



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio químico-biológico de ligantes de *AbFtsz* con actividad antibacteriana.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

FERNANDA HERNÁNDEZ SEDANO



Ciudad México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Rachel Mata Essayag
VOCAL: Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez
SECRETARIO: Dr. José Alberto Rivera Chávez
1° SUPLENTE: Dra. Araceli Pérez Vásquez
2° SUPLENTE: Dr. César Luis Cuevas Velázquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA, LABORATORIOS 2-5 y 2-6,
DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES.

ASESOR DEL TEMA:



DR. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. KAROL CARRILLO JAIMES

SUTENTANTE:

FERNANDA HERNÁNDEZ SEDANO

There's always gonna be another mountain, I'm always gonna wanna make it move. Always gonna be an uphill battle, sometimes I'm gonna have to lose. Ain't about how fast I get there, ain't about what's waiting on the other side, it's the climb.

-Miley Cyrus

It was the end of a decade, but the start of an age. [...] Of all the years that we stood there on the sidelines, wishing for now. [...] Long live that look on your face and bring on all the pretenders, I'm not afraid. [...] Long live the walls we crashed through, I had the time of my life, with you.

-Taylor Swift

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Rivera Chávez por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su apoyo.

Al Dr. Carlos Hernández Fajardo por la asesoría en RMN de las moléculas aisladas, por sus consejos y observaciones que ayudaron a enriquecer esta tesis.

A la Dra. Patricia Cano y a los integrantes del laboratorio de biología molecular (BM-IQ) por el apoyo brindado para la expresión y purificación de la proteína *AbFtsZ*.

Al Dr. Federico del Río Portilla, al Dr. Armando García Hernández y a sus respectivos grupos de investigación por el apoyo brindado para la realización del ensayo de actividad GTPasa de la proteína *FtsZ*.

A la Dra. Diana Corina Ceapă y a su grupo de investigación por el apoyo brindado para el resguardo de las cepas bacterianas utilizadas por el grupo de investigación.

A la Dra. Beatriz Quiroz García, a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y la Q. María de los Ángeles Peña González, por el registro de los análisis espectroscópicos utilizados en este trabajo.

Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza, al M. en C. Enrique Aguilar Ramírez y a la Dra. María del Carmen García González por la colección de datos espectrométricos.

A la Lic. Maricruz López y a todo el personal de tratamiento de residuos del Instituto de Química.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) que a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422) financió algunas de las actividades experimentales de investigación presentadas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, a través del proyecto: CF-2019-263977.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá y mi papá por su apoyo, amor y confianza, por darme todo lo necesario para lograr lo que quiero. No habría podido sin ustedes, los amo.

A Ricardo, por sus preguntas, por sus datos interesantes, por motivarme a su manera, por las risas, el cariño y hasta por las peleas. Te amo mucho hermano.

A Luis Tadeo, por sus preguntas, por las risas, los juegos, los cuentos, por aprenderse lo que le enseñé, por motivarme y por el cariño. Te amo hermanito.

A Drago, por todo. Gracias por llegar, hacías mucha falta en mi vida.

Al Dr. Carlos Álvarez Jiménez por compartir su conocimiento conmigo, por el apoyo brindado a mí y mi familia desde hace tantos años, sin su apoyo y formación no habría sido la misma.

A Mariana Sandoval Gil, por ser la mejor amiga que he podido tener, por todo lo que hemos vivido juntas, por seguir aquí después de tantos años. Te amo, pollo. A María Félix Gil, por brindarme su cariño y confianza.

A Fernando Marín Cerón, por ser mi amigo, por escucharme, por aconsejarme y por nunca dejarme sola. Te amo Fers.

A LMDA: Aída, América, Daniela, Fátima, Jackie y Sara, por ser mi lugar seguro, por inspirarme, escucharme y motivarme. Por todo. Las amo.

A Alison Rodríguez Aldama, por ser mi lugar seguro, por siempre creer en mí, por apoyarme, motivarme y seguir siendo mi amiga a pesar de la distancia. Te amo amiga.

A Laura González Fidencio, por todas las aventuras que pasamos juntas, por todo el apoyo durante la carrera, por todas las risas y experiencias, te quiero mucho Lau.

A Hugo Isaac San Juan Martínez, por acompañarme, motivarme, escucharme y apoyarme. Te amo.

A la M. en C. Karol Carrillo Jaimes, por todo su apoyo, por su guía y consejos en todos los aspectos. Por enseñarme nuevas virtudes y formas de ver la vida, por todo el trabajo que aportó a esta tesis y al grupo de investigación, por su paciencia y acompañamiento. Te quiero mucho.

A Mariana, Les y Angie, por todo su apoyo en mi estancia en el laboratorio, por sus consejos, por las risas, las pláticas y por su amistad. Los quiero mucho.

A los M. en C. Sahid Aguilar e Ixchel Loa por sus enseñanzas y sus consejos. Los quiero.

A mis compañeros del Laboratorio 2-5, por hacer mi estancia en el laboratorio muy agradable.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Resistencia antimicrobiana (RAM).....	2
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> en México	3
2.3 Proteína FtsZ como blanco molecular	5
2.5 Ejemplos selectos de antibacterianos aislados de los géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Talaromyces</i>	13
2.6 Manglares Mexicanos como sitio de bioprospección	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	20
6.1 Reativos.....	20
6.2 Extracción de metabolitos fúngicos.....	20
6.2.1 Cultivos en gran escala de microorganismos fúngicos	20
6.2.2 Obtención de los extractos fúngicos	21
6.2.3 Fraccionamiento primario de extractos orgánicos.....	21
6.2.4 Condiciones cromatográficas y aislamiento de los metabolitos	23
6.3 Caracterización química	25
6.4 Ensayo de actividad antibacteriana	26

6.5 Ensayo de actividad de la proteína <i>AbFtsZ</i>	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos de <i>Aspergillus</i> sp. IQ-503 y <i>Talaromyces</i> sp. IQ-567.....	29
7.1.1 Fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos de <i>Aspergillus</i> sp. IQ-503 y <i>Talaromyces</i> sp. IQ-567.....	29
7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados	30
7.3 Elucidación estructural.....	32
7.3.1 Elucidación estructural del pirofeno (3).....	32
7.3.1 Elucidación estructural de la penicilida (10).....	36
8. CONCLUSIONES	44
9. REFERENCIAS	45
10. ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resistencia antibacteriana. A. Mecanismos de adquisición de genes de resistencia. B. Mecanismos de resistencia bacterianos. C. Mecanismos de acción de los antibióticos de uso actual	3
Figura 2. Modelo de la proteína FtsZ de <i>Acinetobacter baumannii</i> obtenido por homología en el grupo de investigación	6
Figura 3. División celular y formación del anillo Z mediado por la proteína FtsZ	8
Figura 4. Origen de fármacos aprobados por la FDA desde 1981 a 2019	10
Figura 5. Origen de fármacos aprobados por la FDA clasificados como antibacterianos	10
Figura 6. Porcentaje acumulado de productos naturales aprobados por la FDA como antibacterianos de acuerdo con su fuente de origen	11
Figura 7. Policétidos de origen fúngico con actividad antibacteriana	12
Figura 8. Terpenoides con actividad antibacteriana aislados de hongos microscópicos	13
Figura 9. Metabolitos con actividad farmacológica aislados de especies de <i>Aspergillus</i>	14
Figura 10. Metabolitos con actividad farmacológica aislados de especies de <i>Talaromyces</i> ..	14
Figura 11. Hongos aislados de muestras de mangle blanco, Guerrero, México. Izquierda: <i>Aspergillus</i> sp IQ-503. Derecha: <i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	20
Figura 12. Fraccionamiento del extracto <i>Aspergillus</i> sp. IQ-503 mediante cromatografía en columna tipo Flash	22
Figura 13. Fraccionamiento del extracto de <i>Talaromyces</i> sp. IQ-567 mediante cromatografía en columna tipo Flash	22
Figura 14. Perfil cromatográfico de las fracciones seleccionadas	24
Figura 15. Perfil cromatográfico de las fracciones seleccionadas. A) Moléculas aisladas a partir de la fracción F ₁₀ , del extracto fúngico IQ-503; B) Moléculas aisladas a partir de la fracción F ₄ , del extracto fúngico IQ-567	25
Figura 16. Espectro de masas por DART+ para el compuesto 3	32
Figura 17. Espectro de ¹ H-RMN para la molécula 3	34

Figura 18. Espectro de ^{13}C -RMN para la molécula 3	34
Figura 19. Espectro bidimensional de correlaciones HSQC para la molécula 3	35
Figura 20. Espectro bidimensional de correlaciones HMBC para la molécula 3	35
Figura 21. Espectro de masas por DART+ para el compuesto 10	36
Figura 22. Espectro de ^1H -RMN para la molécula 10	39
Figura 23. Espectro de ^{13}C -RMN para la molécula 10	39
Figura 24. Espectro bidimensional de correlaciones COSY para la molécula 10	40
Figura 25. Espectro bidimensional de correlaciones HMBC para la molécula 10	40
Figura 26. Espectro bidimensional de correlaciones HSQC para la molécula 10	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.....	21
Tabla 2. Rendimiento del fraccionamiento primario del hongo <i>Aspergillus</i> sp IQ-503.....	22
Tabla 3. Rendimiento de fraccionamiento primario del hongo <i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	23
Tabla 4. Condiciones optimizadas para la resolución de las fracciones seleccionadas	24
Tabla 5. Actividad antibacteriana frente a <i>A. baumannii</i> A564 de los extractos fúngicos de los aislamientos IQ-503 e IQ-567 cultivados en PDA evaluados a 250 ppm.....	28
Tabla 6. Actividad antibacteriana de los extractos fúngicos de los hongos IQ-503 e IQ-567 cultivados en Cheerios®, evaluados a 250 ppm.....	29
Tabla 7. Inhibición del crecimiento bacteriano de las fracciones evaluadas frente <i>A. baumannii</i> A564 a una concentración de 250 ppm	29
Tabla 8. Rendimientos obtenidos de los metabolitos aislados mediante CLAE-DAD	30
Tabla 9. Actividad antibacteriana de los compuestos 1-3, 10 frente a la cepa <i>A. baumannii</i> A564, a una concentración de 100 ppm.	31
Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 700 MHz; ¹³ C, 175 MHz, δ en ppm; <i>J</i> en Hz; CD ₃ OD) del pirofeno (3).....	33
Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 700 MHz; ¹³ C, 175 MHz, δ en ppm; <i>J</i> en Hz; CDCl ₃) de la penicilida (10).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
AbFtsZ	Proteína FtsZ de <i>Acinetobacter baumannii</i>
ACN	Acetonitrilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cl ₅₀	Concentración Inhibitoria media
CLAE-DAD	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos
CLAE-DAD-DEDL	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos y un detector evaporativo de dispersión de luz
CLAE-EMAR	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución en tándem
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
Complejo ABC	Complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>
COSY	Espectroscopía de correlación
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DAD	Detector de arreglo de diodos
DEDL	Detector evaporativo de dispersión de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
DPN	Derivado de Producto Natural
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramo
GDP	Guanosin Difosfato
GTP	Guanosin Trifosfato
h	Horas
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces

HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
Hz	Hertz
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MH	Müeller-Hinton
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
<i>MtbFtsZ</i>	Proteína FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
nm	Nanometros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PN	Producto Natural
PNB	Producto natural botánico
ppm	Partes por millón
RAM	Resistencia a antimicrobianos
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
<i>SaFtsZ</i>	Proteína FtsZ de <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>SpnFtsZ</i>	Proteína FtsZ de <i>Streptococcus pneumoniae</i>
t	Tiempo
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda
μM	Micromolar
Ω	Índice de deficiencia de hidrógenos

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antimicrobianos (RAM) se define como la habilidad que desarrollan los microorganismos para evitar que los antimicrobianos de uso actual tengan efecto sobre ellos.¹ En 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos prioritarios por su resistencia a antibióticos, y en el 2020, declaró a la RAM como una de las 10 principales amenazas de salud pública a nivel mundial.² Entre los patógenos listados, *Acinetobacter baumannii* (una bacteria panresistente) fue catalogada como prioridad crítica por su resistencia a los antibióticos de última generación.² En México, *A. baumannii* es la principal causante de muertes por infecciones nosocomiales e infecciones farmacorresistentes.

En conjunto, la profilaxis sin diagnósticos apropiados, automedicación, interrupción del tratamiento farmacológico, la falta de higiene y el limitado abanico de dianas moleculares para los antibióticos convencionales han contribuido significativamente a la aparición de la RAM. Bajo este contexto, la búsqueda y evaluación de moléculas dirigidas a blancos moleculares poco explorados ha sido crucial para el desarrollo de antibacterianos novedosos. Entre los blancos moleculares que han recibido poca atención destaca la proteína *filamenting temperature-sensitive mutant Z* (FtsZ, por sus siglas en inglés) que tiene participación en la formación del anillo Z, estructura indispensable para la fisión binaria.⁹

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo la búsqueda de nuevos antibióticos obtenidos de fuentes naturales (metabolitos secundarios de origen fúngico) con actividad antibacteriana contra la cepa resistente *Acinetobacter baumannii* A564 dirigidos a la proteína FtsZ de *A. baumannii*. Así, el estudio químico-biológico de los hongos *Aspergillus* sp. IQ-503 (Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae) y *Talaromyces* sp. IQ-567 (Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae), permitió el aislamiento de la penicilida (**1**) y el pirofeno (**2**). Estas moléculas se caracterizaron utilizando métodos espectrométricos y espectroscópicos. Los ensayos de actividad antibacteriana indicaron que **1** inhibe el crecimiento de la cepa *A. baumannii* A564 en un 40 %. Por otro lado, los ensayos frente a la proteína FtsZ de *A. baumannii* mostraron que ambos productos (**1** y **2**) aumentan la actividad GTPasa de dicha proteína en un 123 % posiblemente induciendo la despolimerización de los filamentos que forman el anillo Z.

2. ANTECEDENTES

2.1 Resistencia antimicrobiana (RAM)

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la habilidad de los microorganismos para evitar que los antimicrobianos de uso actual tengan efecto sobre ellos.³ Esta habilidad puede ser inherente a las cepas o bien, puede ser adquirida durante el proceso infeccioso. En 2017, la OMS declaró la RAM como una de las principales amenazas de salud pública a nivel mundial.¹ De acuerdo con un estudio publicado en *The Lancet* en 2019, 1.3 millones de muertes a nivel mundial fueron causadas por la RAM, posicionando ésta como la tercera causa de muerte a nivel mundial.² La OMS estima que para el año 2050 la incidencia de muertes relacionadas directamente a la RAM será de 10 millones por año, pronunciándose como la principal causa de muerte a nivel mundial.⁴ El problema de la RAM radica en la existencia de resistencia intrínseca ante ciertos antibióticos y la rápida evolución bacteriana que les permite adaptarse a nuevos tratamientos antibacterianos.

Los mecanismos de acción de los antibióticos actuales tienen como blanco molecular la pared celular bacteriana, la síntesis de la membrana celular, replicación o síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de ácido fólico y la síntesis de proteínas, principalmente.⁵ Los mecanismos de resistencia reportados incluyen la modificación del blanco molecular, degradación enzimática del antibiótico, presencia de bombas de eflujo, disminución de la permeabilidad, protección proteica del blanco y modificación química del fármaco.^{5, 6} La diseminación de estos mecanismos se debe a que los genes de resistencia están codificados en regiones móviles dentro del cromosoma bacteriano o en plásmidos.⁵ Esto permite que puedan ser transmitidos de una especie a otra, o incluso entre géneros mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes.⁷ La microbiota juega un papel importante en esto, pues se ha demostrado la existencia de genes de resistencia en la microbiota del intestino humano y su transferencia tanto en animales como en humanos.⁸ La **Figura 1** resume los blancos moleculares de los antibióticos de uso actual, los mecanismos de resistencia y los mecanismos de adquisición de éstos.

El incremento de las tasas de resistencia puede atribuirse a diferentes causas, entre ellas

- 1) El uso indiscriminado de antibióticos. Este fenómeno está relacionado con la dispersión de antibióticos en el medio ambiente, favoreciendo el desarrollo de mecanismos de resistencia y aumentando su frecuencia.⁵ Se ha descrito que entre el 30-50 % de los tratamientos antimicrobianos son prescritos incorrectamente.⁷
- 2) El amplio uso de

antibióticos en la agricultura.⁵ 3) El abandono de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos antibióticos, principalmente por el bajo costo y la disponibilidad de éstos.⁷ Y finalmente, 4) el desapego al tratamiento farmacológico que contribuye a la aparición de la resistencia mediante mutaciones en el DNA que se generan a bajas concentraciones del fármaco y permite la supervivencia de cepas resistentes.

