN-CH₃OH and defatted with the same volume of *n*-hexane. Defatted extracts were preserved at room temperature until use [41,42]. Scale-up cultures and extracts of selected strains were prepared using the same methodology as the small-scale cultures but in 150 g of rice (300 mL of deionized water in a 2.8 L Fernbach flask) and solvent volumes adjusted accordingly. Finally, selected active strains were also grown in rice with Czapek-Dox solution (100 g of rice with 200 mL of Czapek-Dox solution composed of sucrose, 30 g/L; NaNO₃, 2 g/L; K₂HPO₄, 1 g/L; MgSO₄, 0.5 g/L, KCl, 0.5 g/L; and FeSO₄, 0.01 g/L; pH 7.3 at 25 °C) or artificial marine water (32 g/L of Instant Ocean Sea Salt) instead of deionized water, in a 2.8 L Fernbach flask at RT with light-darkness 12/12 h for 21 d [42].

3.2. In Vitro Biological Testing

Defatted extracts, fractions, and pure compounds were tested for antibacterial activity using the broth dilution methods with MTT, following the standard and approved procedures published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for microbial testing [32]. DMSO (2.0%) was used to dissolve all samples. Target bacteria used in the assays (Table 4, Table S1, Table S3 and Table S5) were *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant ATCC 43300 (MRSA) and methicillin-susceptible ATCC 25923 (MSSA), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhi* ATCC 9992V, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* vancomycin-resistant ATCC 51299 (VREF) and vancomycin-susceptible ATCC 29212 (VSEF), *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC 700324, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, and *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistant (clinical isolated strain 564) and susceptible ATCC17978, and the yeast *Candida albicans* ATCC 10231. The bioassays were carried out in 96-well plates in triplicate at concentrations of 200 μ g/mL and 20 μ g/mL for extracts and fractions, and 100 μ g/mL and 10 μ g/mL of pure compounds. Pure compounds 1–8 were also tested against *M. tuberculosis* H37Rv strain under both aerobic (replicating) and anaerobic (nonreplicating) conditions using MABA and LORA (Table S6) [33]. Compounds 6 and 8, with activity above 90% of inhibition of the growth of *M. tuberculosis* in the MABA, were further tested against *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. marinum* ATCC 927, *M. avium* ATCC 15769, and *M. kansasii* ATCC 12478, using MABA [33,34] and the Vero cell lines ATCC CRL-81 using (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Table S6) [35]. For the latter assay, 0.6 mM of resazurin was used and the absorbance

was recorded at 530 nm (excitation) and 590 nm (emission). Positive controls for all assays are indicated in each table of results.

3.3. Chemical Study of Selected Fungal Strains

The extract (194.0 mg) of *Alternaria* sp. CIGOM4 was fractionated via flash chromatography on a RediSep RF Gold Si-gel column (4.0 g of Si-gel; Teledyne Inc., Thousand Oaks, CA, USA) using sequential mixtures of *n*-hexane-CHCl₃-AcOEt-MeOH. Nine fractions were obtained according to their UV and ELSD profiles. Alternariol (1; 35.5 mg) was obtained pure from fraction 7. Fraction 4 was subjected to preparative HPLC (Gemini C18 column 250 mm × 21.2 mm I.D., 5.0 μm, 100 Å; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) with a gradient system from 30:70 CH₃CN–0.1% aqueous formic acid to 100 of CH₃CN in 15 min at 21.24 mL/min, yielding 2.8 mg of alternariol 5-*O*-methyl ether (2; *t*_R = 11.8 min).

