



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“ESTUDIO QUÍMICO-BIOLÓGICO DE ASCOMICETOS ASOCIADOS A
MANGLARES MEXICANOS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE MOLÉCULAS
CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE CEPAS MULTIRRESISTENTES”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. KAROL CARRILLO JAIMES

Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ
Instituto de Química

Ciudad de México, Julio de 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TEMA DE TESIS

**“ESTUDIO QUÍMICO-BIOLÓGICO DE ASCOMICETOS ASOCIADOS A
MANGLARES MEXICANOS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE
MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE CEPAS
MULTIRRESISTENTES”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. KAROL CARRILLO JAIMES

TUTOR

Dr. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ



Ciudad de México, Julio de 2024

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal: Dr. José Antonio Guerrero Analco
Vocal: Dr. Elihú Bautista Redonda
Secretario: Dr. Federico del Río Portilla

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 2-5, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México

Sustentante:

M. en C. Karol Carrillo Jaimes

Tutor:



Dr. José Alberto Rivera Chávez

Investigador Titular A de TC
Instituto de Química, UNAM

Congresos y simposios

2023. Simposio de Innovación Científica y Tecnológica. “**Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana e inhibición de la actividad de AbFtsZ₁₋₄₁₂**”. Autores: K. Carrillo Jaimes, C. Fajardo, F. Hernández Sedano, P. Cano Sánchez y J. A. Rivera Chávez. Modalidad póster.

2022. Simposio del Instituto de Química. “**Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana e inhibición de la actividad de AbFtsZ**”. Autores: K. Carrillo Jaimes, F. Hernández Sedano, P. Cano Sánchez, E. Tapia Mendoza y J. A. Rivera Chávez. Modalidad póster. **Primer lugar.**

2022. 17^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. “**Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana mediante técnicas de derreplicación**”. Autores: K. Carrillo Jaimes, E. Aguilar Ramírez, M. Parra Sánchez y J. A. Rivera Chávez. Modalidad póster.

Publicación

Karol Carrillo-Jaimes, Carlos A. Fajardo-Hernández, Fernanda Hernández-Sedano, Patricia Cano-Sánchez, Jesús Morales-Jiménez, Beatriz Quiroz-García, José Rivera-Chávez. Antibacterial Activity and AbFtsZ Binding Properties of Fungal Metabolites Isolated from Mexican Mangroves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2024, 1-13. DOI: 10.1007/s43450-023-00507-2.

- **Divulgación:**

Karol Carrillo-Jaimes y José Rivera-Chávez. Nuevas estrategias contra viejos enemigos: la importancia de la Química en el combate de la resistencia microbiana. *Gaceta Instituto de Química*. 2022, 32-34.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por la oportunidad para realizar mis estudios de posgrado y mi formación en esta etapa.

A los Mexicanos y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca proporcionada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU 954406), siempre gracias.

Al Instituto de Química por facilitar los recursos y la infraestructura necesaria para el desarrollo de este proyecto y todas sus capacitaciones.

A los proyectos: CONAHCyT (CF-263977), DGAPA-PAPIIT (IA203220 y IA207422) por la financiación de este proyecto de investigación.

Al Dr. José Alberto Rivera Chávez por su asesoría en este proyecto, enseñanzas y por mostrarme que, el trabajo fuerte pero bien dirigido con inteligencia siempre arroja buenos resultados.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero y al Dr. Rodolfo García Contreras por todas sus aportaciones a este proyecto, como miembros del comité tutor.

A los miembros del jurado: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Rogerio Pereda Miranda, Dr. Federico del Río Portilla, Dr. José Antonio Guerrero Analco y Dr. Elihu Bautista Redonda, por todas sus aportaciones y correcciones a esta tesis.

A la Dra. Patricia Cano por su paciencia e instrucción en la obtención de la enzima AbFtsZ y todos sus consejos personales y profesionales.

A la Dra. Nuria Sánchez Puig por su asesoría en el correcto uso de las enzimas.

Al personal técnico y profesional del Instituto de Química: Dra. Beatriz Quiroz García, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, M. en C. Everardo Tapia Mendoza, Dra. María del Carmen García González, Dra. Adriana Romo Pérez, gracias por su gestión en la adquisición de datos espectroscópicos y espectrométricos.

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 *AbFtsZ*.

A la M. en I. Maricruz López López y la Unidad de Tratamiento de Residuos Peligrosos por la disposición y tratamiento de los residuos RPBI generados en este proyecto. A la I. Q. Priscila Azucena López Ortiz, jefa de Seguridad por las capacitaciones.

A la Dra. Diana Corina Ceapa y al laboratorio de microbiología y bioseguridad por sus instalaciones para el manejo de las bacterias.

Al M. en C. Jesús Gumaro Viacobo Flores y la profesora Q.F.B Josefina Tenopala por todas sus gestiones y colaboraciones en mi formación del posgrado.

Agradecimientos Personales

A **Carlos Antonio**, no tendré palabras para expresar tanto agradecimiento, gracias por todo el apoyo, por llegar a este laboratorio a compartirnos todos tus aprendizajes, gracias por ser guía y amistad.

A **Mariana y Fernanda**, por confiar en mí, por levantarme siempre y por su maravillosa amistad, gracias por las carcajadas y hermosos recuerdos. Por recibirme en sus familias.

A todos mis compañeros del lab: **Lesli, Angi, MaFer, Víctor, Carlos, Charly, los Marios y Vale**, gracias por tan agradable ambiente laboral que construimos.

A **Ingrid** Martínez Ladino, por el apoyo y enseñanza con las redes moleculares y el lab.

A **Kike**, gracias por todo lo enseñado profesionalmente y personalmente, que siempre te brille.

A **Ixchel, Sahid y Evelyn**, que maravilloso coincidir. Gracias por esta hermandad, por tantas sonrisas, vivencias, comida, por sus maestrías en mi vida y enseñarme a fluir mejor. Con ustedes todo fue más liviano y sano.

A **Kate, Roger, Jesi, Fausto, Jaz, Belkis y Laura**, gracias por su familiaridad, por cada palabra de aliento, consejo, llamada, comida y toda la energía impartida en mí para la culminación de esta etapa.

A **Emi, Adrián, Pedru y Cami**, gracias por acompañar todo este proceso de tan bonita manera, de todos los modos de apoyo en que lo hicieron, por sus enseñanzas y todos los bonitos recuerdos que me llevo.

Al Dr. **Rogelio** Pereda, por su retroalimentación en mi formación y del artículo de investigación, gracias por permitirme sentirme cálida en su laboratorio.

Al **Profe Fede**, gracias por siempre estar, y acompañarme desde mi primer día de clases del posgrado hasta el último segundo de mi formación. Gracias por enseñarme conceptos tan valiosos como maestría, doctorado, asesor, universidad, investigadora, entre tantos, gracias por todas las conversaciones tan nutritivas.

A **Hugo César**, gracias por las sonrisas, las charlas, el tiempo compartido, el ánimo y la fuerza impartida para mi culminación, y por ser una esperanza en la academia. Que bonito coincidir.

Un agradecimiento muy especial a mi psicólogo M. **Rafael Delgado**, sin ti esto no sería posible. Gracias por ayudarme a crecer en todos los sentidos y enseñarme a cuidarme.

A mi **familia** (sobrinos, hermanas, cuñado, churris, papás), mi legión, no tengo como expresar tanta gratitud y paz de ser parte de nuestro clan. Nadie nos dice al entrar a un posgrado que necesitaremos una red sólida y amorosa que nos sostenga en muchos aspectos cuando vamos a caer.

A mi **mami** y mi **madrina**, gracias por mi mejor regalo: mi libertad.

"Te podrán quitar todo, el dinero, títulos, diplomas, resultados, pero nunca tu conocimiento. No dejes de aprender."

JCT

"Sin prisa, pero sin pausa."

DCT & PC

"Un paso a la vez."

FDRP

"No sirve de nada el avance científico y tecnológico sin la conciencia social para el desarrollo y el bienestar de todos, no de sólo unos pocos."

APJC

"El trabajo fuerte pero bien dirigido con inteligencia, siempre arroja buenos resultados."

JARC

"La vida se nos dio para devolverla vivida, llora, ríe, cae, levántate, perdona, ama, empieza de nuevo y por lo que más valores en este mundo: sueña, haz que tu momento fugaz en la tierra lo valga todo."

NJSM

Dedicatoria

*A Ella & Él, que me concedieron el sueño de vivir en
México, que me cuidan y me guían con amor.*

*A mi Madrina, por enseñarme la importancia del conocimiento
de la mano con la humanidad.*

CONTENIDO

Congresos y simposios	I
Agradecimientos.....	II
Lista de Tablas	VI
Lista de Figuras.....	VII
Lista de abreviaturas y símbolos	XI
Resumen.....	1
Abstract	2
1. Antecedentes.....	3
1.1 Resistencia Antimicrobiana	3
1.2 Resistencia Antimicrobiana en México	4
1.3 Antibióticos.....	8
1.4 Proteína FtsZ	11
1.5 Inhibidores y activadores sintéticos de FtsZ.....	16
1.6 Inhibidores de origen natural.....	17
1.7 Productos Naturales como fuente de posibles fármacos	19
1.8 Manglares Mexicanos	22
2. Problemática y Justificación	24
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos	27
5. Metodología.....	29
5.1 Reactivos	29
5.2 Muestreo y aislamiento de los hongos axénicos	29
5.3 Extracción menor para el cribado bacteriano	32

5.4	Escalamiento y obtención de los extractos orgánicos	32
5.5	Identificación taxonómica de los microorganismos fúngicos preseleccionados	33
5.6	Evaluación de la actividad antibacteriana	34
5.7	Metabolómica no dirigida: elaboración de redes moleculares	35
5.8	Fraccionamiento primario de extractos orgánicos	35
5.9	Separación y aislamiento biodirigido de moléculas promisorias	36
5.10	Caracterización química de los compuestos aislados	43
5.11	Expresión y purificación de <i>AbFtsZ</i>	47
5.12	Ensayo de actividad e inhibición de <i>AbFtsZ</i> ₁₋₄₁₂	48
6.	Resultados y discusión	50
6.1	Aislamiento de microorganismos fúngicos y cribado de actividad antibacteriana	52
6.2	Diversidad taxonómica de los hongos preseleccionados	58
6.3	Priorización de microorganismos para encontrar agentes antibacterianos	62
6.4	Estudio químico biodirigido de IQ-548 (<i>Aspergillus</i> sp.)	72
6.5	Ensayo enzimático de actividad/inhibición de <i>AbFtsZ</i> ₁₋₄₁₂	74
6.6	Evaluación antibacteriana y enzimática de metabolitos fúngicos	77
6.7	Elucidación estructural de compuestos fúngicos con actividad biológica	81
7.	Conclusiones	88
8.	Perspectivas	89
9.	Referencias	90
10.	Anexos	100

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos.	4
Tabla 2. Tipos de antibióticos.	9
Tabla 3. Comparación de la región desordenada del dominio C-terminal de FtsZ entre bacterias patógenas.	13
Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto de IQ-548 (<i>Aspergillus</i> sp.)	36
Tabla 5. Aislamientos de las fracciones elegidas con actividad antibacteriana.	41
Tabla 6. Aislados seleccionados para las evaluaciones biológicas.	42
Tabla 7. Capacidad antibacteriana de los extractos axénicos en PDA con inhibición > 40 %.	57
Tabla 8. Aislamientos fúngicos más representativos sobre la inhibición bacteriana.	62
Tabla 9. Compuestos identificados presuntivamente con el análisis de redes moleculares en GNPS en los extractos preseleccionados.	69
Tabla 10. Capacidad antibacteriana de las fracciones obtenidas de IQ-548, frente a las cepas de estudio.	72
Tabla 11. Cribado biológico de los compuestos seleccionados.	78
Tabla 12. Compuestos con actividad biológica elegidos para su elucidación estructural.	79
Tabla A 1. Capacidad antibacteriana de los 250 extractos fúngicos sobre las 3 cepas bacterianas resistentes.	100
Tabla A 2. Relación de los extractos preseleccionados respecto a las micotoxinas identificadas.	105

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución mundial de aislados de <i>A. baumannii</i> multirresistentes..	6
Figura 2. Mecanismos de resistencia antibiótica y modos de acción de los antimicrobianos.	8
Figura 3. Enzima FtsZ de <i>Bacillus subtilis</i> . PDB: 2RHO.	12
Figura 4. A: Proceso de formación del anillo Z para la división bacteriana. B: Estabilización del anillo Z generando la lisis bacteriana..	15
Figura 5. Modificadores (activadores/inhibidores) sintéticos de la actividad GTPasa y/o polimerización de la enzima FtsZ.	17
Figura 6. Productos naturales que modifican la actividad GTPasa de FtsZ.	18
Figura 7. Ejemplos de algunos fármacos de origen natural.	21
Figura 8. Puntos de muestreo: 1 , Laguna de Tecomate; 2 , Laguna de Chautengo; 3 , Laguna de Corralero; 4 , Laguna de Chacagua; 5 , Laguna de Ventanilla.	31
Figura 9. Cromatograma del extracto IQ-548 (<i>Aspergillus</i> sp.).....	37
Figura 10. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C ₁₈ ; f.m.: 30-50 % MeCN/30 min), de la fracción D	38
Figura 11. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C ₁₈ ; f.m.: 35-60 % MeCN/30 min), de la fracción E	38
Figura 12. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C ₁₈ ; f.m.: 30-60 % MeCN/30 min), de la fracción F	39
Figura 13. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C ₁₈ ; f.m.: 30-90 % MeCN/30 min), de la fracción G	39
Figura 14. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C ₁₈ ; f.m.: 30-70 % MeCN/30 min), de la fracción H	40
Figura 15. Diseño de la placa para el ensayo enzimático de AbFtsZ, descrito en este trabajo.	49

Figura 16. Flujo de trabajo empleado en esta investigación, para la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana.	51
Figura 17. Proceso de obtención de los microorganismos fúngicos para el desarrollo de este trabajo. A. Manglares de la Laguna de Chautengo. B. Proceso de fragmentación y sanitización de las muestras vegetales. C. Crecimiento de los hongos endófitos presentes en las muestras. D. Aislamiento de los microorganismos fúngicos hasta su estado axénico.	53
Figura 18. Algunos de los hongos de manglares en estado axénico que se lograron aislar (250 total).	53
Figura 19. Análisis de conglomerados jerárquico con mapa de calor de la actividad antibacteriana de los 250 extractos fúngicos axénicos sobre <i>A. baumannii</i> (A564), <i>K. pneumoniae</i> (K1) y <i>P. aeruginosa</i> (48M). Se empleó el método Ward con una escala de distancia euclidiana. La figura se realizó en el software Origin Pro 2023b.	56
Figura 20. Árbol filogenético de 24 microorganismos fúngicos de los preseleccionados, a partir de sus regiones ITS. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio.	59
Figura 21. Algunos metabolitos fúngicos con actividad biológica relevante....	61
Figura 22. Capacidad antibacteriana por parte de los extractos fúngicos (Cheerios®) pre-seleccionados sobre <i>A. baumannii</i> (A564), multirresistente.	63
Figura 23. Capacidad antibacteriana por parte de los extractos fúngicos (Cheerios®) pre-seleccionados sobre <i>K. pneumoniae</i> (K1), multirresistente.	63
Figura 24. Capacidad antibacteriana por parte de los extractos fúngicos (Cheerios®) pre-seleccionados sobre <i>P. aeruginosa</i> (48M), multirresistente.	64
Figura 25. Red molecular generada en la plataforma GNPS de los 28 extractos axénicos pre-seleccionados, con el análisis MolNetEnhancer.	67
Figura 26. Algunos compuestos identificados presuntivamente en la red molecular de los extractos pre-seleccionados.	68

Figura 27. Moléculas desreplicadas por el análisis de las redes moleculares en GNPS.....	71
Figura 28. Diagrama de trabajo del fraccionamiento del extracto IQ-548 (<i>Aspergillus</i> sp.) para la obtención de los compuestos 1-7	73
Figura 29. Secuencia de aminoácidos de <i>AbFtsZ</i>	75
Figura 30. Gel de SDS-PAGE empleado en la purificación de <i>AbFtsZ</i> ₁₋₄₁₂	75
Figura 31. Inhibición de la actividad enzimática de <i>AbFtsZ</i> ₁₋₄₁₂ por la berberina a diferentes concentraciones.....	77
Figura 32. Curvas de concentraciones-respuesta para los compuestos 1-4 vs cepas de estudio.....	80
Figura 33. Moléculas aisladas de <i>Aspergillus</i> sp. (IQ-548) con actividad biológica (antibacteriana y enzimática <i>AbFtsZ</i>) prometedora.....	83
Figura 34. Moléculas aisladas e identificadas en la red molecular de GNPS.....	84
Figura A 1. Espectro por HR-DART ⁺ [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 665.2954, C ₄₀ H ₃₇ N ₆ O ₄ ⁺ (665.2876), Δ 11.7ppm, para el compuesto 1 : asperazina.....	107
Figura A 2. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 1 : asperazina.....	108
Figura A 3. Espectro por HR-ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 607.1858, C ₃₂ H ₃₁ O ₁₂ ⁺ (607.1816), Δ 6.9 ppm, para el compuesto 2 : aurasperona B.....	109
Figura A 4. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 2 : aurasperona B.....	110
Figura A 5. Espectro por HR-DART ⁺ [M+H-H ₂ O] ⁺ <i>m/z</i> 557.1446, C ₃₁ H ₂₅ O ₁₀ ⁺ (557.1448), Δ 0.7 ppm, para el compuesto 3 : aurasperona F.....	111
Figura A 6. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 3 : aurasperona F.....	112

Figura A 7. Espectro por HR-DART ⁺ [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 273.0760, C ₁₅ H ₁₃ O ₅ ⁺ (273.0763), Δ 1.1 ppm, para el compuesto 4 : TMC-256A1.....	113
Figura A 8. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 4 : TMC-256A1.....	114
Figura A 9. Espectro por HR-ESI ⁺ -MS [M+H-OH] ⁺ <i>m/z</i> 287.0906, C ₁₆ H ₁₅ O ₅ ⁺ (287.0914), Δ 2.8 ppm, para el compuesto 5 : Fonseca B.....	115
Figura A 10. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 5 : Fonseca B.	116
Figura A 11. Espectro por HR-DART ⁺ [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 557.1446, C ₃₁ H ₂₅ O ₁₀ ⁺ (557.1448), Δ 0.7 ppm, para el compuesto 6 : dianhidroaurasperona C.	117
Figura A 12. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 6 : Dianhidroaurasperona C.	118
Figura A 13. Espectro por HR-ESI ⁺ -MS [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 571.1600, C ₃₂ H ₂₇ O ₁₀ ⁺ (571.1604), Δ 0.2 ppm, para el compuesto 7 : aurasperona A.	119
Figura A 14. A , espectro de RMN- ¹ H (700 MHz-CDCl ₃) y B , espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz-CDCl ₃) para el compuesto 7 : Aurasperona A.....	120

Lista de abreviaturas y símbolos

(CH ₃) ₂ CO	Acetona
° C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
3-MBA	3-metoxi benzamida
AbFtsZ	Enzima mutante Z filamentosa sensible a la temperatura de <i>A. baumannii</i>
Abs	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirronucleico
AU	Unidades arbitrarias
CFU	Unidades formadoras de colonia (<i>Colony Forming Units</i>)
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (<i>Clinical Laboratory Estándar Institute</i>)
DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter spp.</i>
FtsA	Proteína bacteriana involucrada en el divisoma (<i>filamentous temperature sensitive A</i>)

FtsZ	Proteína bacteriana involucrada en el divisoma (<i>filamentous temperature sensitive Z</i>)
g	Gramo
GDP	Guanosín difosfato
GNPS	Plataforma de productos naturales para la desreplicación (<i>Global Natural Products Social</i>)
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora
H ₂ O	Agua
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas tándem con
HPLC/ESI+-MS-Q-TOF	electronebulización y analizadores cuadrupolo y tiempo de vuelo
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos
HPLC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas tándem
I + D	Investigación y desarrollo
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	kilo Dalton
L	Litro
MeCN	Acetonitrilo
mg	Miligramo
MH	Mueller Hinton
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina

<i>MtbFtsZ</i>	Proteína FtsZ de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>m/z</i>	Relación masa carga
NA	No aplica
nm	nanómetro
NP	No presenta inhibición
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDB	Caldo Papa Dextrosa
ppm	Partes por millón
RAM	Resistencia antimicrobiana
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
<i>SaFtsZ</i>	Proteína FtsZ de <i>S. aureus</i>
UAM	Universidad Autónoma de México
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda

Resumen

La resistencia antimicrobiana (RAM) se está convirtiendo en un reto sanitario mundial que requiere una atención inmediata y concertada. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha emitido alertas en las que insta a seguir desarrollando antibióticos con mecanismos de acción novedosos contra patógenos de importancia clínica, como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. En este contexto, los hongos han desempeñado un papel crucial en el descubrimiento y desarrollo de antibióticos. Por ello, en este trabajo se priorizó una cepa fúngica en función de su perfil metabólico y actividad antibacteriana frente a aislados multirresistentes de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, para identificar potenciales moléculas antibióticas. La investigación química del hongo seleccionado (IQ-548, *Aspergillus* sp.) condujo al aislamiento de asperazina (**1**), aurasperona B (**2**), aurasperona F (**3**), TMC-256A1 (**4**), fonsecina B (**5**), dianhidroaurasperona C (**6**) y aurasperona A (**7**). Además, se desarrolló un ensayo *in vitro* para detectar ligandos de la enzima mutante Z filamentosa sensible a la temperatura de *A. baumannii* (*AbFtsZ*), una GTPasa que desempeña un papel central en la división bacteriana, para correlacionar la capacidad de las moléculas antibacterianas aisladas con un mecanismo de acción. Los compuestos **1-4** inhibieron el crecimiento de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Curiosamente, los compuestos **2-3**, **5-7** interaccionaron con *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, aumentando su actividad GTPasa. Por el contrario, el compuesto **4** mostró actuar como inhibidor tanto de la actividad enzimática como del crecimiento de las cepas estudiadas.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is emerging as a global health challenge that requires immediate and concerted attention. Accordingly, the World Health Organization (WHO) has issued alerts urging to continue developing antibiotics with novel mechanisms of action toward clinically important pathogens, including *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. In this context, fungi have played a crucial role in discovering and developing antibiotics. Therefore, in this work, one fungal strain was prioritized based on their metabolic profile and antibacterial activity against multiresistant isolate of *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, to identify potential antibiotic molecules. Chemical investigation of the selected fungus (IQ-548, *Aspergillus* sp.) led to the isolation of asperazine (**1**), aurasperone B (**2**), aurasperone F (**3**), TMC 256A1 (**4**), fonsecin B (**5**), dianhydroaurasperone C (**6**) and aurasperone A (**7**). Moreover, an *in vitro* assay to detect ligands of the Filamentous temperature sensitive mutant Z enzyme of *A. baumannii* (*AbFtsZ*), a GTPase that plays a central role in bacterial division, was developed to correlate the antibacterial properties of the isolated molecules to a mechanism of action. Compounds **1–4** inhibited the growth of *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Interestingly, compounds **2–3**, **5–7** interacted with *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, increasing its GTPase activity. Conversely, compound **4** exhibited an outstanding ability to act as an inhibitor of both, the enzymatic activity and the growth of the strain under study.

1. Antecedentes

1.1 Resistencia Antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) se refiere a la capacidad de los microorganismos para resistir la acción de los medicamentos a los que anteriormente eran sensibles, resultando en tratamientos ineficaces¹. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la RAM se ha declarado como una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial².

A pesar de la creciente amenaza global que representan las bacterias resistentes a los antibióticos, la investigación farmacéutica no ha logrado producir nuevos antibióticos efectivos en suficiente medida. En este contexto, la OMS resalta la necesidad urgente de descubrir nuevas moléculas antibióticas para hacer frente a las infecciones causadas por patógenos resistentes. En las últimas dos décadas, solo se han desarrollado dos nuevas clases de antibióticos, los cuales están principalmente dirigidos contra bacterias Gram-positivas³. Por consiguiente, la OMS ha llamado a la comunidad científica, farmacéutica y clínica a abordar los desafíos científicos y económicos que impiden el hallazgo de moléculas capaces de contrarrestar la RAM⁴.

Como parte de las acciones para hacer frente a esta problemática, en 2017 la OMS publicó una lista (**Tabla 1**) que identifica a los principales patógenos que requieren atención prioritaria⁵. El principal objetivo es impulsar la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para abordar la resistencia, especialmente en casos de infecciones graves y tuberculosis multirresistente⁶.

Tabla 1. Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos⁵.

Prioridad	Microorganismo
1: Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i> , resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas
	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a vancomicina
2: Elevada	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a meticilina y a vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a claritromicina
	<i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i> , resistentes a fluoroquinolonas
3: Media	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporina y a las fluoroquinolonas
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , resistente a penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a la ampicilina
	<i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas

1.2 Resistencia Antimicrobiana en México

En México, el alto consumo de antibióticos se debe a la prescripción innecesaria⁷ (impulsada por el elevado número de casos de infecciones respiraciones agudas y gastrointestinales/diarreicas aguda), la dispensación inadecuada y la regulación laxa en la venta de medicamentos (al no exigir prescripción médica para su venta). Esto promueve la automedicación y el uso indebido tanto en humanos como en la ganadería y agricultura, contribuyendo significativamente al problema del alto consumo de antibióticos^{6,8}.

De acuerdo con el segundo reporte de Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México 2018⁹, que proporciona información sobre la resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas de hemocultivos y urocultivos, se detectó un incremento en la resistencia a cefalosporinas de 3^a y 4^a generación, ciprofloxacino, y meropenem de microorganismos del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa y *Enterobacter* spp.), destacando *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*^{8,9}.