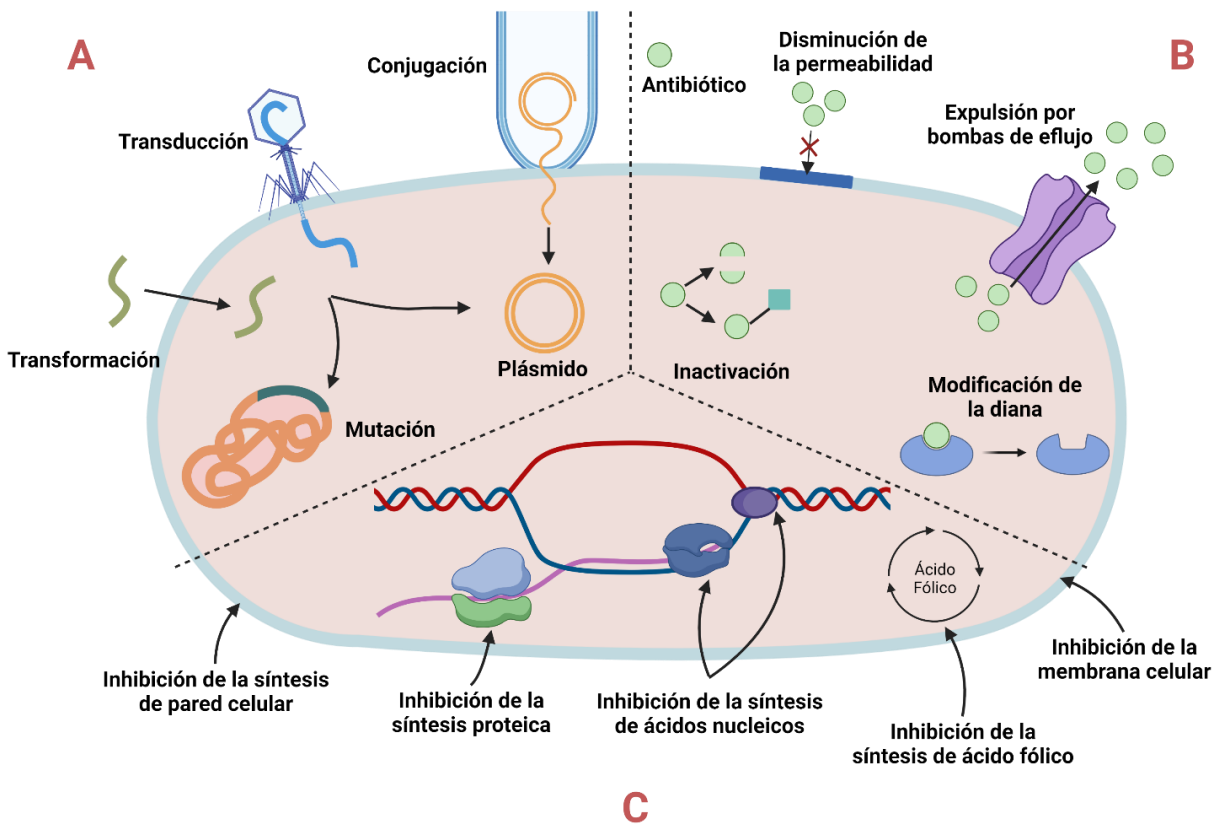


Figura 1. Resistencia antibacteriana. **A.** Mecanismos de adquisición de genes de resistencia. **B.** Mecanismos de resistencia bacterianos. **C.** Mecanismos de acción de los antibióticos de uso actual. Modificado de Chellat, M.⁹

2.2 *Acinetobacter baumannii* en México

Las seis especies bacterianas más patógenas y enlistadas en los documentos de la OMS están representadas por el acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.).⁵ Dentro de la lista de patógenos prioritarios publicada por la OMS, *Acinetobacter baumannii* es catalogada como patógeno de prioridad crítica por su resistencia a los antibióticos de última generación.¹⁰

Acinetobacter baumannii es la especie más virulenta dentro del género, se caracteriza por poseer resistencia intrínseca a β -lactámicos que puede expresarse de manera constitutiva o en respuesta a la presencia de antibióticos.⁵ El instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) reportó que esta especie es intrínsecamente resistente a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, aztreonam, ertapenem, trimetoprima, cloranfenicol y fosfomicina.^{5,11} A pesar de la existencia de la resistencia intrínseca a determinados antibacterianos, el verdadero problema se sitúa en la resistencia adquirida en cepas bacterianas que eran originalmente susceptibles a otros antimicrobianos.⁷ Entre 1995 y 2004 se analizó la susceptibilidad a antibacterianos de las especies del complejo ABC, este análisis demostró un incremento en el porcentaje de resistencia en cuatro de las principales clases de antimicrobianos: fluoroquinolonas (50-73 %), aminoglucósidos (19-31 %), β -lactámicos (39-66 %) y carbapenémicos (9-39 %).⁷ Los principales mecanismos de resistencia utilizados por *A. baumannii* comprenden cambios en la permeabilidad de membrana mediados por el uso de bombas de eflujo (principales en la resistencia ante β -lactámicos), inactivación de los antimicrobianos por modificación estructural (acetilación, fosforilación, adenilación) y modificación del sitio de acción, el cual está relacionado directamente con la resistencia a diversas clases de antibacterianos.¹¹ Además, se ha descrito la presencia de β -lactamasas, cambios en las porinas de membrana y alteraciones en las proteínas de unión a penicilina.⁶ La pérdida de porinas y el cambio en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana citoplasmática disminuyen la capacidad de los antibióticos para penetrar en la célula. *A. baumannii* posee porinas específicas para moléculas no mayores a 200 Da, provocando que su membrana sea altamente impermeable.⁶ Dentro de los factores que incrementan la virulencia de *A. baumannii* destaca su competencia natural para la captación de ADN y su alta tasa de transformación natural.^{8, 12}

En México, *A. baumannii* es la principal causa de muertes por infecciones farmacorresistentes.¹³ Esta bacteria es considerada un patógeno oportunista, la mayoría de los aislamientos de *A. baumannii* provienen de pacientes infectados en las unidades de cuidados intensivos. Se ha reportado que el 90 % de las infecciones nosocomiales y el 92 % de las bacteriemias nosocomiales son causadas por *A. baumannii*.¹⁴ De acuerdo con los datos proporcionados con la red PUCRA, las cepas de *A. baumannii* aisladas en 2020 fueron resistentes a múltiples fármacos (6 %), extensamente resistentes (63 %) y panresistentes

(25 %).¹³ Asimismo, las cepas evaluadas entre 2018 y 2020 sólo presentaron sensibilidad frente a la tigeciclina y la colistina.¹³ Sin embargo, de acuerdo con un estudio publicado en *Antibiotics* en 2023 las cepas de *A. baumannii* presentan un rango de sensibilidad a colistina entre el 12 y 50 %.¹⁵ Las infecciones provocadas por esta bacteria aumentan la estancia hospitalaria de los pacientes así como su mortalidad.^{4,14}

2.3 Proteína FtsZ como blanco molecular

Durante los últimos años la proteína FtsZ ha sido estudiada como potencial blanco molecular para el desarrollo de nuevos antibacterianos debido a su participación en la división celular.¹⁶ La división celular es el proceso por el cual la célula se reproduce para formar dos células hijas idénticas.¹⁷ Este proceso es fundamental para la propagación de los seres vivos; la habilidad de las bacterias para crecer y dividirse rápidamente es fundamental para el proceso infeccioso.¹⁷

La citocinesis es mediada por el divisoma, la proteína FtsZ es la proteína más caracterizada de las presentes en el divisoma.^{17,18} La estructura cristalina se obtuvo por primera vez utilizando una proteína proveniente de la arquea *Methanocaldococcus jannaschii*.¹⁷ Esto permitió identificar a la proteína FtsZ como un homólogo estructural de la tubulina, proteína que forma parte del citoesqueleto en las células eucarióticas. Ambas proteínas contienen un dominio de unión a GTP en la región N-terminal, lo que les confiere actividad GTPasa.¹⁷ Sin embargo, existe una diferencia estructural importante entre ambas proteínas, FtsZ presenta una hendidura entre dominios a lo largo de la hélice H7 que separa los dominios amino y carboxilo terminal (**Figura 2**).¹⁷ Contrario a lo que ocurre en la estructura de la tubulina, esta hendidura está altamente conservada entre especies bacterianas, así como el dominio de unión a GTP.¹⁷ El dominio globular C-terminal está unido a una región desordenada (conocida como región de unión) y termina en un extremo conservado.¹⁷ La longitud de esta región varía entre FtsZ de diferentes especies, datos experimentales sugieren que esta región actúa como una atadura flexible que interactúa con las proteínas de anclaje a membrana FtsA y ZipA, indicando que esta región tiene un papel en la regulación del metabolismo del peptidoglicano y en la estabilidad de los polímeros de FtsZ. Asimismo, sugiere que la región desordenada de FtsZ (que no está presente en la tubulina), es esencial para la división celular al mantener las interacciones proteína-proteína.¹⁷

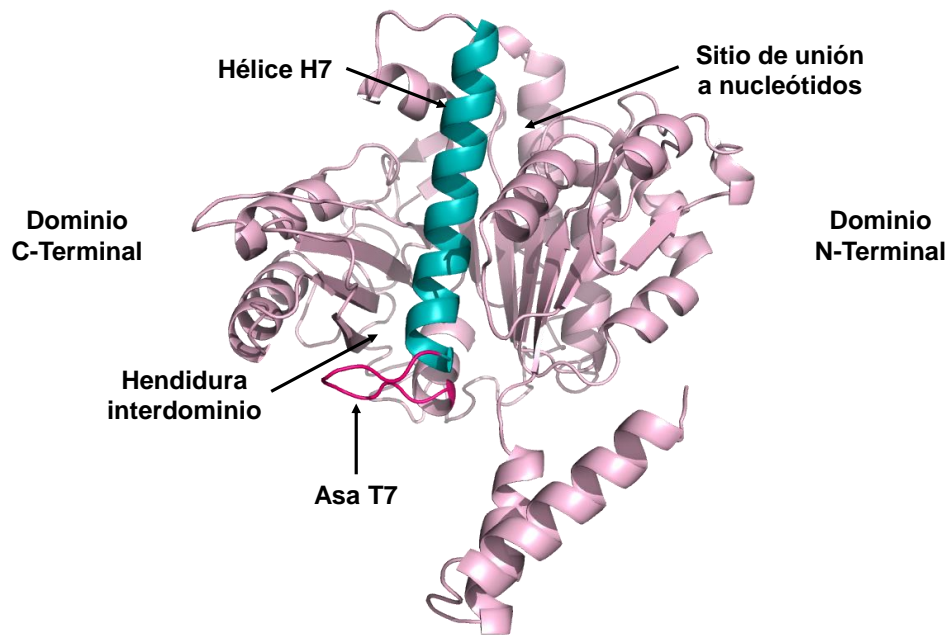


Figura 2. Modelo de la proteína FtsZ de *Acinetobacter baumannii* obtenido por homología en el grupo de investigación.

Después de la replicación y segregación de los cromosomas, el primer paso de la citocinesis es la polimerización de la proteína FtsZ para formar el anillo Z en la mitad de la célula, por lo tanto, FtsZ es la primera proteína en moverse hacia el sitio de división.^{16,17} La polimerización de los monómeros de FtsZ está mediada por la hidrólisis de GTP a GDP y la presencia de Mg^{2+} .¹⁷ La polimerización inicia cuando el asa T7 de una subunidad de FtsZ se inserta en el dominio de unión a nucleótidos de otra subunidad de FtsZ. La interfase entre ambas subunidades crea un sitio activo para la hidrólisis de GTP.¹⁷ Como primer paso, la proteína FtsZ debe localizar las enzimas de pared célula y coordinar sus actividades para la síntesis de peptidoglicano durante la citocinesis, aunado a ello, la unión de FtsZ a la pared celular mediante las proteínas FtsA y ZipA permite formar filamentos del citoesqueleto utilizados durante la fisión binaria.^{17,18} Los filamentos polimerizados forman una estructura tipo anillo (llamada anillo Z) que rodea la célula.¹⁶ Aproximadamente el 30 % de los monómeros de FtsZ disponibles forman el anillo Z, mientras que los monómeros restantes se mantienen en el citoplasma y se intercambian con monómeros de FtsZ polimerizadas.^{19,20} El sitio de ensamblaje del anillo Z define el sitio de división donde FtsZ recluta y regula proteínas esenciales para la constricción.¹⁸ El ensamblaje y constricción del anillo Z debe coordinarse con la replicación y la segregación cromosómica, por lo tanto, el ensamblaje del

anillo Z sucede durante la fase S del ciclo celular e implica un cambio de concentración del polímero lejos de los polos.¹⁸ En la mayoría de las bacterias, el ensamblaje de esta proteína en la mitad de la célula está regulado por sistemas de posicionamiento extrínsecos que modifican la dinámica interna del polímero de FtsZ.¹⁸ Sin embargo, estos sistemas varían dependiendo de la especie bacteriana.¹⁸ Existen reguladores negativos del anillo Z (sistemas Min o MinZ) que promueven el desensamble de los polímeros de FtsZ cerca de los polos, mientras que los reguladores positivos (MapZ o PomZ) promueven el ensamblaje de los polímeros de FtsZ en la mitad de la célula.¹⁸

FtsZ es altamente dinámica dentro del anillo Z, esta dinámica depende de la actividad GTPasa de la enzima.¹⁸ El movimiento de FtsZ en el anillo se conoce como “*treadmilling*” (o cinta rodante), donde las subunidades se agregan en un extremo de un grupo de filamentos y se disocian del otro.¹⁸ El aumento o disminución en la actividad GTPasa conduce a un aumento o disminución en la tasa de recambio, respectivamente.¹⁸ Manipular la velocidad de agregación y disgregación no sólo afecta el movimiento de FtsZ sino también de la proteína FtsA y la síntesis de PBP2B y peptidoglicano, lo que demuestra que el movimiento de “cinta rodante” controla la ubicación y la tasa de síntesis de peptidoglicano durante la división celular.²¹

Para finalizar la citocinesis el anillo Z debe contraerse y dar lugar a dos células idénticas, de acuerdo con diversos estudios esto ocurre porque los protofilamentos unidos a GTP tienen ligeras curvaturas mientras que los protofilamentos unidos a GDP están muy curvados, por lo tanto, se especula la hidrólisis de GTP a GDP contrae el anillo Z y genera la fuerza necesaria para dividir la célula.^{19,22} Esta hipótesis se sustenta en que la contracción del anillo Z inicia por la hidrólisis de GTP a GDP.¹⁹ Por otro lado, los protofilamentos de FtsZ unidos a GDP promuevan la despolimerización de la proteína debido a que son más inestables que los polímeros FtsZ-GTP.^{16,17} La **Figura 3** resume la participación de la proteína FtsZ durante la división celular.

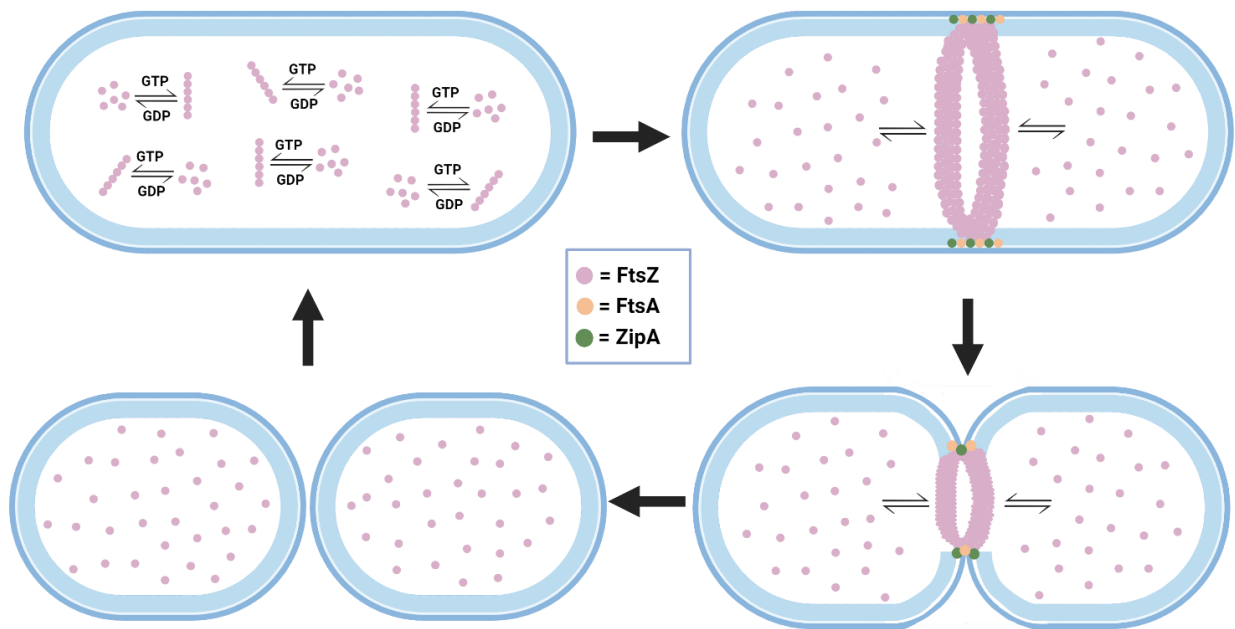


Figura 3. División celular y formación del anillo Z mediado por la proteína FtsZ. (Tomado de Haranahalli, K. et al)¹⁹

La proteína FtsZ, además de ser esencial en la división celular bacteriana, la proteína FtsZ está altamente conservada entre especies bacterianas (40-50 % identidad),¹⁷ lo que permite el desarrollo de fármacos de amplio espectro.¹⁷ A pesar de ser homóloga de la tubulina, la identidad entre ellas es menor al 20 % y comparten sólo el 10 % de identidad en el dominio N-terminal.^{20, 22} Otro factor que la posiciona como un blanco molecular de interés es la presencia de tres sitios de unión a fármacos: el dominio de unión a nucleótidos, el asa T7 y la hendidura interdominio (**Figura 2**).¹⁷ La supresión de FtsZ provoca que las bacterias bacilares formen células elongadas que se lisan eventualmente, mientras que las bacterias con forma de coco incrementan su tamaño estándar hasta ocho veces.¹⁷

2.4 Productos Naturales de origen fúngico

Un producto natural (PN) se define como una molécula orgánica aislada de fuentes naturales que se producen por las vías del metabolismo primario o secundario.²³

Los PN se caracterizan por su diversidad y complejidad estructural, comparados con compuestos sintéticos, éstos poseen una mayor masa molecular, un mayor número de carbonos sp³ y átomos de oxígeno, pero menor cantidad de nitrógeno, halógenos y átomos de azufre, poseen mayor número de centros quirales, forman mayor cantidad de enlaces de

hidrógeno, tienen mayor hidrofobicidad y rigidez molecular, principalmente en los sistemas de anillos fusionados.^{24,25}

Las principales ventajas de los productos naturales es el amplio rango de farmacóforos y la estereoquímica que presentan, estas características permiten obtener más “*hits*” a partir de colecciones de PN, incluso contra blancos moleculares complicados como las interacciones proteicas, pues son producto de rutas biosintéticas en las que usualmente fungen como ligandos de blancos proteicos o receptores.²⁵ Adicionalmente, al ser metabolitos naturales pueden no sólo ser biológicamente activos, sino también, ser sustratos para los sistemas de transporte dentro del organismo y así poder llegar a su sitio de acción.²⁵ Los antibióticos producidos por microorganismos suelen estar mejor optimizados evolutivamente para atravesar la pared celular y las membranas de las bacterias.^{25,26} Los PN han evolucionado y están estructuralmente diseñados para cumplir funciones biológicas específicas incluyendo la regulación del sistema inmunológico y la interacción con otros organismos, lo que explica la gran relevancia de estos compuestos para enfermedades infecciosas y cáncer.²⁴

En general, los PNs han sido una fuente importante en el desarrollo de fármacos, *per se*, o bien, como moléculas líderes para el desarrollo de productos más eficaces. Entre enero de 1981 y septiembre de 2019 se aprobaron 1934 fármacos de bajo peso molecular, el 67 % fueron productos naturales, que tienen un producto natural como farmacóforo o bien, mimetizan un producto natural (**Figura 4**).²⁷ Los productos naturales constituyen dos terceras partes de los antibióticos utilizados en la clínica.²⁸ En el periodo comprendido entre 1981 y 2019, el 93 % de los antibióticos aprobados son productos naturales y sus derivados (**Figura 5**).²⁷ Sin embargo, desde 1990 la industria farmacéutica ha apostado por el descubrimiento de nuevos fármacos mediante el cribado de alto rendimiento a partir de colecciones generadas por química combinatoria, sin embargo, únicamente el 0.001 % de los compuestos sintetizados a partir de estas colecciones han sido aprobados. Mientras tanto, del 0.2 al 0.3 % de metabolitos de origen microbiano se han aprobados como medicamentos y una tasa similar sirvieron como compuestos guía.²⁵