From *P. echinulatum* CONTIG4, extract (2.1 g) was fractionated via flash chromatography on a RediSep RF Gold Si-gel column (40 g of Si-gel) using sequential mixtures of *n*-hexane-CHCl₃-AcOEt-MeOH. Thirteen primary fractions were obtained according to their UV and ELSD profiles. Fractions 5 (174.8 mg), 6 (109.0 mg), and 7 (43.4 mg) were subjected to preparative HPLC (Gemini C18 column 250 mm × 21.2 mm I.D., 5.0 μm, 100 Å) with a gradient system from 30:70 CH₃CN–0.1% aqueous formic acid to 100 of CH₃CN in 15 min at 21.24 mL/min, yielding cycloenin (3; 5.5 mg, *t*_R = 9.197 min), cyclopeptin (4; 46.6 mg, *t*_R = 9.754 min), dehydrocyclopetin (5; 6.2 mg, *t*_R = 10.236 min), and viridicatin (6; 14.1 mg, *t*_R = 12.044 min).

The extract (38.4 g) of *Biatriospora* sp. CIGOM 2 was fractionated via flash chromatography on a RediSep RF Gold Si-gel column (4 g of Si-gel) using sequential mixtures of *n*-hexane-CHCl₃-AcOEt-MeOH. Five primary fractions were obtained according to their UV and ELSD profiles. Fraction four was subject to semipreparative HPLC (Gemini C18 column 250 mm × 10.0 mm I.D., 5.0 μm, 100 Å) with a gradient system from 15:85 CH₃CN–0.1% aqueous formic acid to 100 of CH₃CN in 15 min at 4.72 mL/min, yielding cytochalasin D (7; 1.7 mg, *t*_R = 13.95 min).

Finally, the extract (1.0 g) of *Penicillium* sp. CIGOM 10 was fractionated via flash chromatography on RediSep RF Gold Si-gel column (40 g of Si-gel) using sequential mixtures of *n*-hexane-CHCl₃-AcOEt-MeOH. Twelve fractions were obtained according to their UV and ELSD profiles. Fraction 10 (83.6 mg) was subject to preparative HPLC (Gemini C18 column 250 mm × 21.2 mm I.D., 5.0 μm, 100 Å) with a gradient system from 15:85 CH₃CN–0.1% aqueous formic acid to 100 of CH₃CN in 15 min at 21.24 mL/min, yielding meleagrins A (8; 14.4 mg, *t*_R = 6.30 min).

3.4. LC-MS/MS, Untargeted Metabolomic and Molecular Network Analysis

Extracts (1 mg/mL), fractions (1 mg/mL), and pure compounds (0.1 mg/mL) were analyzed on an Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to a Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mass spectrometer. LC analysis was performed on an Acquity BEH C18 column (Waters 50 mm × 2.1 mm I.D., 1.7 μm, 130 Å) at 40 °C, with a gradient system from 15:85 CH₃CN–0.1% aqueous formic acid to 100% of CH₃CN in 8 min, then held for 1.5 min with CH₃CN and returned to the starting conditions, flow rate of 0.3 mL/min, and injection volume of 3.0 μL. HRMS-MS/MS data were obtained using an ESI source (positive and negative modes) at a full scan range (*m/z* 150–2000), with the following settings: capillary voltage, 5 V; capillary temperature, 300 °C; tube lens offset, 35 V; spray voltage, 3.80 kV; sheath and auxiliary gas flow, 30 arbitrary units. [30]. Then, MS raw data of all samples were converted to mzXML format using MS Converter of ProteoWizard tool. PCA analysis was performed from the MS data (molecular features after blank removal) using R software (version 4.0.5) with the package FactoMineR [43]. Metabolomic analysis by GNPS molecular networking of all extracts and for the selected fungal strains was assessed using the standard protocol [21] with the following parameters: precursor ion mass tolerance, 0.01 Da; fragment ion mass tolerance, 0.02 Da; minimum cosine score and score threshold, 0.7; minimum matched fragment ions,

cluster size, and library search minimum matched peaks, 4.0; and maximum connected component size and maximum analog search mass difference, 100. MolNetEnhancer tool was applied for chemical classification [44]. Molecular networks were visualized with Cytoscape 3.8.1 [45]. Finally, manual dereplication was assessed using UV-absorption maxima and HRMS-MS/MS data against MS/MS data of 1–8 and by comparison with those reported in the Dictionary of Natural products [46], SciFinder [47], and an *in-house* mycotoxins database. The annotation of isolated compounds 1–8 and annotated 9–15 was at confidence level 1 and 2, respectively, according to the metabolomics standards initiative [29] and exact mass accuracy <5 ppm.