A. baumannii es una bacteria Gram negativa y es reconocida como un patógeno clínicamente significativo causante de un amplio espectro de infecciones nosocomiales, especialmente en grupos de pacientes vulnerables, por ejemplo, pacientes en unidades de cuidados intensivos, pacientes con hospitalizaciones prolongadas, personas con cirugías o procedimientos invasivos (cateterismo vascular central, traqueostomías y laparoscopias, entre otras), neonatos y personas inmunosuprimidas^{10,11}). Estas infecciones se producen principalmente en pacientes de edad avanzada en asociación con alcoholismo, diabetes, enfermedad renal y/o pulmonar. Las tasas de mortalidad asociadas a las infecciones por *A. baumannii* varían considerablemente en función de las enfermedades concomitantes, la duración de la estancia hospitalaria, las características demográficas y la sensibilidad a los antibióticos de las cepas causantes de la infección¹⁰. Además, se cree que la regulación diferencial de los genes de virulencia dependiente de la cepa, la gran cantidad de reguladores transcripcionales en comparación con otras especies de *Acinetobacter* y la sinergia de múltiples genes que codifican factores de virulencia contribuyen al potencial de virulencia de *A. baumannii*¹⁰.

Las cepas de *A. baumannii* son capaces de regular los mecanismos intrínsecos de resistencia a los antibióticos, lo que, junto con la adquisición de nuevos genes de resistencia a través de mecanismos de transferencia horizontal, contribuye a la propagación y la diversidad del perfil de resistencia de *A. baumannii*. Algunos mecanismos intrínsecos de resistencia que presenta *A. baumannii* son, la presencia de betalactamasas, las bombas de eflujo, los cambios en las proteínas asociadas a la membrana y las enzimas que reconocen antimicrobianos como sustratos^{10,11}. Además de la resistencia intrínseca, se ha demostrado que el flujo genético y la transferencia horizontal son los principales mecanismos a través de los cuales *A. baumannii* adquiere resistencia a los antibióticos.

A inicios de la década de 1970, los aislados clínicos de *A. baumannii* eran sensibles a los antibióticos de uso común, como ampicilina, gentamicina, cloranfenicol y ácido

nalidíxico. Sin embargo, a finales de los años setenta *A. baumannii* emergió como un importante patógeno nosocomial, principalmente asociado al uso de antibióticos de amplio espectro en los hospitales. Actualmente, este patógeno muestra resistencia a la mayoría de los antibióticos de primera línea, como las quinolonas, sulfamidas, cefalosporinas y betalactámicos¹¹. La colistina y la tigeciclina (antibióticos de última generación) siguen siendo los únicos antibióticos activos contra ella y se emplean como último recurso en el tratamiento hacia *A. baumannii* multirresistente; sin embargo, se han notificado cepas resistentes a la colistina en distintas regiones del mundo^{10,11} (**Figura 1**).

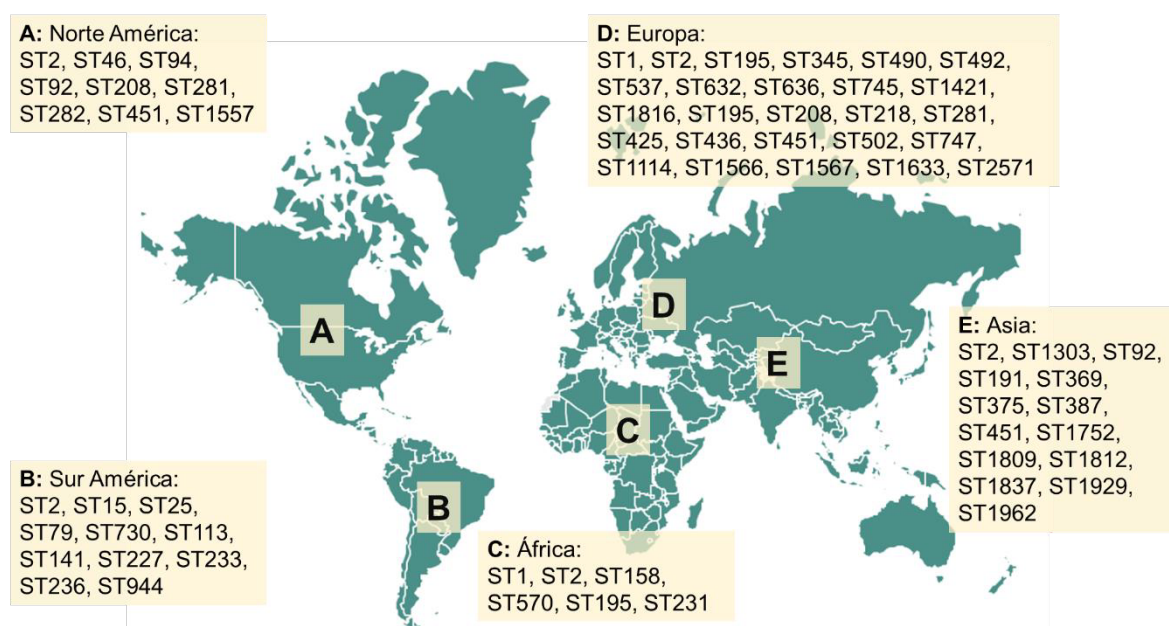


Figura 1. Distribución mundial de aislados de *A. baumannii* multirresistentes. Tomado de Novovic y colaboradores¹⁰.

Klebsiella pneumoniae, es una bacteria Gram negativa y no móvil que puede causar diversas infecciones, como neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones del torrente sanguíneo¹². Se trata de un patógeno oportunista que puede provocar infecciones graves y difíciles de tratar. La bacteria suele colonizar las superficies mucosas humanas de la orofaringe y el tracto gastrointestinal^{12,13}. En 1983 se identificó en *K. pneumoniae* la producción de una betalactamasa que puede hidrolizar el grupo oximino y el anillo betalactámico, haciendo ineficaces a las cefalosporinas y penicilinas de última generación¹⁴. Otros de los mecanismos de

resistencia que presenta esta bacteria son, la formación de biopelícula (presentan propiedades de barrera osmótica ocasionando una resistencia a los agentes antimicrobianos), pérdida y mutación de las porinas (reduce la entrada de los antibióticos mediante la reducción de la proteína de membrana externa porina), y bombas de eflujo (que reducen la concentración del fármaco liberándolo fuera de la célula)¹⁵.

Las infecciones por *Klebsiella pneumoniae*, en particular las del torrente sanguíneo, se asocian a elevadas tasas de mortalidad en todo el mundo^{13,16}. Esta bacteria ha mostrado una preocupante resistencia a una serie de antibióticos, como amoxicilina-ácido clavulánico, cefuroxima, ceftazidima, cefalotina, entre otros^{13,16}. La aparición de *K. pneumoniae* resistentes a los antibióticos complica el tratamiento de las infecciones causadas por estas bacterias¹⁶. El desarrollo de resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae* ha provocado una disminución de la eficacia de los tratamientos tradicionales contra el patógeno, lo que plantea importantes retos en la terapia clínica.

Por otro lado, *P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, aeróbica, con motilidad unipolar, patógeno oportunista, que provoca infecciones respiratorias, urinarias y en el torrente sanguíneo y presente en infecciones nosocomiales^{17,18}. Esta bacteria tiene una rápida capacidad de reproducción y una gran capacidad de adaptación, lo que le permite prosperar en diversos entornos, incluidos los alimentos¹⁷. Actualmente *P. aeruginosa* presenta alta resistencia a fármacos como: fluoroquinolonas, quinolonas, aminoglucósidos, penicilinas y carbapenémicos^{17,18}, y los mecanismos de resistencia que posee este microorganismo bacteriano son: sistemas de bombas de eflujo, baja permeabilidad de la membrana (modificación del lipopolisacárido de la membrana externa), presencia de enzimas betalactamasas, formación de biopelícula^{18,19}. En 2020, Chegini y colaboradores²⁰ reportaron el amplio uso de bacteriófagos como coadyuvantes de los antibióticos para la inhibición de la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* multirresistente.

1.3 Antibióticos

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones causadas por bacterias. La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos medicamentos. Estos fármacos pueden dividirse en dos categorías principales²¹: a) bactericidas, cuya acción es letal y lleva a la lisis bacteriana; y b) bacteriostáticos, que, al alcanzar concentraciones en sangre o tejidos, impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana sin destruir las células. Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una u otra forma, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en el objetivo o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo^{22,23} (**Figura 2**).

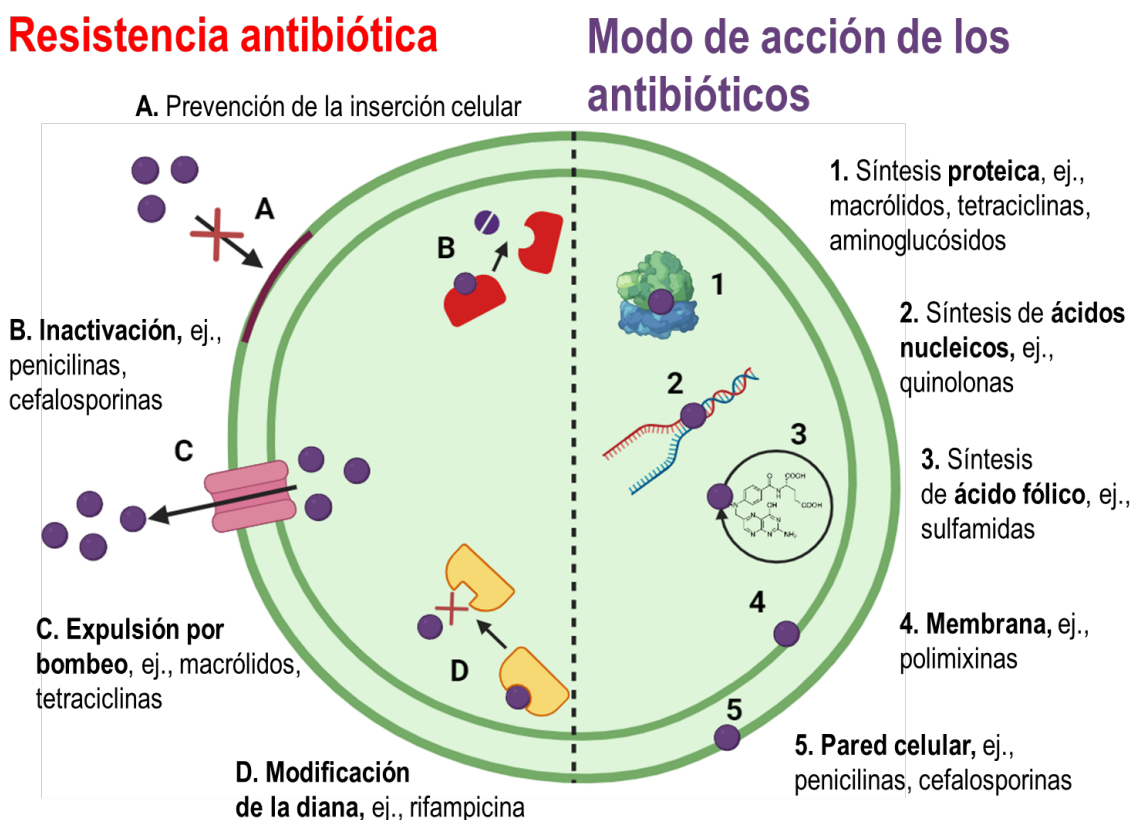


Figura 2. Mecanismos de resistencia antibiótica (izquierda) y modos de acción de los antimicrobianos²¹ (derecha). Tomado de Chellat, M. F., y colaboradores²¹.

- **Modo de acción de los antibióticos**

Existe una amplia diversidad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico (**Tabla 2**). Los mecanismos por los cuales los compuestos con actividad antibacteriana inhiben el crecimiento o causan la muerte de las bacterias son sumamente variados y dependen de las dianas afectadas. Algunos antimicrobianos de uso clínico ejercen su acción al inhibir la síntesis de la pared bacteriana, alterar la integridad de la membrana citoplásmica, impedir la síntesis proteica o bloquear la síntesis o funciones de ácidos nucleicos. Asimismo, hay otros cuya función consiste en proteger otros compuestos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de β -lactamasas (**Figura 2**)^{21,23}.

Tabla 2. Tipos de antibióticos²³.

Mecanismo de acción	Grupo de antibióticos	Ejemplos
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	β -lactámicos	Penicilinas, Cefalosporinas, Aztreonam, Imipenem,
	Glucopéptidos	Vancomicina, Bacitracina
	Bacitracina	Fosfomicina
Alteración de la membrana citoplásmica	Polimixinas	Polimixina B, Polimixina E (Colistina)
	Lipopéptidos	Daptomicina
Inhibición de la síntesis proteica	Ácido fusídico	Ácido Fusídico
	Amiglicósidos	Gentamicina, Amicacina,
	Anfenicoles	Cloranfenicol, Tiamfenicol
	Macrólidos	Clindamicina, Lincomicina
	Estreptograminas	Eritromicina, Azitromicina
	Lincosamidas	Telitromicina, Mupirocina
	Tetraciclinas	Linezolid. Tetraciclina, Doxiciclina
	Ozaxolidinonas	Tigeciclina
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas	Ácido Nalidixico, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Gemifloxacino
	Rifampicinas	Rifampicina
	Nitroimidazoles	Metronidazol, Tinidazol
	Nitrofuranos	Nitrofurantoína, Furazolidona
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas	Trimetoprima, Sulfametoxazol
	Diaminopirimidinas	
Inhibidores de β-lactamasas	Ácido Clavulánico, Sulbactam, Tazobactam	

- **Mecanismos de resistencia**

Las bacterias, debido a su alta capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos que los contrarrestan. Los principales mecanismos de resistencia natural incluyen la prevención de la penetración en la célula, la eliminación a través de proteínas de transporte en la membrana, la descomposición o modificación mediante proteínas inactivadoras, y la modificación del objetivo (**Figura 2**)^{21,24}.

Se han observado mutaciones en los genes que codifican las proteínas ribosómicas, lo que puede disminuir la eficacia de los antibióticos al reducir su afinidad por la diana de acción. Además, mutaciones en el gen 23S rRNA han demostrado tener un efecto similar. Algunas bacterias utilizan bombas de eflujo para expulsar los antibióticos de la célula y evitar su acumulación, como ocurre con las tetraciclinas. Otra estrategia de resistencia bacteriana implica la producción de enzimas que inactivan los antibióticos al modificar o degradar el compuesto, como las β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos, un mecanismo observado con tetraciclinas y beta-lactámicos. Estos son algunos de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos^{21,24}.

1.4 Proteína FtsZ

La citocinesis es el proceso de división celular en el cual se produce la división del citoplasma de una célula madre en dos células hijas, cada una con su propio núcleo y citoplasma rodeado por una membrana plasmática. Este proceso se lleva a cabo mediante la actuación de un complejo proteico conocido como divisoma, donde destaca la proteína FtsZ, enzima procarionte la cual se desplaza primero al sitio de división celular bacteriana^{25,26}. La primera estructura cristalográfica de FtsZ se obtuvo utilizando una proteína de la arquea *Methanocaldococcus jannaschii*²⁵. Aunque la proteína FtsZ se ha identificado como un homólogo estructural de la tubulina presente en células eucariotas, existe una diferencia estructural importante entre ellas: FtsZ presenta una hendidura entre dominios a lo largo de la hélice H7, que separa los dominios amino-terminal y carboxilo-terminal (**Figura 3**)²⁵. Esta región es inexistente en las células eucariotas, pero se encuentra altamente conservada entre las bacterias, al igual que el dominio de unión a GTP²⁵.

El dominio C-terminal de FtsZ presenta una región desordenada que consiste en una región linker o conectora, un péptido conservado y una región variable. La región del péptido conservado está conformada por aproximadamente ocho residuos, de los cuales, el ácido aspártico (368 para *B. subtilis*, 371 para *E. coli*), la prolina (370 para *B. subtilis*, 373 para *E. coli*) y la fenilalanina (372 para *B. subtilis*, 375 para *E. coli*) están altamente conservados. La región variable comprende de 1-10 residuos y contiene aminoácidos con carga positiva en Gram positivas y carga neutra en Gram negativas^{25,27,28}.

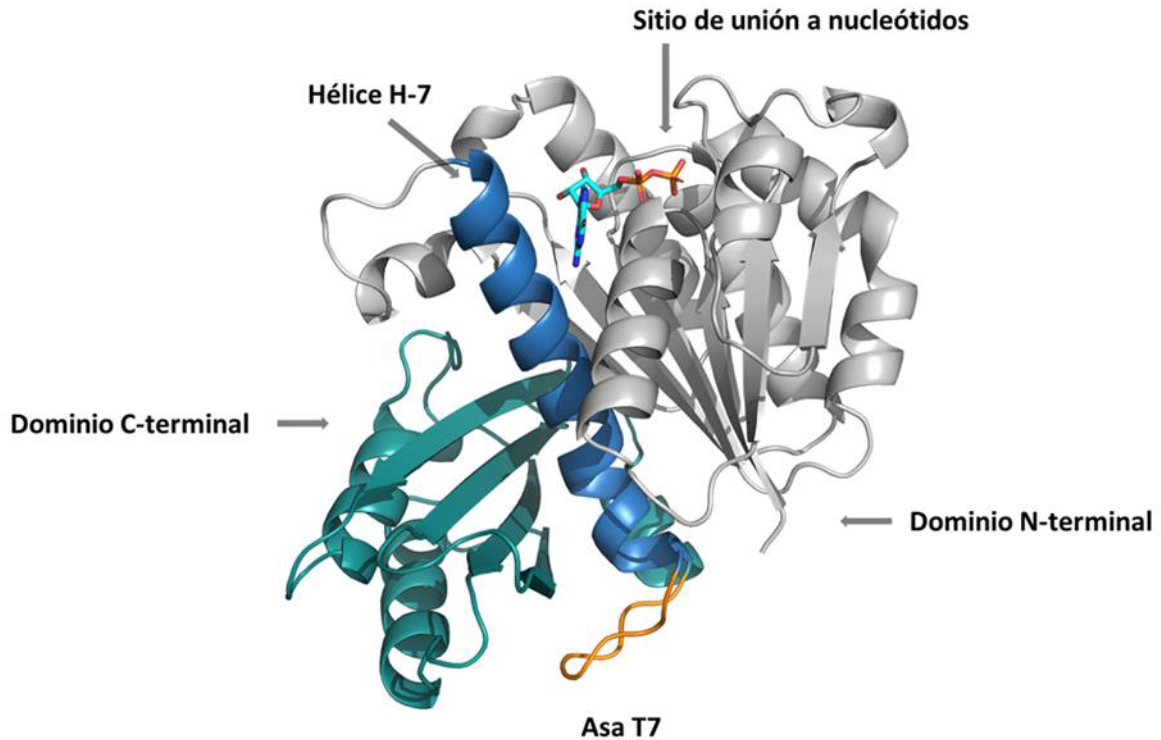


Figura 3. Enzima FtsZ de *Bacillus subtilis*. PDB: 2RHO.

Tanto la región desordenada como la región conservada del C-terminal interactúan con las proteínas modificadoras de FtsZ^{26,28}. Aunque la región desordenada del C-terminal no se ha observado en la estructura cristalográfica, ya que es muy flexible, los análisis filogenéticos han mostrado que varía entre especies bacterianas^{26,28}. La similitud en la secuencia de esta región entre bacterias patógenas es menor al 20 %, sin embargo, las diferencias no se limitan a la secuencia, sino que también se ve afectada la longitud de la región linker o conectora, tal como se muestra en la **Tabla 3**²⁸.

Tabla 3. Comparación de la región desordenada del dominio C-terminal de FtsZ entre bacterias patógenas²⁸.

Organismo	Número de aminoácidos de la región conectora	Aminoácidos de la región del péptido conservado	Número de aminoácidos de la región variable
<i>B. subtilis</i>	55	DIPTFLR	6
<i>S. aureus</i>	57	DIPSFIR	12
<i>S. pneumoniae</i>	95	DTPPFK	2
<i>E. coli</i>	58	DIPAFLR	4
<i>P. aeruginosa</i>	68	DIPAFLR	4
<i>M. tuberculosis</i>	60	DVPPFMR	1

Diversos resultados experimentales sostienen que esta región conectora actúa como un asa flexible que interactúa con las proteínas de anclaje a membrana FtsA y ZipA, sugiriendo que tiene un papel importante en la regulación del metabolismo del peptidoglicano y la estabilidad de los polímeros de FtsZ^{25,26,28}. También se propone que la región desordenada de FtsZ, ausente en la tubulina, es esencial para la división celular al mantener interacciones proteína-proteína²⁵. Un aumento en el número de aminoácidos o la interacción de una molécula en esta región alteraría la posición del anillo Z y la frecuencia de la división celular²⁸. La autopolimerización de la proteína FtsZ para formar un anillo (anillo Z) en el centro de la célula marca el inicio de la división celular (**Figura 4**)²⁵. La polimerización de los monómeros de FtsZ depende de la hidrólisis de GTP a GDP en presencia de Mg²⁺²⁵. El sitio catalítico para la hidrólisis de GTP se crea cuando el asa T7 de un monómero de FtsZ se une al sitio de unión a nucleótidos de otro monómero de FtsZ^{25,26}. Los polímeros de FtsZ conforman la estructura del anillo Z, que rodea la célula justo en el centro²⁹, esta ubicación del sitio de ensamblaje del anillo Z determina el sitio de división bacteriana, a su vez, FtsZ recluta proteínas esenciales para la constricción de la célula²⁶. El proceso de ensamblaje y constricción del anillo Z debe sincronizarse con la replicación y la segregación cromosómica, por lo que el ensamblaje del anillo Z ocurre durante la fase S del ciclo celular e implica un cambio en la concentración del polímero lejos de los polos²⁶. En la mayoría de las bacterias, la regulación del ensamblaje de esta proteína en el centro de la célula se lleva a cabo mediante sistemas de posicionamiento externo que modifican la dinámica interna del polímero de

FtsZ^{26,29}. Existen reguladores negativos específicos de cada especie del anillo Z, que promueven el desensamblaje de los polímeros de FtsZ cerca de los polos, mientras que los reguladores positivos fomentan el ensamblaje de los polímeros de FtsZ en el centro de la célula^{26,29}.

La dinámica del anillo Z está influenciada por la actividad GTPasa de la enzima FtsZ^{26,29}. El movimiento de FtsZ dentro del anillo se conoce como "*treadmilling*" o cinta rodante, a causa de la unión de subunidades de polímeros de FtsZ en un extremo de un conjunto de filamentos y su disociación en el otro extremo²⁶. La variación en la actividad de GTPasa, ya sea un incremento o una disminución, conlleva a un ajuste correspondiente en la tasa de recambio, es decir a que se formen más polímeros de FtsZ o que tiendan a la forma monomérica. Por lo tanto, manipular la actividad GTPasa no solo impacta el movimiento de FtsZ, sino que también influye en el comportamiento de la dinámica del anillo Z, conduciéndolo a su desestructuración^{26,30}.

Para finalizar el proceso de la citocinesis, es relevante que el anillo Z experimente una contracción, que da lugar a la formación de dos células hijas. La contracción del anillo Z comienza con la hidrólisis de GTP a GDP. De acuerdo con diversas investigaciones, este proceso de constricción se atribuye a que los filamentos unidos a GTP presentan una estructura más lineal, en contraste con los filamentos unidos a GDP, que exhiben una curvatura pronunciada. Por tanto, la hidrólisis de GTP a GDP provoca la contracción del anillo Z y genera la fuerza necesaria para que se lleve a cabo la fisión binaria^{31,32}. También se ha encontrado que los filamentos de FtsZ unidos a GDP promueven la despolimerización del anillo Z, ya que son menos estables en comparación con el complejo FtsZ-GTP^{25,29}.

Otra característica relevante de la proteína FtsZ, es que se destaca por su conservación entre distintas especies bacterianas, con un nivel de identidad entre ellas que oscila entre el 40% y el 50%²⁵. La presencia de tres sitios de interacción de algunos activadores/inhibidores (el dominio de unión a nucleótidos, el asa T7 y la hendidura interdominio), la convierte en una diana molecular ideal para el

desarrollo y reposicionamiento de antibacterianos que ayudan a contrarrestar la RAM²⁵.

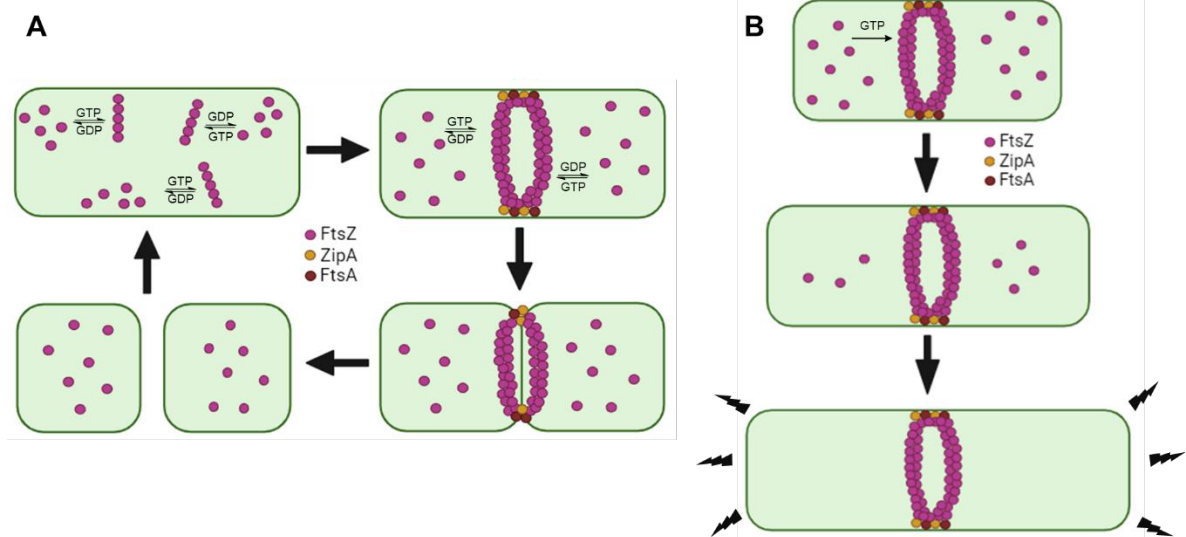


Figura 4. A: proceso de formación del anillo Z para la división bacteriana. **B:** Estabilización del anillo Z generando la lisis bacteriana. Tomado de Kusuma y colaboradores²⁵, Tripathy y colaboradores²⁹.