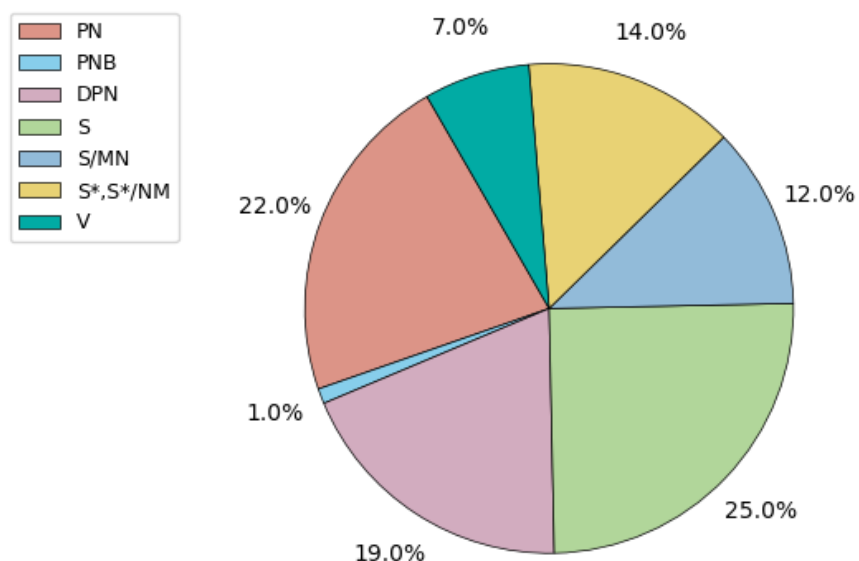


Figura 4. Origen de fármacos aprobados por la FDA desde 1981 a 2019. PN: Productos Naturales, DPN: Derivados de Productos Naturales, S: Moléculas sintéticas en su totalidad, S*/MN: Moléculas sintéticas que mimetizan un PN, S*, S*/NM: Moléculas sintéticas o sintéticas que mimetizan un PN, con un PN como farmacóforo, V: vacunas. (Modificado de Newman, D.)²⁷

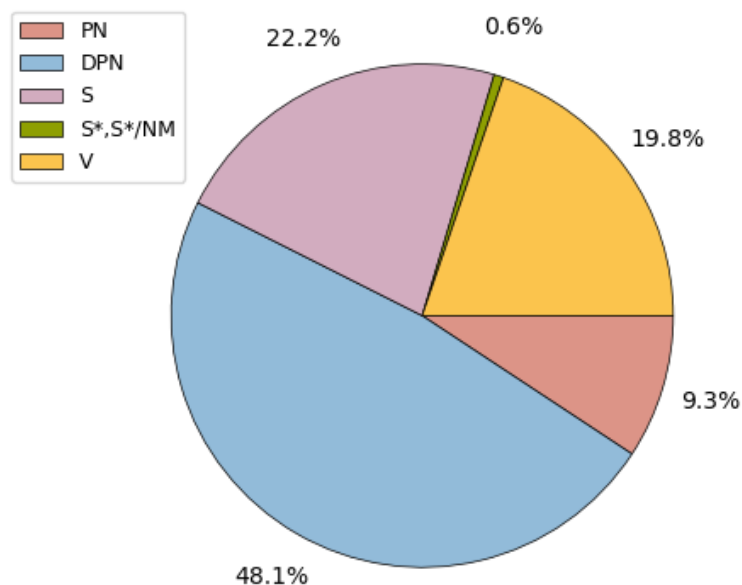


Figura 5. Origen de fármacos aprobados por la FDA clasificados como antibacterianos. PN: Productos Naturales, DPN: Derivados de Productos Naturales, S: Moléculas sintéticas en su totalidad, S*, S*/NM: Moléculas sintéticas o sintéticas que mimetizan un PN, con un PN como farmacóforo. (Modificado de Newman, D.)²⁷

Entre las principales fuentes de productos naturales encontramos plantas, hongos y bacterias. Del total de antibacterianos aprobados por la FDA, el 69 % se originan a partir de productos naturales, de los cuales, el 97 % provienen de microorganismos: 51 % proviene de bacterias y el 46 % proviene de hongos microscópicos (**Figura 6**).²⁸

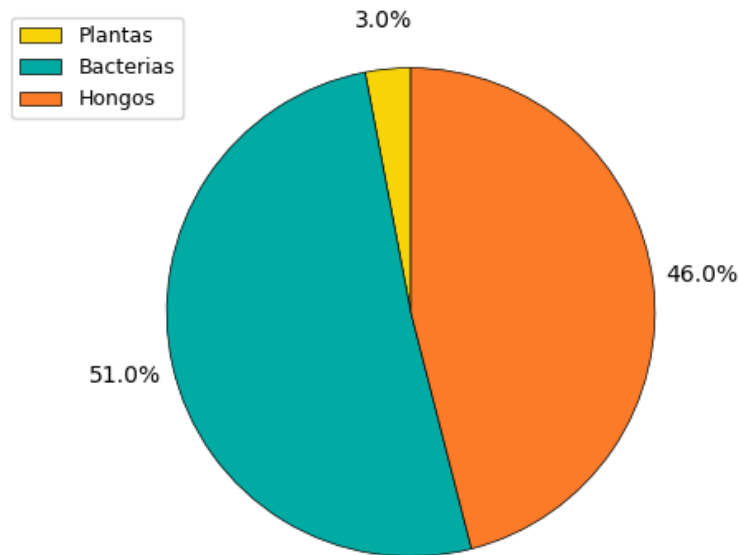


Figura 6. Porcentaje acumulado de productos naturales aprobados por la FDA como antibacterianos de acuerdo con su fuente de origen. Tomado de Patridge, E.²⁸

Un ejemplo por excelencia de la importancia de los productos naturales de origen fúngico es el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming. Este descubrimiento revolucionó la quimioterapia e inició la era dorada de los antibióticos.²⁹ Asimismo, el descubrimiento de los β -lactámicos es uno de los mayores avances en la medicina moderna y son un ejemplo clásico de la síntesis de péptidos no ribosomales.²⁹ Las dos principales familias de β -lactámicos son las penicilinas y las cefalosporinas originalmente aisladas de especies de *Penicillium* y *Acremonium*, respectivamente.²⁹ Estos compuestos son los antibióticos de acción prolongada más utilizados en la medicina moderna y actúan contra un amplio espectro de bacterias por la inhibición de la síntesis de pared celular.²⁹

La ruta de los policétidos constituye una de las principales vías biosintéticas para la producción de productos naturales de origen fúngico.²⁹ Dentro de los policétidos se encuentran compuestos como los poliésteres, polifenoles, macrólidas, polienos y enedinos, por mencionar algunos.²⁹ Como ejemplo de estos compuestos destaca la uredinorrubelina I (**Figura 7**) proveniente de una especie de *Torrubiella*, esta molécula mostró actividad

antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.²⁹ Asimismo, el hongo *Ramularia collo-cygni*, agente etiológico de la enfermedad Ramularia, es un importante productor de metabolitos secundarios entre los que se encuentran las rubelinas (**Figura 7**), antraquinonas que además de presentar actividad fitotóxica han demostrado actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas, incluidas cepas resistentes de *S. aureus* y *Enterococcus faecalis*.²⁸ Otro tipo de antraquinonas sintetizadas por las policétido sintasas son la viriditoxina y la xantoradona A (**Figura 7**), producidas por el hongo *Penicillium radicum*, las Xantoradonas A y B mostraron actividad contra *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, mientras que la Viriditoxina y la Xantoradona C han sido reportadas como inhibidoras de la proteína FtsZ.^{29,30}

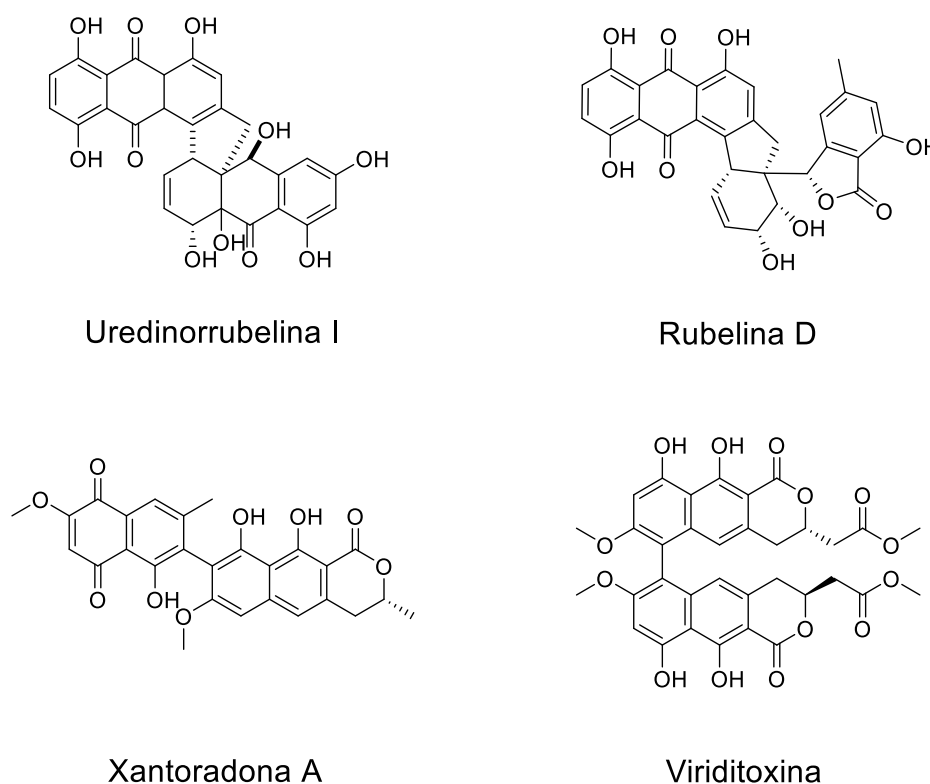


Figura 7. Policétidos de origen fúngico con actividad antibacteriana.

Los géneros *Hormonema* y *Trichoderma* son productores de terpenoides como la enfumafungina y la ergokonina A (**Figura 8**), que han mostrado actividad antibiótica contra bacterias, levaduras y hongos.²⁹ Otro ejemplo de terpenoides de origen fúngico son las periconicias A y B (**Figura 8**), moléculas con actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *Salmonella typhimurium*.²⁹

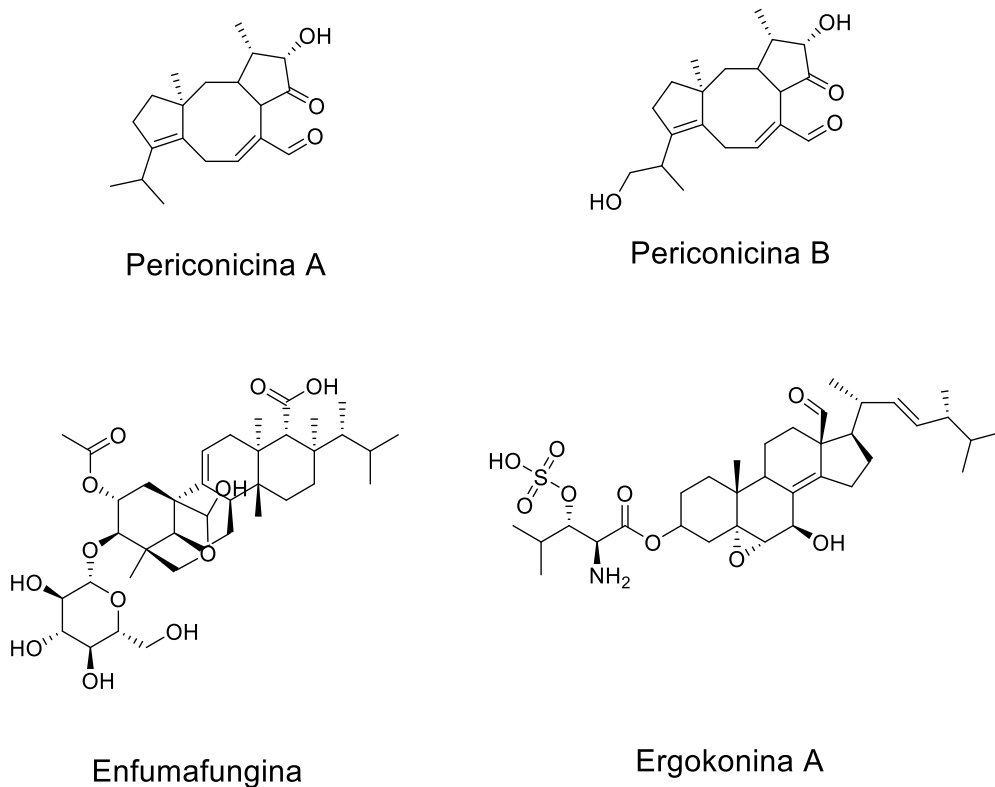


Figura 8. Terpenoides con actividad antibacteriana aislados de hongos microscópicos.

2.5 Ejemplos selectos de antibacterianos aislados de los géneros *Aspergillus* y *Talaromyces*

El género *Aspergillus* es utilizado ampliamente en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Desde 1974 se han aislado moléculas como la equinocandina B (**Figura 9**), un lipopéptido considerado como potente antifúngico.²⁹ Otro ejemplo es la brevianamida S (**Figura 9**), un alcaloide aislado de *Aspergillus versicolor* con actividad antibacteriana contra el bacilo Calmette-Guérin, una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* utilizada en la búsqueda de fármacos antituberculosis.²⁸ Otro alcaloide indólico es el waikialoid A (**Figura 9**) aislado de *Aspergillus* sp. con actividad inhibitoria sobre la formación de biopelícula por *Candida albicans*.³⁰

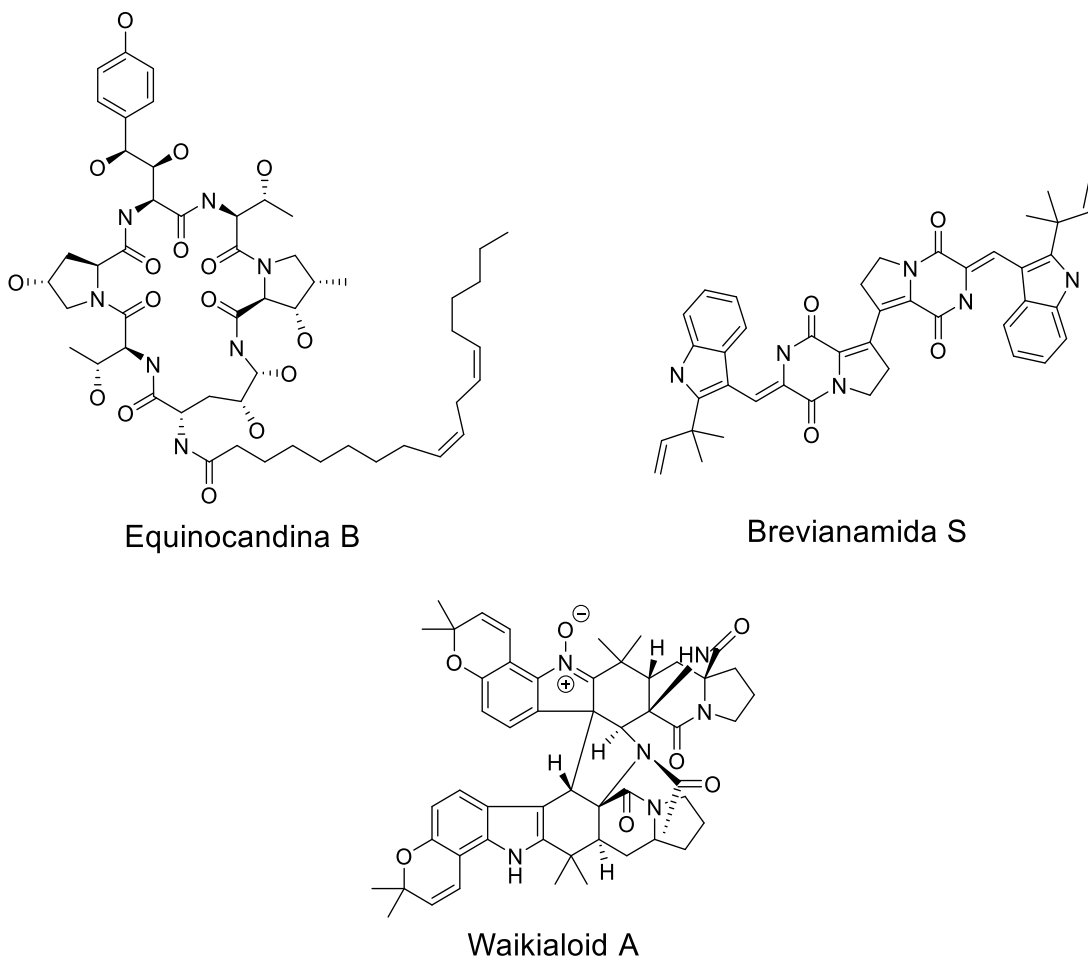


Figura 9. Metabolitos con actividad farmacológica aislados de especies de *Aspergillus*.

Del género *Talaromyces* se han aislado diversos compuestos como el talaromicolido A y la dinapinona A (**Figura 10**), obtenidos a partir de *Talaromyces pinophilus*. El talaromicolido A ha mostrado actividad antibacteriana contra *Clostridium perfringens*, mientras que la dinapinona A inhibe la síntesis de triacilgliceroles.^{29,30}

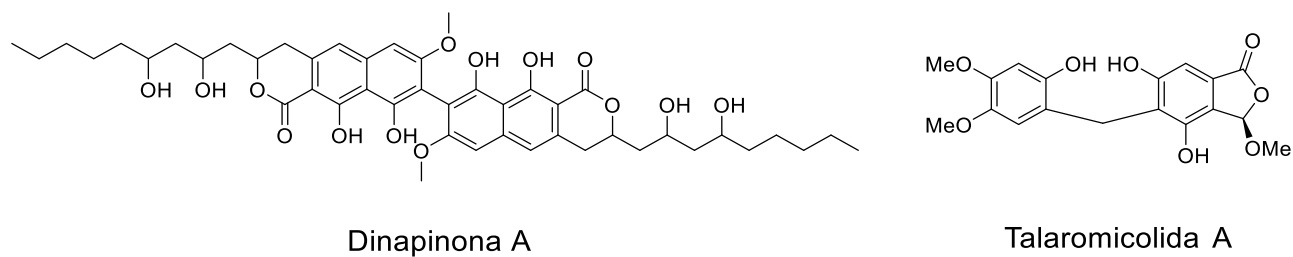


Figura 10. Metabolitos con actividad farmacológica aislados de especies de *Talaromyces*.