3.5. Data Availability

LC-MS/MS data can be accessed at MassIVE (accession no. MSV000088218; accessed on 26 November 2021). The molecular network of selected fungi can be accessed at <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1e7a7e47a5c54413a52ef96708565aaf> (MolNetEnhancer analysis; accessed on 26 November 2021), molecular network of CONTIG4 at <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=3b276ea9c0354dd4975472b560e2a6f7> (accessed on 26 November 2021), molecular network of CIGOM2 at <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=fd2034712bbd4bb3b72c3ede4e725ef> (accessed on 26 November 2021), molecular network of CIGOM10 at <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a9a38aed67dc4e69a8caf34d5e1cb2fb> (accessed on 26 November 2021).

4. Conclusions

This work advances our chemical and biological knowledge of a series cultivable fungal strains isolated from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico, an important and poorly studied ecosystem with significant environmental damage as a result of anthropogenic activities. Under the OSMAC approach, the chemical and antimicrobial potential of these strains was exposed. Interestingly, over 50% of the extracts tested showed antimicrobial activity. The most active were the ones grown under conditions that resemble the deep-sea environment. PCA analysis confirmed that culture temperature is the main factor of chemical variation. The chemical study of selected fungal strains, together with GNPS molecular networking and untargeted metabolomics, allowed the biosynthetic potential of these species to produce interesting chemistry to be discovered. Although several strains did not show biological activity, their potential to produce new chemistry remains to be investigated.

Supplementary Materials: The following are available online, Table S1. Antimicrobial activity of small-scale extracts of marine fungi from the GoM; Table S2. LC-MS data of the 87 fungal extracts used for PCA analysis (features after blank removal); Table S3. Antimicrobial activity of primary fractions of *Alternaria* sp. CIGOM4 and *P. echinulatum* CONTIG4 scaled-up extracts; Table S4. Spectroscopic and spectrometric data of isolated compounds; Table S5. Anti-ESKAPE activity of compounds 1–8; Table S6. Anti-*Mycobacteria* and cytotoxic activities of compounds 1–8; Figure S1. ¹H NMR spectrum of alternariol (1) in methanol-*d*₄ (400 MHz); Figure S2. ¹H NMR spectrum of methyl alternariol (2) in DMSO-*d*₆ (400 MHz); Figure S3. ¹H NMR spectrum of cyclopenin (3) in DMSO-*d*₆ (400 MHz); Figure S4. ¹³C NMR spectrum of cyclopenin (3) in DMSO-*d*₆ (100 MHz); Figure S5. ¹H NMR spectrum of cyclopeptin (4) in CDCl₃ (400 MHz); Figure S6. ¹H NMR spectrum of dehydrocyclopeptin (5) in CDCl₃ (400 MHz); Figure S7. ¹³C NMR spectrum of dehydrocyclopeptin (5) in CDCl₃ (100 MHz); Figure S8. ¹H NMR spectrum of viridicatin (6) in methanol-*d*₄ (400 MHz); Figure S9. ¹³C NMR spectrum of viridicatin (6) in methanol-*d*₄ (100 MHz); Figure S10. ¹H NMR spectrum of cytochalasin D (7) in CDCl₃ (400 MHz); Figure S11. ¹H NMR spectrum of meleagrins A (8) in CDCl₃ (400 MHz).

Author Contributions: Conceptualization, R.V.-S. and M.F.; methodology, R.V.-S., P.V., M.R., C.A.F.-H., A.M.-C., A.A.-R., B.W., R.M., M.Q., S.G.F. and M.F.; formal analysis, R.V.-S., P.V. and M.F.; writing original draft preparation, review, and editing, R.V.-S., P.V. and M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from UNAM-DGAPA-PAPIIT IN222220 (M.F.) and IN200921 (P.V.), FQ-PAIP 5000-9145 (M.F.), and by the Fondo Sectorial CONACYT-Secretaría de Energía-Hidrocarburos (201441).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary material.