1.5 Inhibidores y activadores sintéticos de FtsZ

La alteración de la polimerización y/o de la actividad GTPasa de FtsZ inhibe la formación del anillo Z provocando la lisis bacteriana²⁷. Evidencia experimental indica que la supresión (alteración de la actividad o de la polimerización) 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 veces²⁵. La polimerización de FtsZ puede regularse con moléculas que se unan a la región del asa T7 o que se unan al sitio de unión a nucleótidos³². Algunos de los principales derivados sintéticos evaluados son los benzimidazoles, dentro de los cuales, SB-P3G2 y 1a-G4 son reconocidos por aumentar la actividad GTPasa de la proteína FtsZ de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtbFtsZ*) e inhibir la polimerización de ésta³². El compuesto sintético 3-MBA (3-metoxi benzamida) es usado como base para el desarrollo de nuevos fármacos debido a su capacidad para permear en la célula bacteriana de *B. subtilis* e inhibe la polimerización de FtsZ (*B. subtilis*)^{27,33} (**Figura 5**).

Dentro de las moléculas prometedoras se encuentra el derivado sintético PC190723, un análogo del 3-MBA, descrito inicialmente como un inhibidor de la actividad GTPasa de SaFtsZ (FtsZ de *S. aureus*), sin embargo, diversos grupos de investigación determinaron que, en realidad PC190723 aumenta la actividad GTPasa de SaFtsZ y junto con ello, disminuye la cooperatividad entre monómeros y resensibiliza a las cepas MRSA ante los β -lactámicos^{29,31,33}. Otro derivado del 3-MBA y de PC190723 es el compuesto TXA709, que se encuentra en ensayos preclínicos, es el inhibidor más avanzado. TXA709 presentó inhibición del crecimiento bacteriano de *B. subtilis* y de *S. aureus*, inhibió la actividad GTPasa y despolimerización de los filamentos de SaFtsZ, también se ha confirmado su mecanismo de acción por medio de ensayos de microscopía^{25,29,32,33}.

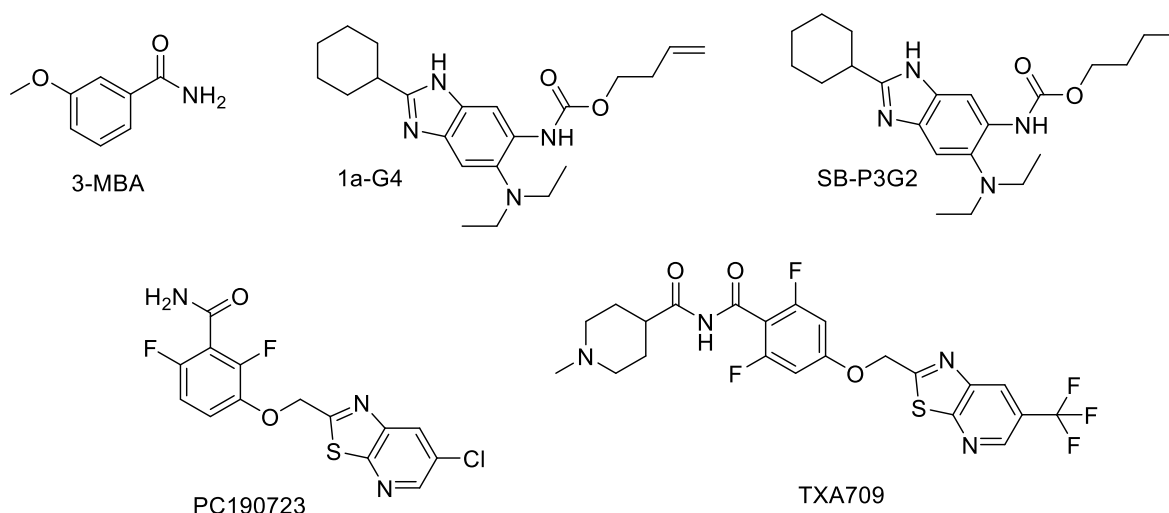


Figura 5. Modificadores (activadores/inhibidores) sintéticos de la actividad GTPasa y/o polimerización de la enzima FtsZ.

1.6 Inhibidores de origen natural

Uno de los principales retos al desarrollar nuevos antibióticos cuyo blanco es una proteína citoplasmática como FtsZ es la capacidad de estos para penetrar las membranas celulares. En el caso específico de bacterias Gram negativas es indispensable que la molécula atraviese las porinas y evada las bombas de eflujo²⁵. Una de las ventajas de los productos naturales es que, al ser metabolitos de origen natural, pueden ser reconocidos por sistemas de transporte celular para así llegar a su sitio de acción³⁴. Asimismo, al ser productos de rutas biosintéticas tienen mayor probabilidad de interactuar como ligandos de proteínas³⁴.

La berberina (sal de amonio cuaternario del grupo de las isoquinolinas, presente en las plantas *Berberis* spp.) es una molécula altamente estudiada. Las plantas donde está presente han sido empleadas en la medicina tradicional contra infecciones microbianas³³. Este compuesto inhibe el crecimiento de las bacterias *M. tuberculosis* y *S. aureus* resistente a meticilina, por otro lado, al evaluar su actividad frente a FtsZ se encontró que inhibe la polimerización y la actividad GTPasa de FtsZ (*M. tuberculosis* y *S. aureus*), y mediante estudios de microscopía se comprobó que también desestabiliza los filamentos de FtsZ^{29,31,33}. Por otro lado, el cinamaldehído y sus derivados han demostrado inhibir la actividad GTPasa de FtsZ, así como el ensamblaje de los polímeros de FtsZ (*E.*

coli), perturbando la morfología del anillo Z *in vitro*³⁵; el cinamaldehído también inhibe el crecimiento bacteriano de *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* resistente a meticilina²⁹. Las cumarinas han sido reportadas como inhibidores de la actividad GTPasa de *BsFtsZ* (FtsZ de *B. subtilis*), sin embargo, éstas ejercen su efecto de forma alostérica uniéndose a la región del asa T7³¹. La plumbagina mostró en ensayos contra *BsFtsZ* que inhibe la polimerización de *BsFtsZ* y reduce su actividad GTPasa³¹. Un ejemplo del uso de productos naturales como base para el descubrimiento de antimicrobianos es la viriditoxina, compuesto con amplia actividad antibacteriana en Gram positivas, que ha demostrado perturbar la formación de los filamentos de *EcFtsZ* (FtsZ de *E. coli*) y su actividad GTPasa³⁶. La viriditoxina fue descubierta como un inhibidor de *EcFtsZ* por medio de un proyecto biodirigido, cribando 100.000 extractos (plantas, bacterias y hongos) respecto al ensayo de inhibición de la polimerización de FtsZ, fue hallada en el extracto de *Aspergillus viridinutans* (**Figura 6**)³⁶.

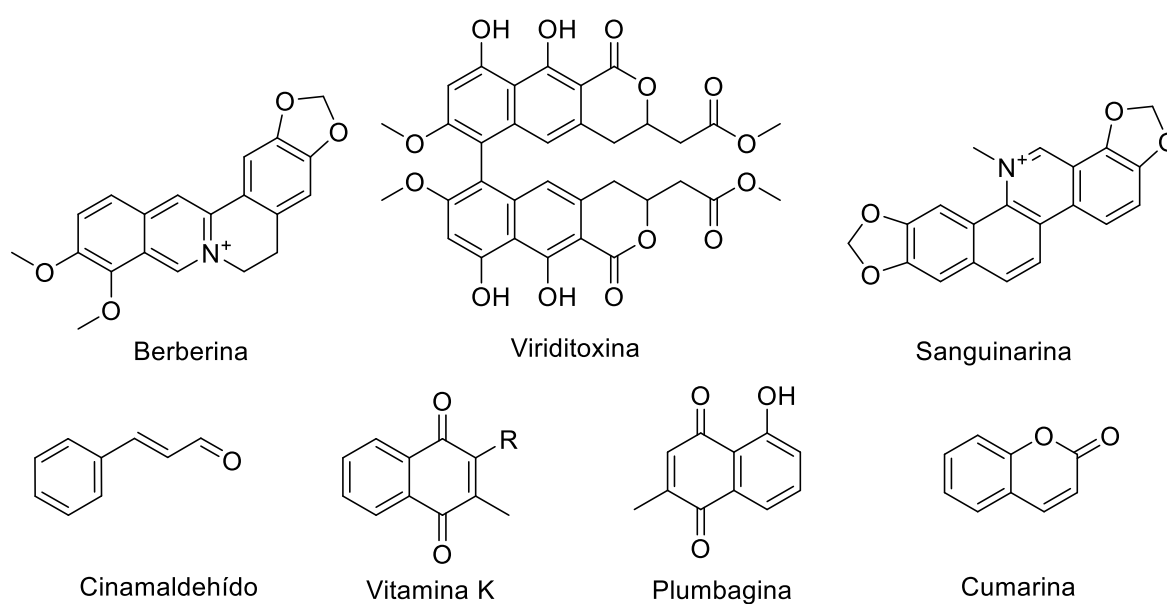


Figura 6. Productos naturales que modifican la actividad GTPasa de FtsZ.

1.7 Productos Naturales como fuente de posibles fármacos

Un producto natural es una sustancia o compuesto químico que se encuentra en la naturaleza, ya sea de origen vegetal, animal o de un microorganismo, y que no ha sido alterado significativamente por la intervención humana. Estos productos pueden ser utilizados con diversos fines, como alimentación, medicina, cosmética, entre otros³⁷.

Los productos naturales pueden ayudar a identificar nuevos blancos terapéuticos y comprender mejor algunos mecanismos de acción de los fármacos. El estudio de los productos naturales puede revelar nuevas dianas moleculares y vías metabólicas que pueden ser explotadas en el desarrollo de medicamentos³⁸. Algunos ejemplos de productos naturales de relevancia industrial³⁹:

- La aspirina (ácido acetilsalicílico) se deriva del ácido salicílico, que se encuentra en la corteza del sauce blanco (**Figura 7**)^{38,39}.
- La digoxina, utilizada para tratar la insuficiencia cardíaca, se obtiene de la planta *Digitalis purpurea* (**Figura 7**)^{38,39}.
- La morfina, un analgésico potente, se extrae del opio, (*Papaver somniferum*) (**Figura 7**)^{38,39}.
- La quinina, utilizada para tratar la malaria, se extrae de la corteza del árbol de la quina (*Cinchona spp*) (**Figura 7**)^{38,39}.

Los hongos y bacterias son una fuente importante de productos naturales con propiedades terapéuticas, su capacidad de producir una amplia gama de compuestos bioactivos los convierte en un recurso importante de nuevos fármacos. La investigación en este campo se centra en la identificación y caracterización de los compuestos producidos por los hongos, así como en la optimización de los procesos de producción para obtener cantidades suficientes de las moléculas deseadas^{38,39}.

Algunos ejemplos de antibióticos producidos por hongos son, la penicilina, uno de los primeros antibióticos descubiertos, y promotor de la era dorada de antibióticos,

la molécula es producida por el hongo *Penicillium chrysogenum*. Otro ejemplo son las cefalosporinas, antibióticos de amplio espectro, producidas por el hongo *Cephalosporium acremonium*. Por otro lado, la eritromicina, un antibiótico macrólido eficaz contra Gram positivas es producido por la bacteria *Saccharopolyspora erythraea*. La tetraciclina, otro claro ejemplo de alta variedad de metabolitos bioactivos provenientes de los microorganismos, es un antibiótico de amplio espectro producido por la bacteria *Streptomyces aureofaciens*³⁸.

Otro ejemplo relevante de fármacos derivado de productos naturales, es la ciclosporina, un inmunosupresor utilizado en trasplantes de órganos, producido por el hongo *Tolypocladium inflatum*. También cabe resaltar, que los hongos del género *Aspergillus* son conocidos por producir estatinas, que se utilizan para reducir los niveles de colesterol en sangre^{37,38,40} (**Figura 7**).

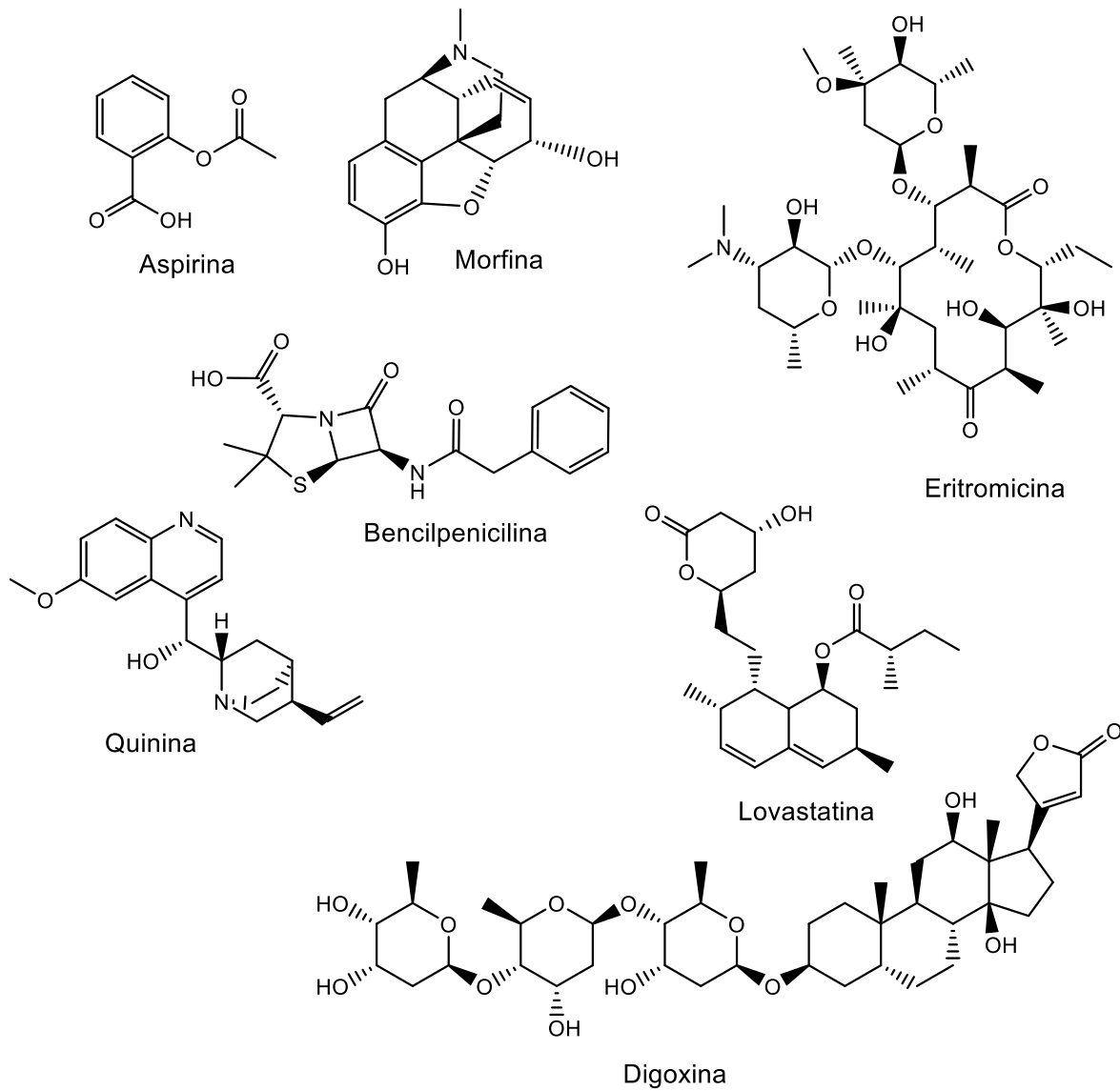


Figura 7. Ejemplos de algunos fármacos de origen natural.

1.8 Manglares Mexicanos

Los manglares son ecosistemas costeros únicos que albergan una rica y diversa variedad de especies vegetales y animales, como peces, crustáceos, aves, reptiles e invertebrados. Se caracterizan por su capacidad para prosperar en suelos salinos y pobres en oxígeno, lo que les hace estar bien adaptados a las difíciles condiciones de la zona intermareal^{41,42}. Los manglares proporcionan un hábitat esencial para miles de especies en todos los niveles de las redes tróficas marinas y forestales, desde bacterias a percebes o tigres de Bengala. Los manglares son el hábitat de numerosas especies amenazadas, según un reporte de *Nature-Scientific Reports* en 2018, los manglares sanos son focos de biodiversidad y sirven de hábitat a 341 especies amenazadas de todo el mundo^{41,43}. Los manglares desempeñan un papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas del mundo, son altamente productivos con tasas de producción de oxígeno iguales a las de los bosques tropicales húmedos; los manglares de todo el mundo almacenan 34 millones de toneladas de carbono al año, lo que los hace importantes en el contexto de la mitigación del cambio climático^{41,44}; también sirven de hábitats para peces e invertebrados de importancia comercial, por lo que son esenciales para mantener poblaciones de peces sanas y sostener la pesca local⁴⁴.

México, es el quinto país en el mundo con mayor biodiversidad^{36,44,45}, y posee una de las mayores extensiones de manglares del mundo (6 %), en el 2020 la superficie de manglares mexicanos aumentó a 900.000 hectáreas^{44,46}. En el actual territorio mexicano se encuentran tres especies principales: *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*⁴⁷, sin embargo, los manglares de México, como los de muchas otras partes del mundo, están amenazados⁴⁸. A pesar de estos retos, en México, se están realizando esfuerzos para proteger y restaurar los ecosistemas de manglares. Grupos de mujeres como las Chelemeras de Yucatán trabajan para restaurar los manglares amenazados por el desarrollo turístico y la urbanización⁴⁸. Estos esfuerzos son cruciales para mantener la biodiversidad y los servicios ecosistémicos que proporcionan los manglares en México y en todo el mundo. Por otro lado, los estudios químico-biológicos de microorganismos de estos

hábitats son muy escasos en la república mexicana, es por esto, que, desde una perspectiva ecológica y teniendo en cuenta la importancia de los manglares en la conservación de la flora y fauna costera, los ecosistemas de manglares se convierten en un foco de particular interés para la exploración de metabolitos especializados producidos por microorganismos.

2. Problemática y Justificación

La resistencia a los antibióticos plantea un riesgo inminente para la salud global. En 2019, las enfermedades infecciosas provocaron 1.27 millones de muertes directamente atribuibles a cepas bacterianas resistentes, marcando una crisis sanitaria crítica⁴⁹. Este fenómeno ha sido muy bien documentado por la OMS, la cual ha emitido diferentes boletines de alerta en los últimos cinco años sobre esta pandemia silenciosa⁴⁻⁶. Desde el 2016, la OMS ha advertido a la comunidad científica⁶, a las compañías farmacéuticas y al personal clínico, acerca de la importancia de difundir entre la población las causas de este problema de salud pública y sobre la trascendencia de encontrar y desarrollar antibióticos novedosos para enfrentar la resistencia que, de seguir con la tasa de crecimiento actual, ocasionará más de 10 millones de muertes para el año 2050, posicionándose como la principal causa de muerte en el mundo^{49,50}.

Entre las especies patógenas con mayor tasa de farmacorresistencia a los antibacterianos de primera elección, resaltan las bacterias del grupo ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter* spp⁵. Si bien, esta clasificación sirve como referencia a nivel mundial, no se puede generalizar; por ello, es importante caracterizar la biota de cada país. Por ejemplo, en Estados Unidos de América, *S. aureus* resistente a la meticilina es el agente patógeno aislado con mayor frecuencia, mientras que en México las infecciones más habituales son las relacionadas con *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Escherichia coli*, microorganismos que presentan altas tasas de resistencia a cefalosporinas de 3^a y 4^a generación y ciprofloxacino, entre otros antibióticos de primera línea^{8,9}.

Adicionalmente, la resistencia antimicrobiana no solo afecta la salud humana y el sector clínico, sino que también impacta en sectores como la ganadería y la agricultura. La falta de regulación en el uso de agentes antimicrobianos en animales y cultivos contaminan los suministros de agua y genera un riesgo significativo para la cadena alimentaria y para los aumentos en la tasa de la RAM⁶.

Ante esta urgencia, la OMS ha resaltado la carencia de nuevos antibióticos para hacer frente a las infecciones farmacorresistentes, realizando la formación de la Alianza Mundial para la Investigación y Desarrollo de Antibióticos (GARDP), y ha exhortado a la comunidad científica para la búsqueda de nuevas moléculas o reposicionamiento de moléculas con capacidad antibacteriana ante las cepas más críticas^{4,6}. En este contexto, el presente proyecto se justifica como una respuesta necesaria y oportuna. México, con su rica biodiversidad, ofrece un entorno propicio para la búsqueda de soluciones innovadoras. Este proyecto se centra en la exploración de hongos asociados a manglares mexicanos para el descubrimiento de metabolitos secundarios eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas, específicamente aquellas provocadas por cepas intrahospitalarias multirresistentes (*A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*). El estudio químico-biológico de microorganismos fúngicos en estado axénico, la evaluación de las propiedades antibióticas de sus extractos orgánicos y el aislamiento de metabolitos con capacidad de inhibición sobre cepas multirresistentes se plantean como parte de las contribuciones para abordar la resistencia antimicrobiana.

3. Hipótesis

Con base en el potencial de los hongos para la producción de compuestos antibióticos, se espera que las especies fúngicas recolectadas de manglares mexicanos produzcan moléculas con actividad antibacteriana contra cepas resistentes a antibióticos y que modifiquen la actividad de la proteína *AbFtsZ*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Realizar un estudio biodirigido que integre métodos de metabolómica no dirigida, datos taxonómicos y métodos convencionales de química de productos naturales para identificar moléculas con capacidad antibacteriana provenientes de hongos de manglares, con el propósito de combatir cepas multirresistentes y contribuir a la mitigación de la farmacorresistencia.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar microorganismos fúngicos en estado axénico a partir de diversas muestras colectadas (hojas, raíces, sedimentos, hormigueros) de manglares mexicanos de la región del Pacífico.
- Obtener los extractos fúngicos orgánicos para evaluar su capacidad antibacteriana sobre las cepas multirresistentes y preseleccionar los microorganismos más promisorios.
- Escalar los cultivos de los microorganismos preseleccionados para adquirir sus extractos orgánicos y evaluar su actividad antibacteriana y continuar con el cribado biodirigido.
- Identificar micotoxinas presentes en los extractos preseleccionados usando herramientas de metabolómica no dirigida, para evitar el re-aislamiento de compuestos con actividad biológica previamente reportada, y seleccionar el extracto a separar.
- Expresar y purificar la enzima *AbFtsZ* para desarrollar un método espectrofotométrico que permita evaluar su actividad y el cambio de ésta en presencia de los compuestos fúngicos aislados.
- Fraccionar el extracto seleccionado, y evaluar la capacidad antibacteriana de dichas fracciones frente a las bacterias de estudio, con el fin de rastrear los metabolitos responsables de la inhibición.

- Aislar los compuestos presentes en las fracciones con potencial antibacteriano y evaluarlos frente a las cepas multirresistentes y a la enzima *AbFtsZ*.
- Caracterizar químicamente los metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana y aquellos que modificaron la actividad enzimática de *AbFtsZ*.

5. Metodología

5.1 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 Mueller-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), IPTG (Goldbio, EE.UU.), molibdato de amonio (Sigma-Aldrich), tris básico (Dibbiotek), sal de oxalato de verde de malaquita (Sigma-Aldrich), tween²⁰ (Sigma-Aldrich).

5.2 Muestreo y aislamiento de los hongos axénicos

Con el fin de obtener aislados fúngicos diversos, se escogieron 5 puntos de muestreo: 1. Laguna de Tecomate, 2. Laguna de Chautengo, 3. Laguna Corralero, 4. Laguna de Chacagua, y 5. Laguna de Ventanilla, todas ellas lagunas con manglares poco estudiados de la costa pacífica de México (estados de Guerrero y Oaxaca: **Figura 8**). En dichos puntos, se recolectaron muestras de sedimentos, raíces, hojas sanas y hojas enfermas de mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) y rojo (*Rhizophora mangle*), y algunos hormigueros y termiteros. La colecta se realizó en febrero de 2020.

Las muestras se procesaron empleando los métodos implementados en el laboratorio de productos naturales de origen microbiano del Instituto de Química de la UNAM⁵¹. Cada muestra de hoja o raíz se dividió en cuatro fragmentos (1-2 mm aproximadamente) y se sometieron a un proceso de sanitización, como se describe a continuación, primero las muestras se sumergieron en agua estéril por 1 minuto, posteriormente, en etanol al 70 % por 1 minuto, después, las muestras se enjuagaron con agua estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % por 30 segundos, finalmente, se lavaron con agua estéril y se dejaron

secar al aire en un gabinete de bioseguridad, consecutivamente los fragmentos se colocaron en una caja de Petri con PDA (agar de dextrosa y papa) solidificado, estéril y suplementado con gentamicina (500 mg/L), y se almacenaron a temperatura ambiente. Las muestras de sedimentos, hormigueros y termiteros se suspendieron en agua estéril en relación 1:10 (1 g de muestra/9 mL de agua); de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-3} g muestra/mL), y después se tomó una alícuota de 200 μ L de cada una y se inocularon en cajas de Petri con PDA-antibiótico. Estas cajas se dejaron en reposo con periodos de luz-oscuridad (12 h/cada uno) a temperatura ambiente, entre 2-5 días y se monitoreó de cerca el crecimiento de los hongos para aislarlos y obtenerlos en estado axénico (**Figuras 18-19**)^{51,52}. Este procedimiento permitió obtener una colección de 250 aislamientos.