Manglares Mexicanos como sitio de bioprospección

Un manglar es un tipo de humedal leñoso, denso, formado por una o varias especies de mangle de 1 a 30 metros de altura. Los mangles son árboles de origen terrestre adaptados para sobrevivir en ambientes inundables con fluctuaciones de temperatura, acidez, alcalinidad y salinidad.^{32, 33, 34} Además, poseen gran abundancia de fauna, flora y diversidad fúngica.³⁵ Los ecosistemas de manglar cubren entre el 60 y el 75 % de la línea costera mundial y su distribución se limita a zonas tropicales y subtropicales.³⁴ Los países latinoamericanos con mayor abundancia de manglares son Brasil, México, Cuba, Colombia y Venezuela.³⁴ En México, las especies de mangle predominantes son: *Rhizophora mangle* (Mangle rojo), *Laguncularia racemosa* (Mangle blanco), *Avicennia germinans* (Mangle negro) y *Conocarpus erectus* (Mangle botoncillo).^{32, 33} México posee el 6 % del total de los manglares de todo el mundo.³⁶ En 2020, la superficie de manglares en México superó las 900,000 hectáreas.³⁷

Los bosques de manglar presentan una alta productividad de materia orgánica asociada a la biodegradación de biomasa vegetal.³⁸ Esta biodegradación es llevada a cabo por microorganismos heterótrofos como los hongos.³⁸ Los hongos aislados en laboratorio a partir de muestras de mangle son catalogados hongos asociados a manglar.³⁵ Los primeros registros de hongos asociados a manglar corresponden a trabajos realizados en la India, donde destacaron la presencia de deuteromycetes, zigomycetes, ascomycetes y oomycetes.³⁸ Estos microorganismos habitan distintos nichos en los ecosistemas de mangle y desempeñar funciones de biodegradación (fragmentación de hojas, degradación de madera y materia orgánica en sedimentos) o bien, pueden establecer simbiosis micorrícicas o fungir como endófitos de hojas y raíces.³⁸

Para el año 2005 se habían reportado 278 ascomycetos, 277 deuteromycetos, 30 basidiomycetos y 14 oomycetes.³⁹ La diversidad fúngica de estos ecosistemas ha sido relacionada con la edad del manglar, la diversidad de las especies de mangle, la diversidad de los árboles terrestres cercanos, la variación de sustrato, la salinidad, la inundación y cambios en el nivel de agua.^{37, 38}

Los hongos pueden dividirse en terrestres (aquellos que colonizan las partes del mangle que crecen por encima del agua) y marinos, que se desarrollan en las partes sumergidas en el agua.³⁶ La presencia de hongos típicamente terrestres en los manglares se asocia con adaptaciones provocadas por las condiciones ecológicas de estos ecosistemas, donde destacan la concentración de sales, anegamiento y condiciones anaerobias.³⁸

Desde un criterio ecológico y considerando el papel de los manglares en preservación de la flora y fauna costera, los manglares se convierten en un nicho de interés ecológico para la búsqueda de metabolitos especializados a partir de microorganismos.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a antimicrobianos es una de las diez principales amenazas de salud pública a nivel mundial.¹ En 2019, 1.3 millones de muertes a nivel mundial fueron causadas por la RAM.² Tan solo en la Unión Europea, la RAM ocasiona 25,000 muertes al año originando una pérdida económica de hasta 150 millones de euros.⁴ En México, la presencia de las bacterias del grupo ESKAPE es significativa, la red PUCRA-UNAM reportó el análisis de 20,542 cepas provenientes de 31 hospitales en el periodo 2017-2020.¹³ *Acinetobacter baumannii* presentó el mayor porcentaje de resistencia (36 – 70 %) ante los antimicrobianos evaluados y más del 50 % de las cepas se catalogaron como extensamente resistentes.¹³ El aumento en la incidencia de la RAM es tan drástico, que diversos estudios estiman que esta condición ocasionará 10 millones de muertes anuales en 2050, y, en consecuencia, pérdidas económicas de hasta 100 billones de dólares, equivalente a 5 % del producto interno bruto (PIB) en países de bajo ingreso.^{15,39}

A pesar de que la RAM es un fenómeno natural, la aparición de nuevas cepas y la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia se debe principalmente a la mala profilaxis, el diagnóstico erróneo, al desapego al tratamiento con antibacterianos y en gran medida, a la falta de investigación y desarrollo de moléculas con mecanismos de acción novedosos frente a estos microorganismos.

En este contexto, el descubrimiento de nuevos blancos moleculares, así como nuevos antibióticos eficaces contra cepas resistentes es de vital importancia tanto en México como a nivel global. En este sentido, en el presente trabajo se realizó un estudio multi-informativo que integra datos metabólicos, de actividad antibacteriana y de interacción de ligantes con la proteína *AbFtsZ* conducente al descubrimiento de productos naturales con actividad antibacteriana obtenidos de hongos microscópicos provenientes de nichos ecológicos poco explorados.

4. HIPÓTESIS

El estudio químico de microorganismos aislados de manglares mexicanos (*Aspergillus* sp. IQ-503 y *Talaromyces* sp. IQ-567) seleccionados con base en ensayos de actividad antibacteriana frente a *A. baumannii* A564, conducirá a la obtención de moléculas que inhiban el crecimiento de la bacteria bajo estudio e interaccionen con la proteína AbFtsZ.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Descubrir moléculas con actividad antibacteriana sobre la cepa intrahospitalaria resistente *Acinetobacter baumannii* A564, así como moléculas que funjan como ligantes de la proteína *AbFtsZ* (blanco molecular para nuevos antibacterianos) y modifiquen su actividad, a partir de hongos asociados manglares mexicanos.

5.2 Objetivos específicos

- Reducir la complejidad química de los extractos orgánicos de los hongos seleccionados mediante técnicas cromatográficas.
- Rastrear los compuestos responsables de la actividad antibacteriana presentes en los extractos orgánicos y fracciones por medio de su evaluación en ensayos antibacterianos y de actividad frente a la enzima *AbFtsZ*.
- Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y que además muestren capacidad de interaccionar con la proteína *AbFtsZ*.
- Evaluar la actividad biológica de las moléculas aisladas sobre *AbFtsZ* y el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* panresistente.

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1 Reactivos

Acetonitrilo (Sigma-Aldrich), Ácido clorhídrico (J.T. Baker), Ácido Fórmico (Fermont), Ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich), Agar Papa Dextrosa (MCD Lab), Agua desionizada (Elga Pure Lab Quest, VFLC29), Berberina (Sigma-Aldrich), Caldo Müller-Hinton (CONDA), Cloroformo deuterado (Cambridge Isotope Laboratories Inc.), Cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich), Cloruro de potasio (Wöhler), Dimetilsulfóxido (Fermont), Gentamicina (GoldBio), Glicerol (Sigma-Aldrich), GTP (Sigma-Aldrich), Metanol deuterado (Cambridge Isotope Laboratories Inc.), Molibdato de amonio (Sigma-Aldrich), Tris básico (Dibbiotek), Sal de oxalato de verde de malaquita (Sigma-Aldrich), Tween²⁰ (Sigma-Aldrich).

6.2 Extracción de metabolitos fúngicos

6.2.1 Cultivos en gran escala de microorganismos fúngicos

A partir de los cultivos axénicos de los hongos *Talaromyces* sp. IQ-567 y *Aspergillus* sp. IQ-503 (**Figura 11**) en Agar Papa Dextrosa (APD) se prepararon cultivos líquidos en caldo papa-dextrosa (CPD) de cada uno de los taxones y se dejaron fermentar por cinco días. Subsecuentemente, se inocularon 20 matraces con 10 g de cereal Cheerios® para cada cepa fúngica y se incubaron durante 28 días con ciclos normales de luz/oscuridad a temperatura ambiente.



Figura 11. Hongos aislados de muestras de mangle blanco, Guerrero, México. Izquierda: *Aspergillus* sp. IQ-503. Derecha: *Talaromyces* sp. IQ-567.

6.2.2 Obtención de los extractos fúngicos

Una vez transcurrido el periodo de fermentación a cada uno de los matraces se le añadieron 80 mL acetona/acetato de etilo en una relación 1:9, la biomasa se fragmento mecánicamente con una espátula y se dejaron macerar en agitación constante durante 24 h. Posteriormente, se separó la biomasa de la fase orgánica mediante filtración al vacío, el filtrado se concentró a presión reducida hasta sequedad. Al extracto obtenido se le realizó un reparto líquido-líquido utilizando la mezcla CH₂Cl₂-MeOH-H₂O, 4:1:5. La fase acuosa se desechó y la fase orgánica se concentró hasta sequedad a presión reducida. El extracto orgánico se reconstituyó con 300 mL ACN/MeOH 1:1 y 300 mL de hexano y se realizó un segundo reparto desechando la fase hexánica y concentrando la fase polar. Ambos extractos se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE-DAD-DEDL).

6.2.3 Fraccionamiento primario de extractos orgánicos

Los extractos orgánicos de los microorganismos seleccionados se fraccionaron mediante cromatografía en columna tipo Flash, en un cromatógrafo Pure C-810 Flash (Büchi) equipado con una bomba binaria y un detector de arreglo de diodos (DAD). Como fase estacionaria se utilizó una columna de C₁₈ SNAP Ultra Biotage, 25 g, 50 mL) y como fase móvil un gradiente creciente de ACN y agua desionizada acidificada con ácido fórmico al 0.1 %, el gradiente inició en una relación 20:80, respectivamente y fue aumentando durante 30 minutos hasta llegar a 100 % de ACN. La **Tabla 1** resume las condiciones empleadas para el fraccionamiento de cada extracto.

Tabla 1. Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.

Hongo	<i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	<i>Aspergillus</i> sp. IQ-503
Cantidad de muestra inyectada	553.9 mg	423.6 mg
Columna	C ₁₈	C ₁₈
Flujo de la fase móvil	10 mL/min	10 mL/min
Solvente A	Acetonitrilo	Acetonitrilo
Solvente B	Agua acidificada	Agua acidificada
Volumen de fracción	25 mL	25 mL

El fraccionamiento primario de los extractos fúngicos de *Aspergillus* sp IQ-503 (**Figura 12**) y *Talaromyces* sp. IQ-567 (**Figura 13**), condujo a la obtención de 26 y 14 fracciones, respectivamente. El rendimiento obtenido para cada fracción se resume en las **Tablas 2 y 3**.

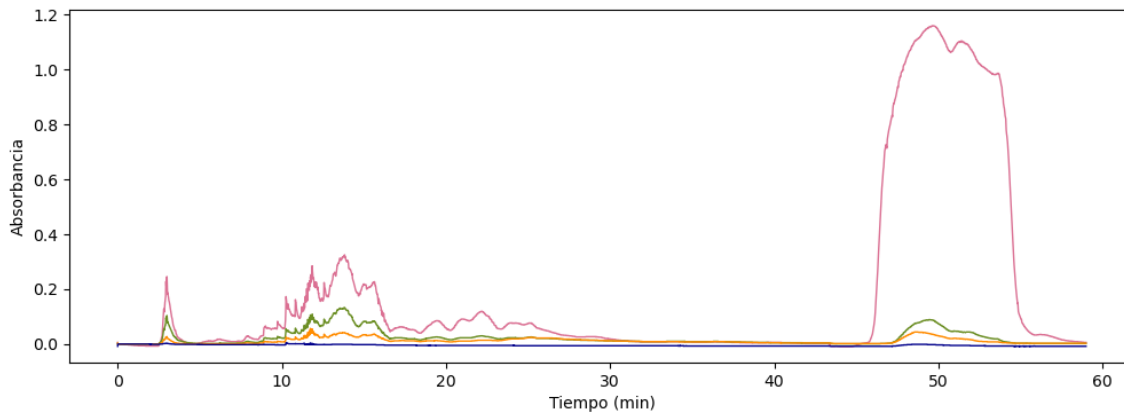


Figura 12. Fraccionamiento del extracto *Aspergillus* sp. IQ-503 mediante cromatografía en columna tipo Flash. En rosa: absorbancia a $\lambda=254$ nm; en verde absorbancia a $\lambda=360$ nm; en amarillo absorbancia a $\lambda=450$ nm y en azul, absorbancia a $\lambda=580$ nm.

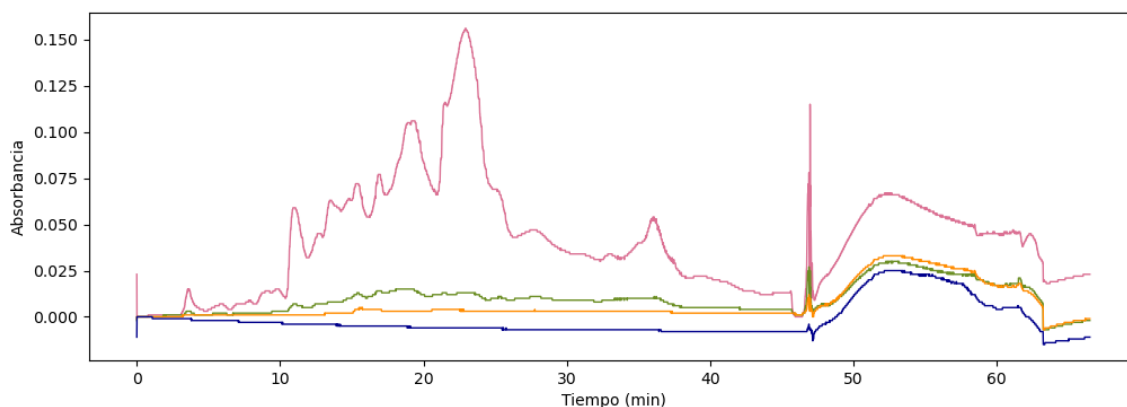


Figura 13. Fraccionamiento del extracto de *Talaromyces* sp. IQ-567 mediante cromatografía en columna tipo Flash. En rosa: absorbancia a $\lambda=254$ nm; en verde absorbancia a $\lambda=360$ nm; en amarillo absorbancia a $\lambda=450$ nm y en azul, absorbancia a $\lambda=580$ nm.

Tabla 2. Rendimiento del fraccionamiento primario del hongo *Aspergillus* sp IQ-503.

Fracción	Rendimiento (mg)	Fracción	Rendimiento (mg)
1	0.6	14	3.2
2	4.2	15	6.1
3	0.5	16	6.7
4	2.3	17	9.6
5	3.7	18	6.1
6	3.9	19	31
7	2.6	20	24.6
8	1.5	21	29.4
9	2.7	22	0.5
10	55.6	23	5.8
11	0.3	24	3.6
12	3.4	25	133
13	1.1	26	34.5
Total			376.5

Tabla 3. Rendimiento de fraccionamiento primario del hongo *Talaromyces* sp. IQ-567.

Fracción	Rendimiento (mg)	Fracción	Rendimiento (mg)
1	27.9	8	1.9
2	2.5	9	3.1
3	5.1	10	59.9
4	84.2*	11	54.9
5	30.2	12	0.9
6	10.8	13	1.2
7	181.3	14	41.2
Total			505.1

6.2.4 Condiciones cromatográficas y aislamiento de los metabolitos activos

Los análisis cromatográficos a nivel analítico se realizaron mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de acuerdo con protocolos definidos en el grupo de investigación. Se utilizó un cromatógrafo Waters® equipado con un detector UV con arreglo de diodos (DAD-2998), acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (DEDL-2424) y una columna Phenomenex Gemini® (C₁₈, 5 µm, 10 × 250 mm), utilizando como fase móvil un gradiente creciente de ACN-H₂O (desionizada y acidificada con 0.1% ácido fórmico) el cual inició en una relación 20:80 hasta llegar a una composición de 100:0 en 30 min. Se inyectaron 10 µL de cada muestra a una concentración 5.0 mg/mL empleando un automuestreador (Waters® 2707) a un flujo de 1.0 mL/min.

Previo al análisis semipreparativo se optimizó el gradiente de la fase móvil de cada una de las muestras. Las condiciones finales se especifican en la **Tabla 4**. El aislamiento de los compuestos bioactivos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Se utilizó un cromatógrafo Waters® equipado con un detector UV con arreglo de diodos (DAD-2998) y una columna semipreparativa Phenomenex Gemini® (C₁₈, 5 µm, 4.6 × 250 mm), como fase móvil se utilizaron los mismos disolventes antes descritos. El método se realizó a un flujo de 4.6 mL/min utilizando un colector de fracciones (WFCIII). Los cromatogramas de las corridas se obtuvieron a una longitud de onda de 240 nm. Los datos se adquirieron y procesaron utilizando el software Empower 3 (Waters®) y el software Jupyter Notebook (Versión 6.5.2), respectivamente.

Tabla 4. Condiciones optimizadas para la resolución de las fracciones seleccionadas.

Hongo	IQ-567	IQ-503
Fracción	4	10
Cantidad de muestra (mg)	81	55.4
Fase móvil ACN-H ₂ O (0.1%)	35-70	30-80
Tiempo de corrida (min)	21	20

Este análisis permitió conocer su complejidad y diseñar las condiciones de trabajo para el aislamiento de los metabolitos fúngicos bioactivos (**Figura 14**).

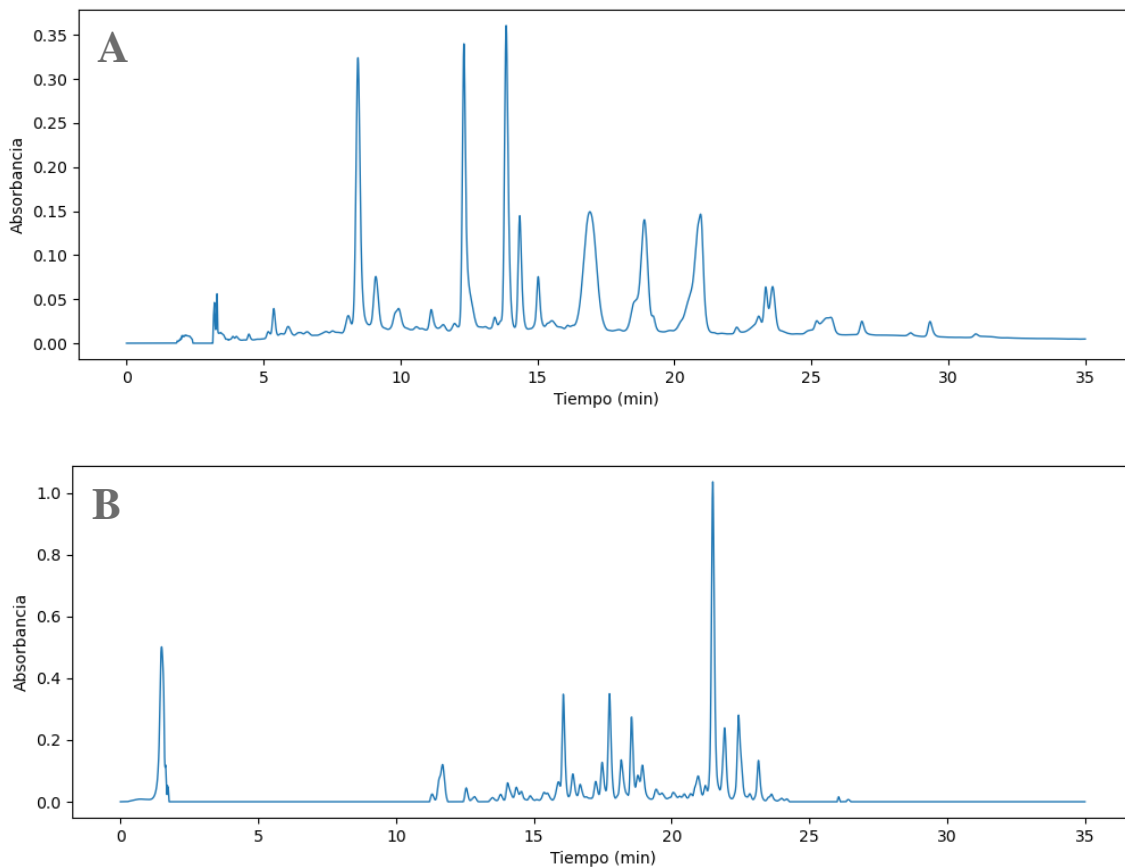


Figura 14. Perfil cromatográfico en modo analítico de las fracciones seleccionadas: A) Fracción F₁₀, del extracto de *Aspergillus* sp. IQ-503; fase móvil ACN-H₂O (30:70) hasta 100 % de ACN por 30 min; B) Fracción F₄, proveniente del extracto de *Talaromyces* sp. IQ-567; fase móvil ACN-H₂O (35:65) hasta 100 % de ACN por 30 min.