Acknowledgments: R.V.-S. acknowledges a fellowship from CONACYT (576665) to pursue graduate studies. A.M.-C. acknowledges the postdoctoral fellowship from DGAPA, UNAM. We thank Isabel Rivero-Cruz and the Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) from Facultad de Química, UNAM, and to Laura Flores-Bocanegra from the University of North Carolina at Greensboro (UNCG), Greensboro, NC, USA, for their technical support, recording the NMR spectra, and assistance in running UPLC-HRMS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Sample Availability: Samples of the compounds 1–8 are available from the corresponding author.

References

1. Dash, H.R.; Das, S. Chapter 4. Molecular methods for studying microorganisms from atypical environments. In *Methods in Microbiology*; Gurtler, V., Trevors, J.T., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; Volume 45, pp. 89–122.
2. Salazar, G.; Sunagawa, S. Marine microbial diversity. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, R489–R494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gladfelter, A.S.; James, T.Y.; Amend, A.S. Marine fungi. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, R191–R195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rédou, V.; Vallet, M.; Meslet-Cladière, L.; Kumar, A.; Pang, K.-L.; Pouchus, Y.-F.; Barbier, G.; Grovel, O.; Bertrand, S.; Prado, S.; et al. Marine Fungi. In *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*; Stal, L.J., Cretoiu, M.S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 99–153.
6. Poli, A.; Finore, I.; Romano, I.; Gioiello, A.; Lama, L.; Nicolaus, B. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. *Microorganisms* **2017**, *5*, 25. [[CrossRef](#)]
7. Amend, A.; Burgaud, G.; Cunliffe, M.; Edgcomb, V.P.; Ettinger, C.L.; Gutiérrez, M.H.; Heitman, J.; Hom, E.F.Y.; Ianiri, G.; Jones, A.C.; et al. Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *mBio* **2019**, *10*, e01189–18. [[CrossRef](#)]
8. Vargas-Gastélum, L.; Chong-Robles, J.; Lago-Lestón, A.; Darcy, J.L.; Amend, A.S.; Riquelme, M. Targeted ITS1 sequencing unravels the mycoidiversity of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 4046–4061. [[CrossRef](#)]
9. Kimes, N.; Callaghan, A.; Aktas, D.; Smith, W.; Sunner, J.; Golding, B.; Drozdowska, M.; Hazen, T.; Sufliata, J.; Morris, P. Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the deepwater horizon oil spill. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 50. [[CrossRef](#)]
10. King, G.M.; Kostka, J.E.; Hazen, T.C.; Sobecky, P.A. Microbial responses to the Deepwater Horizon oil spill: From coastal wetlands to the deep sea. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **2015**, *7*, 377–401. [[CrossRef](#)]
11. Dombrowski, N.; Donaho, J.A.; Gutierrez, T.; Seitz, K.W.; Teske, A.P.; Baker, B.J. Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16057. [[CrossRef](#)]
12. Bacosa, H.P.; Erdner, D.L.; Rosenheim, B.E.; Shetty, P.; Seitz, K.W.; Baker, B.J.; Liu, Z. Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. *ISME J.* **2018**, *12*, 2532–2543. [[CrossRef](#)]
13. Noirungsee, N.; Hackbusch, S.; Viamonte, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Müller, R. Influence of oil, dispersant, and pressure on microbial communities from the Gulf of Mexico. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7079. [[CrossRef](#)]
14. Ramírez, D.; Vega-Alvarado, L.; Taboada, B.; Estradas-Romero, A.; Soto, L.; Juárez, K. Bacterial diversity in surface sediments from the continental shelf and slope of the North West Gulf of Mexico and the presence of hydrocarbon degrading bacteria. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *150*, 110590. [[CrossRef](#)]
15. Cerqueda-García, D.; García-Maldonado, J.Q.; Aguirre-Macedo, L.; García-Cruz, U. A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *150*, 110775. [[CrossRef](#)]
16. Escobedo-Hinojosa, W.; Pardo-López, L. Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*, ftx058. [[CrossRef](#)]
17. Velez, P.; Gasca-Pineda, J.; Riquelme, M. Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* **2020**, *153*, 104816. [[CrossRef](#)]