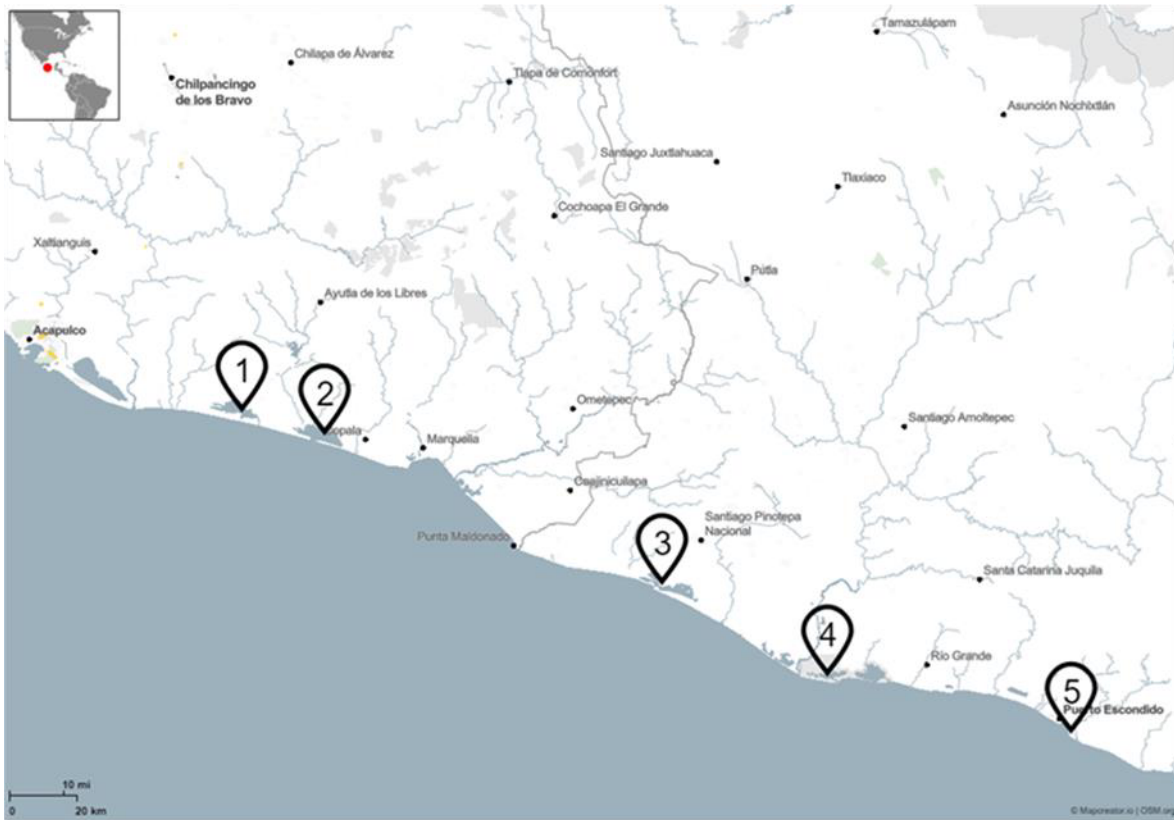


Figura 8. Puntos de muestreo: **1**, Laguna de Tecomate; **2**, Laguna de Chautengo; **3**, Laguna de Corralero; **4**, Laguna de Chacagua; **5**, Laguna de Ventanilla.

5.3 Extracción menor para el cribado bacteriano

Después de obtener los 250 microorganismos fúngicos aislados en estado axénico, se realizó una extracción rápida (directamente de la caja Petri) con el fin de cribar los extractos más promisorios para inhibir el crecimiento bacteriano de las cepas *A. baumannii* (A564), *K. pneumoniae* (K1) y *P. aeruginosa* (48M), todas ellas multirresistentes. Brevemente el proceso de extracción consistió en fraccionar el hongo (en PDA) en pequeños fragmentos y depositarlos en un matraz, posteriormente a cada matraz se le agregaron 60 mL de una mezcla AcOEt-(CH₃)₂CO (9:1). Después los matraces se dejaron en maceración por 24 horas con agitación orbital constante^{51,52}. Transcurrido este tiempo, se recuperó la mezcla de disolventes por filtración y se obtuvo el extracto orgánico. A cada extracto se le determinó el potencial antibacteriano frente a las cepas de prueba usando un ensayo de microdilución en placa⁵³. Los resultados de actividad antibacteriana pre-seleccionaron un conjunto de hongos para su posterior escalamiento y estudio químico.

5.4 Escalamiento y obtención de los extractos orgánicos

Para el escalamiento de los microorganismos seleccionados se preparó un cultivo semilla en PDB. Los cultivos se sometieron a agitación orbital constante por cinco días con el fin de aumentar la biomasa; posteriormente, estos cultivos semilla se transfirieron a matraces con cereal Cheerios® (10 gramos) previamente esterilizados. Estos cultivos se dejaron crecer por 30 días a temperatura ambiente, con periodos de luz-oscuridad (12 h/cada uno). Transcurrido el periodo de fermentación, a cada uno de los matraces se les añadió una mezcla de extracción (AcOEt-(CH₃)₂CO, 9:1) y la biomasa se sometió a un proceso de trituración física, después cada matraz se dejó macerar por 24 horas en agitación orbital constante^{51,52}. Luego, la biomasa de cada hongo se separó del extracto por medio de filtración al vacío, y el filtrado se concentró a presión reducida, inmediatamente, al extracto obtenido se le adicionó una mezcla de CH₂Cl₂-CH₃OH-H₂O (4:1:5) para realizar un primer reparto y obtener la fase orgánica. Después de retirar los disolventes, el extracto se sometió a un segundo reparto con una mezcla de MeCN-

CH₃OH (1:1) y hexano (en la misma proporción), con el fin de desechar las grasas y obtener la fase polar⁵¹.

5.5 Identificación taxonómica de los microorganismos fúngicos preseleccionados

La caracterización taxonómica de los hongos preseleccionados se realizó mediante el análisis de la secuencia de la región espaciadora interna transcrita (ITS, *Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosómico. Para ello, inicialmente se extrajo el material genético (ADN) empleando el método de fenol-cloroformo⁵⁴, brevemente éste consiste en obtener aproximadamente 100 mg del micelio, y exponerlo a procesos de lisis (molienda, solución amortiguadora de lisis), posteriormente, se realizan pequeños repartos con el fenol-cloroformo y la solución amortiguadora de lisis, después se centrifuga la mezcla para separar las fases y se recupera la fase acuosa donde se encuentra el ADN. Después por medio de lavados con alcohol y centrifugación se purifica el ADN.

Posteriormente, se amplificó la región ITS y consecutivamente se realizó la identificación⁵⁵. Las secuencias de las regiones ITS se compararon con la biblioteca GenBank empleando la herramienta BLAST del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los resultados de las identidades se ordenaron según la identidad máxima. La identificación taxonómica de los hongos se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez de la Universidad Autónoma de Metropolitana (UAM).

5.6 Evaluación de la actividad antibacteriana

Las bacterias de estudio, *Acinetobacter baumannii* (A564), *Klebsiella pneumoniae* (K1) y *Pseudomonas aeruginosa* (48M) son muestras clínicas multirresistentes y fueron proporcionadas por Dr. Rodolfo García Contreras y la QFB. Rosario Larios, obtenidas del Instituto Nacional de Pediatría y el Instituto de Cardiología Ignacio Chávez. Estas cepas bacterianas se cultivaron en caldo Mueller Hinton a 37 °C y posteriormente resguardadas en caldo Mueller Hinton y glicerol estéril (4:1) a -80 °C. El ensayo de evaluación antibacteriana se realizó utilizando la metodología reportada por el CLSI M07-A10⁵³. Brevemente, el ensayo consistió en el método de microdilución de placas de 96 pozos. Las cepas bacterianas se suspendieron en caldo Mueller Hinton a 37 °C durante 12 h y se ajustaron a una turbidez de 0.5 unidades del estándar McFarland (10^8 CFU/mL, ajustado a 0.08-0.13 de densidad óptica a 600 nm). Las muestras (extractos/fracciones/compuestos) se analizaron a 100 µg/mL en DMSO. La microdilución en placa, consistió en 10 µL de la suspensión bacteriana, 2 µL de la muestra y 88 µL de caldo de Mueller Hinton. Luego, la densidad óptica de la placa a 600 nm se midió en un espectrofotómetro lector de placas (*Cytation BioTek*®). Posteriormente, la placa se incubó a 37 °C durante 24 h y se tomó la segunda medición para calcular el porcentaje de inhibición y la IC_{50} (concentración inhibitoria al 50 %). Las mediciones se realizaron con cuatro réplicas. Se empleó el antibiótico de amplio espectro gentamicina, como control positivo en el ensayo (100 ppm). Los valores de inhibición se calcularon mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{DO.muestra_{t=24} - DO.muestra_{t=0}}{DO.control_{t=24} - DO.control_{t=0}} \right) * 100 \% \quad \text{Ecuación 1}$$

Para el cálculo de las IC_{50} , se empleó la ecuación 2, con el software *GraphPad Prism* 8.0.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{100}{1 + 10^{[\log IC_{50} - X] * S}} \quad \text{Ecuación 2}$$

5.7 Metabolómica no dirigida: elaboración de redes moleculares

El análisis de redes moleculares se realizó por medio de la plataforma GNPS (*Global Natural Products Social*). En este estudio se incluyeron 28 extractos con potencial antibacteriano. Para ello, se adquirió el perfil por HPLC-MS/MS (HPLC/ESI⁺-MS-Q-TOF), columna: Gemini-NX C₁₈: 3 μm, 2.0 × 75 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA, de cada extracto (2000 μg/mL), empleando una mezcla de MeCN-H₂O (0.1 % ácido fórmico) como fase móvil y un gradiente inicial de 15:85 hasta 100:0 durante 8 minutos, seguido de un sistema isocrático por 1.5 minutos a un flujo de 0.4 mL/min. Posteriormente, los datos se convirtieron al formato .mzML usando la herramienta *MsConvert* (versión 3.0.20239) de *ProteoWizard*; los archivos resultantes se analizaron en la plataforma Global Natural Products Social (GNPS; <https://gnps.ucsd.edu>), usando una metodología previamente descrita y una tolerancia del ion precursor y de los iones fragmentos de 0.02 Da⁵⁶. Posteriormente se empleó la plataforma GNPS para generar la red molecular y realizar un análisis de derreplicación (*Derreplicator*)⁵⁷⁻⁶⁰ y del tipo *MolNetEnhacer*⁶⁰. Los compuestos identificados presuntivamente (desreplicados) se filtraron con un error en masa (Δppm) <10, y con una puntuación del coseno > 0.7 (**Tabla 9**). Cada uno de los compuestos identificados se comparó con las bases de datos de la plataforma GNPS (MIADB, CASMI, MASSBANK y NIST)⁵⁶. Las redes moleculares (**Figura 24-25**) se visualizaron con el programa *Cytoscape 3.8.1*⁵⁸.

5.8 Fraccionamiento primario de extractos orgánicos

El fraccionamiento primario de los extractos se realizó por cromatografía Flash en un sistema Buchi Pure C-810 equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA: 198-800 nm) y una columna de Sephadex LH-20 y con una elución de 100 % MeOH durante 120 minutos con un flujo de 2 mL/min⁵¹.

Para la obtención de los perfiles cromatográficos y las separaciones de los compuestos se realizaron por HPLC, utilizando un sistema Waters (bomba cuaternaria 2535) conectado a un muestreador automático (2707), con detectores

de arreglo de diodos (PDA 2998) y detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD 2424). La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el software *Empower*® 3 (Waters). Se realizaron análisis por el modo HPLC analítico y semi-preparativo en columnas C₁₈ Gemini-NX (5 µm) (4.6 × 250 mm y 10.0 × 250 mm, para las corridas analíticas y semipreparativa, respectivamente; Phenomenex, Torrance, CA, USA)^{51,52}.

5.9 Separación y aislamiento biodirigido de moléculas promisorias

El extracto orgánico (1.1 g) del microorganismo IQ-548 (*Aspergillus* sp.) se obtuvo como se indicó en la **Sección 5.4** Posteriormente, 500 mg del extracto se fraccionaron por cromatografía flash (fase estacionaria: *Sephadex* LH-20) empleando MeOH (100 %) como fase móvil durante 3 horas y con un flujo de 2 mL/min (**Figura 9**). Este fraccionamiento permitió obtener 10 fracciones (**Tabla 4**).

Tabla 4. Fracciones obtenidas del extracto de IQ-548 (*Aspergillus* sp.)

Fracción°	mg	Tiempo, min
A	31	3-30
B	36	30-33.5
C	172	33.6-41.5
D	77	41.6-49.5
E	159	49.6-62.5
F	124	62.6-72
G	99	72.1-88
H	19	88.1-97.5
I	23	97.6-120.5
J	10	120.6-180

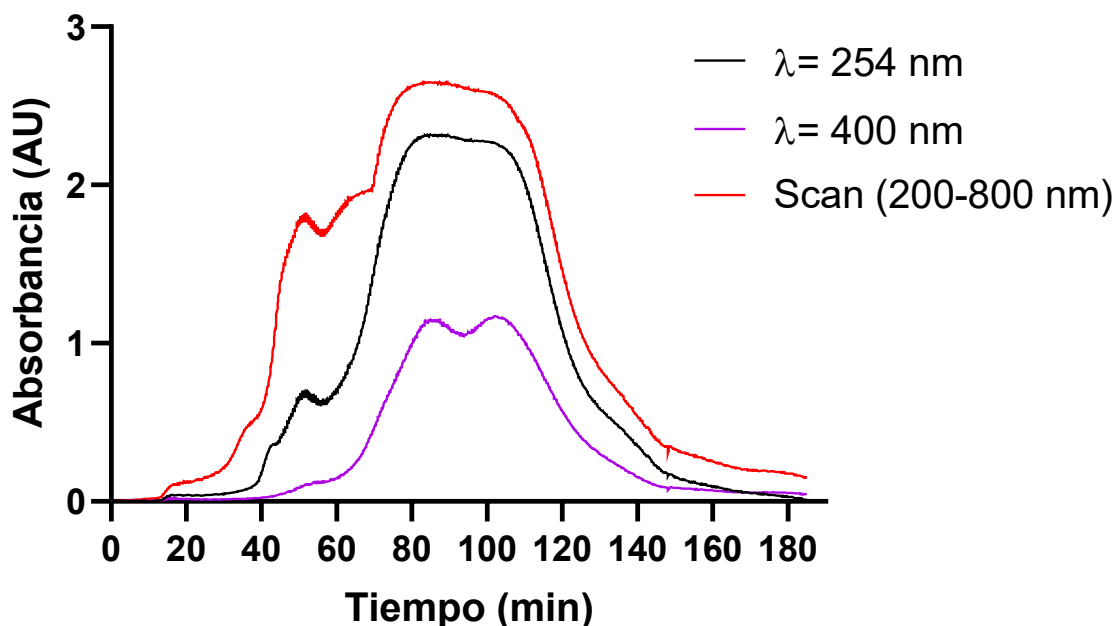


Figura 9. Cromatograma del extracto IQ-548 (*Aspergillus* sp.).

Posterior a la obtención de las fracciones, cada una de ellas se evaluó en el ensayo de actividad antibacteriana con las cepas de estudio (**Tabla 10**), y se analizaron por HPLC, con el fin de seleccionar las más apropiadas para el aislamiento de compuestos activos, con base en el rendimiento, la complejidad del perfil cromatográfico y los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano. Este procedimiento seleccionó las fracciones **D-H** para el aislamiento de sus componentes.

En las **Figuras 10-14** se muestran las separaciones cromatográficas de estas fracciones en modo semi-preparativo.

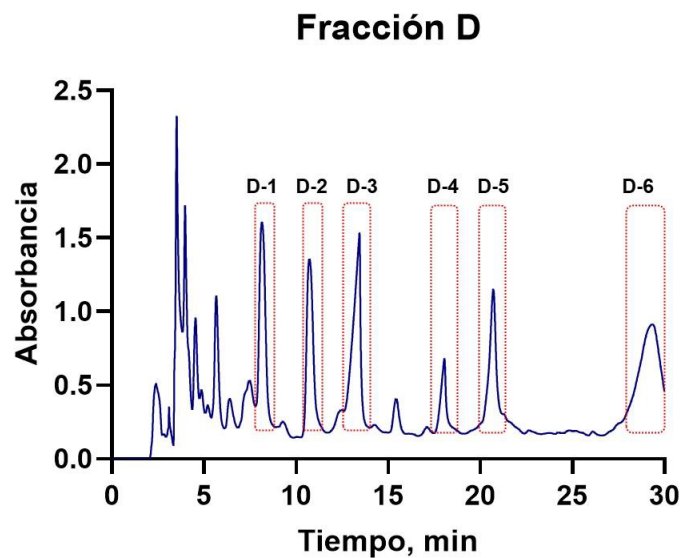


Figura 10. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C₁₈; f.m.: 30-50 % MeCN/30 min), de la fracción **D**.

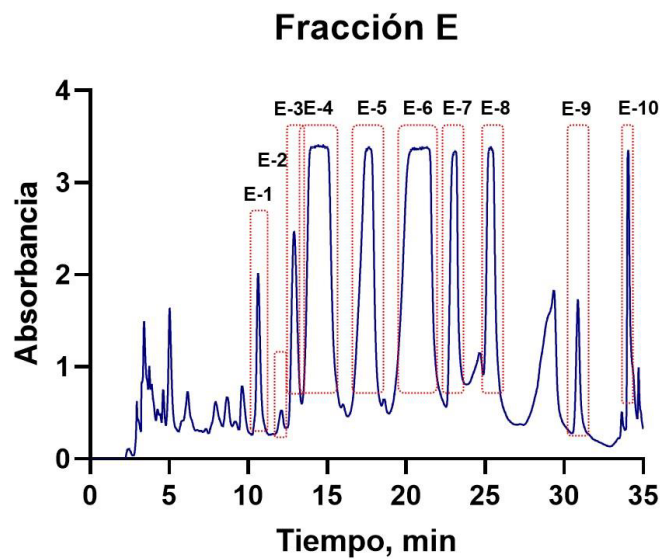


Figura 11. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C₁₈; f.m.: 35-60 % MeCN/30 min), de la fracción **E**.

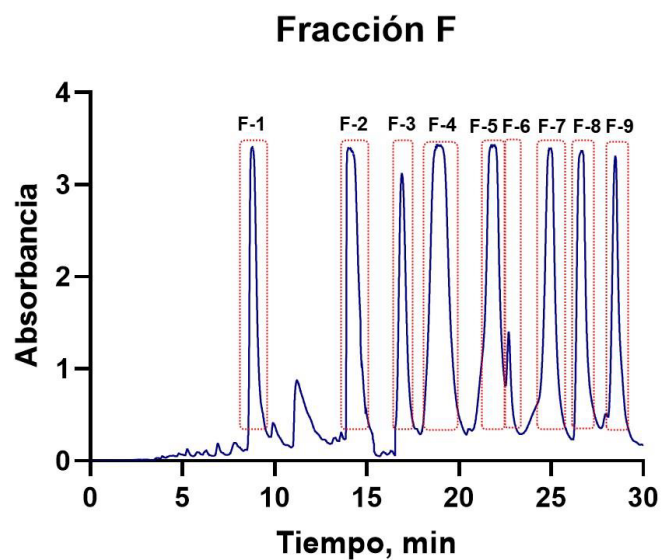


Figura 12. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C₁₈; f.m.: 30-60 % MeCN/30 min), de la fracción F.

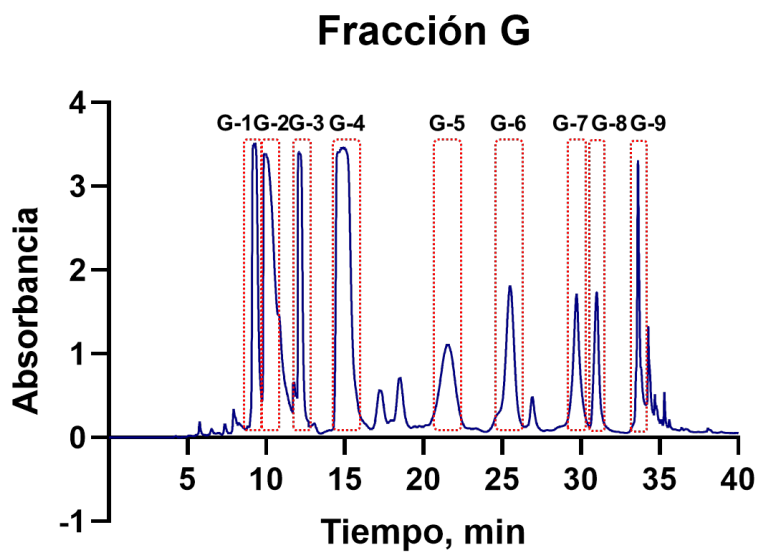


Figura 13. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C₁₈; f.m.: 30-90 % MeCN/30 min), de la fracción G.

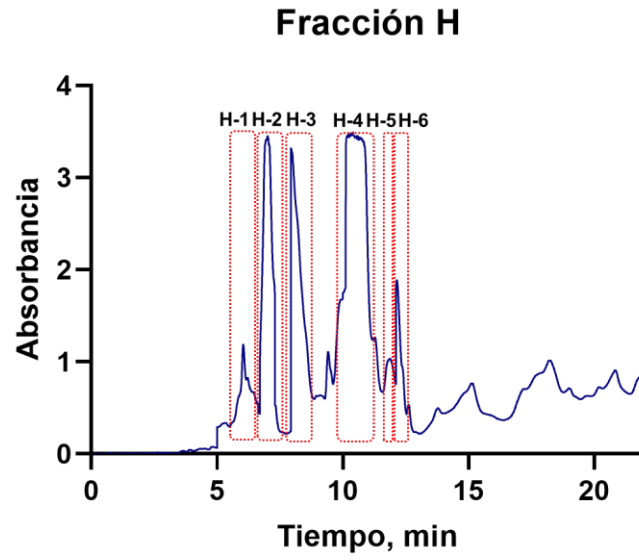


Figura 14. Cromatograma (254 nm) obtenido por HPLC-DAD en modo semi-preparativo (f.e.: C₁₈; f.m.: 30-70 % MeCN/30 min), de la fracción **H**.

Tabla 5. Aislamientos de las fracciones elegidas con actividad antibacteriana.

N°	Fracción	mg	Subfracción
1	D	2.6	D-1
2		3.3	D-2
3		4.0	D-3
4		1.8	D-4*
5		1.4	D-5*
6		1.5	D-6
7	E	1.5	E-1
8		2.0	E-2*
9		3.5	E-3
10		2.0	E-4*
11		8.0	E-5*
12		10.0	E-6
13		7.7	E-7*
14		4.6	E-8*
15		4.9	E-9
16		1.5	E-10
17	F	5.1	F-1*
18		2.6	F-2
19		4.3	F-3
20		12.0	F-4
21		6.5	F-5*
22		1.3	F-6
23		0.5	F-7*
24		4.3	F-8
25		0.3	F-9*
26	G	6.1	G-1
27		4.8	G-2
28		1.0	G-3
29		1.5	G-4
30		4.0	G-5
31		1.7	G-6
32		1.7	G-7
33		1.0	G-8
34		1.0	G-9
35	H	0.5	H-1*
36		0.3	H-2*
37		1.0	H-3
38		1.9	H-4
39		2.0	H-5
40		0.1	H-6*

*No seleccionados para la evaluación biológica.

De las 5 fracciones elegidas (**D-H**) se obtuvieron 40 subfracciones (**Tabla 5**). Cada una de estas se analizó nuevamente por las columnas en el equipo HPLC y/o se registró su perfil RMN-¹H para asegurar el aislamiento de moléculas individuales. De los 40 aislamientos se descartaron 14 (marcados con *), ya fuese por su bajo rendimiento (< 1 mg) o porque había más de un compuesto. Este procedimiento seleccionó 26 aislados para continuar con los ensayos biológicos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Aislados seleccionados para las evaluaciones biológicas.

Aislados	Subfracción	mg
I	D-1	2.6
II	D-2	3.3
III	D-3	4.0
IV	D-6	1.5
V	E-1	1.5
VI	E-3	3.5
VII	E-6	10.0
VIII	E-9	4.9
IX	E-10	1.5
X	F-2	2.6
XI	F-3	4.3
XII	F-4	12.0
XIII	F-6	1.3
XIV	F-8	4.3
XV	G-1	6.1
XVI	G-2	4.8
XVII	G-3	1.0
XVIII	G-4	1.5
XIX	G-5	4.0
XX	G-6	1.7
XXI	G-7	1.7
XXII	G-8	1.0
XXIII	G-9	1.0
XXIV	H-3	1.0
XXV	H-4	1.9
XXVI	H-5	2.0

5.10 Caracterización química de los compuestos aislados

La determinación estructural de los compuestos aislados con actividad biológica se llevó a cabo por técnicas espectroscopias de resonancia magnética nuclear (RMN) y por técnicas espectrométricas. Para los experimentos de RMN mono y bidimensionales se utilizó un espectroscopio BRUKER-AVANCE 700 que opera a 700 MHz para ^1H y 175 MHz para ^{13}C , los espectros se registraron en CDCl_3 y todos los desplazamientos químicos (δ) se referenciaron en relación con el pico de disolvente deuterado^{51,52}. Por otro lado, se midió la masa exacta de los compuestos en un espectrómetro JEOL, AccuTOF JMS-T100LC (HR-DART-MS) con PEG y/o HPLC (Agilent 1260 Infinity) acoplado a un espectrómetro de masas MS-(ESI+)-SQ-TOF (Agilent G6530BA)^{51,52}.