Una vez optimizados los métodos cromatográficos para el aislamiento de los componentes presentes de cada muestra, cada una de las fracciones se resolvió por CLAE-DAD en modo semipreparativo (**Figura 15**).

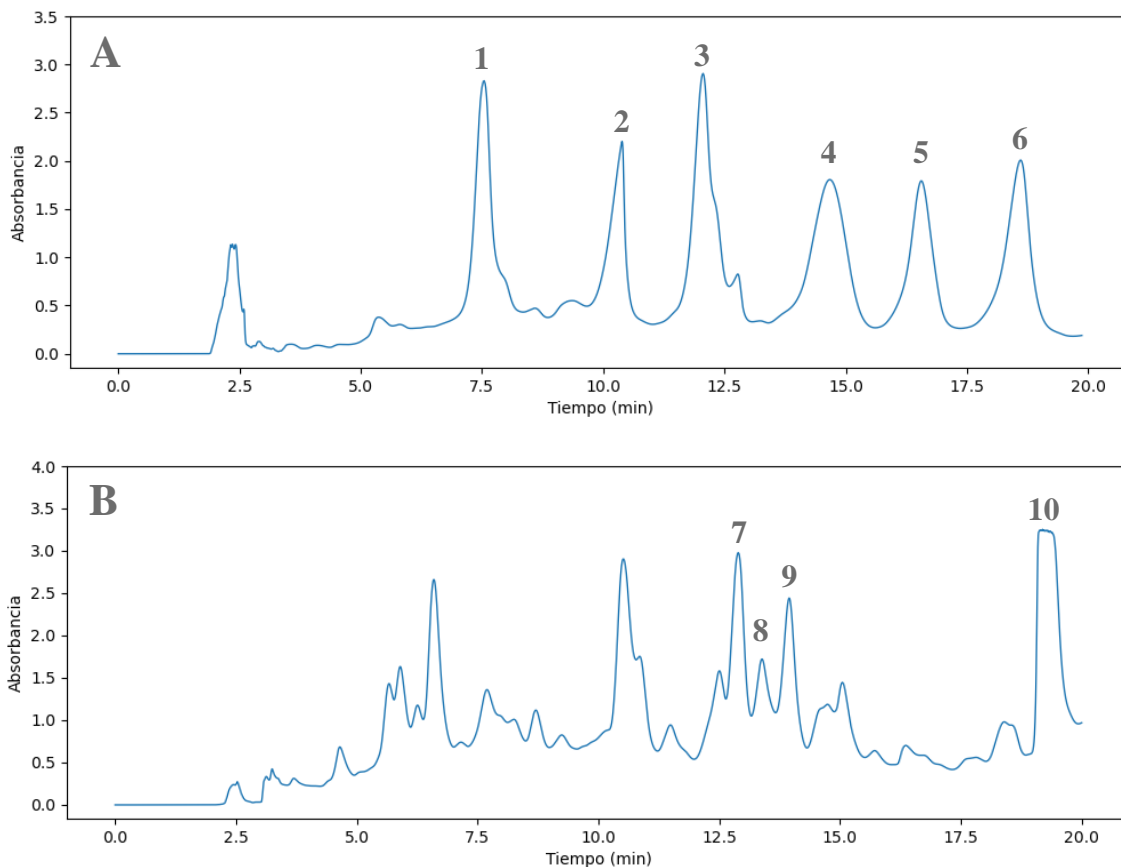


Figura 15. Perfil cromatográfico en modo semi-preparativo de las fracciones seleccionadas. A) Moléculas aisladas a partir de la fracción F₁₀, del extracto fúngico IQ-503; B) Moléculas aisladas a partir de la fracción F₄, del extracto fúngico IQ-567.

6.3 Caracterización química

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en los equipos Avance III 400 MHz (¹H) y Bruker AVANCE III HD 700 MHz (¹H) y 175 MHz (¹³C). Los análisis bidimensionales se obtuvieron en el equipo Bruker AVANCE III HD 700 MHz utilizando CDCl₃ y/o CD₃OD como disolvente. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm (δ). El procesamiento de los espectros se realizó con el programa MestreNova (versión 14.2.0, Mestrelab Research, 2020).

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (ADTR) en un espectrómetro de masas The AccuTOF JMS-T100LC.

6.4 Ensayo de actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó por el método de microdilución utilizando una placa de 96 pozos y la cepa resistente *Acinetobacter baumannii* A564, aislada de un paciente pediátrico del Instituto Nacional de Pediatría, CDMX, proporcionada por el Dr. Rodolfo García Contreras (FACMED-UNAM).

El procedimiento se realizó en condiciones de estricta esterilidad. La bacteria se activó realizando una suspensión en caldo Müeller Hinton (MH) e incubando durante 18-24 h a 37 °C. Posteriormente, se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana a 0.5 unidades del estándar de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL)⁴⁰, que corresponde a 0.08-0.13 unidades de dispersión óptica (DO). La DO se midió en un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Plus a 600 nm. Los extractos, fracciones y moléculas se prepararon previamente utilizando DMSO como disolvente; los extractos y fracciones se evaluaron a 250 ppm y las moléculas se evaluaron a 100 ppm. Se utilizó como control positivo el fármaco antimicrobiano gentamicina a una concentración de 100 ppm y como control negativo (control de crecimiento) el medio de cultivo con la suspensión bacteriana y DMSO al 2 %. La lectura de la microplaca de 96 pozos se realizó en el equipo Cytation⁵ (BioTek®) a una longitud de onda de 600 nm. La primera lectura (t_1) se realizó una vez terminado el llenado de los pozos. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación se leyó la microplaca en el mismo equipo a una longitud de onda $\lambda=600$ nm (t_2).

Utilizando ambos datos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia}_{t_2} - \text{Absorbancia}_{t_1}}{\text{Absorbancia control}_{t_2} - \text{Absorbancia control}_{t_1}} \right) 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde Absorbancia control se refiere a la absorbancia del control negativo (control de crecimiento).

6.5 Ensayo de actividad de la proteína AbFtsZ

Para realizar la evaluación de la actividad de la proteína AbFtsZ se siguieron los protocolos reportados por Quan, A. *et al.*, Martín-García, F. *et al.*, y Mukherjee, A. *et al.*, con algunas modificaciones.^{41, 42, 43}

La proteína *AbFtsZ*, expresada y purificada en el grupo de trabajo se encuentra congelada a -80°C en pequeñas alícuotas, para su correcto descongelamiento se sumergió en agua fría durante un minuto exacto, posteriormente, se dejó en hielo durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la proteína se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C utilizando una centrífuga AccuSpin Micro 17R (*Fisher-Scientific™*). Utilizando el sobrenadante se midió la absorbancia de la proteína utilizando el equipo NanoDrop One (*ThermoScientific™*) a una longitud de onda de 280 nm, así, se calculó la concentración de la proteína en la alícuota utilizada.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos empleando solución amortiguadora de ensayo (2.5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-base, 200 mM KCl), GTP (50 μM), proteína *AbFtsZ* (4 μM), Berberina en DMSO (186 ppm) y las moléculas evaluadas disueltas en DMSO a una concentración de 100 ppm (concentración final en pozo, en un volumen de 100 μL). Para realizar el experimento se colocó un blanco para cada muestra (solución amortiguadora de ensayo, GTP (50 μM) y DMSO (2%). Como control de actividad GTPasa de la proteína se utilizó solución amortiguadora de ensayo, DMSO (2 %), GTP (50 μM) y proteína *AbFtsZ* (4 μM). Como control de inhibición de la actividad GTPasa se utilizó Berberina en DMSO (186 ppm) junto con los reactivos previamente mencionados. Una vez preparados los pozos de reacción la placa se incubó por 30 minutos a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación a cada pozo se le añadieron 20 μL de reactivo de verde de malaquita fresco, se realizó una homogenización suave durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm en el lector de microplacas Cytation⁵ (*BioTek®*).

El porcentaje de actividad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Actividad} = \left(\frac{\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco de muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{Control de Actividad}}} \right) 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde Control de Actividad se refiere a la absorbancia de la actividad de la proteína *AbFtsZ* sin muestra problema.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de los microorganismos de estudio

El presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto de investigación enfocado en la búsqueda de moléculas con actividad antibacteriana a partir de microorganismos fúngicos colectados en ecosistemas poco explorados del territorio nacional (lagunas de manglares) y tiene como objetivo el aislamiento de productos naturales bioactivos contra la cepa clínica *Acinetobacter baumannii* A564 y/o que funjan como ligantes de la proteína FtsZ de esta cepa.

El estudio comenzó con la selección de los taxones fúngicos a estudiar con base en los resultados de actividad biológica determinada en un cribado preliminar (trabajo realizado previamente por el grupo de investigación) y considerando los perfiles metabólicos de los microorganismos seleccionados, obtenidos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplados a espectrometría de masas (CLAE-EM) y analizados por redes moleculares. Con base en estos resultados, se seleccionaron los microorganismos *Aspergillus* sp. IQ-503 y *Talaromyces* sp. IQ-567 para su estudio químico. En la **Tabla 5** se indica la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos correspondientes a las cepas seleccionadas.

Tabla 5. Actividad antibacteriana frente a *A. baumannii* A564 de los extractos fúngicos de los aislamientos IQ-503 e IQ-567 cultivados en PDA, evaluados a 250 ppm.

Hongo	% Actividad antibacteriana
<i>Aspergillus</i> sp. IQ-503	59.3 ± 9
<i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	75.0 ± 5
Gentamicina*	20 ± 8

* La gentamicina fue utilizada como control positivo en el ensayo (100 ppm).

Para incrementar el rendimiento de los extractos orgánicos, los microorganismos seleccionados (IQ-503 e IQ-567) se fermentaron en medio sólido (Cheerios®) de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección **6.2.1**. Transcurrido el tiempo de cultivo, se prepararon los extractos orgánicos y se evaluó su actividad antibacteriana nuevamente (**Tabla 6**), atendiendo posibles variaciones por cambios en la composición del extracto por las diferencias en los medios de cultivo.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de los extractos fúngicos de los hongos IQ-503 e IQ-567 cultivados en Cheerios®, evaluados a 250 ppm.

Hongo	Rendimiento (g)	% Actividad antibacteriana
<i>Aspergillus</i> sp. IQ-503	4.3	60.8 ± 5
<i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	1.1	60.9 ± 8
Gentamicina*	NA	20 ± 8

NA: No aplica. * La gentamicina fue utilizada como control positivo en el ensayo (100 ppm).

7.1 Estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos de *Aspergillus* sp. IQ-503 y *Talaromyces* sp. IQ-567

Posteriormente, se realizó su estudio químico empleando un conjunto de métodos cromatográficos guiados por ensayos de actividad antibacteriana frente a la cepa de interés. En esta sección se discuten los resultados obtenidos del aislamiento y caracterización química de los productos obtenidos, así como los resultados de actividad antibacteriana y actividad frente a la enzima *AbFtsZ* de los productos caracterizados.

7.1.1 Fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos de *Aspergillus* sp. IQ-503 y *Talaromyces* sp. IQ-567

El fraccionamiento primario de los extractos fúngicos de *Aspergillus* sp IQ-503 (**Figura 12**) y *Talaromyces* sp. IQ-567 (**Figura 13**), condujo a la obtención de 26 y 14 fracciones, respectivamente. Posteriormente, con base en el rendimiento obtenido y la complejidad del perfil cromatográfico (ver **Anexo I**), se seleccionaron las fracciones mostradas en las **Tabla 7**, para su evaluación biológica.

Tabla 7. Inhibición del crecimiento bacteriano de las fracciones evaluadas frente *A. baumannii* A564, a una concentración de 250 ppm.

Hongo	Fracción	% Actividad antibacteriana
<i>Aspergillus</i> sp. IQ-503	10	38.3 ± 7
	19	NP
	20	NP
	21	10.3 ± 2
<i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	4	39.9 ± 7
	11	12.9 ± 4
	14	NP
Gentamicina*	NA	20 ± 8

NP: No Presentó, NA: No Aplica, n=4. * La gentamicina fue utilizada como control positivo en el ensayo (100 ppm).

Los resultados de esta evaluación biológica permitieron seleccionar las fracciones F₁₀ y F₄ de *Aspergillus* sp IQ-503 y *Talaromyces* sp. IQ-567, respectivamente, para continuar con el aislamiento de sus componentes. La resolución de la complejidad química de las fracciones activas por CLAE en modo semipreparativo, condujo a la obtención de 10 moléculas con posible actividad antibacteriana (**Tabla 8**).

Tabla 8. Rendimientos obtenidos de los metabolitos aislados mediante CLAE-DAD.

Hongo	Fracción	Molécula	Rendimiento (mg/100 g de medio de cultivo)
<i>Aspergillus</i> sp. IQ-503	10	1	7.1*
		2	2.1*
		3	2.4*
		4	1.4
		5	1.5
		6	1.1
<i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	4	7	1.8
		8	0.2
		9	0.3
		10	8.0*

* Moléculas seleccionadas para los ensayos biológicos, teniendo en cuenta rendimiento y/o pureza confirmada por ¹H-RMN.

De este conjunto de moléculas, sólo los marcados con asterisco se seleccionaron para evaluación biológica, los restantes se descartaron debido a su bajo rendimiento y presencia de mezclas.

7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados

Los metabolitos seleccionados se evaluaron en el ensayo de inhibición bacteriana con el fin de encontrar los compuestos bioactivos; paralelamente también se evaluó su potencial en el ensayo de actividad enzimática de *AbFtsZ*, con el fin de relacionar su actividad antimicrobiana con un posible mecanismo de acción. Los resultados obtenidos (**Tabla 9**) se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano respecto al control negativo y el porcentaje de actividad GTPasa de la proteína *AbFtsZ*.

Tabla 9. Actividad antibacteriana de los compuestos 1-3, 10 frente a la cepa *A. baumannii* A564, a una concentración de 100 ppm.

Molécula	Hongo	% Inhibición bacteriana	% Actividad GTPasa
1	<i>Aspergillus</i> sp. IQ-503	NP	95.6 ± 9
2		NP	103.0 ± 10
3		NP	123.3 ± 12
10	<i>Talaromyces</i> sp. IQ-567	38.2 ± 6	123.7 ± 16
Gentamicina (100 ppm)	NA	20 ± 9	NA
Berberina (186 ppm)	NA	NA	43 ± 5

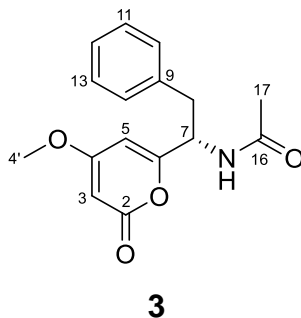
NP: no presentó actividad. NA: no aplica para este ensayo. n=4.

En la **Tabla 9** se observa que, de los cuatro compuestos evaluados en el ensayo de actividad de la enzima *AbFtsZ*, sólo dos (**3** y **10**) presentaron resultados promisorios. El compuesto **3**, por ejemplo, provocó un aumento en la actividad enzimática de la proteína indicando una interacción con *AbFtsZ*. Este es el primer reporte de una molécula de origen fúngico de unión a la enzima *FtsZ* de *A. baumannii*. Por otro lado, el compuesto **10**, fue el único que presentó inhibición del crecimiento bacteriano, superando a la gentamicina (antibiótico de amplio espectro). Cabe destacar que esta cepa bacteriana es panresistente e intrahospitalaria y encontrar una molécula que actúe sobre ella es de gran relevancia. Además, el compuesto **10**, también aumentó la actividad de *AbFtsZ*. Con base en estos resultados es posible que la actividad antibacteriana de **10** esté relacionada con la desestructuración del anillo Z (conformado por polímeros de *FtsZ*).

Debido a la actividad biológica presentada por las moléculas **3** y **10**, se estableció la estructura química de ambos productos con base en los resultados obtenidos de diversos análisis, tanto espectroscópicos (RMN de una y dos dimensiones) como espectrométricos (espectrometría de masas).

7.3 Elucidación estructural

7.3.1 Elucidación estructural del pirofeno (3)



El compuesto **3** se aisló como un sólido de color blanco. Su fórmula molecular se estableció como $C_{16}H_{17}NO_4$ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada $[M+H]^+$ $C_{16}H_{18}NO_4$: 288.1225 uma (**Figura 16**), calculada para $[M+H]^+$ $C_{16}H_{18}NO_4^+$: 288.1235 uma ($\Delta=3.5$ ppm), permitiendo nueve grados de insaturación (Ω).

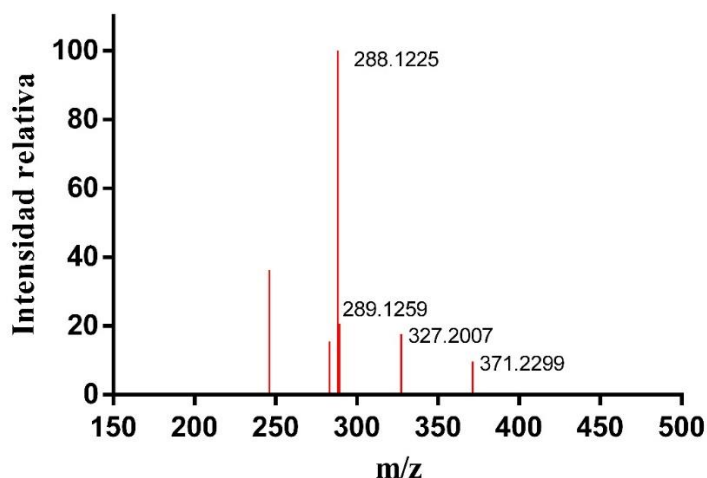


Figura 16. Espectro de masas por DART+ para el compuesto **3**.

Las señales características observadas en los espectros de RMN uni- y bidimensional (**Figuras 17-20** y **Tabla 10**) permitieron establecer la estructura del compuesto **3** como el pirofeno.^{44,45} A continuación se resumen las características más importantes observadas para esta molécula en los espectros de RMN.

- a) En el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 18**) se observan señales para 14 tipos de carbonos, de las cuales, dos corresponden a grupos carbonilo (δ_c 166.8, δ_c 172.9) y dos corresponden a carbonos vinílicos base de oxígeno (δ_c 173.4, δ_c 164.3).