18. Romero-Hernández, L.; Velez, P.; Betanzo-Gutiérrez, I.; Camacho-López, M.D.; Vázquez-Duhalt, R.; Riquelme, M. Extra-heavy crude oil degradation by *Alternaria* sp. isolated from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6090. [[CrossRef](#)]
19. Godoy-Lozano, E.E.; Escobar-Zepeda, A.; Raggi, L.; Merino, E.; Gutierrez-Rios, R.M.; Juarez, K.; Segovia, L.; Licea-Navarro, A.F.; Gracia, A.; Sanchez-Flores, A.; et al. Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2528. [[CrossRef](#)]
20. Bode, H.B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* **2002**, *3*, 619–627. [[CrossRef](#)]
21. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapon, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [[CrossRef](#)]
22. Aly, A.H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I.D.; Wray, V.; Müller, W.E.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schächtele, C.; Kubbutat, M.H.; Lin, W. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972–980. [[CrossRef](#)]
23. Tan, N.; Tao, Y.; Pan, J.; Wang, S.; Xu, F.; She, Z.; Lin, Y.; Gareth Jones, E.B. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 296–300. [[CrossRef](#)]
24. Kusano, M.; Koshino, H.; Uzawa, J.; Fujioka, S.; Kawano, T.; Kimura, Y. Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2559–2568. [[CrossRef](#)]
25. Abdel-Hadi, A.; Awad, M.; Abo-Dahab, N.; El-Shanawany, A.; Abdelkader, M.; Abo-Kadoum, M.V. Viridicatin and dehydrocyclopeptide, two bioactive alkaloids isolated from marine derived fungus *Penicillium aurantiogriseum* AUMC 9759. *IBSPR* **2015**, *3*, 115–122. [[CrossRef](#)]
26. Kishimoto, S.; Hara, K.; Hashimoto, H.; Hirayama, Y.; Champagne, P.A.; Houk, K.N.; Tang, Y.; Watanabe, K. Enzymatic one-step ring contraction for quinolone biosynthesis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2826. [[CrossRef](#)]
27. Jikai, L.; Jianwen, T.; Zejun, D.; Zhihui, D.; Xianghua, W.; Peigui, L. Neoengleromycin, a novel compound from *Engleromyces goetzii*. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1439–1442. [[CrossRef](#)]
28. Kawai, K.; Nozawa, K.; Nakajima, S.; Iitaka, Y. Studies on fungal products. VII. The structures of meleagrins and 9-O-bromobenzoylmeleagrins. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 94–98. [[CrossRef](#)]
29. Sumner, L.W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M.H.; Beger, R.; Daykin, C.A.; Fan, T.W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J.L.; et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3*, 211–221. [[CrossRef](#)]
30. El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B.M.; Cech, N.B.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1709–1716. [[CrossRef](#)]
31. Romano, S.; Jackson, S.A.; Patry, S.; Dobson, A.D.W. Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 244. [[CrossRef](#)]
32. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsnouda, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71–79. [[CrossRef](#)]
33. Cho, S.; Lee, H.S.; Franzblau, S. Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for *Mycobacterium tuberculosis*. In *Mycobacteria Protocols*; Parish, T., Roberts, D.M., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2015; pp. 281–292.
34. Gao, W.; Kim, J.-Y.; Anderson, J.R.; Akopian, T.; Hong, S.; Jin, Y.-Y.; Kandror, O.; Kim, J.-W.; Lee, I.-A.; Lee, S.-Y.; et al. The cyclic peptide ecumicin targeting ClpC1 is active against *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 880–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhou, B.; Shetye, G.; Yu, Y.; Santarsiero, B.D.; Klein, L.L.; Abad-Zapatero, C.; Wolf, N.M.; Cheng, J.; Jin, Y.; Lee, H.; et al. Antimycobacterial rufomycin analogues from *Streptomyces atratus* strain MJM3502. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 657–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, Y.; Yang, M.-H.; Wang, X.-B.; Li, T.-X.; Kong, L.-Y. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Fitoterapia* **2014**, *99*, 153–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, C.-C.; Ding, S.-S.; Shi, W.-S.; Cao, F.; Zhu, H.-J.; Wen, M.-L. A new quinolinone from freshwater lake-derived fungus *Myrothecium verrucaria*. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 99–103. [[CrossRef](#)]
38. Cunningham, K.G.; Freeman, G.G. The isolation and some chemical properties of viridicatin, a metabolic product of *Penicillium viridicatum* Westling. *Biochem. J.* **1953**, *53*, 328–332. [[CrossRef](#)]
39. Hamed, A.; Abdel-Razek, A.S.; Araby, M.; Abu-Elghait, M.; El-Hosari, D.G.; Frese, M.; Soliman, H.S.; Stammer, H.G.; Sewald, N.; Shaaban, M. Meleagrins from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: Crystal structure and diverse biological activity studies. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 3830–3838. [[CrossRef](#)]
40. Zheng, C.J.; Sohn, M.-J.; Lee, S.; Kim, W.-G. Meleagrins, a new FabI inhibitor from *Penicillium chrysogenum* with at least one additional mode of action. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78922. [[CrossRef](#)]