- **Compuesto 1: Asperazina**

El compuesto **1** se aisló como un sólido de color blanco. Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_4$ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$: 665.2954 uma (**Figura A1**), y calculada para $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_4^+$: 665.2876 uma ($\Delta=11.7$ ppm). ^1H NMR (700 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 8.60 (1H, s-ancha, NH-1'), 7.44 (1H, dd, $J=7.4$, 1.6 Hz, H-5'), 7.30 (3H, m, H-21/H-7'/H-21'), 7.18-7.14 (2H, m, H-20/H-22), 7.18-7.10 (8H, m, H-7/H-19/H-23/H-6'/H-19'/H-20'/H-22'/H-23'), 6.91 (1H, dd, $J=7.5$, 1.2 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, d, $J=8.0$, H-8), 6.75 (1H, td, $J=7.5$, 1.0, H-6), 5.90 (1H, s-ancha, NH-1), 5.82 (1H, d, $J=3.9$ Hz, NH-14),), 5.72 (1H, d, $J=2.2$ Hz, NH-14'), 5.67 (1H, s-ancha, NH-10'), 5.62 (1H, d, $J=1.3$, H-2), 4.22 (1H, td, $J=6.5$, 4.1 Hz, H-15'), 3.96 (1H, td, $J=8.1$, 3.0 Hz, H-15), 3.64 (1H, dd, $J=10.2$, 3.6 Hz, H-11'), 3.43 (1H, dd, $J=14.7$, 4.2 Hz, H-12'), 3.35 (1H, dd, $J=13.7$, 7.4 Hz, H-12), 3.27 (1H, dd, $J=10.3$, 7.4 Hz, H-11), 3.20 (1H, dd, $J=13.9$, 3.9 Hz, H-17), 3.14 (1H, dd, $J=13.8$, 6.5 Hz, H-17'), 3.01 (1H, dd, $J=13.8$, 4.2 Hz, H-17'), 2.94 (1H, dd, $J=13.9$, 8.1 Hz, H-17), 2.90 (1H, dd, $J=14.9$, 10.0 Hz, H-12'), 2.57 (1H, dd, $J=13.7$, 10.4 Hz, H-12); ^{13}C -RMN (175 MHz, CDCl_3): δ_{C} 168.9 (C-13), 168.2 (C-13'), 167.6 (C-16'), 167.1 (C-16), 145.9 (C-9), 135.1 (C-18), 135.0 (C-18'), 134.6 (C-9'), 132.0 (C-4), 129.8 (C-

19/C-23), 129.8 (C-19'/C-23'), 129.4 (C-7), 129.2 (C-20'/C-22'), 129.1 (C-20/C-22), 128.1 (C-4'), 127.9 (C-21), 127.8 (C-21'), 125.2 (C-8'), 124.4 (C-6), 124.3 (C-2'), 121.0 (C-5), 120.0 (C-6'), 119.2 (C-7'), 118.8 (C-5'), 110.5 (C-8), 109.4 (C-3'), 83.3 (C-2), 59.3 (C-15'), 57.5 (C-3), 56.4 (C-15), 56.4 (C-11), 54.3 (C-11'), 40.3 (C-17'), 40.3 (C-17), 39.0 (C-12), 29.6 (C-12')^{61,62}.

- **Compuesto 2: Aurasperona B**

El compuesto **2** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se estableció como C₃₂H₃₀O₁₂ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada [M+H]⁺: 607.1858 uma (**Figura A3**), y calculada para [M+H]⁺ C₃₂H₃₁O₁₂⁺: 607.1816 uma (Δ=6.9 ppm).

¹H NMR (700 MHz, CDCl₃): δ_H 14.51/14.50 (1H, s, 5'-OH), 14.10/14.09 (1H, s, 5-OH), 6.85 (1H, s, H-9), 6.69/6.68 (1H, s, H-10), 6.36 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-7'), 6.14/6.12 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-9'), 4.00 (3H, s, 6'-OMe), 3.80 (3H, s, 8-OMe), 3.65/3.64 (3H, s, 8'-OMe), 3.39/3.38 (3H, s, 6-OMe), 3.05 (1H, dd, J=16.9, 9.9, 3'), 2.98 (1H, dd, J = 16.9, 3.7 Hz, H-3'), 2.92 (2H, d, J = 13.9 Hz, H-3), 1.80 (3H, s, 2-Me), 1.48 (3H, s, 2'-Me); ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃): δ_C 197.6 (C-4'), 196.7 (C-4), 165.1 (C-5'), 164.3 (C-5), 162.4 (C-8'), 161.9 (C-6'), 161.2 (C-8), 158.4 (C-6), 153.2 (C-10a), 151.4 (C-10'a), 142.7 (C-9a), 142.5 (C-9'a), 118.0 (C-10'), 110.9 (C-5a), 108.0 (C-5'a), 106.8 (C-7), 104.0 (C-4'a), 103.7 (C-4a), 102.8 (C-10), 102.4 (C-9), 100.4 (C-2'), 100.2 (C-2), 97.5 (C-9'), 96.5 (C-7'), 61.8 (6-OMe), 56.4 (6'-Me), 56.1 (8-OMe), 55.3 (8'-OMe), 47.4 (C-3), 46.9 (C-3'), 29.1 (2'-Me), 28.9 (2-Me)^{63,64}.

- **Compuesto 3: Aurasperona F**

El compuesto **3** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se estableció como C₃₁H₂₄O₁₀ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada [M+H-H₂O]⁺: 557.1446 uma (**Figura A5**), y calculada para [M+H]⁺ C₃₁H₂₅O₁₀⁺: 557.1448 uma (Δ=0.7 ppm).

¹H-RMN (700 MHz, CDCl₃): δ_H 15.25/15.23 (1H, s, 5'-OH), 14.27/14.26 (1H, s, 8-OH), 7.03 (1H, s, H-9), 6.67 (1H, s, H-10), 6.34 (1H, s-ancha, H-7'), 6.26/6.25 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-9'), 5.97/5.96 (1H, s, H-3'), 3.93 (3H, s, 6'-OMe), 3.66 (3H, s, 8'-OMe), 3.43/3.43 (3H, s, 6-OMe), 3.05 (1H, dd, J = 16.9,

4.2 Hz, H-3), 2.98 (1H, dd, $J = 16.9, 1.9$ Hz, H-3'), 2.16/2.15 (3H, s, 2'-Me), 1.81/1.80 (3H, s, 2-Me). ^{13}C -RMN (175 MHz, CDCl_3): δ_{C} 196.6 (C-4), 184.3 (C-4'), 168.2 (C-2'), 164.6 (C-5), 163.9 (C-5'), 162.5 (C-8'), 161.3 (C-6'), 160.0 (C-6), 157.4 (C-8), 153.1 (C-10a), 152.3 (C-10'a), 142.9 (C-9a), 140.8 (C-9'a), 115.1 (C-10'), 110.9 (C-5A), 108.7 (C-5'A), 107.6 (C-3'), 106.5 (C-9), 104.4 (C-4'a), 103.5 (C-4A), 102.5 (C-10), 101.5 (C-7), 100.2 (C-2), 97.5/97.4 (C-7'), 95.9/95.8 (C-9'), 62.2 (6-OMe), 56.2 (6'-OMe), 55.5 (8'-OMe), 47.3 (C-3), 29.8/29.0 (2-Me), 20.9 (2'-Me)^{65,66}.

- **Compuesto 4: TMC-256A1**

El compuesto **4** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$: 273.0760 uma (**Figura A7**), y calculada para $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_5^+$: 273.0763 uma ($\Delta=1.1$ ppm).

^1H -RMN (700 MHz, CDCl_3): δ_{H} 15.02 (1H, s, 5-OH), 6.90 (1H, s, H-10), 6.59 (1H, d, $J=2.2$, H-9), 6.38 (1H, d, $J=2.2$, H-7), 5.99 (1H, d, $J=0.9$ Hz, H-3), 4.01 (3H, s, 6-OMe), 2.35 (3H, d, $J=0.9$ Hz, 2-Me); ^{13}C -RMN (175 MHz, CDCl_3): δ_{C} 184.4 (C-4), 167.6 (C-2), 163.2 (C-5), 161.6 (C-6), 157.8 (C-8), 153.5 (C-10a), 141.1 (C-9a), 108.5 (C-5a), 107.4 (C-3), 104.4 (C-4a), 101.6 (C-9), 100.6 (C-10), 96.7 (C-7), 56.3 (C-6-OMe), 20.8 (C-2-Me)⁶⁷.

- **Compuesto 5: Fonseca B**

El compuesto **5** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$: 287.0906 uma (**Figura A9**), y calculada para $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+ \text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5^+$: 287.0914 uma ($\Delta=2.8$ ppm).

^1H -RMN (700 MHz, CDCl_3): δ_{H} 14.26 (1H, s, 5-OH), 6.51 (1H, s, H-10), 6.46 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-9), 6.31 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-7), 3.96 (3H, s, 6-OMe), 3.89 (3H, s, 8-OMe), 3.01 (1H, d, $J=16.9$ Hz, H-3), 2.92 (1H, d, $J=16.9$ Hz, H-3), 2.82 (1H, s-ancha, 2-OH), 1.74 (3H, s, 2-Me); ^{13}C -RMN (175 MHz, CDCl_3): δ_{C} 196.1 (C-4), 165.0 (C-5), 162.6 (C-8), 161.6 (C-6), 153.3 (C-10a), 143.5 (C-9a), 107.6 (C-5a), 103.2 (C-4a), 102.7 (C-10), 100.1 (C-2), 98.8 (C-9), 96.9 (C-7), 56.2 (C-6-OMe), 55.6 (C-8-OMe), 47.2 (C-3), 28.8 (C-2-Me)⁶⁸.

- **Compuesto 6: Dianhidroaurasperona C**

El compuesto **6** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se estableció como $C_{31}H_{24}O_{10}$ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada $[M+H]^+$: 557.1446 uma (**Figura A11**), y calculada para $[M+H]^+ C_{31}H_{25}O_{10}^+$: 557.1448 uma ($\Delta=0.7$ ppm).

1H -RMN (700 MHz, $CDCl_3$): δ_H 15.16 (1H, s, 5-OH), 14.91 (1H, s, 5'-OH), 7.20 (1H, s, 9H), 7.13 (1H, s, 10H), 6.27 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-7'), 6.26 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-9'), 6.06 (1H, s, 8-OH), 6.02 (1H, s, H-3), 5.93 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H-3'), 3.85 (3H, s, 6'-OMe), 3.66 (3H, s, 8'-OMe), 3.45 (3H, s, 6-OMe), 2.40 (3H, d, $J=0.8$ Hz, 2-Me), 2.16 (3H, d, $J=0.8$ Hz, 2'-Me). ^{13}C -RMN (175 MHz, $CDCl_3$): δ_C 184.7 (C-4), 184.3 (C-4'), 168.3 (C-2'), 167.9 (C-2), 163.7 (C-5'), 162.4 (C-5), 162.4 (C-8'), 161.1 (C-6'), 159.0 (C-6), 156.8 (C-8), 153.4 (C-10a), 152.2 (C-10a'), 140.8 (C-9a), 140.8 (C-9a'), 116.0 (C-7), 111.4 (C-5a), 108.6 (C-5a'), 107.5 (C-3), 107.4 (C-3'), 106.1 (C-9), 104.5 (C-4a), 104.3 (C-4a'), 101.9 (C-10), 101.0 (C-10'), 97.3 (C-7'), 96.0 (C-9'), 62.3 (6-OMe), 56.1 (6'-OMe), 55.4 (8'-OMe), 20.9 (2-Me), 20.9 (2'-Me)⁶⁹.

- **Compuesto 7: Aurasperona A**

El compuesto **7** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se estableció como $C_{32}H_{26}O_{10}$ con base en la masa exacta observada para la molécula protonada $[M+H]^+$: 571.1600 uma (**Figura A13**), y calculada para $[M+H]^+ C_{32}H_{27}O_{10}^+$: 571.1604 uma ($\Delta=0.2$ ppm.).

1H -NMR (700 MHz, $CDCl_3$): δ_H 15.23 (1H, s, 5'-OH), 14.83 (1H, s, 5-OH), 7.15 (1H, s, H-10), 6.97 (1H, s, H-9), 6.41 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-9'), 6.21 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7'), 6.06 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-3), 5.98 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-3'), 4.03 (3H, s, 6'-OMe), 3.79 (3H, s, 8-OMe), 3.62 (3H, s, 8'-OMe), 3.46 (3H, s, 6-OMe), 2.42 (3H, s, 2-Me), 2.12 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, 2'Me); ^{13}C -RMN (175 MHz, $CDCl_3$): δ_C 184.8 (C-4'), 184.6 (C-4), 167.8 (C-2), 167.7 (C-2'), 162.9 (C-5'), 162.2 (C-5), 161.6 (C-8'), 161.2 (C-6'), 160.4 (C-8), 158.8 (C-6), 153.5 (C-10a), 151.0 (C-10'a), 140.9 (C-9a), 140.7 (C-9'a), 117.8 (C-7), 111.6 (C-5a), 108.7 (C-5'a), 107.6 (C-3), 107.4 (C-3'), 105.3 (C-10'), 104.9

(C-4a), 104.4 (C-4'a), 101.5 (C-9), 101.4 (C-10), 97.0 (C-7'), 96.7 (C-9'), 62.2 (C-6'-OMe), 56.4 (C-6'-OMe), 56.1 (C-8'-OMe), 55.3 (C-8'-OMe), 20.9 (C-2-Me), 20.8 (C-2'-Me)⁷⁰.

5.11 Expresión y purificación de AbFtsZ

La secuencia optimizada de codones de la proteína FtsZ₁₋₄₁₂ mutante sensible a la temperatura de *Acinetobacter baumannii*, (ID Gen Bank CU459141.1) se clonó en el vector de expresión pET-28-HT (Addgene), cuyo sitio de trombina se cambió por el sitio TEV. La construcción se amplificó mediante PCR utilizando el oligonucleótido específico FtsZ Fwd 5'-CCGCATATGGCCTCATTGGAATTTAGAAG-3' y FtsZ Rev 5'-TTCAAGCTTACTTACGTTGCTGATTTTTC-3' que introducen los sitios de restricción 5'-NdeI y 3'-HindIII. El vector resultante AbFtsZ₁₋₄₁₂ se verificó mediante secuenciación de ADN (Laragen, Inc)⁷¹. Para expresar la proteína recombinante, se inocularon 20 mL de medio LB con kanamicina (50 µL/mL) y cloranfenicol (30 µL/mL) con una colonia de la cepa *E. coli Rosetta* (DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, EE.UU.) previamente transformada con el vector AbFtsZ₁₋₄₁₂ (por choque térmico) y se cultivó toda la noche a 37 °C con agitación continua^{51,52}. Al día siguiente, el cultivo se diluyó 1:20 en medio LB fresco con antibióticos, y se incubó a 37 °C hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0.6. La expresión de la proteína se indujo añadiendo IPTG (0.5 mM) a 30 °C durante 6 h. Posterior al periodo de incubación de la inducción, se obtuvo el sedimento celular por centrifugación (5500 g, 10 min, 4 °C). El paquete celular se conservó a -20 °C hasta la purificación de la proteína.

La purificación de FtsZ (*A. baumannii*) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Jiménez, B. *et. al.*⁵² y Chen, Y. *et. al.*⁷² con algunas modificaciones⁵¹. Brevemente, el *pellet* celular de un cultivo de 500 mL se descongeló en hielo y se suspendió en 40 mL de tampón de lisis (300 mM KCl, 50 mM Tris y glicerol 10 % a pH 8.0). La lisis se realizó por choques de sonicación (*Misonix3000*) con intervalos de 5 segundos ON y 30 segundos OFF para un total de 4 minutos de sonicación (750 W). La fracción soluble se aclaró por centrifugación (45 minutos a 30.000 g, 4

°C) y después filtró con una membrana de PVDF (tamaño de poro de 45 µm). La enzima *AbFtsZ₁₋₄₁₂* fue purificada por cromatografía de afinidad (Columna Ni²⁺ *His Trap*). La columna de afinidad se equilibró con la solución tampón de lisis. La elución consistió en la solución tampón de lisis (300 mM KCl, 50 mM Tris y glicerol 10 % a pH 8.0) e imidazol (50 mM) con un flujo de 1 mL/min, finalmente se realizó una electroforesis de SDS-PAGE (12 %). La proteína se utilizó inmediatamente para el ensayo de actividad para comprobar su actividad enzimática, y después alícuotada y almacenada a -80 °C en el mismo tampón de lisis.

5.12 Ensayo de actividad e inhibición de *AbFtsZ₁₋₄₁₂*

Brevemente, el ensayo consistió en un método de microdilución en placa de 96 pozos monitoreado por un lector de placas a una longitud de onda de 630 nm y a 37 °C⁵¹. Se empleó una solución amortiguadora de ensayo (300 mM KCl, 50 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂ a 7.0 pH), junto con la enzima *AbFtsZ₁₋₄₁₂* a una concentración final de 4 µM y usando GTP (50 µM, concentración final) como sustrato, los compuestos a una concentración final de 100 ppm (DMSO) y/o berberina (control positivo, 186 ppm). Como control negativo (utilizado para la actividad/inhibición porcentual), se empleó la enzima (4 µM), GTP (50 µM), la solución tampón de ensayo y DMSO (2 % v/v). Todos los ensayos se realizaron en un volumen final de 100 µL. Después, la placa se incubó a 37 °C durante 30 min, y, transcurrido dicho tiempo, se adicionaron 20 µL de solución de verde malaquita a cada pozo [500 µL de verde malaquita (1.22 mg/mL en ácido sulfúrico 20 % v/v) + 125 µL de molibdato de amonio (7.5 % p/v) y 10 µL Tween²⁰ (11 % v/v)] y se registraron las lecturas de absorbancia a 630 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se muestran como media ± desviación estándar. El diseño del experimento se indica en la **Figura 15**.

Los porcentajes de inhibición y/o actividad de la enzima en presencia de las sustancias de prueba se calculó empleando las ecuaciones **3** y **4**.

$$\% \text{ Actividad} = \left(\frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control\ negativo} - Abs_{blanco}} \right) * 100 \% \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control\ negativo} - Abs_{blanco}} \right) * 100 \% \quad \text{Ecuación 4}$$

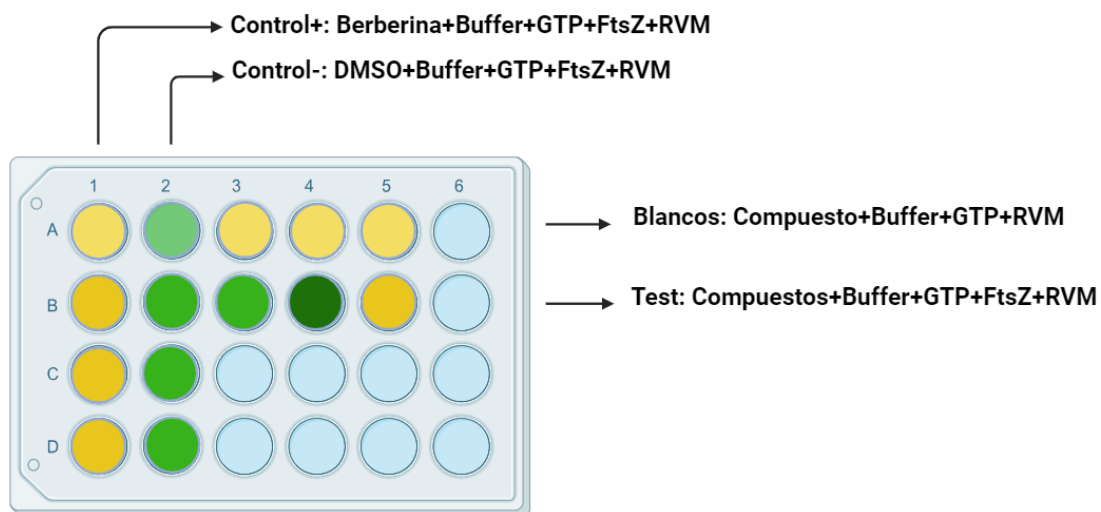


Figura 15. Diseño de la placa para el ensayo enzimático de AbFtsZ, descrito en este trabajo.

6. Resultados y discusión

Este trabajo se originó con el objetivo de identificar metabolitos fúngicos con actividad antimicrobiana contra cepas multirresistentes de aislados clínicos, específicamente *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Para ello, se implementó una metodología que incluyó el rastreo de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana en extractos fúngicos obtenidos de manglares mexicanos.

En resumen, el proceso se inició con la recolección de muestras de hojas y raíces de manglares (*Rhizophora mangle* y *Laguncularia racemosa*) en cinco lagunas poco estudiadas con una alta biodiversidad. A partir de estas muestras vegetales, se aislaron microorganismos fúngicos endófitos, que posteriormente se cultivaron hasta obtener 250 cepas axénicas. Luego, empleando técnicas de maceración y extracción sólido-líquido se obtuvieron los extractos orgánicos de estos microorganismos, con el propósito de evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de las bacterias resistentes. Con base en estos resultados, se seleccionaron 28 de los 250 hongos para un escalamiento adicional, evaluación biológica y perfilamiento químico por HPLC-MS/MS para identificar posibles compuestos citotóxicos en dichos extractos, y así poder discernirlos y escoger el adecuado para el aislamiento de compuestos.

Los resultados de estos análisis permitieron la elección del extracto del hongo IQ-548 (*Aspergillus* sp.) para su estudio químico y el aislamiento de moléculas promisorias. De manera paralela a este proceso, se trabajó en la expresión y purificación de la enzima FtsZ de *A. baumannii* para investigar un posible mecanismo de acción de los compuestos aislados, ya que esta enzima desempeña un papel fundamental en la división bacteriana. En consecuencia, las moléculas aisladas se evaluaron tanto en ensayos de actividad antibacteriana como en ensayos enzimáticos sobre *AbFtsZ*. Finalmente, los metabolitos con actividad se

caracterizaron para establecer su estructura química. La **Figura 16** resume la estrategia experimental empleada en este proyecto de investigación.

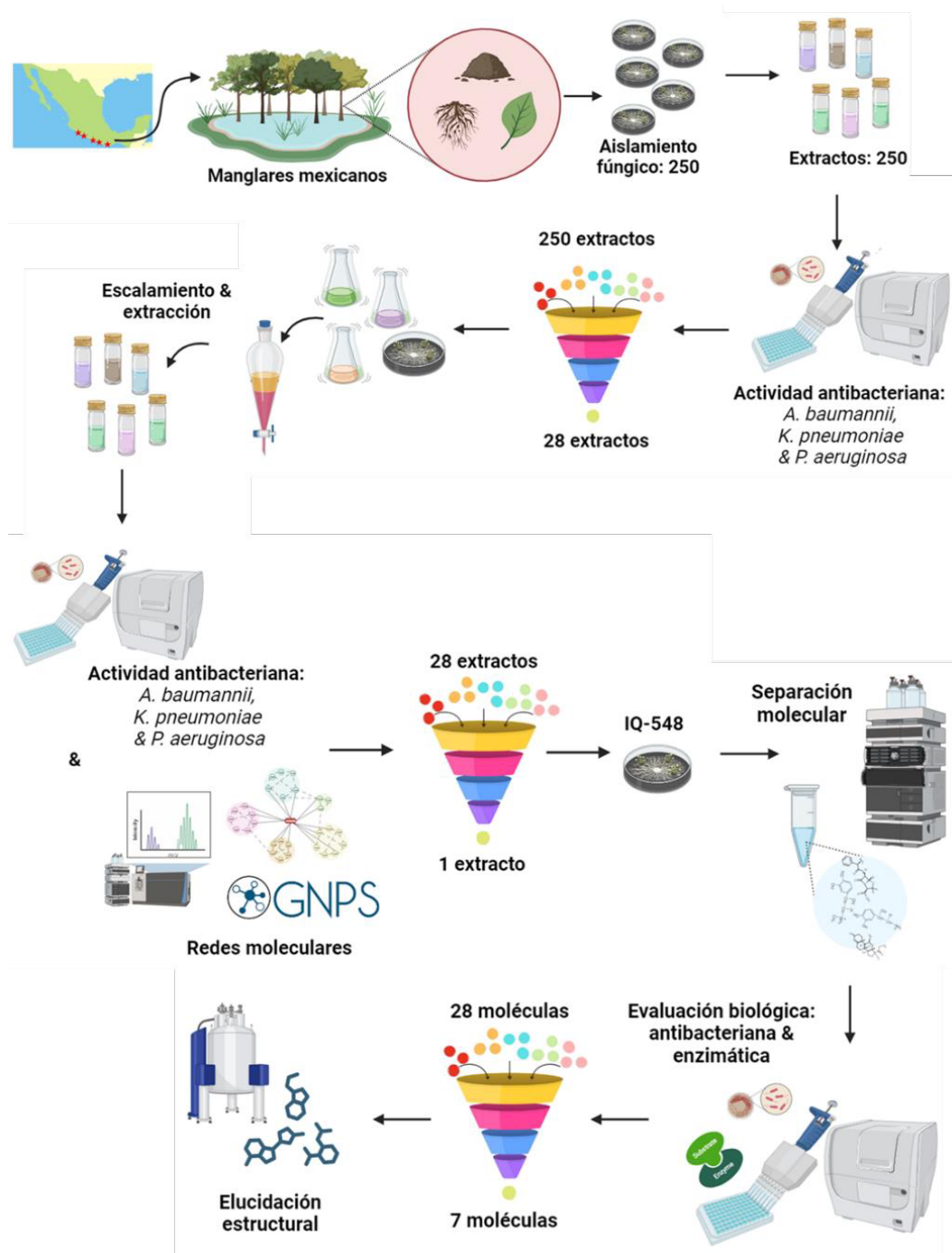


Figura 16. Flujo de trabajo empleado en esta investigación, para la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana.

6.1 Aislamiento de microorganismos fúngicos y cribado de actividad antibacteriana

Aislamiento de microorganismos

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto de mayor alcance que tiene como objetivo principal descubrir nuevos inhibidores bacterianos a partir de hongos microscópicos de manglares mexicanos (*Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle*).

México ocupa la sexta posición en abundancia de manglares a nivel mundial^{44,73}. Los manglares son ecosistemas altamente biodiversos que albergan una amplia gama de especies, en particular microorganismos heterótrofos como los hongos, con importancia ecológica, química y económica⁷⁴. Estos microorganismos desempeñan diversas funciones en este ambiente, como la descomposición de la madera o de la materia orgánica de los sedimentos, la fragmentación de las hojas y como endófitos en procesos simbióticos con las raíces y hojas de los manglares⁷⁴. Una revisión realizada por Devadatha y colaboradores⁷⁵ indica que hasta el 2020 se han identificado aproximadamente 850 hongos de manglar, siendo *Xylaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., y *Fusarium* spp. los más representados. En este escenario, en este trabajo se investigaron hongos endófitos aislados de manglares mexicanos (*Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle*) en busca de moléculas con actividad antibacteriana frente a cepas multirresistentes intrahospitalarias.

Para ello, inicialmente se realizó un muestreo a lo largo de la costa del Pacífico mexicano en lagunas poco exploradas con alta biodiversidad biológica, incluyendo las Lagunas de Tecomate, Chautengo, Corralero, Chacagua y Ventanilla. Las muestras recolectadas se procesaron empleando métodos microbiológicos convencionales, para obtener 250 cultivos fúngicos axénicos (**Figuras 17-18**).