- b) El carbono en posición C-3 (δ_C 89.0) presenta un desplazamiento poco convencional; al ser un carbono de hibridación sp^2 se espera un desplazamiento mayor a 100 ppm, sin embargo, se encuentra por debajo de dicho desplazamiento. Esto se debe a la presencia de un éster de enol.
- c) En el espectro de RMN 1H (**Figura 17**) las señales δ_H 7.20 (m, H-12), 7.21 (d, $J = 7.3$, H-10, H-14) y 7.27 (dt, $J = 8.0, 6.9$, H-11, H-13) corresponden a la presencia de un anillo aromático monosustituido.
- d) En δ_H 2.99 (dd, $J = 13.7, 8.7$) y δ_H 3.16 (dd, $J = 13.7, 6.9$) se registran dos señales correspondientes a un grupo metileno con hidrógenos diasterotópicos.
- e) Las correlaciones observadas en el experimento HSQC (**Figura 19**) permitieron identificar la presencia de ocho metinos (δ_C/δ_H 130.2/7.21, δ_C/δ_H 129.6/7.27, δ_C/δ_H 127.9/7.20, δ_C/δ_H 101.8/6.00, δ_C/δ_H 89.0/5.55, δ_C/δ_H 54.1/4.91), un metoxilo (δ_C/δ_H 57.0/3.82) y un grupo metilo (δ_C/δ_H 22.3, 1.90).
- f) Las señales registradas en δ_H 5.55 (d, $J = 2.2$) y 6.00 (d, $J = 2.2$) corresponden a dos protones presentes en las posiciones H-3 y H-5 en el anillo de 2-pirona.
- g) La señal correspondiente al grupo amida no se observa debido a un intercambio del protón con el disolvente utilizado para registrar el espectro (CD_3OD).

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN (1H , 700 MHz; ^{13}C , 175 MHz, δ en ppm; J en Hz; CD_3OD) del pirofeno (**3**).

Posición	δ_C	δ_H , mult (J en Hz)	δ_C ^{44,45 *}	δ_H , mult (J en Hz) ^{44,45 *}
2	166.8		164.4	
3	89.0	5.55, d (2.2)	88.6	5.41, d (2.2)
4	173.4		171.0	
4'	57.0	3.82, s	56.1	3.75, s
5	101.8	6.00, d (2.2)	101.3	5.74, d (2.2)
6	164.3		161.3	
7	54.1	4.91, q (8.7)	52.5	5.00, q (8.0)
8	39.3	a: 2.99, dd (13.7, 8.7) b: 3.16, dd (13.7, 6.9)	39.1	3.10, d (7.6)
9	138.1		135.9	
10,14	130.2	7.21, d (7.3)	129.2	7.11, m
11,13	129.6	7.27, dt (8.0, 6.9)	128.9	7.27, m
12	127.9	7.20, m	127.3	7.23, m
15		NR		5.95, d (8.5)
16	172.9		169.6	
17	22.3	1.90, s	23.4	1.96, s

* Datos registrados utilizando $CDCl_3$ como disolvente a 500 MHz (1H) y 125 MHz (^{13}C)

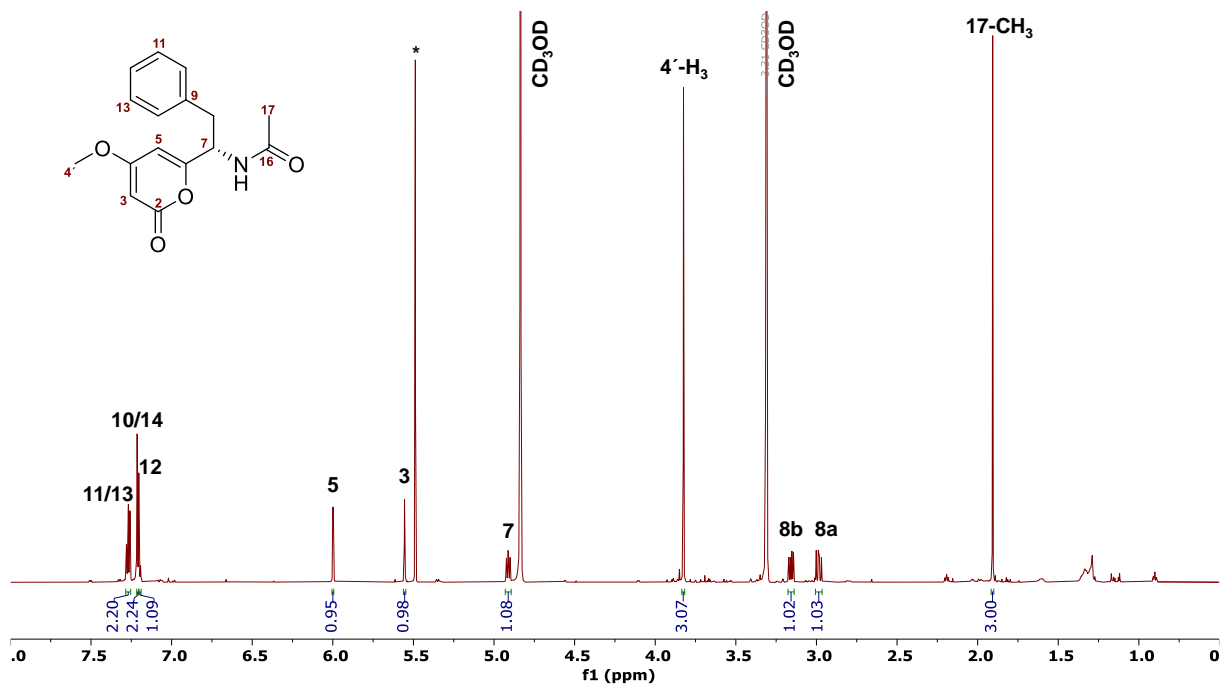


Figura 17. Espectro de ¹H-RMN para la molécula 3.

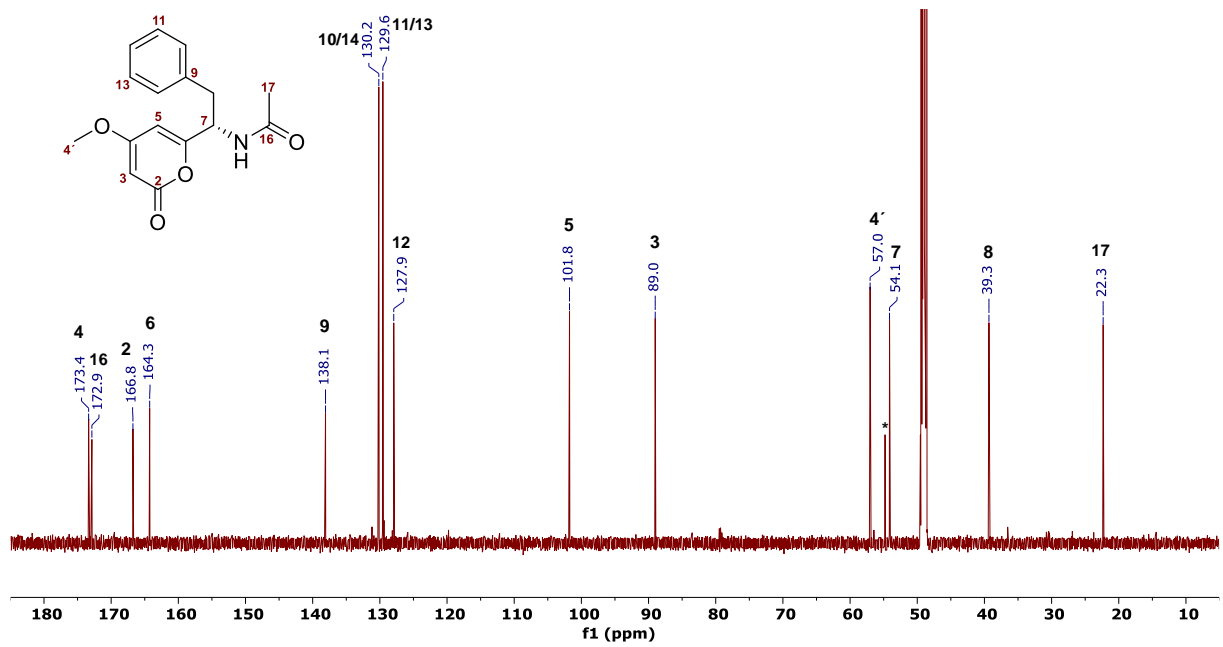


Figura 18. Espectro de ¹³C-RMN para la molécula 3.

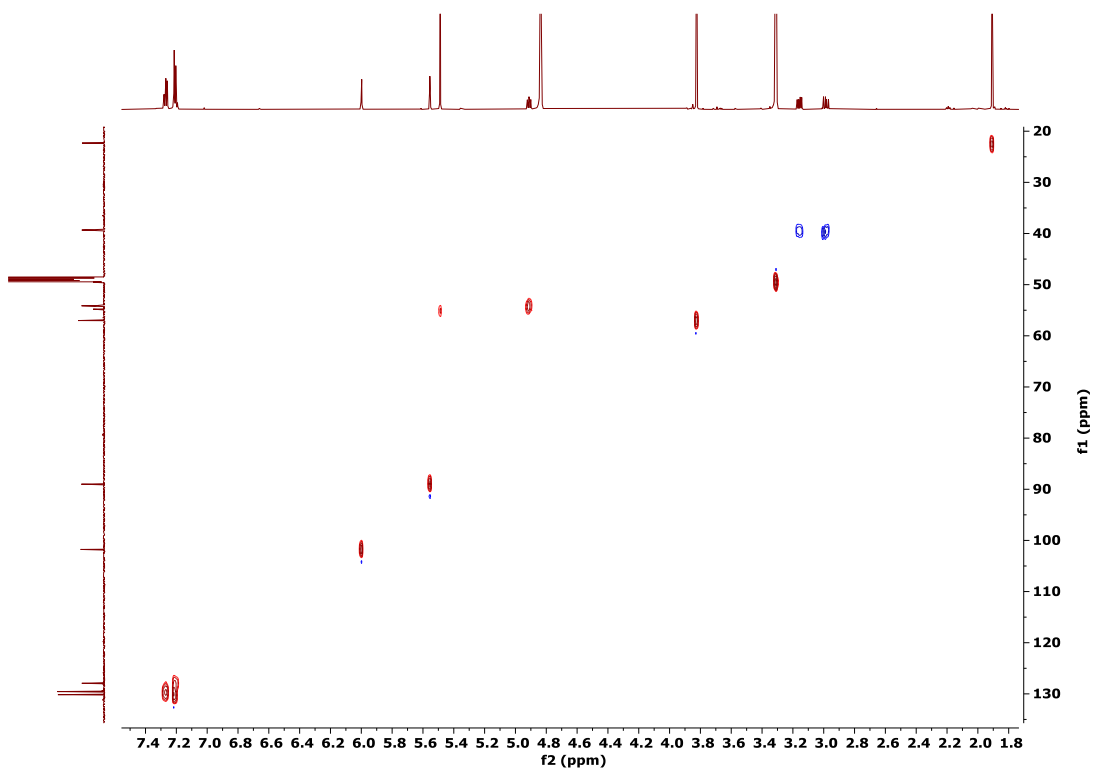


Figura 19. Espectro bidimensional de correlaciones HSQC para la molécula **3**.

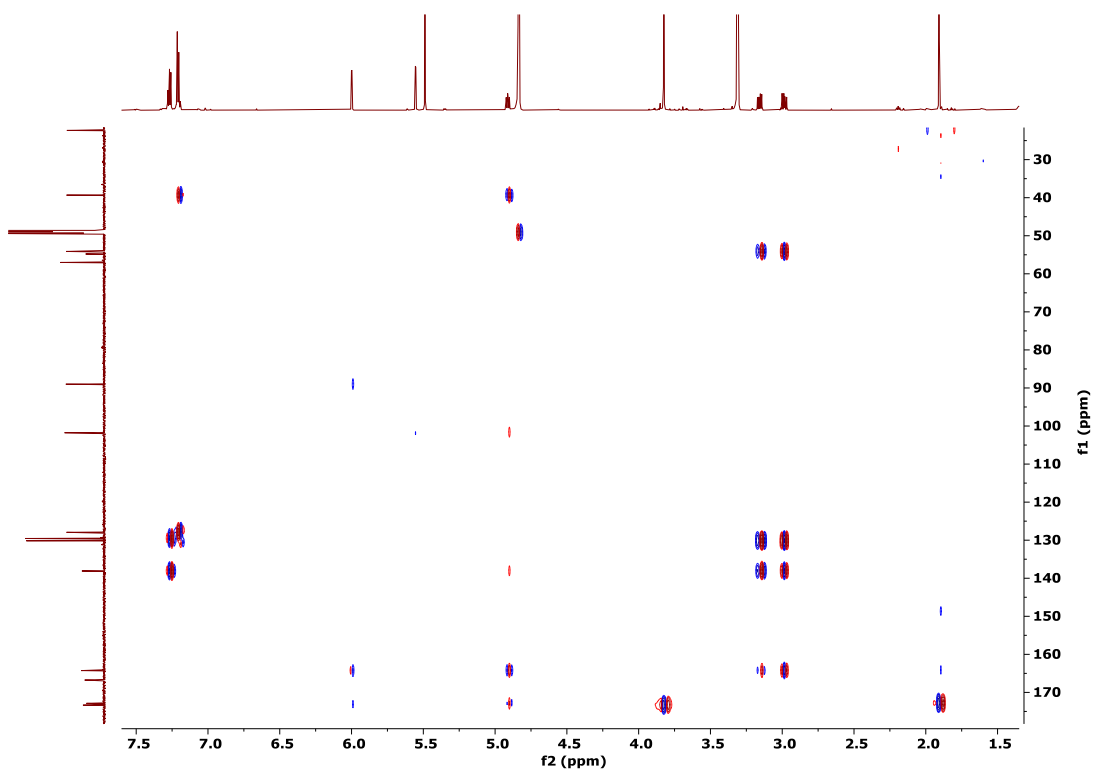
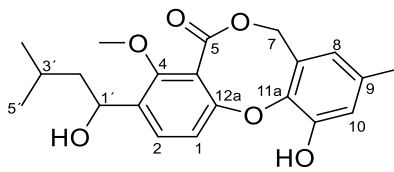


Figura 20. Espectro bidimensional de correlaciones HMBC para la molécula **3**.

7.3.2 Elucidación estructural de la penicilida (10)



10

La estructura química del producto **10** se estableció a través del análisis exhaustivo de un conjunto de datos espectrométricos (**Figura 21**) y espectroscópicos (RMN de una y dos dimensiones, **Figuras 22-26**). La masa exacta para la especie protonada $[M+H]^+$ m/z : 373.1673, permitió establecer la fórmula molecular como: $C_{21}H_{25}O_6^+$ 373.1651 ($\Delta=5.8$ ppm), con un índice de deficiencia de hidrógenos de 10 ($\Omega=10$).

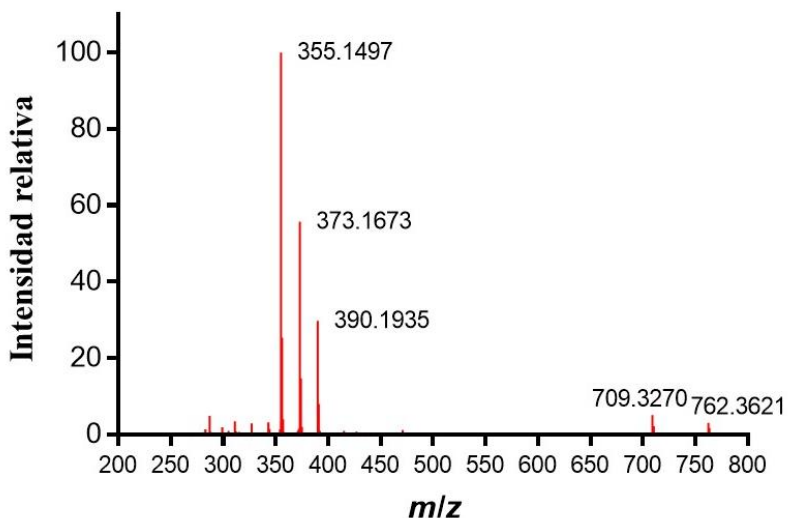


Figura 21. Espectro de masas por DART+ para el compuesto **10**.

Las señales observadas en los espectros de RMN (**Tabla 11**) que permitieron la elucidación química del compuesto se detallan a continuación:

- En el espectro de RMN 1H (**Figura 22**) se observaron en δ_H 6.36 (m, H-8), δ_H 6.85 (m), δ_H 6.86 (s) y δ_H 7.54 (d, $J = 8.4$) cuatro señales correspondientes a los hidrógenos de los anillos aromáticos tetrasustituidos.
- Por otro lado, se observan señales asignables a tres grupos metilo, uno de ellos sobre un sistema aromático en δ_H 2.23 (s), δ_H 0.98 (d, 6.6) y δ_H 0.96 (d, 6.6) correspondientes a las posiciones H-9a, H-5' y H-4', respectivamente.

- c) Con base en las correlaciones observadas en el experimento HSQC (**Figura 26**), se determinó que las señales en $\delta_H 5.07$ (s) y $\delta_H 5.07$ (dd, $J = 9.2, 4.2$), las cuales en conjunto integran para 3 hidrógenos son asignables a un metileno (C-7) y un metino (C-1') base de oxígeno.
- d) Las señales registradas en el espectro de RMN 1H (**Figura 22**) y sus correlaciones en el experimento HSQC (**Figura 26**) permitieron identificar la presencia de un metino vecino a un heteroátomo ($\delta_C/\delta_H 66.9/5.07$), un metileno unido a oxígeno ($\delta_C/\delta_H 69.2/5.07$), un metileno con hidrógenos diasterotópicos ($\delta_C/\delta_H 47.8/1.47, 1.67$), un metoxilo ($\delta_C/\delta_H 62.8/3.97$) y un metino adyacente ($\delta_C/\delta_H 25.1/1.78$) a un grupo gem dimetilo ($\delta_C/\delta_H 21.9, 23.6/0.96, 0.98$).
- e) El registro de las señales en RMN ^{13}C (**Figura 23**) permitió identificar 20 tipos de carbonos, de estos, la señal en $\delta_C 167.7$ corresponde a un grupo carbonilo, las señales en $\delta_C 154.7, 147.5, 141.5$, corresponden a carbonos aromáticos base de oxígeno, mientras que la señal el $\delta_C 69.2$ corresponde a un carbono alifático base de oxígeno.
- f) La señal en $\delta_C 117.8$ es asignable a dos carbonos aromáticos en las posiciones C-10 y C-1.

Con base en esta información, el análisis detallado de las correlaciones observadas en el espectro HMBC y los datos espectroscópicos registrados en la literatura, se determinó que el compuesto **10** corresponde a la penicilida.⁴⁶

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 700 MHz; ^{13}C , 175 MHz, δ en ppm; J en Hz; CDCl_3) de la penicilida (**10**).

Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (J en Hz)	δ_{C}^{46} *
1	117.8	6.86, s	117.7
2	131.1	7.54, d (8.4)	131.0
3	137.1		136.9
4	154.7		154.3
4a	119.7		119.4
5	167.7		167.9
7	69.2	5.07, s	69.1
7a	125.9		125.7
8	120.9	6.36, m	120.6
9	135.2		134.9
10	117.8	6.85, m	117.7
11	147.5		147.5
11a	141.5		141.3
12a	151.5		151.3
1'	66.9	5.07, dd (9.2, 4.2)	66.6
2'	47.8	a: 1.47, m b: 1.67, m	47.6
3'	25.1	1.78, m	24.9
4'	21.9	0.96, d (6.6)	21.8
5'	23.6	0.98, d (6.6)	23.3
4-OMe	62.8	3.97, s	62.6
9-Me	21.0	2.23, s	20.8

* Datos registrados utilizando CDCl_3 como disolvente a 100 MHz (^{13}C).