41. Aparicio-Cuevas, M.A.; Rivero-Cruz, I.; Sánchez-Castellanos, M.; Menéndez, D.; Raja, H.A.; Joseph-Nathan, P.; González, M.d.C.; Figueroa, M. Dioxomorpholines and derivatives from a marine-facultative *Aspergillus* species. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2311–2318. [[CrossRef](#)]
42. VanderMolen, K.M.; Raja, H.A.; El-Elmat, T.; Oberlies, N.H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express* **2013**, *3*, 71. [[CrossRef](#)]
43. Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* **2015**, *25*, 1–18. [[CrossRef](#)]
44. Ernst, M.; Kang, K.B.; Caraballo-Rodríguez, A.M.; Nothias, L.-F.; Wandy, J.; Chen, C.; Wang, M.; Rogers, S.; Medema, M.H.; Dorrestein, P.C.; et al. MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites* **2019**, *9*, 144. [[CrossRef](#)]
45. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [[CrossRef](#)]
46. Dictionary of Natural Products 30.1. Available online: <https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml> (accessed on 26 November 2021).
47. SciFinder—CAS. Available online: <https://scifinder.cas.org> (accessed on 26 November 2021).

Anexo 5. Resumen y cartel presentado en el congreso virtual Vanguard of Natural Product Research 2021, ASP.

P-089 – Pharmacological Potential and Chemical Diversity of Marine Sediment Fungi of the Gulf of Mexico

Rodrigo Villanueva-Silva¹, Patricia Velez², and Mario Figueroa¹. ¹Facultad de Química and ²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México.

As part of our investigations on the chemical diversity of organisms from unexplored marine habitats of Mexico, a series of 29 fungal strains isolated from deep-sea sediments (<600 m deep) from the Gulf of Mexico were investigated. The antimicrobial potential of their organic extracts from solid cultures grown under the OSMAC approach was assessed against a panel of ESKAPE bacteria and the yeast *C. albicans*. Chemical studies on the active scaled-up cultures and some small-scale cultures led to the isolation of benzochromenones from *Alternaria* sp. CIGOM4, benzodiazepines from *P. echinulatum* CONTIG4, a cytochalasin from *Biatriospora* sp. CIGOM2, and an imidazopyridoinole from *Penicillium* sp. CIGOM10. Molecular network analysis by GNPS combined with manual dereplication showed the enormous potential of these fungi to produce bioactive compounds.



Pharmacological Potential and Chemical Diversity of Marine Sediment Fungi of the Gulf of Mexico

Rodrigo Villanueva-Silva¹, Patricia Velez², and Mario Figueroa¹.