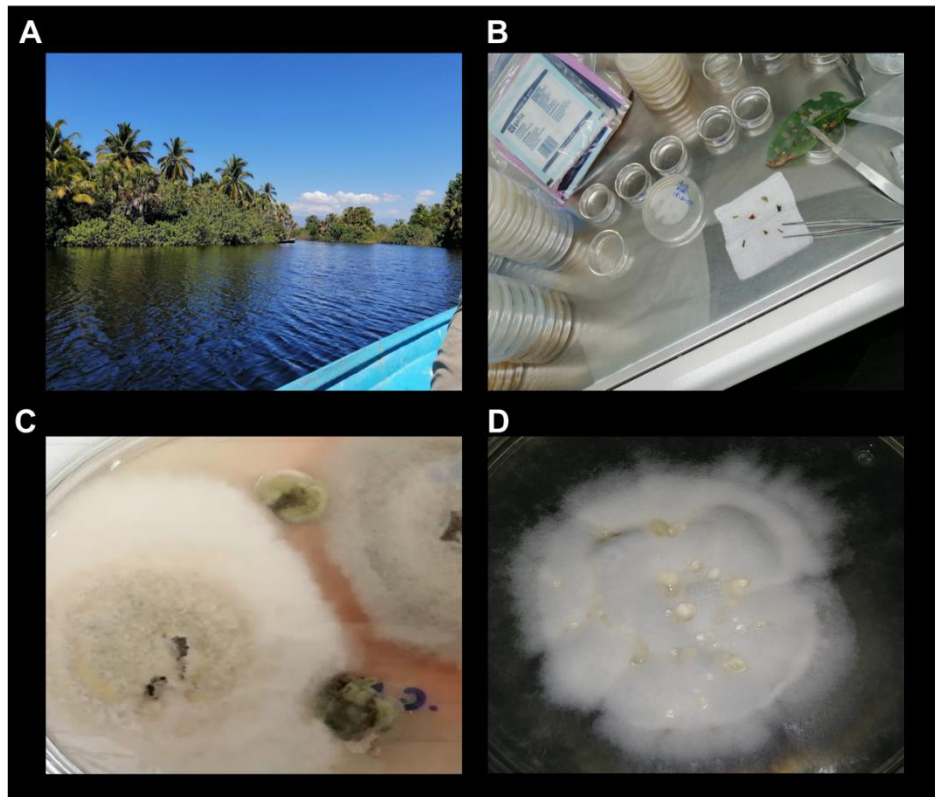


Figura 17. Proceso de obtención de los microorganismos fúngicos para el desarrollo de este trabajo. **A.** Manglares de la Laguna de Chautengo. **B.** Proceso de fragmentación y sanitización de las muestras vegetales. **C.** Crecimiento de los hongos endófitos presentes en las muestras. **D.** Aislamiento de los microorganismos fúngicos hasta su estado axénico.



Figura 18. Algunos de los hongos de manglares en estado axénico que se lograron aislar (250 total).

Cribado de actividad antibacteriana

Las cepas bajo estudio en este proyecto son Gram negativas, aislados clínicos y presentan resistencia a antibióticos de última generación. Los microorganismos *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* son las cepas bacterianas con mayor tasa en aumento de los casos de infecciones bacterianas resistentes en México^{8,9}, aunado a esto, también se encuentran en la lista emergente emitida por la OMS de los microorganismos con prioridad en la búsqueda de nuevos antibióticos⁴.

A. baumannii, es resistente a fármacos como ciprofloxacino, gentamicina, ceftriaxona, piperacilina, ampicilina y, además, muestra una resistencia moderada a la colistina, un antibiótico de última generación empleado por los infectólogos como último recurso hacia este patógeno^{76,77}. Algunos de los mecanismos de resistencia presentados en *A. baumannii* son: cambios en la membrana celular alterando su permeabilidad, lo que ocasiona que se impida la entrada de los fármacos; la expulsión del antibiótico por parte de la célula por medio de bombas de eflujo; alteraciones en la diana molecular y modificaciones enzimáticas hacia el antibiótico⁷⁶⁻⁷⁸.

Por su parte, *K. pneumoniae* presenta mecanismos de resistencia como impermeabilidad en la membrana, inactivación del fármaco por parte de β -lactamasas, y es resistente a betalactámicos, carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación^{8,79}.

P. aeruginosa muestra resistencia a antibióticos como carbapenémicos, piperacilina y fluoroquinolonas, y algunos mecanismos de resistencia que presenta son, membrana externa de baja permeabilidad, formación de biopelículas y bombas de eflujo^{8,79}.

Los resultados de la actividad antibacteriana de los 250 extractos fúngicos (cultivados en medio sólido PDA) frente a las cepas de estudio *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, se analizaron mediante conglomerados jerárquicos y se visualizaron por medio de un mapa de calor (**Figura 19**). Los resultados se agruparon en dos conglomerados principales: *P. aeruginosa* y *A. baumannii*-*K.*

pneumoniae, evidenciando la elevada resistencia de la cepa de *P. aeruginosa*, para la cual sólo se detectaron tres extractos con porcentajes de inhibición superior al 50 %, en comparación con las cepas *A. baumannii* y *K. pneumoniae* que tuvieron 28 y 19 extractos fúngicos con respuesta (mayor al 50 % de inhibición), respectivamente. Algunos de los aislamientos más promisorios para la búsqueda de moléculas bioactivas fueron: IQ-548 que fue el único que presentó respuesta frente a las tres bacterias (*A. baumannii*: 42 ± 2 %; *K. pneumoniae*: 73 ± 5 %; *P. aeruginosa*: 19 ± 8 %), el extracto IQ-587 con gran respuesta hacia *P. aeruginosa* (*A. baumannii*: 51 ± 4 %; *P. aeruginosa*: 64 ± 4 %), los extractos IQ-520 (*A. baumannii*: 79 ± 4 %, *K. pneumoniae*: 74 ± 3 %) e IQ-567 (*A. baumannii*: 75 ± 2 %, *K. pneumoniae*: 68 ± 4 %) con inhibiciones mayores al 60 %. Los datos completos se encuentran en el **Anexo Tabla A1**.

Con base en estos resultados, se seleccionaron los extractos orgánicos de 28 aislamientos (inhibición del crecimiento bacteriano mayor al 40 %) para proseguir con su estudio (**Tabla 7**). Aunque el extracto del aislamiento IQ-548 presentó una inhibición del 19 ± 8 % para la cepa *P. aeruginosa* se seleccionó, debido a que para las bacterias *A. baumannii* y *K. pneumoniae* el porcentaje de inhibición fue mayor al 40 %. Así mismo, se seleccionó el aislamiento IQ-512 por su inhibición frente a *A. baumannii* (64 ± 5 %).

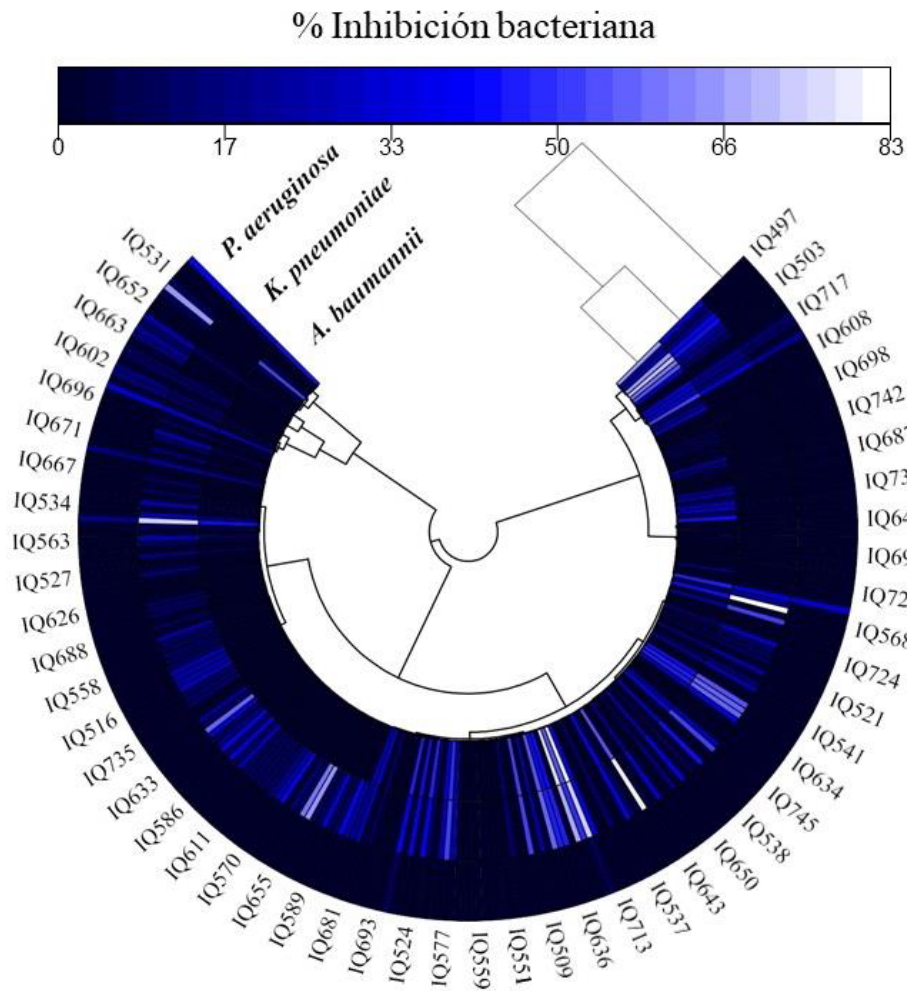


Figura 19. Análisis de conglomerados jerárquicos con mapa de calor de la actividad antibacteriana de los 250 extractos fúngicos axénicos sobre *A. baumannii* (A564), *K. pneumoniae* (K1) y *P. aeruginosa* (48M). Se empleó el método Ward con una escala de distancia euclidiana. La figura se realizó en el software Origin Pro 2023b.

Tabla 7. Capacidad antibacteriana de los extractos axénicos en PDA con inhibición > 40 %.

Extracto fúngico	<i>A. baumannii</i> , % inh.			<i>K. pneumoniae</i> , % inh.			<i>P. aeruginosa</i> , % inh.		
IQ-497	64	±	4	NP			NP		
IQ-503	59	±	3	NP			NP		
IQ-512	64	±	5	39	±	9	NP		
IQ-518	53	±	8	NP			NP		
IQ-519	46	±	5	39	±	2	NP		
IQ-520	79	±	4	74	±	3	NP		
IQ-545	54	±	3	78	±	2	NP		
IQ-547	46	±	3	56	±	5	NP		
IQ-548	42	±	2	73	±	5	19	±	8
IQ-566	54	±	4	57	±	7	NP		
IQ-567	75	±	2	68	±	4	NP		
IQ-568	42	±	2	83	±	3	NP		
IQ-573	43	±	3	47	±	2	NP		
IQ-574	40	±	2	52	±	5	NP		
IQ-577	49	±	2	50	±	6	NP		
IQ-587	51	±	4	NP			64	±	4
IQ-592	42	±	6	NP			NP		
IQ-600	51	±	7	NP			NP		
IQ-631	53	±	5	49	±	1	NP		
IQ-632	69	±	6	44	±	3	NP		
IQ-635	47	±	3	57	±	4	NP		
IQ-636	43	±	3	47	±	5	NP		
IQ-638	50	±	3	50	±	6	NP		
IQ-644	44	±	6	NP			NP		
IQ-651	47	±	9	40	±	2	NP		
IQ-705	47	±	7	NP			NP		
IQ-720	44	±	9	55	±	3	NP		
IQ-732	42	±	7	NP			39	±	5
Gentamicina	20	±	1	100	±	2	100	±	1

NP: no presentó inhibición. n=4.

*Los extractos se evaluaron a 250 ppm y el control positivo a 100 ppm.

6.2 Diversidad taxonómica de los hongos preseleccionados

La identificación taxonómica de 24 de los 28 microorganismos preseleccionados se realizó mediante métodos moleculares. Para ello, se amplificó y secuenció la región ITS del ADN ribosómico. La región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) es una región del ADN ribosomal (ITS1 y ITS2, separados por el gen 5.8S rRNA) que se utiliza comúnmente en la identificación de hongos, y se ha establecido como un marcador de ADN universal, debido a su alta tasa de variación entre especies fúngicas, y se aprovecha esta capacidad para distinguir especies fúngicas estrechamente relacionadas⁵⁵. El árbol filogenético construido tras el alineamiento de la región ITS de las cepas de estudio con aquellas de referencia depositadas en GenBank® muestra las relaciones evolutivas entre los organismos, el árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud (**Figura 20**).

Todos los hongos identificados pertenecen a tres órdenes: Botryosphaerales, Eurotiales e Hypocreales del filo Ascomycota. Dentro de los Eurotiales, los géneros *Talaromyces*, *Aspergillus* y *Penicillium* fueron los más abundantes, mientras que los géneros *Pyllosticta* y *Lasiodiplodia* (Botryosphaerales) fueron menos presentes.

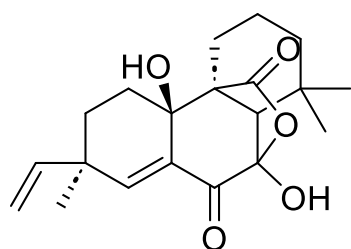


Figura 20. Árbol filogenético de 24 microorganismos fúngicos preseleccionados, a partir de sus regiones ITS. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio.

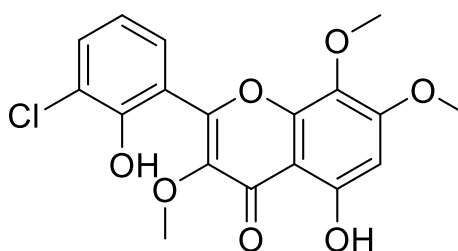
Aspergillus es un género de hongos que produce una variedad de moléculas con importantes actividades biológicas (**Figura 21**). Las especies de este género han sido reconocidas como una enorme fuente de compuestos con estructuras diversas y actividades biológicas prometedoras, incluidas actividades antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas⁸⁰. Algunos ejemplos de moléculas relevantes descubiertas en *Aspergillus* son: la esferopsidina A y a partir de ésta algunos derivados con propiedades anticancerígenas⁸¹, eurocina un péptido bioactivo (antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas y anticancerígeno) producido por *A. montevicensis*, A30461 una nueva tiodicetopiperazina con actividad antifúngica, clorflavonina (antibacteriano frente a *Mycobacterium* spp.) un flavonoide biosintetizado por *A. candidus*, aspulvinonas compuestos con actividad antigripal del virus H1N1 aislados de *A. terreus* derivado del suelo de la rizosfera de manglares, la fumagilina un metabolito aislado de *A. fumigatus* que ha demostrado tener actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli*, la aspergilomarasmina A una molécula aislada de *A. versicolor*, activa frente varias bacterias multirresistentes incluidas las *Enterobacteriaceae* spp. resistentes a los carbapenémicos⁸⁰. Estos hallazgos ponen de manifiesto las diversas actividades y aplicaciones biológicas de las moléculas producidas por *Aspergillus* y su alta riqueza metabólica, que van desde funciones esenciales en el reciclado medioambiental, la patogenicidad y aplicaciones farmacológicas.

Penicillium, es conocido por producir una amplia gama de moléculas con diversas actividades biológicas, destacando los compuestos antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerígenos, promotores del crecimiento vegetal, inhibidores de α -glucosidasas y de α -amilasas⁸². Además, las especies de *Penicillium* han sido reconocidas como una fuente de compuestos con potenciales propiedades antiinfecciosas contra SARM⁸³. Algunos ejemplos de compuestos con relevancia biológica obtenidos a partir del género *Penicillium*, son la penicilina, molécula clave que dio origen a la era dorada del desarrollo de los antibióticos^{84,85}, la ciclosporina un inmunosupresor empleado en las cirugías de trasplantes obtenido de *P. tolietum*. La lovastatina obtenida de *P. citrinum* es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y es utilizada en el tratamiento de la hipercolesterolemia, la viridomicina un

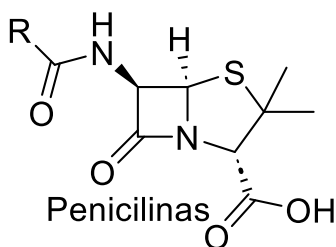
antimicrobiano de amplio espectro aislado de *P. viridicatum*, micafungina un antifúngico usado principalmente en pacientes inmunocomprometidos obtenido de diferentes especies de *Penillium*, entre otros^{84,85}. Estos descubrimientos subrayan las diversas actividades biológicas y las potenciales aplicaciones de las moléculas producidas por el género *Penicillium*, convirtiéndolo en una valiosa fuente para el descubrimiento de compuestos bioactivos con diversas propiedades farmacológicas.



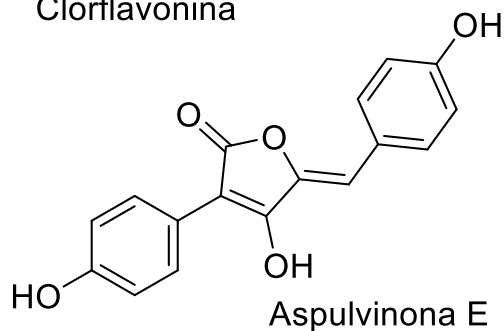
Esferopsidina A



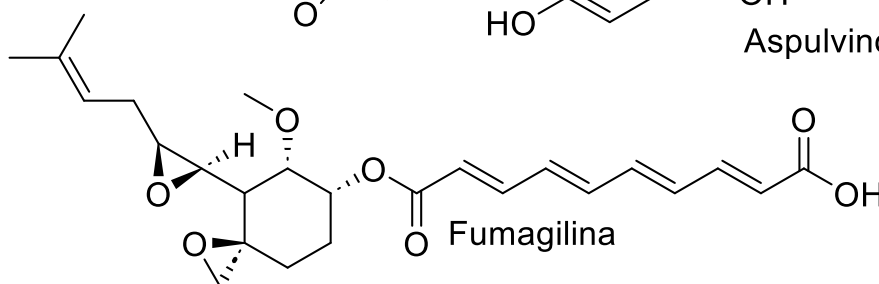
Clorflavonina



Penicilinas



Aspulvinona E



Fumagilina

Figura 21. Algunos metabolitos fúngicos con actividad biológica relevante.

6.3 Priorización de microorganismos para encontrar agentes antibacterianos

Los 28 microorganismos axénicos preseleccionados se cultivaron en medio sólido (Cheerios®) para aumentar el rendimiento¹¹⁴. Una vez obtenidos los extractos orgánicos se evaluó su capacidad antibacteriana frente a las cepas de estudio (**Figura 22-24**), considerando el cambio en el medio de cultivo. Aunque, inicialmente los 28 extractos fúngicos no presentaron inhibición frente a *P. aeruginosa* (**Tabla 7**), se evaluó su capacidad antibacteriana sobre las tres bacterias y considerando que el cambio de medio pudiese impactar en su perfil metabólico, traduciéndose a cambios posibles en la actividad antibacteriana.

Dos géneros muy representativos respecto a la actividad antibacteriana fueron *Aspergillus* y *Penicillium* (**Tabla 8**), que corresponden a aquellos con el mayor número de productos naturales estructuralmente diversos, reportados en la literatura, con 2596 y 2181 productos, respectivamente⁸⁶. *A. baumannii* fue la cepa bacteriana para la cual se presentó mayor respuesta: 9 extractos fúngicos (IQ-503, IQ-512, IQ-518, IQ-519, IQ-548, IQ-567, IQ-568, IQ-573, IQ-574), seguida de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* con cuatro extractos fúngicos para cada una: IQ-512, IQ-548, IQ-567, IQ-568 para *K. pneumoniae*; IQ-503, IQ-512, IQ-548, IQ-568 respecto a *P. aeruginosa* (**Figura 22-24**).

Tabla 8. Aislamientos fúngicos más representativos sobre la inhibición bacteriana.

Género	Aislamiento	<i>A. baumannii</i> , % inh.	<i>K. pneumoniae</i> , % inh.	<i>P. aeruginosa</i> , % inh.
<i>Aspergillus</i> sp.	IQ-503	54 ± 4	NP	66 ± 6
	IQ-512	76 ± 5	44 ± 4	58 ± 2
	IQ-548	60 ± 2	78 ± 9	60 ± 6
<i>Penicillium</i> sp.	IQ-568	42 ± 6	47 ± 5	40 ± 3
	IQ-573	43 ± 7	NP	NP
<i>Fusarium</i> sp.	IQ-547	35 ± 3	NP	NP
<i>Talaromyces</i> sp.	IQ-567	75 ± 5	55 ± 5	31 ± 2
	IQ-574	42 ± 6	NP	NP

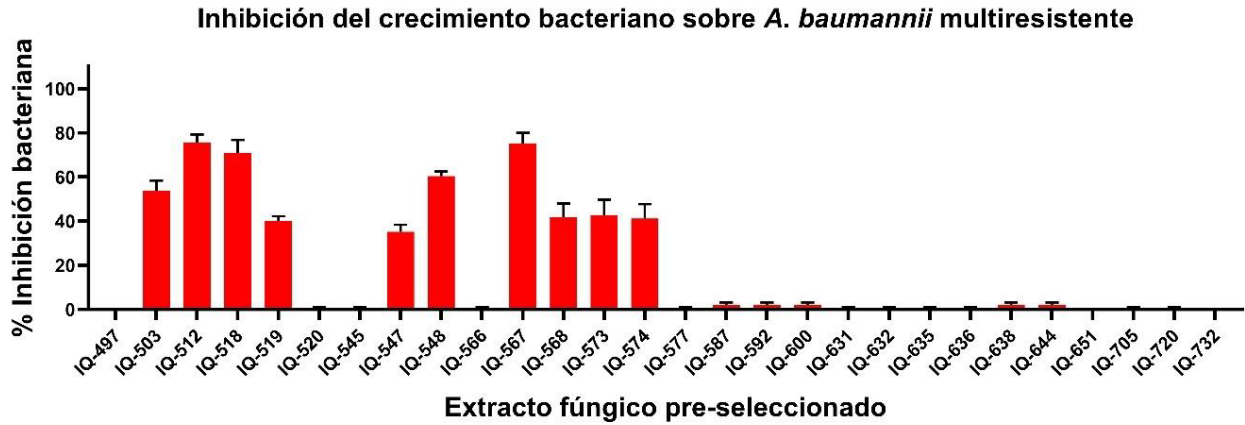


Figura 22. Capacidad antibacteriana por parte de los extractos fúngicos (Cheerios®) pre-seleccionados sobre *A. baumannii* (A564), multirresistente.

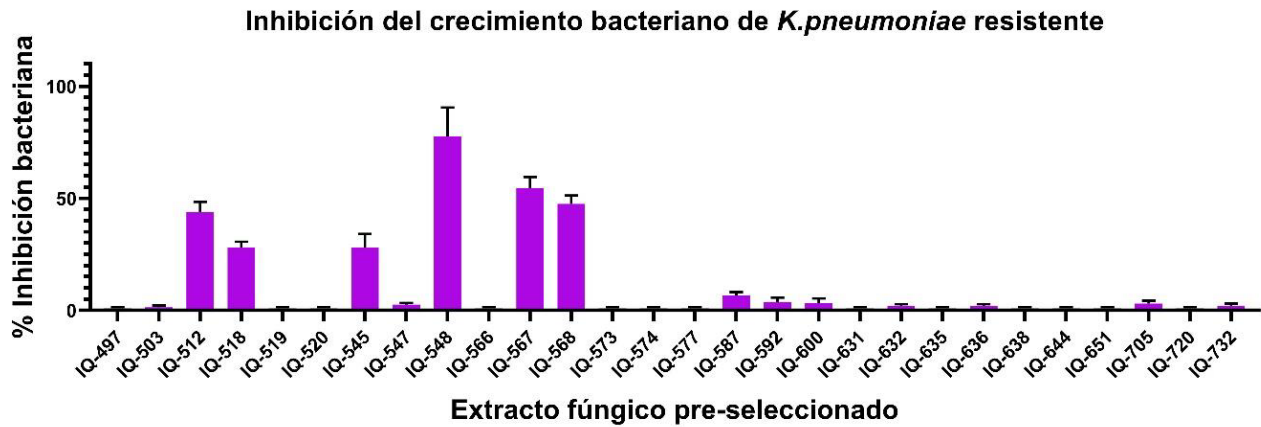


Figura 23. Capacidad antibacteriana por parte de los extractos fúngicos (Cheerios®) pre-seleccionados sobre *K. pneumoniae* (K1), multirresistente.

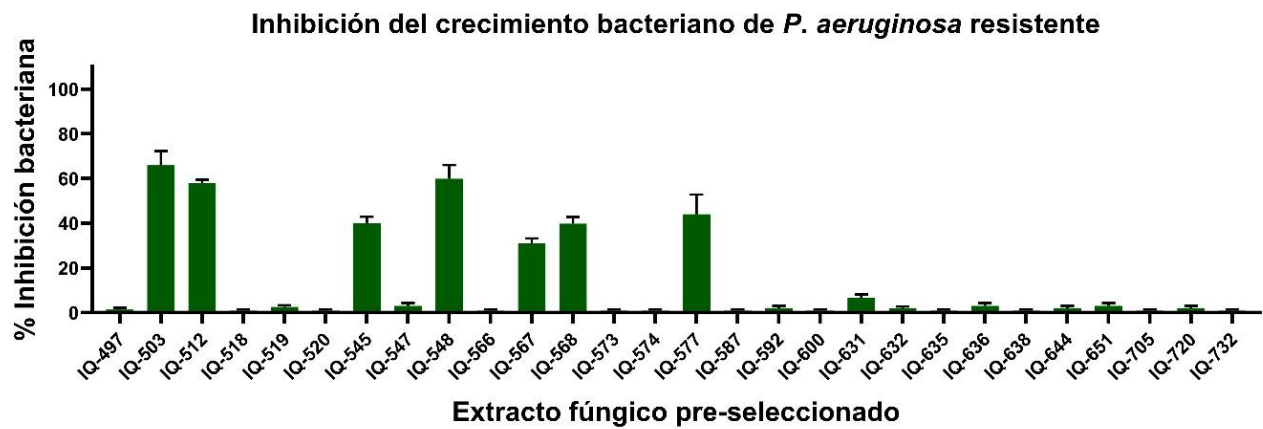


Figura 24. Capacidad antibacteriana por parte de los extractos fúngicos (Cheerios®) pre-seleccionados sobre *P. aeruginosa* (48M), multirresistente.