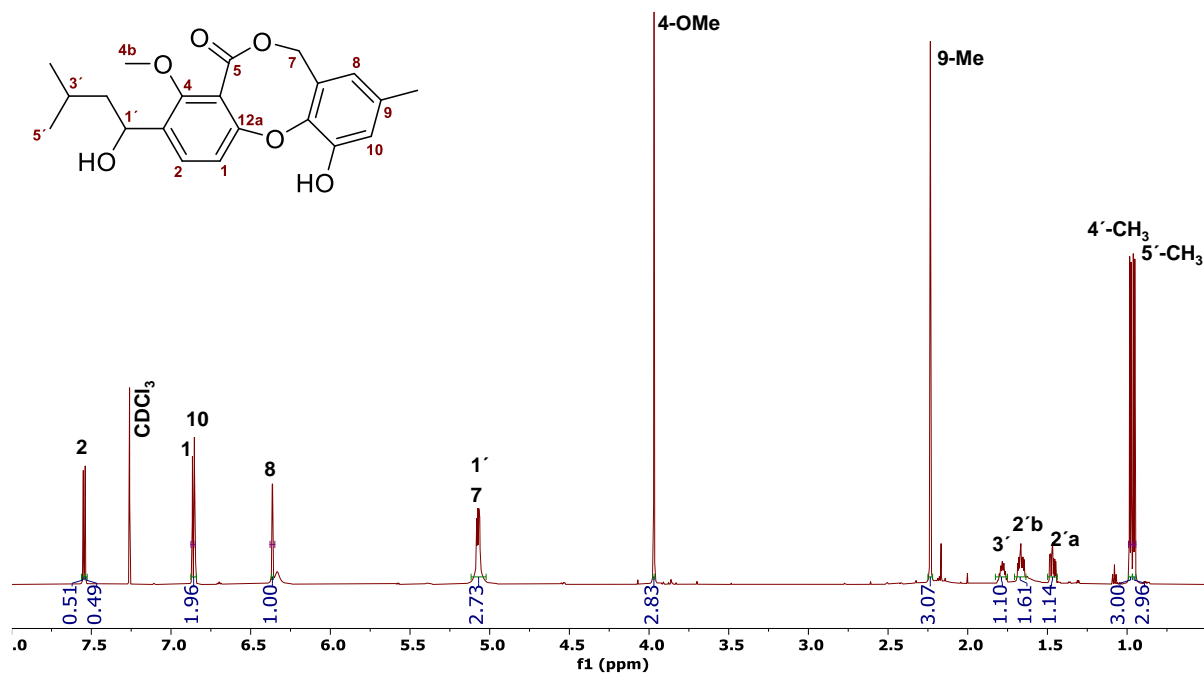


Figura 22. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ para la molécula 10.

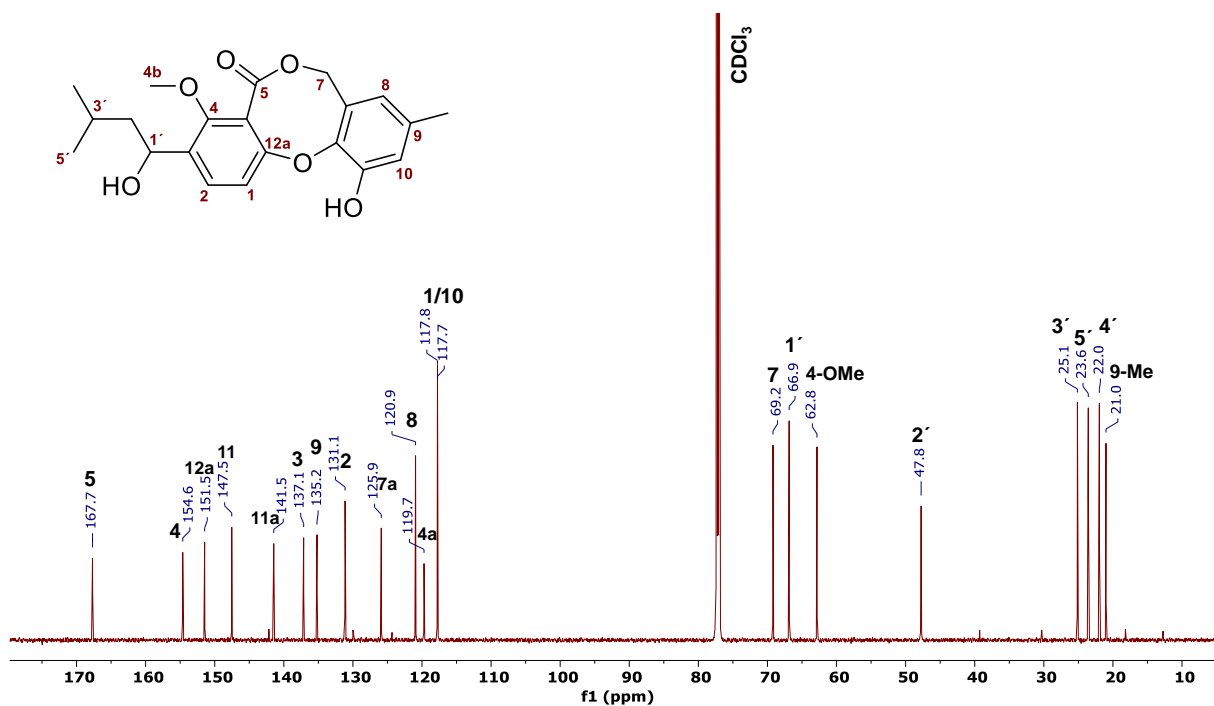


Figura 23. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ para la molécula 10.

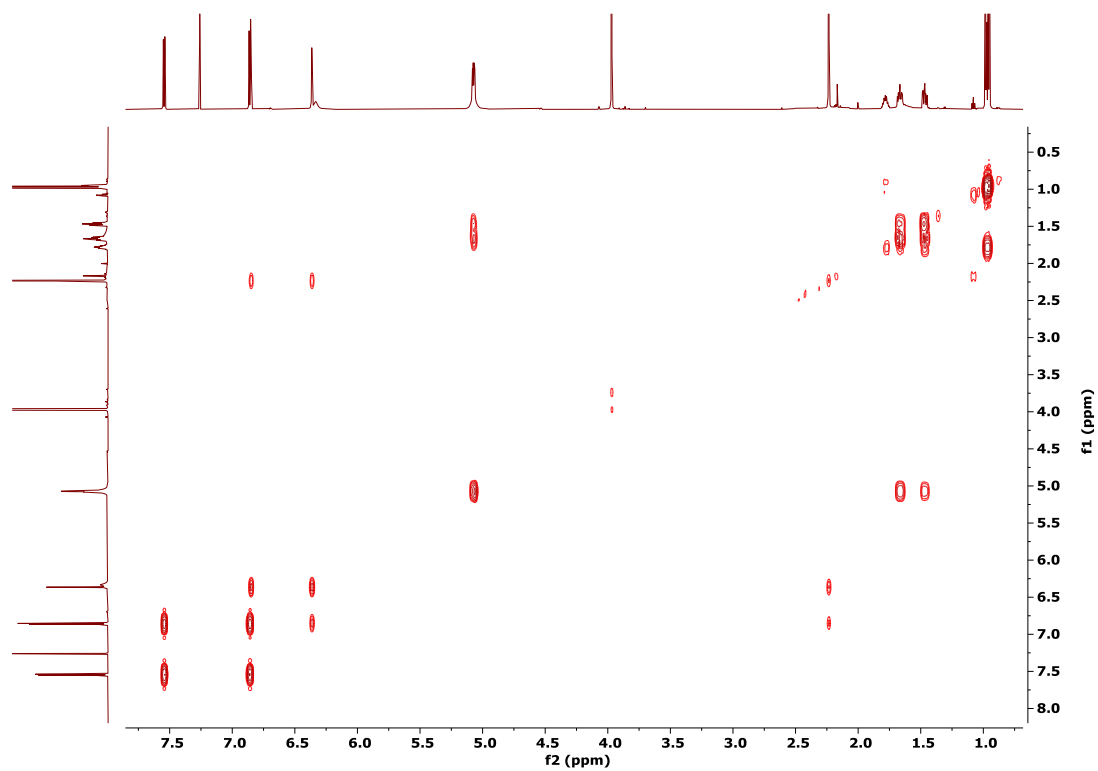


Figura 24. Espectro bidimensional de correlaciones COSY para la molécula **10**.

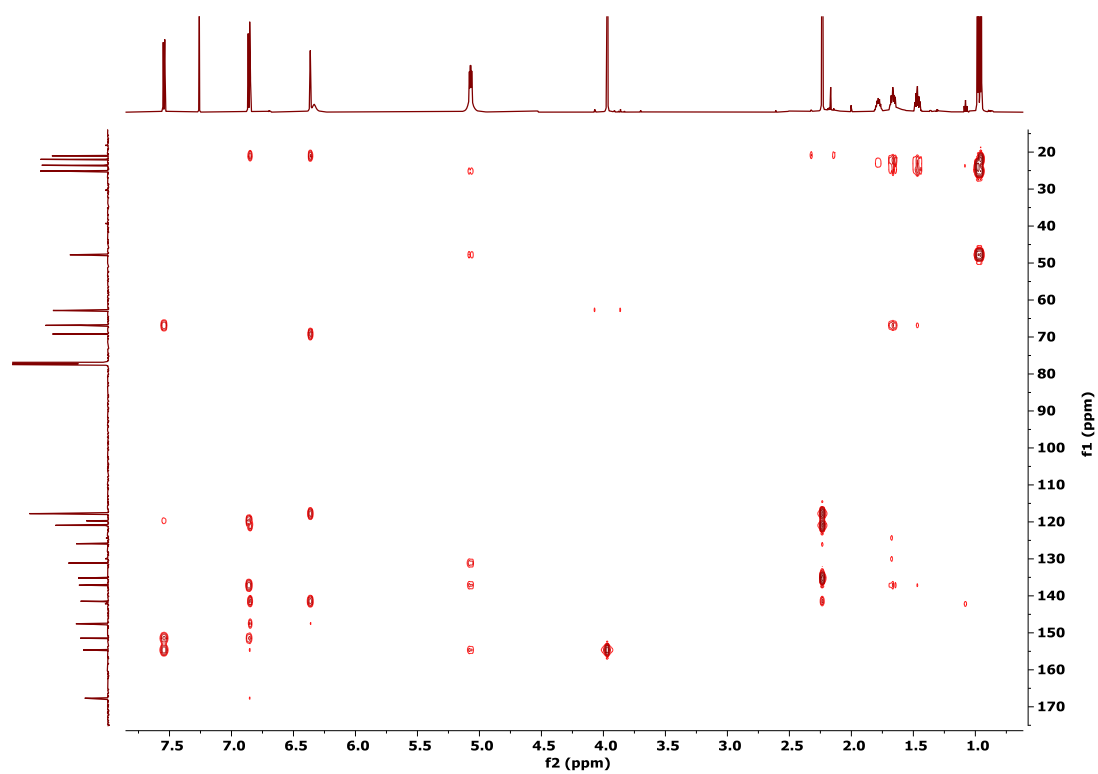


Figura 25. Espectro bidimensional de correlaciones HMBC para la molécula **10**.

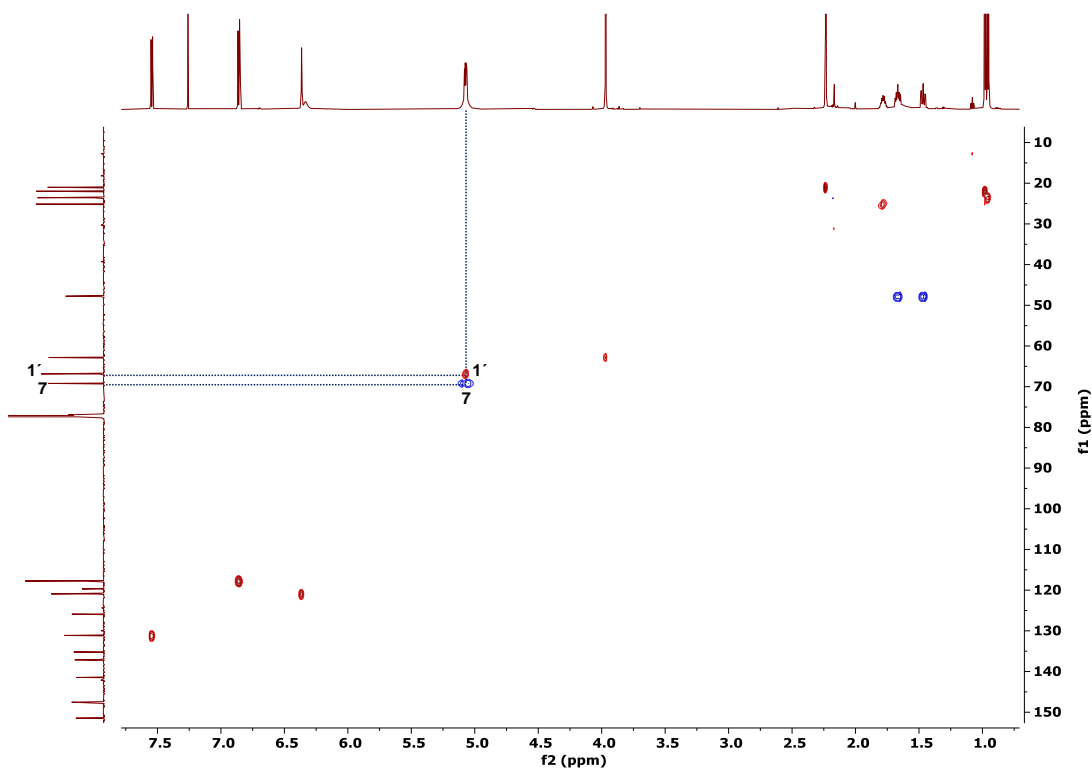


Figura 26. Espectro bidimensional de correlaciones HSQC para la molécula **10**.

El compuesto **3** es una 4-metoxi-2-pirona derivado del aminoácido fenilalanina,⁴⁷ y un policétido pequeño, también ha sido aislado de otras especies fúngicas como *Aspergillus brasiliensis*,⁴⁸ *Aspergillus welwitschiae* CUGBMF180262, una cepa muy cercana morfológicamente con *A. niger*,⁴⁹ *Aspergillus niger* obtenido del tallo del líquen que forma con el alga *Parmotrema ravum* recolectada en la India y *Aspergillus* sp. proveniente de *Piper crocatum*.^{50, 51} De acuerdo con los ensayos biológicos realizados por diversos autores, el pirofeno (**3**) presenta actividad antibacteriana contra las cepas *Micrococcus luteus* (CI₅₀ 63 µg/mL), *Aeromonas hydrophila* (CI₅₀ 62 µg/mL) y *Listeria innocua* (CI₅₀ 82 µg/mL), asimismo, se reporta actividad antifúngica contra las cepas *Candida parapsilosis* (CI₅₀ 35 µg/mL), *C. utilis* (CI₅₀ 62 µg/mL) y *C. albicans* (CI₅₀ 74 µg/mL).^{50, 52} El pirofeno (**3**) es citotóxico contra las líneas celulares T47D y Vero, con valores de CI₅₀ 9.2 µg/mL y 109 µg/mL, respectivamente.⁵¹

Por otro lado, la penicilida (**10**) una dibenzodioxocina, ha sido aislada anteriormente de especies fúngicas como *Penicillium* sp. SYFz-1 proveniente de una muestra de suelo de mangle;⁵³ *Pestalotiopsis* sp. PSU-ES194, hongo endófito de la especie marina *Enhalus acoroides*,⁵⁴ *Talaromyces flavus* (ATCC 74110),⁵⁵ *Penicillium* sp. TGM112 microorganismo

endófito del manglar *Bruguiera sexangula* var. *rhyngopetala*,⁵⁶ así como del hongo marino *Talaromyces* sp. BTBU20213036 proveniente de una muestra de lodo recolectada en la región costera de Qingdao, en la provincia de Shandong.⁵⁷ Esta molécula ha sido evaluada en diversos ensayos biológicos, destacando su actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* con una CMI de 100 µg/mL.⁵⁷ Asimismo, se ha reportado su actividad citotóxica contra las líneas celulares cancerígenas H1975, MCF-7, K562, HL7702 a una concentración de 30 µM y actividad citotóxica contra la línea celular Vero con IC₅₀ 84 µM.^{53, 54} La penicilida también presentó actividad antioxidante en el ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}; actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa con una IC₅₀ de 490 µM,⁵⁶ por último, se destaca la actividad antagonista sobre la oxitocina (IC₅₀ 67 µM) y sobre todo, de sus derivados (mono acetato de penicilida IC₅₀ 8.4 µM).⁵⁵ Con base en lo anterior, la actividad antibacteriana mostrada por la molécula **10**, coincide con reportes previos.

Se han encontrado reportes sobre algunos ligantes de la enzima FtsZ como modificadores de su actividad enzimática. La molécula PC190723, inicialmente descrita como un inhibidor de la actividad GTPasa, sin embargo, posteriormente se comprobó que aumenta la actividad GTPasa de SaFtsZ y resensibiliza a las cepas MRSA ante los β-lactámicos.²³ De igual manera, los benzimidazoles SB-P3G2, SB-P17G-C2, 1a-G4 y 1a-G7 mejoran la actividad GTPasa de *Mtb*FtsZ e inhiben su polimerización; SB-P17G-C2 también desestabiliza y despolimeriza los polímeros de FtsZ previamente formados.^{20, 23, 58} La Vitamina K3 es un activador de la actividad GTPasa de *Spn*FtsZ con una subsecuente inhibición de la polimerización.⁵⁹ Estos activadores de la actividad GTPasa también interfieren con la polimerización de FtsZ, con la ubicación del anillo Z en la célula, inducen la despolimerización e inhiben la proliferación bacteriana.^{23, 59}

De hecho, el aumento en la actividad GTPasa de la proteína FtsZ desestabiliza los polímeros de FtsZ, conduciendo a la inhibición de la polimerización y la formación de filamentos debido a que los polímeros GTP-FtsZ son más estables que los polímeros GDP-FtsZ.^{58,60} El incremento en la hidrólisis de GTP provocaría la desestabilización de estos protofilamentos y la despolimerización de los polímeros ya formados debido a que la proteína FtsZ no se ensambla cooperativamente en presencia de GDP.⁶¹ Asimismo, este incremento en la actividad puede afectar el movimiento de cinta rodante del anillo Z (como lo hace la molécula MciZ, un antagonista del anillo Z)⁶² evitando su correcto ensamblaje y,

por ende, interfiriendo el ensamblaje de peptidoglicano y citocinesis, generando la lisis bacteriana.⁵⁹

Por lo anteriormente descrito, tanto el compuesto **3** como el **10** presentaron interacción sobre la enzima *AbFtsZ*, posicionando ambas moléculas como punto de partida para el desarrollo de derivados que mejoren la actividad antibacteriana sobre *A. baumannii* con un nuevo mecanismo de acción, ayudando así, a contrarrestar la RAM. Tomando en cuenta el perfil de resistencia de *A. baumannii* y la tasa de mortalidad asociada a este microorganismo, los resultados obtenidos son altamente promisorios, pues existen muy pocos compuestos con actividad antibacteriana frente a este patógeno.