¹Facultad de Química and ²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México.

As part of our investigations on the metabolic diversity of organisms from unexplored marine habitats of Mexico, a series of 29 fungal strains isolated from deep-sea sediments (<600 m deep) from the Gulf of Mexico were investigated. The antimicrobial potential of their organic extracts from solid cultures grown under the OSMAC approach was assessed against a panel of ESKAPE bacteria and the yeast *C. albicans*. Chemical studies on the active scaled-up cultures and some small-scale cultures led to the isolation of compounds 1-8. Molecular network analysis by GNPS combined with manual dereplication showed the enormous potential of these fungi to produce bioactive compounds.

Extract	Condition	Microorganism				Inhibition scale
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>P. echinulatum</i> CONTIG4	2	200	200	200	200	No inhibition.
	2	200	200	200	200	Partial inhibition at maximum concentration.
<i>Alternaria</i> sp. CIGOM4	3	200	200	200 & 20	200	Partial inhibition at both concentrations.
	3	200	200	200 & 20	200	Total inhibition at maximum concentration and partial at minimum.
Ampicillin MIC (µg/mL)		1.56	0.39	0.05	16.3	Total inhibition at both concentrations.

Figure 1. UPLC-PDA chromatograms of small-scale extracts of *Alternaria* sp. CIGOM4 (left) and scale-up extracts of *P. echinulatum* CONTIG4 (right).

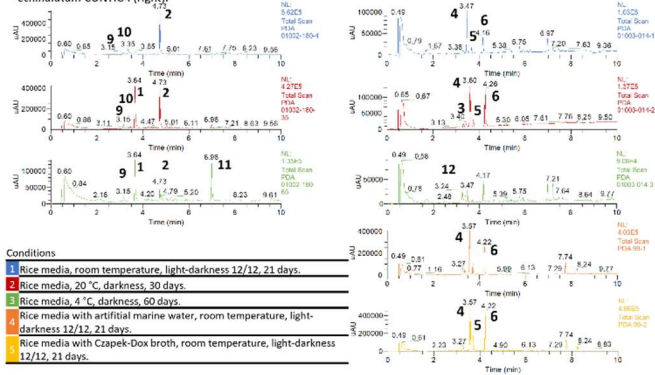


Figure 2. Isolated and annotated metabolites in the molecular network of *Alternaria* sp. CIGOM4, *P. echinulatum* CONTIG4, *Biatriospora* sp. CIGOM2 and *Penicillium* sp. CIGOM10

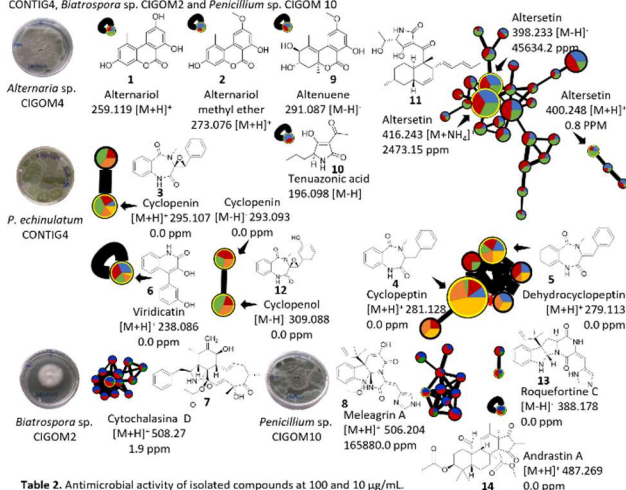


Table 2. Antimicrobial activity of isolated compounds at 100 and 10 µg/mL.

Compound	Microorganism		
	<i>S. aureus</i> 6538	<i>S. aureus</i> 25923	<i>S. aureus</i> MRSA
1 Alternariol	100	100 and 10	100
8 Meleagrina A	100	100	100
Antibiotic MIC (µg/mL)	100.0*	100.0*	1.25**

*Ampicillin, ** Vancomycin