Estudios de metabolómica no dirigida

GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) es una herramienta de acceso abierto, que incluye amplias bases de datos (ejemplo: NIST, MIADB, MassBank) para la identificación presuntiva de productos naturales⁸⁷⁻⁸⁹. La plataforma GNPS proporciona un conjunto de análisis que generan redes moleculares a partir de datos de espectrometría de masas/masas (MS/MS) que permiten encontrar moléculas conocidas, análogos y tipos de familias de compuestos, sin el procedimiento previo del aislamiento. GNPS ha facilitado la colaboración y la creación de redes entre diferentes grupos de investigación en el mundo (150 países), identificando y enriqueciendo la plataforma con compuestos novedosos de origen natural, lo que ha permitido compartir información y datos ahorrando recursos. Brevemente, la plataforma se alimenta con los espectros de masas de los compuestos presentes en una muestra, los clasifica dependiendo las diferencias, posteriormente compara cada uno de estos espectros con las bases de datos para asignar alguna identificación presuntiva de alguna molécula conocida, y después, los compara entre los mismos compuestos presentes para agruparlos dependiendo el grado de similitud entre ellos⁸⁷⁻⁸⁹. Algunas herramientas adicionales de GNPS son *Dereplicator+* y *MolNetEnhancer*. El algoritmo *Dereplicator+* es una herramienta que permite la identificación presuntiva de metabolitos por medio de análisis *in-silico* de las posibles múltiples fragmentaciones (iones fragmentos) que pudiera presentar un compuesto. Genera un espectro de masas teórico (gráfico de fragmentación) el cuál compara con los reposados en las bases de datos para llegar a una asignación. Esta herramienta fue inicialmente desarrollada para péptidos analizando la ruptura de enlaces peptídicos, posteriormente se tuvieron en cuenta las rupturas no sólo de enlaces peptídicos, sino de enlaces tipo C-C y/o C-O, para el análisis y/o identificación de lípidos, alcaloides, policétidos, flavonoides, entre otros, esto se conoce como *Dereplicator+*. Esta identificación presuntiva es útil ya sea para evitar el reaislamiento de compuestos conocidos, encontrar análogos y/o explorar los perfiles metabólicos del origen de la muestra (microorganismos, plantas, algas, entre otros)⁵⁹. Por otro lado, el algoritmo *MolNetEnhancer* realiza una clasificación de los espectros de masas dependiendo de los datos de fragmentación

presentes y de los resultados obtenidos por *Dereplicator+*, para la identificación de familias estructurales de las moléculas (fenoles, ácidos carboxílicos, aminoácidos, alcoholes, entre muchos) y genera sub-redes de éstas, permitiendo una representación química visual⁶⁰.

La información sobre la composición química, obtenida mediante LC-MS/MS para los 28 extractos preseleccionados, se organizó en redes moleculares utilizando la plataforma GNPS con los algoritmos *Derreplicator+* y *MolNetEnhancer*. La red molecular se construyó a partir de 6,123 espectros de masas agrupados en 930 nodos y clasificados en 13 grupos de familias de compuestos (**Figura 25**). Las familias moleculares (*clusters*) representadas en las redes moleculares se basan en la similitud de los espectros de masas (intensidad y fragmentación). El grupo más extenso corresponde a los ácidos benzoicos, con un total de 108 nodos, mientras que se resaltó el grupo de las pironas y piranos, con 13 nodos. Por otro lado, el grupo más pequeño corresponde a las benzodiazepinas, con tan solo dos nodos. Además, este análisis permitió identificar la presencia de 31 metabolitos (con un error de masa inferior a 10 ppm y una similitud de coseno superior a 0.7: **Tabla 9**), entre los que se incluyen algunas micotoxinas como citrinina, harmano, meleagrina y esterigmatocistina, entre otras (**Figura 26**). Es importante mencionar que, de las 32 moléculas identificadas, nueve han sido reportadas previamente por sus actividades hepatotóxicas⁹⁰, neurotóxicas⁹¹, nefrotóxicas⁹² y/o mutagénicas⁹³ (**Tabla 9 y Figura 27**).

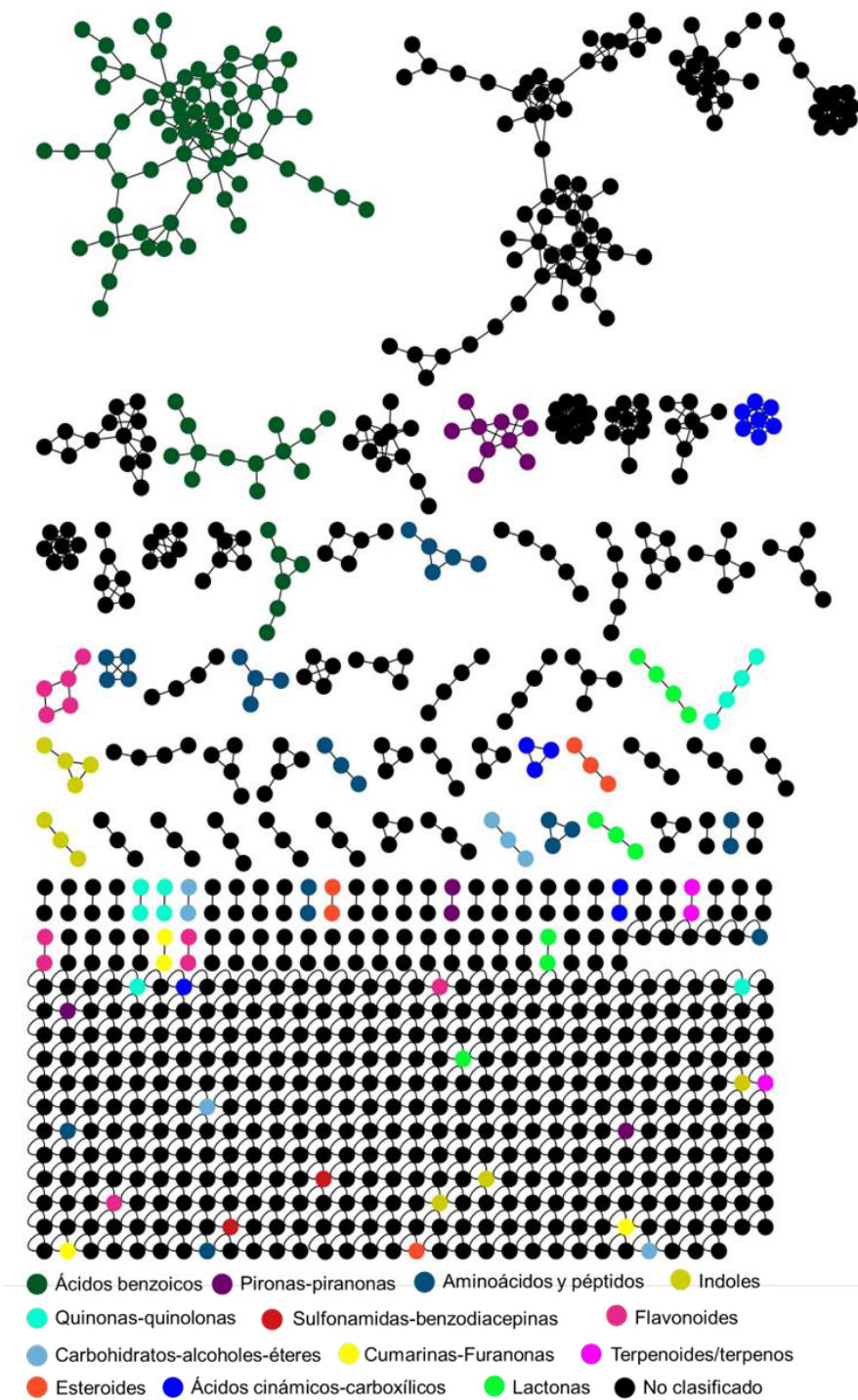


Figura 25. Red molecular generada en la plataforma GNPS de los 28 extractos axénicos pre-seleccionados, con el análisis MolNetEnhancer.

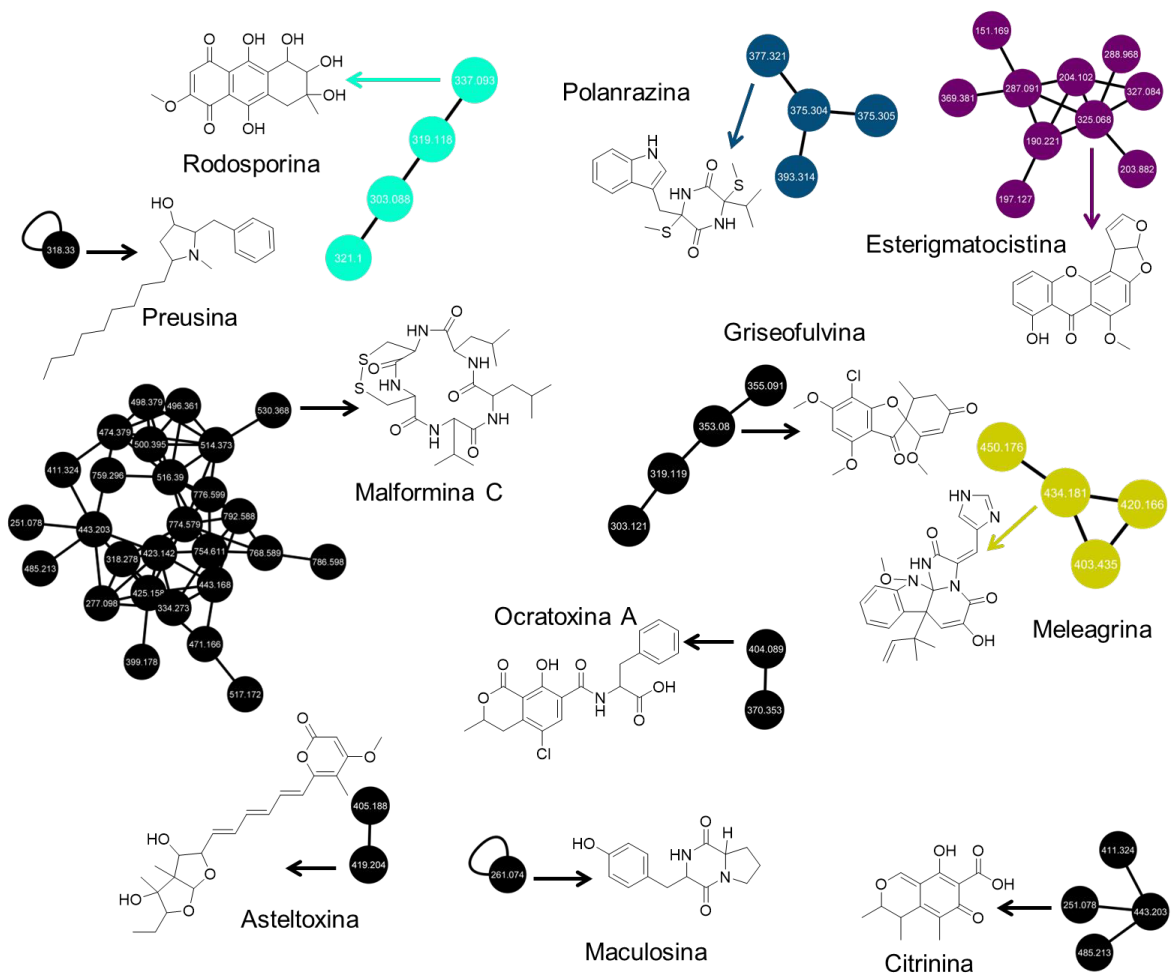


Figura 26. Algunos compuestos identificados presuntamente en la red molecular de los extractos pre-seleccionados.

Este análisis se realizó con el fin de excluir los extractos que contenían compuestos citotóxicos previamente descritos (18 de 28, **Tabla A2**), dando así prioridad al aislamiento de entidades químicas con actividad biológica prometedora frente a las cepas de estudio.

Con base en los resultados de actividad antibacteriana (inhibición > 40%, **Figura 22-24**) y la identificación presuntiva (**Tabla 9**) se priorizaron los extractos de los microorganismos: IQ-503 (*Aspergillus sp.*), IQ-548 (*Aspergillus sp.*), y IQ-567 (*Talaromyces sp.*), todos microorganismos endófitos de la especie *Rhizophora mangle* (mangle rojo), colectados en la Laguna de Tecomate, Guerrero, México.

Tabla 9. Compuestos identificados presuntamente con el análisis de redes moleculares en GNPS en los extractos preseleccionados.

N°	Compuesto identificado presuntamente	Fórmula molecular	Aducto	Δ PPM	Coseno	Extracto fungico	Actividad relevante
1	Quinolactacina	$C_{16}H_{18}N_2O_2$	[M+H] ⁺	0	0.96	IQ568, IQ573, IQ577, IQ587, IQ638, IQ732	Anticancerígeno ⁹⁰⁻⁹³
2	Glandicolina	$C_{22}H_{21}N_5O_3$	[M+H] ⁺	0	0.91	IQ520	Citotóxica ⁹⁰⁻⁹³
3	Roquefortina	$C_{22}H_{23}N_5O_2$	[M+H] ⁺	0	0.89	IQ520, IQ587	Neurotóxico ⁹⁰⁻⁹³
4	Lumicromo	$C_{12}H_{10}N_4O_2$	[M+H] ⁺	0	0.88	IQ520, IQ545, IQ566, IQ592, IQ632, IQ635, IQ636, IQ720	Colorante fluorescente
5	Maculosina	$C_{14}H_{16}N_2O_3$	[M+H] ⁺	0	0.86	IQ503, IQ519, IQ520, IQ548, IQ566, IQ567, IQ573, IQ587, IQ592, IQ600	Antibacteriano
6	Prolifenilalanina	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	[M-H ₂ O+H] ⁺	0	0.83	IQ497, IQ503, IQ512, IQ518, IQ520, IQ545, IQ547	Anticancerígeno
7	Malformina C	$C_{23}H_{39}N_5O_5S_2$	[M+H] ⁺	0	0.72	IQ503, IQ519, IQ548, IQ705	Anticancerígeno.
8	Vermixocina A	$C_{21}H_{24}O_6$	[M-H ₂ O+H] ⁺	0	0.71	IQ567	Anticancerígeno
9	Coranimina	$C_{44}H_{65}N_7O_7$	[M+H] ⁺	1	0.85	IQ638	-
10	Meleagrina	$C_{23}H_{23}N_5O_4$	[M+H] ⁺	2	0.87	IQ520, IQ545, IQ547, IQ568, IQ638, IQ644	Citotóxica ⁹⁰⁻⁹³
11	Harmano	$C_{12}H_{10}N_2$	[M+H] ⁺	10	0.83	IQ520, IQ545, IQ547, IQ566, IQ573, IQ577, IQ592, IQ631	Citotóxico ⁹⁰⁻⁹³
12	Polanrazina	$C_{18}H_{23}N_3O_2S_2$	[M+H] ⁺	2	0.74	IQ518, IQ520, IQ545, IQ566, IQ573, IQ574, IQ587, IQ592, IQ600, IQ632	Citotóxico ⁹⁰⁻⁹³

Continuación **Tabla 9.** Compuestos identificados presuntamente con el análisis de redes moleculares en GNPS en los extractos preseleccionados.

13	Griseofulvina	C ₁₇ H ₁₇ ClO ₆	[M+H] ⁺	2	0.93	IQ545, IQ631	Antifúngico ⁹⁰⁻⁹³
14	Preusina	C ₂₁ H ₃₅ NO	[M+H] ⁺	3	0.8	IQ518, IQ519	Anticancerígeno y citotóxico ⁹⁰⁻⁹³
15	GameXpéptido C	C ₂₉ H ₅₃ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	3	0.86	IQ518, IQ547, IQ636, IQ720	-
16	Lichexantona	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H]	3	0.71	IQ503, IQ518, IQ548, IQ705	Antibacterial ⁹⁰⁻⁹³
18	Beauvericina	C ₄₅ H ₆₇ N ₃ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	3	0.91	IQ600	Insecticida. antibacterial ⁹⁰⁻⁹³
19	Oleoilglicerofosfolina	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	3	0.95	IQ592, IQ632, IQ635	-
20	Daidzeína	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	3	0.96	IQ567, IQ574, IQ587, IQ592, IQ632, IQ638, IQ720, IQ732	Anticancerígeno ⁹⁰⁻⁹³
21	Ocratoxina A	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	[M+H] ⁺	4	0.78	IQ519	Micotoxina: nefrotóxica ⁹⁰⁻⁹³
22	Mevastatina	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	[2M+NH ₄] ⁺	5	0.85	IQ520	Estatina. Precursor para fármacos hacia la reducción de colesterol
23	Crisogina	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	5	0.77	IQ520, IQ547, IQ636	-
24	Rodosporina	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	[M+H] ⁺	5	0.96	IQ631	Anticancerígeno y antibacterial ⁹⁰⁻⁹³
25	Astelfoxina	C ₂₃ H ₃₀ O ₇	[2M+H] ⁺	6	0.74	IQ518, IQ519	Anticancerígeno ⁹⁰⁻⁹³
26	dilinoil-glicero-3-fosfolina	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	[M+H] ⁺	6	0.98	IQ548, IQ600, IQ636	-
27	Canariona	C ₁₄ H ₈ O ₆	[M+H] ⁺	7	0.83	IQ503, IQ732	Antioxidante ⁹⁰⁻⁹³
28	Surfactina	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	[M+H] ⁺	7	0.89	IQ497, IQ520, IQ547, IQ636	Antibacterial, antifúngica ⁹⁰⁻⁹³
29	Epiequisetina	C ₂₂ H ₃₁ NO ₄	[M+H] ⁺	7	0.81	IQ547, IQ636	-
30	Compactina-diol-lactona	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	[M+H] ⁺	3	0.72	IQ520, IQ545	Anticolesterolémico ⁹⁰⁻⁹³
31	Citrinina	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	7	0.94	IQ512, IQ568, IQ573	Hepatotóxico, nefrotóxica ⁹⁰⁻⁹³
32	Esterigmatocistina	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	9	0.97	IQ512	Citotóxica ⁹⁰⁻⁹³

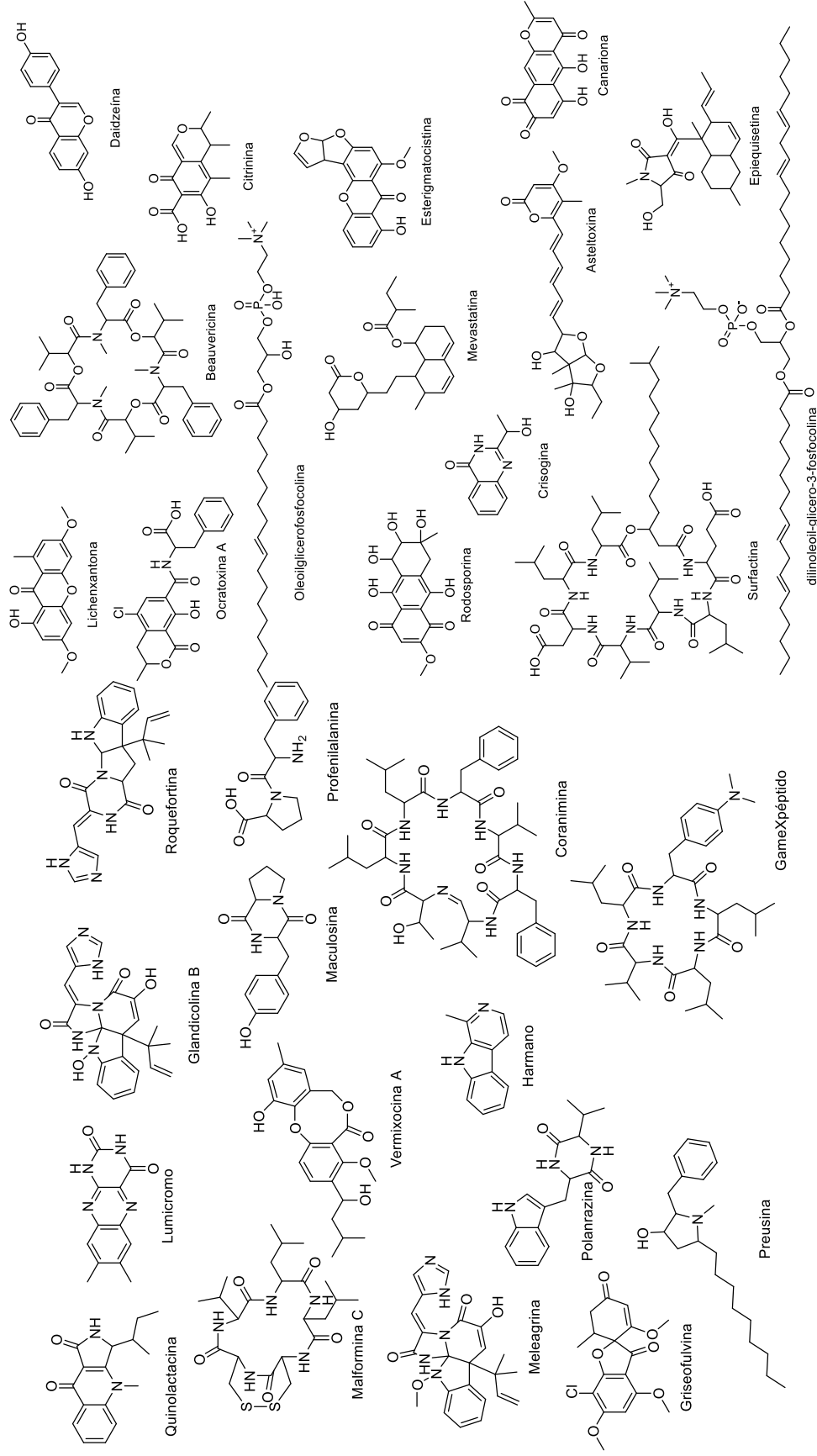


Figura 27. Moléculas desreplicadas por el análisis de las redes moleculares en GNPS.

6.4 Estudio químico biodirigido de IQ-548 (*Aspergillus* sp.)

El fraccionamiento primario del extracto orgánico generó 10 fracciones (**Figura 9** y **Tabla 4**). De estas, con base en su perfil cromatográfico por HPLC-PDA-ELSD y la actividad antibacteriana, se seleccionaron las fracciones **D, E, F, G** y **H** para continuar con el aislamiento guiado por su actividad antibacteriana.

Tabla 10. Capacidad antibacteriana de las fracciones obtenidas de IQ-548, frente a las cepas de estudio.

Fracción	<i>A. baumannii</i> , % inh.	<i>K. pneumoniae</i> % inh.	<i>P. aeruginosa</i> % inh.
A	NP	NP	NP
B	NP	NP	NP
C	NP	NP	NP
D	35 ± 5	37 ± 2	NP
E	53 ± 3	50 ± 4	NP
F	40 ± 2	60 ± 3	27 ± 6
G	30 ± 5	25 ± 3	NP
H	36 ± 4	40 ± 5	NP
I	NP	NP	NP
J	NP	NP	NP
Gentamicina	20 ± 1	100 ± 2	100 ± 1

NP: No presentó actividad. n=4.

*Las fracciones fueron evaluadas a 250 ppm y el control positivo a 100 ppm.

La resolución de las fracciones por HPLC-semipreparativo en fase reversa generó 40 subfracciones: seis para la D, diez para la E, nueve para la F y G, y seis para la H. De estos 40 aislamientos se escogieron 26 para las evaluaciones biológicas, con base en su rendimiento y pureza (**Tabla 5**).

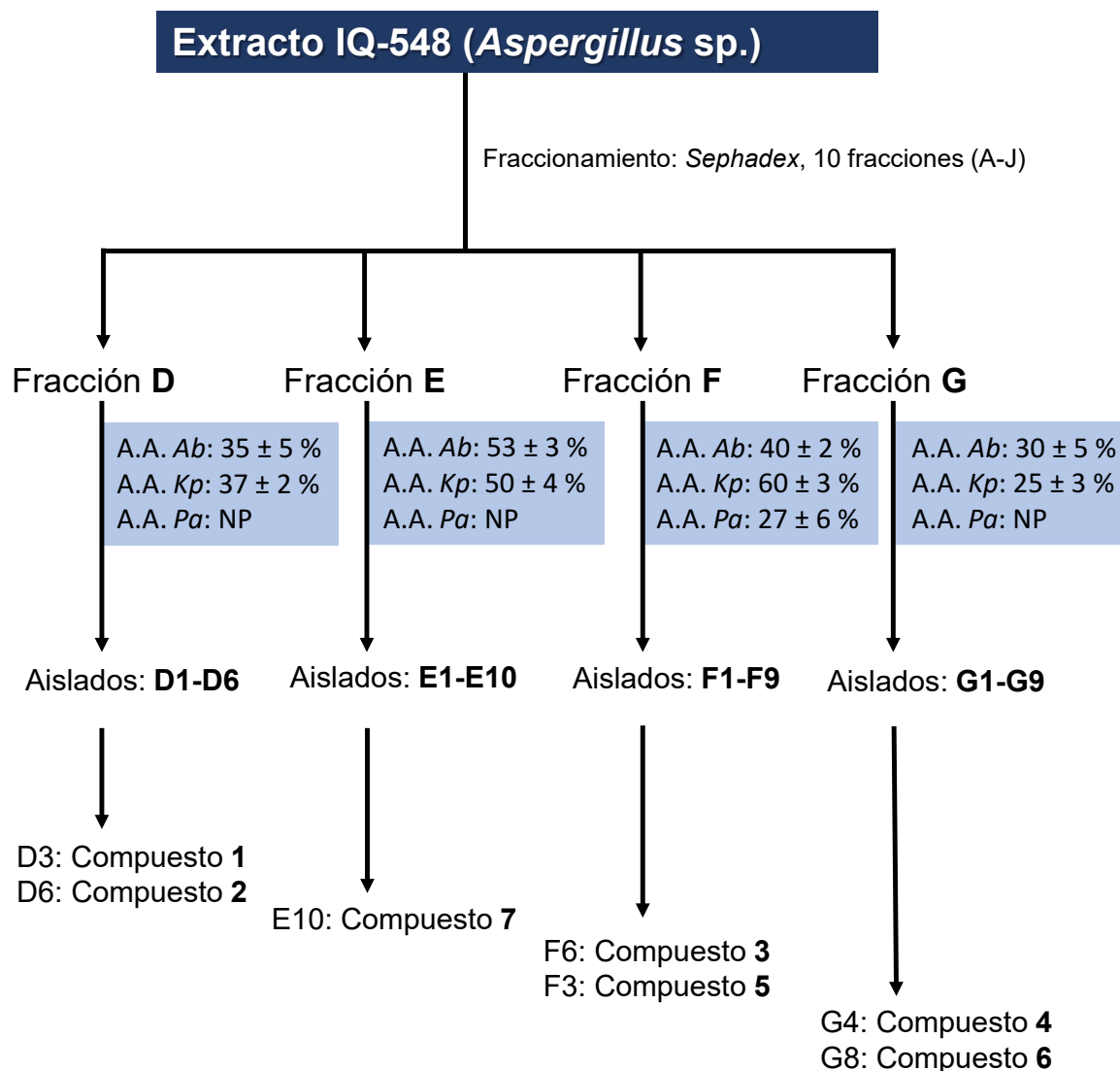


Figura 28. Diagrama de trabajo del fraccionamiento del extracto IQ-548 (*Aspergillus* sp.) para la obtención de los compuestos 1-7. A.A. Actividad antibacteriana.