8. CONCLUSIONES

- El fraccionamiento de los extractos orgánicos de los hongos *Aspergillus* sp. IQ-503 y *Talaromyces* sp. IQ-567 mediante técnicas cromatográficas permitió el aislamiento de los compuestos **3** y **10**, caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como pirofeno y penicilida, respectivamente.
- La evaluación biológica de las fracciones permitió identificar a las moléculas **3** y **10** como responsables de la actividad biológica observada en sus respectivos extractos orgánicos.
- El pirofeno (**3**) mejoró la actividad GTPasa del blanco molecular *AbFtsZ*, sin embargo, no presentó actividad antibacteriana. Por otro lado, la penicilida (**10**) presentó actividad antibacteriana contra *Acinetobacter baumannii* A564 y mejoró la actividad GTPasa de la proteína *AbFtsZ*.
- Este es el primer trabajo donde se reporta la capacidad del pirofeno (**3**) y de la penicilida (**10**) para interactuar con la enzima FtsZ, lo cual abre el campo de investigación sobre este tipo de moléculas para el posible desarrollo de antibióticos con un nuevo mecanismo de acción, y así, contrarrestar la farmacorresistencia.

9. REFERENCIAS

1. World Health Organization: WHO. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
3. Centers for Disease Control: CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
4. World Health Organization: WHO. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
5. Schneider, Y. K. (2021). Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics*, 10(7), 842. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070842>
6. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., y Blair, J. M. A. (2022). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
7. Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Juárez-Vignon-Whaley, J. J., Vaamonde, J. A. A., Alonzo, L. F., Reséndiz, A. R., Álvarez, M. A., López, E., Franyuti-Kelly, G., Álvarez-Hernández, D. A., Guzmán, V., Bañuelos, J., Felix, J. C., Barrios, J. M., y Fortes, T. B. (2020). *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics*, 9(4), 205. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205>
8. Davies, J., y Davies, D. R. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/mubr.00016-10>
9. Chellat, M. F., Raguž, L., y Riedl, R. (2016). Targeting Antibiotic Resistance. *Angewandte Chemie*, 55(23), 6600-6626. <https://doi.org/10.1002/anie.201506818>
10. World Health Organization: WHO. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

11. Martínez-Trejo, A., Ruiz-Ruiz, J. M., Gonzalez-Avila, L. U., Saldaña-Padilla, A., Hernández-Cortez, C., Loyola-Cruz, M. A., Bello-López, J. M., y Castro-Escarpulli, G. (2022). Evasion of Antimicrobial Activity in *Acinetobacter baumannii* by Target Site Modifications: An Effective Resistance Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms23126582>
12. Munita, J. M., y Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
13. Universidad Nacional Autónoma de México: UNAM. (2022). Resistencia antimicrobiana 2017 a 2020. <http://www.puis.unam.mx/divulgacion/docs/reportePUCRA17a20.pdf>
14. Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J., Rayo Morfín-Otero, M., Torres-López, F. y Alcántar-Curiel, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2), 172-180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
15. Novović, K., y Jovcic, B. (2023). Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. *Antibiotics*, 12(3), 516. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030516>
16. Tripathy, S., y Sahu, S. K. (2019). FtsZ inhibitors as a new genera of antibacterial agents. *Bioorganic Chemistry*, 91, 103169. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103169>
17. Kusuma, K. D., Payne, M. J., Ung, A. T., Bottomley, A. L., y Harry, E. J. (2019). FtsZ as an Antibacterial Target: Status and Guidelines for Progressing This Avenue. *ACS Infectious Diseases*, 5(8), 1279-1294. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00055>
18. Barrows, J. M., y Goley, E. D. (2021). FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? *Current Opinion in Cell Biology*, 68, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.10.013>
19. Haranahalli, K., Tong, S., y Ojima, I. (2016). Recent advances in the discovery and development of antibacterial agents targeting the cell-division protein FtsZ. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 24(24), 6354-6369. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.003>
20. Silber, N., De Opitz, C. L. M., Mayer, C., y Sass, P. (2020). Cell division protein FtsZ: from structure and mechanism to antibiotic target. *Future Microbiology*, 15(9), 801-831. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0348>
21. Egan, A. J. F., Errington, J., y Vollmer, W. (2020). Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 446-460. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3>

22. Hurley, K. A., Santos, T. M., Nepomuceno, G. M., Huynh, V., Shaw, J. T., y Weibel, D. B. (2016). Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(15), 6975-6998. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01098>
23. Alamgir, A. (2018) Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: *Phytochemistry and Bioactive Compounds*. (Vol 2.)
24. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., y Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200-216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
25. Schneider, Y. K. (2021b). Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics*, 10(7), 842. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070842>
26. Harvey, A. R., Edrada-Ebel, R., y Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111-129. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>
27. Newman, D., y Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
28. Patridge, E., Gareiss, P. C., Kinch, M. S., y Kinch, M. S. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204-207. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>
29. Jakubczyk, D., y Dussart, F. (2020b). Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. *Molecules*, 25(4), 911. <https://doi.org/10.3390/molecules25040911>
30. Schueffler, A., y Anke, T. (2014c). Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.*, 31(10), 1425-1448. <https://doi.org/10.1039/c4np00060a>
31. Lei, L., Gong, L., Jin, M., Wang, R., Liu, R., Gao, J., Liu, M., Huang, L., Wang, G., Tang, B. Z., y Deng, Y. (2022c). Research advances in the structures and biological activities of secondary metabolites from *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.984801>
32. Conabio. (s. f.). Manglares | Biodiversidad Mexicana. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/manglares>
33. SEMARNAT. (s.f.). Los manglares mexicanos. gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/manglares-mexicanos>

34. Holguin, G. y Bashan, Y. (2007). La importancia de los manglares y su microbiología para el sostenimiento de las pesquerías costeras. En *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, plantamicroorganismo*. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. (Capítulo 10). Editorial Trillas, Ciudad de México, México. pp. 239-253.
35. Ortíz, A., Robles, K., Urrego, L. y Romero, M. (2018). Diversidad e interacciones biológicas en el ecosistema manglar. *Revista de Ciencias*. 22(2): 111-127. doi: 10.25100/rc.v22i2.7925
36. Portillo, J. y Ezcurra, E. (2002) Los manglares de México: una revisión. *Madera y Bosques*. 27-51. ISSN: 1405-0471
37. Conabio. (s. f.). Sistema de Monitoreo de Manglares de México (SMMM) | Biodiversidad Mexicana. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/monitoreo/smmm>
38. Sosa- Rodríguez, T., Sánchez-Nieves, J. y Melgarejo, L. (2009). Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 38(1):39-57. ISSN: ISSN 0122-9761
39. Amézquita, J., Fernández, S. y Lezana, M. (2018). Resistencia antimicrobiana. *Boletín CONAMED*. <http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin22/Resistencia.pdf>
40. CLSI. (2018) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. (11° ed. CLSI standard M07). *Clinical and Laboratory Standards Institute*. https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
41. Quan, A., y Robinson, P. (2005). Rapid purification of native Dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Methods in Enzymology*, 404, 556-569. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)04049-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(05)04049-8)
42. Martín-García, F., Salvarelli, E., Mendieta-Moreno, J. I., Vicente, M., Mingorance, J., Mendieta, J., y Gómez-Puertas, P. (2012). Molecular Dynamics Simulation of GTPase activity in polymers of the cell division protein FtsZ. *FEBS Letters*, 586(8), 1236-1239. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.042>
43. Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., y Avaeva, S. M. (1988). A Malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 171(2), 266-270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90484-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90484-8)

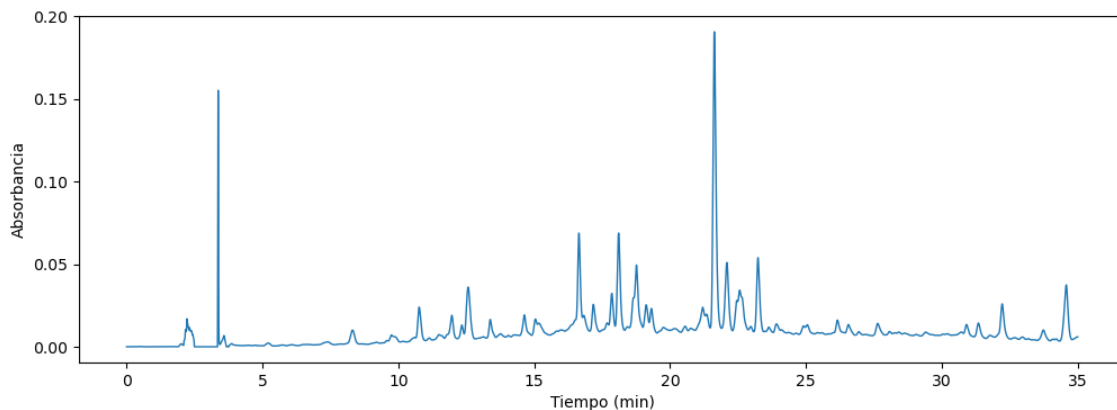
44. Fajardo, C. (2018). Actividad antimicrobiana de ascomicetos selectos de México [tesis de Maestría, UNAM], TESIUNAM.
45. Zhang, Y., Li, X., Feng, Y., y Wang, B. (2009). Phenethyl- α -pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Natural Product Research*, 24(11), 1036-1043. <https://doi.org/10.1080/14786410902940875>
46. Suzuki, K., Nozawa, K., Udagawa, S., Nakajima, S. y Kawai, K. (1991). Penicillide and dehydroisopenicillide from *Talaromyces derxii*. *Phytochemistry*, 30(6): 2096-2098. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85080-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85080-J)
47. Barnes, C. L., Steiner, J. R., Torres, E., Pacheco, R., y Marquez, H. (1990). Structure and absolute configuration of pyrophen, a novel pryrone derivative of L-phenylalanine from *Aspergillus niger*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 36(3), 292-296. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00981>
48. Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., y Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59, 53-66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
49. Han, J., Yang, N., Wei, S., Jia, J., Lin, R., Li, J., Bi, H., Song, F., y Xu, X. (2022). Dimeric hexylitaconic acids from the marine-derived fungus *Aspergillus welwitschiae* CUGBMF180262. *Natural Product Research*, 36(2), 578-585. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1793152>
50. Agrawal, S., Deshmukh, S. K., Reddy, M. V., Prasad, R., y Goel, M. (2020). Endolichenic fungi: A hidden source of bioactive metabolites. *South African Journal of Botany*, 134, 163-186. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.008>
51. Astuti, P., Erden, W., Wahyono, W., Wahyuono, S., y Hertiani, T. (2016). Pyrophen Produced by Endophytic Fungi *Aspergillus* sp. Isolated from Piper crocatum Ruiz y Pav Exhibits Cytotoxic Activity and Induces S Phase Arrest in T47D Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(2), 615-618. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.2.615>
52. Padhi, S., Evidente, A., Panda, S. K., Luyten, W., Cimmino, A., y Tayung, K. (2019). Antimicrobial secondary metabolites of an endolichenic *Aspergillus niger* isolated from lichen thallus of *Parmotrema ravum*. *Natural Product Research*, 34(18), 2573-2580. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1544982>

53. Tao, H., Wei, X., Lin, X., Zhou, X., Dong, J., y Yang, B. (2017). Penixanthonones A and B, two new xanthone derivatives from fungus *Penicillium* sp. SYFz-1 derived of mangrove soil sample. *Natural Product Research*, 31(19), 2218-2222. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1297442>
54. Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Supaphon, O., y Sakayaroj, J. (2015). Meroterpenoid, isocoumarin, and phenol derivatives from the seagrass-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-ES194. *Tetrahedron*, 71(5), 882-888. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.009>
55. Salituro, G., Pettibone, D. J., Clineschmidt, B. V., Williamson, J. M., y Zink, D. L. (1993). Potent, non-peptidic oxytocin receptor antagonists from a natural source. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 337-340. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)80905-7](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)80905-7)
56. Zeng, W., Cai, J., Wang, B., Chen, L., Pan, C., Chen, S., Huang, G., y Zheng, C. (2021). A new bioactive isocoumarin from the mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. TGM112. *Journal of Asian Natural Products Research*, 24(7), 679-684. <https://doi.org/10.1080/10286020.2021.1952188>
57. Song, F., Dong, Y., Wei, S., Zhang, X., Zhang, K., y Xu, X. (2022). New Antibacterial Secondary Metabolites from a Marine-Derived *Talaromyces* sp. Strain BTBU20213036. *Antibiotics*, 11(2), 222. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020222>
58. Kumar, K., Awasthi, D., Lee, S., Zanardi, I., Ruzsicska, B. P., Knudson, S. E., Tonge, P. J., Slayden, R. A., y Ojima, I. (2010). Novel Trisubstituted Benzimidazoles, Targeting Mtb FtsZ, as a New Class of Antitubercular Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 374-381. <https://doi.org/10.1021/jm1012006>
59. Pushpakaran, A., Battaje, R. R., y Panda, D. (2022b). Vitamin K3 inhibits FtsZ assembly, disrupts the Z-ring in *Streptococcus pneumoniae* and displays anti-pneumococcal activity. *Biochemical Journal*, 479(14), 1543-1558. <https://doi.org/10.1042/bcj20220077>
60. Ma, S., y Ma, S. (2012). The Development of FtsZ Inhibitors as Potential Antibacterial Agents. *ChemMedChem*, 7(7), 1161-1172. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200156>
61. Elsen, N. L., Lu, J., Parthasarathy, G., Reid, J. L., Singh, T. P., Soisson, S. M., y Lumb, K. J. (2012). Mechanism of Action of the Cell-Division Inhibitor PC190723: Modulation of FtsZ Assembly Cooperativity. *Journal of the American Chemical Society*, 134(30), 12342-12345. <https://doi.org/10.1021/ja303564a>

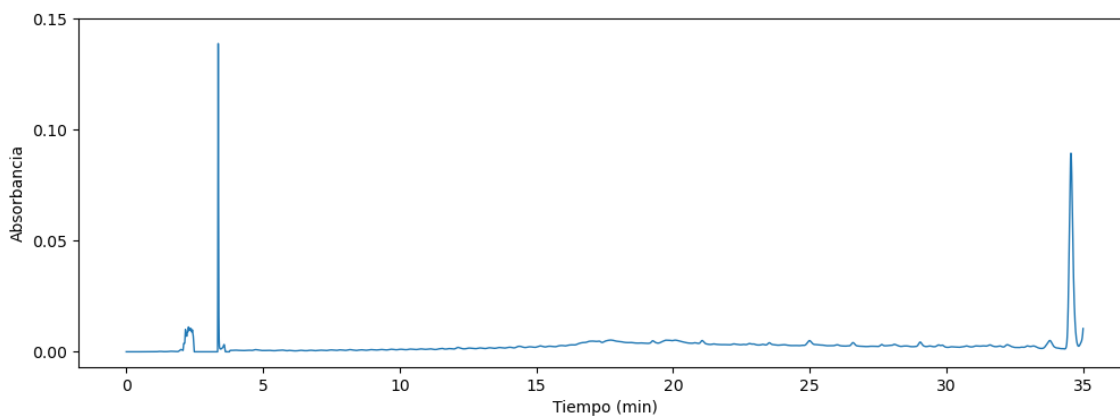
62. Bisson-Filho, A., Hsu, P., Squyres, G., Kuru, E., Wu, F., Jukes, G., Sun, Y., Dekker, Holden, S., VanNieuwenhze, M., Brun, Y. y Garner, E. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, 355(6326), 739-743. DOI:10.1126/science.aak9973

10. ANEXOS

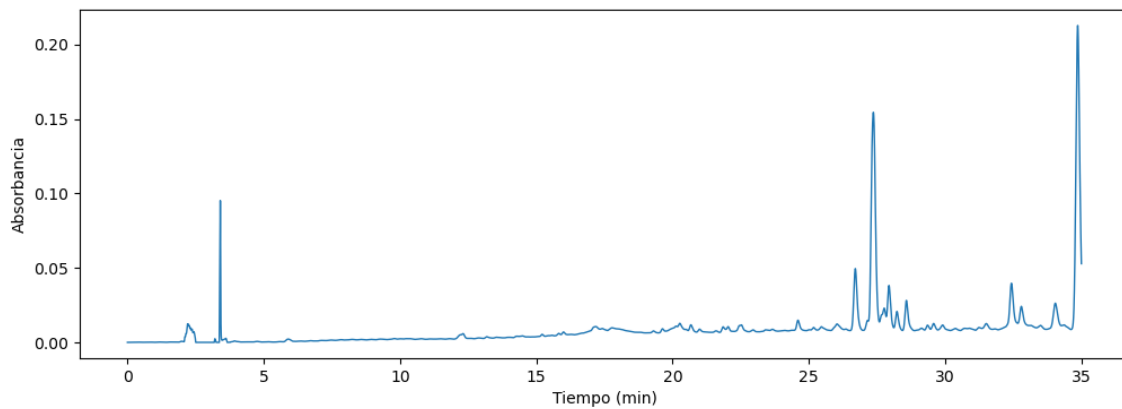
ANEXO I. Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD-DEDL.



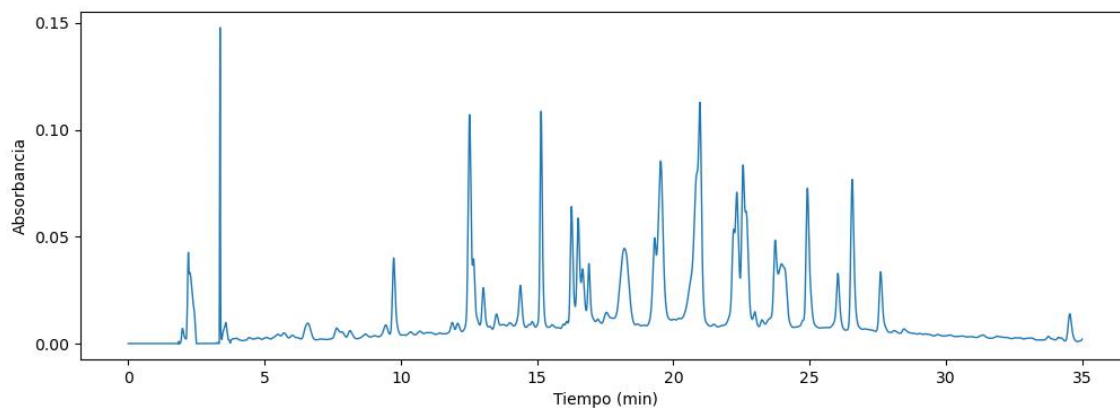
Cromatograma 1. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD-DEDL de la fracción F₁₁ del extracto de *Talaromyces* sp. IQ-567; fase móvil ACN-H₂O (80:20) hasta 100 % de ACN por 30 min.



Cromatograma 2. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD-DEDL de la fracción F₁₄ del extracto de *Talaromyces* sp. IQ-567; fase móvil ACN-H₂O (80:20) hasta 100 % de ACN por 30 min.



Cromatograma 3. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD-DEDL de la fracción F₂₀ del extracto de *Aspergillus* sp. IQ-503; fase móvil ACN-H₂O (80:20) hasta 100 % de ACN por 30 min.



Cromatograma 4. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD-DEDL de la fracción F₂₁ del extracto de *Aspergillus* sp. IQ-503; fase móvil ACN-H₂O (80:20) hasta 100 % de ACN por 30 min.