6.5 Ensayo enzimático de actividad/inhibición de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂

Con el fin de establecer un posible mecanismo de acción de las moléculas aisladas con potencial antimicrobiano y atender la problemática expuesta en este trabajo, se seleccionó a la enzima FtsZ (proteína clave en la fisión binaria) de *A. baumannii*, ya que hasta la fecha no se encuentran reportados inhibidores fúngicos de esta enzima, y, a su vez no hay ningún fármaco aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration*) dirigido a este blanco molecular. El compuesto más avanzado hasta el momento es el TXA709 (una benzamida) que se encuentra en ensayos preclínicos²⁹.

Para encontrar posibles modificadores de la actividad enzimática de *AbFtsZ* fue necesario establecer un ensayo que permitiera monitorear la actividad enzimática de la proteína frente a los compuestos fúngicos, para encontrar dichos modificadores. En este trabajo de investigación se implementó un ensayo espectrofotométrico con el reactivo verde de malaquita, siguiendo algunos protocolos reportados por Quan, A. *et al.*⁹⁴, Martín-García, F. *et al.*⁹⁵, y Baykov, A. *et al.*⁹⁶ con algunas modificaciones y adecuaciones necesarias para trabajar esta enzima y mantener la reproducibilidad en los resultados.

Por otro lado, ya que la estructura de las proteínas depende de parámetros físicos y químicos, y todas sus funciones dependen de su estructura, es altamente recomendado estudiar las proteínas con secuencias completas para comprender su estructura y función y obtener resultados precisos y fiables^{97,98}. Las secuencias de proteínas incompletas o trucas pueden introducir errores o sesgos en el análisis de la estructura y la función de las proteínas. Por estas razones, se expresó la enzima *AbFtsZ* de longitud de 412 aminoácidos (44.47 kDa) (**Figura 30**).

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMASFEFIEDELNDGNGQARFTVFGVGGGGGN
AVQHMQSDIQGVKFCANTDKQALDCMNAPFKIQLGEQSTRGLGAGANPEVG
QVAAEESREIIRQHLEGTDMMVFVVTAGMGGGTGTGAAPVVAEVAKEMGILTVGVV
TTPFNFEGRRRRQKSAERGIEALEAHVDSLIIIPNQRLLSVYGDISMKDAYKKADDVLL
NAVRSIFDLVVRGHINLDFADLKTAMSTRGYAMMGAGLGRGEDRARQAAEQAI
RSPLLDNVNIINAKGVLINITGGDDITLRETEIITDVVNQIVDLDEGEIFYGTVFDPDA
RDELRTVIATGLTRNAADAEPKRKNTVSHTSTQSAQSVEDEDDVPAINKRQNAEN
DVNNAPSSTPRSSPMSIQDYLNQQRK

Figura 29. Secuencia de aminoácidos de *AbFtsZ*.

El gen *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ se subclonó en un vector pET-28 con etiquetas peptídicas His×6 específicas en el N-terminal y un sitio de reconocimiento de proteasas TEV. La expresión de la proteína se realizó a 37 °C en la cepa Rosetta (DE3) pLysS™ tras inducción con IPTG^{51,52}. Tras 6 horas, la proteína *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ se purificó mediante cromatografía de afinidad (**Figura 30**) y se obtuvo en un rendimiento de 100 mg/L de cultivo. Debido a la alta susceptibilidad de esta enzima a los cambios bruscos de temperatura, la purificación y el almacenamiento se realizaron en un ambiente frío a 4 °C y -80 °C, respectivamente⁵¹.

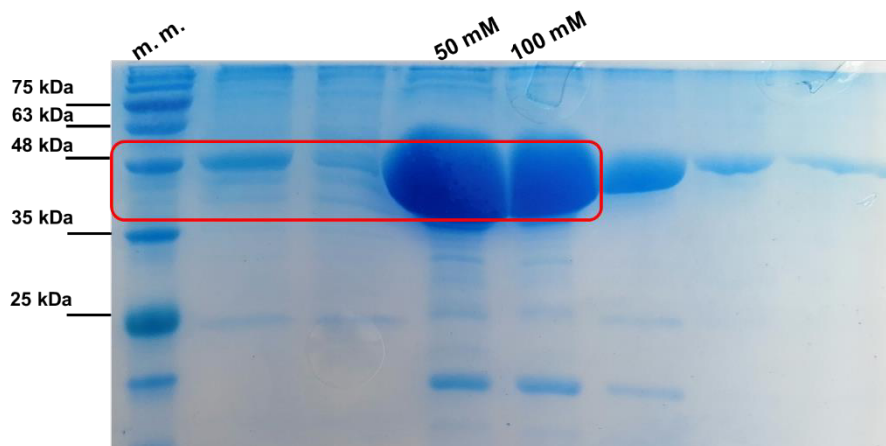


Figura 30. Gel de SDS-PAGE empleado en la purificación de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂.

Una vez obtenida la enzima, se desarrolló un ensayo espectrofotométrico en un formato de placa de 96 pozos a 37 °C para evaluar las moléculas aisladas como modificadores de la actividad enzimática de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂. Debido a que las proteínas *FtsZ* son fosfatasas, se empleó el reactivo verde de malaquita para monitorear la

actividad enzimática (630 nm) y medir la modificación de esta actividad en presencia de las moléculas de prueba.

El ensayo inició con la evaluación de la actividad de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ a una concentración de 4 μ M y con GTP (50 μ M) como sustrato en un volumen final de 100 μ L a pH= 7.0 y 37 °C, de acuerdo con lo reportado por Quan y colaboradores⁹⁴, y Martín-García y colaboradores⁹⁵. Cabe destacar, que también se hicieron pruebas de pH variándolo en el rango de 5-9, encontrando que en el intervalo de 6.5-7.5 la actividad enzimática era reproducible. Una vez establecidas las condiciones del ensayo, los reactivos empleados (GTP, buffer de ensayo, proteína, RfVM), temperatura y tiempo de incubación manteniendo la actividad enzimática reproducible, se buscó un control positivo con la finalidad de validar la capacidad del ensayo de detectar moléculas capaces de alterar la actividad GTPasa de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂. Inicialmente se evaluaron las moléculas sanguinarina y curcumina reportadas previamente²⁹ como inhibidores de FtsZ de *E. coli* y *B. subtilis*, sin embargo, ninguna de las moléculas modificó la actividad GTPasa de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂. Subsecuentemente, se evaluó el desempeño de la berberina (**Figura 31**), un alcaloide previamente reportado como inhibidor de la enzima FtsZ en *S. aureus*⁹⁹. Los resultados del ensayo indicaron que berberina, inhibe la actividad de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ en no más del 50 % a una concentración de 186 ppm (500 μ M) (**Figura 31**). Con base en estos hallazgos, se seleccionó a la berberina, como control positivo.

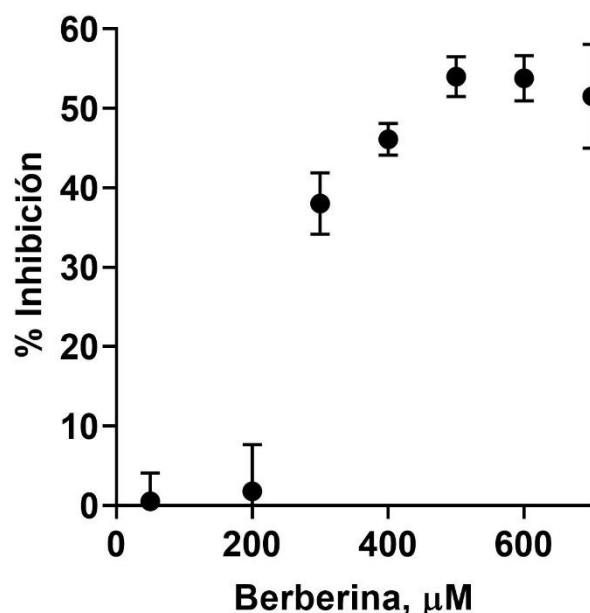


Figura 31. Inhibición de la actividad enzimática de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ por la berberina a diferentes concentraciones.

6.6 Evaluación antibacteriana y enzimática de metabolitos fúngicos

Después de la elección de los aislados fúngicos a evaluar (**Tabla 6**) y de tener implementado el ensayo enzimático de *AbFtsZ* se evaluaron las capacidades antibacterianas y de modificación de la actividad enzimática de cada una de las fracciones (**Tabla 11**). De las 26 fracciones evaluadas siete (**III, IV, IX, X/XVIII, XI, XIII/XX, XXII**) presentaron actividad biológica prometedora, ya fuese por su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano o por modificar la capacidad enzimática de *AbFtsZ* (inhibiendo o aumentando la actividad). Una de las ventajas de estudiar la actividad enzimática de una proteína FtsZ, es que ya sea que presente inhibición o aumento en la actividad es un resultado favorable, porque estos dos fenómenos pueden inducir al desensamble del anillo Z, ocasionando la muerte bacteriana.

Tabla 11. Cribado biológico de los aislados seleccionados.

Aislados	Ab	Kp	Pa	Alteración sobre AbFtsZ₁₋₄₁₂
I	NP	NP	NP	No
II	NP	NP	NP	No
III	P	P	P	No
IV	P	P	28 ± 2 %*	Sí: activación
V	NP	NP	NP	No
VI	NP	NP	NP	No
VII	NP	NP	NP	No
VIII	NP	NP	NP	No
IX	NP	NP	NP	Sí: activación
X	P	P	40 ± 5 %*	Sí: inhibición
XI	NP	NP	NP	Sí: activación
XII	NP	NP	NP	No
XIII	P	P	40 ± 1 %*	Sí: activación
XIV	NP	NP	NP	No
XV	NP	NP	NP	No
XVI	NP	NP	NP	No
XVII	NP	NP	NP	No
XVIII	P	P	40 ± 5 %*	Sí: inhibición
XIX	NP	NP	NP	No
XX	P	P	40 ± 1 %*	Sí: activación
XXI	NP	NP	NP	No
XXII	NP	NP	NP	Sí: activación
XXIII	NP	NP	NP	No
XXIV	NP	NP	NP	No
XXV	NP	NP	NP	No
XXVI	NP	NP	NP	No
Gentamicina	20 ± 1 %*	100 ± 2 %	100 ± 1 %	-
Berberina	-	-	-	Sí: inhibición

NP: No presentó actividad. n=4 para AA. n=3 para EE.
 Los aislados y la gentamicina fueron evaluados a 100 ppm, la berberina a 186 ppm.
P: Presentó inhibición promisorio (> 50 %).
Ab: *A. baumannii* (A564).
Kp: *K. pneumoniae* (K1).
Pa: *P. aeruginosa* (48M).
 *: Compuesto con inhibición menor al 50 %.

Las siete fracciones con actividad biológica promisorio fueron seleccionados para su elucidación estructural y determinar su CI₅₀ frente a las cepas de estudio (**Tabla 12 y Figura 32**).

Tabla 12. Compuestos con actividad biológica elegidos para su elucidación estructural.

Compuesto	Aislado	<i>Ab</i> , CI ₅₀ µg/mL	<i>Kp</i> , CI ₅₀ µg/mL	<i>Pa</i> , CI ₅₀ µg/mL	% Act. FtsZ	% Inh. FtsZ
1	III	6.9±0.7	1.5±0.3	104.0±1.6	88±3	-
2	IV	9.9±0.8	6.6±0.4	28±2 %*	215±5	-
3	XIII/XX	8.3±0.9	29.5±0.6	40±1 %*	141±2	-
4	X/XVIII	7±1	18.2±0.6	40±5 %*	49±3	51±4
5	XI	NA	NA	NA	136±2	-
6	XXII	NA	NA	NA	244±5	-
7	IX	NA	NA	NA	142±4	-
Gentamicina		20±1 %	100±2 %	100±1 %	-	-
Berberina		-	-	-	43±3	57±2

NA: No aplica. n=4 para AA. n=3 para EE.

La gentamicina fue evaluada a 100 ppm y la berberina a 186 ppm.

Ab: *A. baumannii* (A564).

Kp: *K. pneumoniae* (K1).

Pa: *P. aeruginosa* (48M).

*: Compuesto con inhibición menor al 50 %.

% Act. FtsZ.: Actividad enzimática sobre *AbFtsZ*₁₋₄₁₂.

% Inh. FtsZ.: Inhibición de la actividad enzimática sobre *AbFtsZ*₁₋₄₁₂.

El compuesto **1** inhibió el crecimiento bacteriano de las 3 cepas de estudio, y aunque no presentó alteración sobre la enzima *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, esta molécula puede representar un avance en la búsqueda de moléculas sobre bacterias multirresistentes. Los compuestos **2** y **3** presentaron tanto actividad antibacteriana como un incremento en la actividad enzimática de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, sugiriendo que el mecanismo de acción de estas moléculas es a través del desensamble del anillo Z. Respecto a la molécula **4** se destaca que no sólo presentó inhibición del crecimiento bacteriano, sino que a su vez fue el único compuesto que presentó inhibición enzimática de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, posicionando a la molécula **4** como el primer inhibidor de esta proteína. Por último, los compuestos **5**, **6** y **7** aumentaron la actividad de la proteína, sin embargo, no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano.

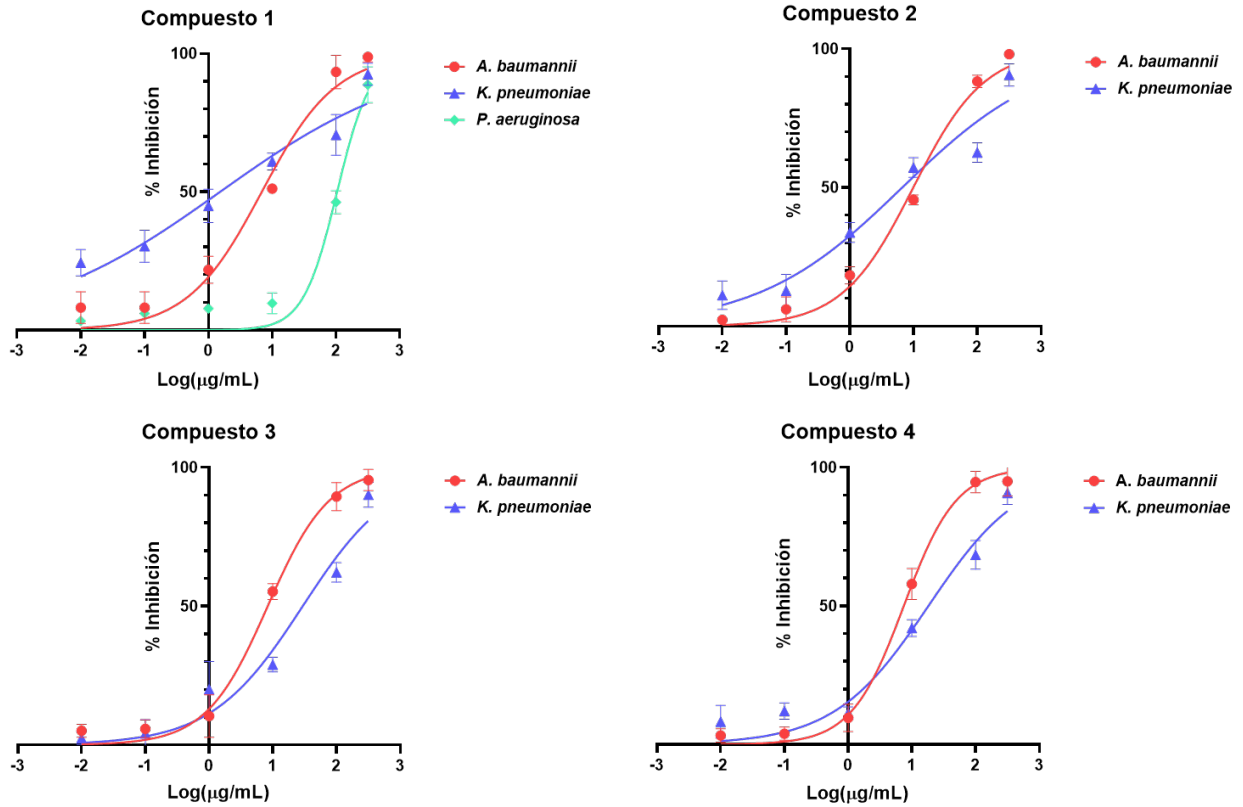


Figura 32. Curvas de concentraciones-respuesta para los compuestos 1-4 vs cepas de estudio.

6.7 Elucidación estructural de compuestos fúngicos con actividad biológica

Como se mencionó en la **Sección 5.10**, la elucidación estructural de los compuestos aislados (HPLC) con actividad biológica se llevó a cabo por técnicas espectroscopias de resonancia magnética nuclear (RMN) y por técnicas espectrométricas.

El compuesto **1** fue caracterizado como la asperazina (**1**) (**Figura 33**). Esta molécula presentó algunas señales características, como la del hidrogeno de NH del grupo indol en δ_H 8.60 ppm (H-1'), y en δ_C 124.3 y 109.4 ppm para los carbonos sp^2 (C-2' y C-3', respectivamente) del anillo heterocíclico, así como los carbonos aromáticos (C-4':C-9') de este grupo con desplazamientos entre δ_C 118.8-134.6 ppm, y sus hidrógenos aromáticos alrededor de δ_H 7.10-7.44 ppm (H-5':H-7'). Respecto a la indolina se tiene un desplazamiento en δ_H 5.90 ppm (H-1) del grupo amino NH de la pirrolidina y en δ_C 83.3 y 57.5 ppm para los carbonos sp^3 (C-2 y C-3, respectivamente) del anillo heterocíclico, así como los carbonos aromáticos (C-4:C-9) de este grupo con desplazamientos entre δ_C 121.0-145.9 ppm, y sus hidrógenos aromáticos alrededor de δ_H 6.75-7.1 ppm (H-5:H-8). También se presentaron tres señales tipo amida en δ_H 5.82 ppm (H-14), 5.72 ppm (H-14'), 5.67 ppm (H-10') de los residuos de la fenilalanina y el triptófano, confirmando los grupos amida con los desplazamientos de sus carbonilos: 168.9 ppm (C-13), 168.2 ppm (C-13'), 167.6 ppm (C-16'). Se presentaron dos señales de metilenos en δ_H 3.14 ppm y 3.20 ppm (H-17' y H-17, respectivamente), con desplazamientos en δ_C 40.3 ppm para C-17' y C-17, y dos anillos aromáticos (C-18:C-23 & C-18':C-23') con señales propias características para carbono alrededor de δ_C 129.1-135.0 ppm y sus protones aromáticos (H-19:H-23 & H-19':H-23') aproximadamente en δ_H 7.10-7.30 ppm⁶¹.

Los compuestos **2**, **3**, **6** y **7** se identificaron como benzofenonas (**Figura 33**), estas moléculas presentan algunas señales características entre ellas, por ejemplo, los carbonilos de la pirona en las posiciones C-4 y C-4' con δ_C entre 184-197 ppm; los hidroxilos en la posición C-5' y C-5, con δ_C entre 163-164 ppm aproximadamente

para los carbonos 5' y 5, y de δ_H 14.5-15.2 ppm para los hidrógenos de los fenoles (-OH) en estas posiciones, donde el hidrogeno esta quelatado con el carbonilo de C-4' y C-4 respectivamente. Otras señales características en estas moléculas son los carbonos aromáticos que tienen un metoxilo como sustituyente en las posiciones C-6 y C-6' entre δ_C 161-162 ppm y de δ_H 3.4-4.0 ppm para los hidrógenos, y el carbono aromático con el metoxilo en C-8' alrededor de δ_C 161.5-162.4 ppm y δ_H 3.6 ppm aproximadamente para los protones de dicho metoxilo. Las moléculas **2** y **7** presentan en común un carbono aromático con el metoxilo en C-8 (δ_C 160.4-161.2 ppm y δ_H 3.80-3.79 ppm) a diferencia de los compuestos **3** y **6** que tienen un fenol en esta posición (δ_C 156.8-157.4 ppm). Una diferencia estructural entre **2** y **7** son los carbonos en las posiciones C-2 y C-2' y sus sustituyentes: es decir, para el compuesto **2** se presentan dos carbonos asimétricos de hemicetal (δ_C 100.2 y 100.4 ppm, respectivamente) con un metilo (δ_C 29.0-28.9 ppm) e hidroxilo en cada uno, mientras que para el compuesto **7** los carbonos C-2 y C-2' tienen hibridación sp^2 sustituidos con grupos metilos cada uno (δ_C 20.8-20.9 ppm). Entre los metabolitos **3** y **6** la diferencia radica en el carbono C-2, para el compuesto **3** este carbono es sp^3 asimétrico (δ_C 100.2 ppm) con un hidroxilo y un metilo (δ_C 29.8 ppm) como sustituyentes, en contraste para el compuesto **6** que es un carbono sp^2 (δ_C 167.9 ppm) con un metilo como sustituyente (δ_C 20.9 ppm). Por otro lado, los compuestos **4** y **5** son pironas estructuralmente muy similares en el núcleo principal (grupo pirona unida a un bifenilo), diferenciándose en la posición 2, para el compuesto **4** es un carbono sp^2 (δ_C 167.6 ppm) con un metilo como sustituyente (δ_C 20.8 ppm), y para el compuesto **5** es un carbono de hemicetal (δ_C 100.1 ppm) asimétrico sustituido con un metilo (δ_C 28.8 ppm); otra diferencia es el metoxilo (δ_C 162.6 ppm) en C-8 de **5**, a diferencia del compuesto **4** que presenta un hidroxilo^{63-65,67,68,70}.

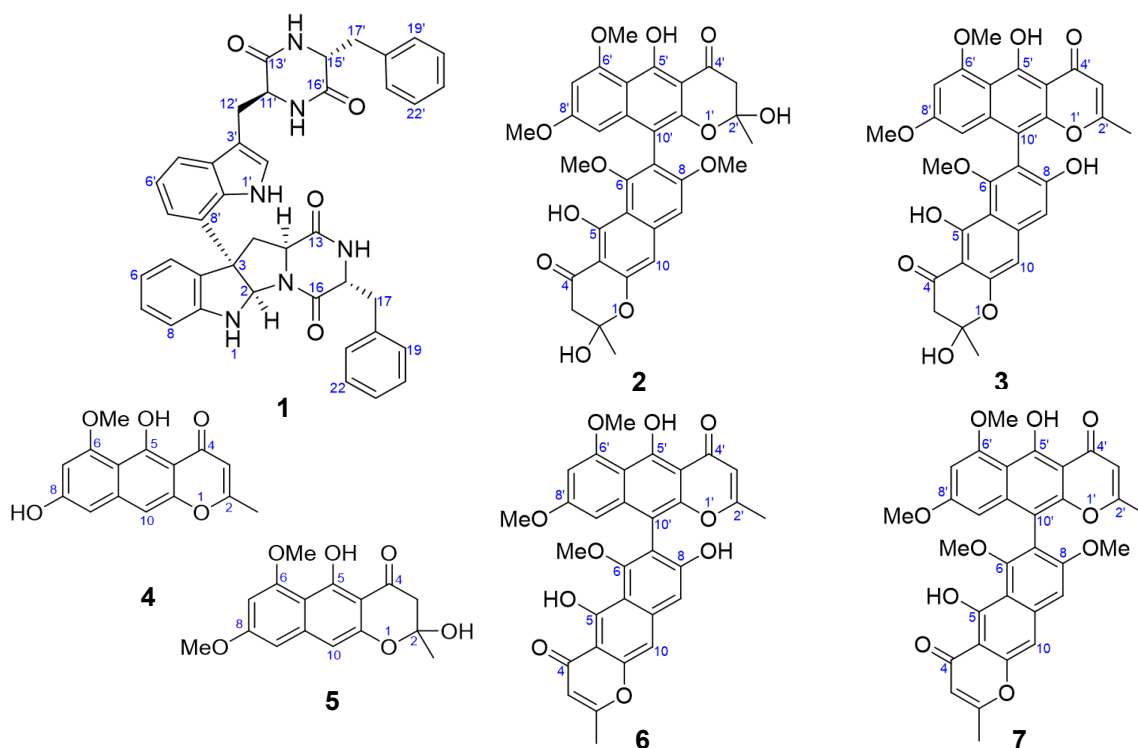


Figura 213. Moléculas aisladas de *Aspergillus* sp. (IQ-548) con actividad biológica (antibacteriana y enzimática *AbFtsZ*) prometedora.

Tras la caracterización estructural, los compuestos **1-7** se anotaron manualmente en la red molecular (**Figura 34**). La asperazina (**1**) pertenece al grupo de los derivados del indol y puede observarse en un grupo de dos nodos. Los compuestos **2-7** se encuentran en agrupaciones pequeñas. Los compuestos **2** y **3** presentan un alto grado de similitud en su estructura molecular, diferenciándose únicamente en pequeños cambios en las posiciones 2' y 8, concretamente una deshidratación y pérdida del grupo metoxilo, respectivamente. Del mismo modo, los compuestos **6** y **7** también formaron una única agrupación porque estas benzofenonas tienen distintos sustituyentes en la posición C-8, hidroxilo y metoxilo, respectivamente. Sin embargo, aunque los compuestos **4** y **5** son estructuralmente similares, se encontraron en agrupaciones diferentes, probablemente por la diferencia en sus patrones de fragmentación.

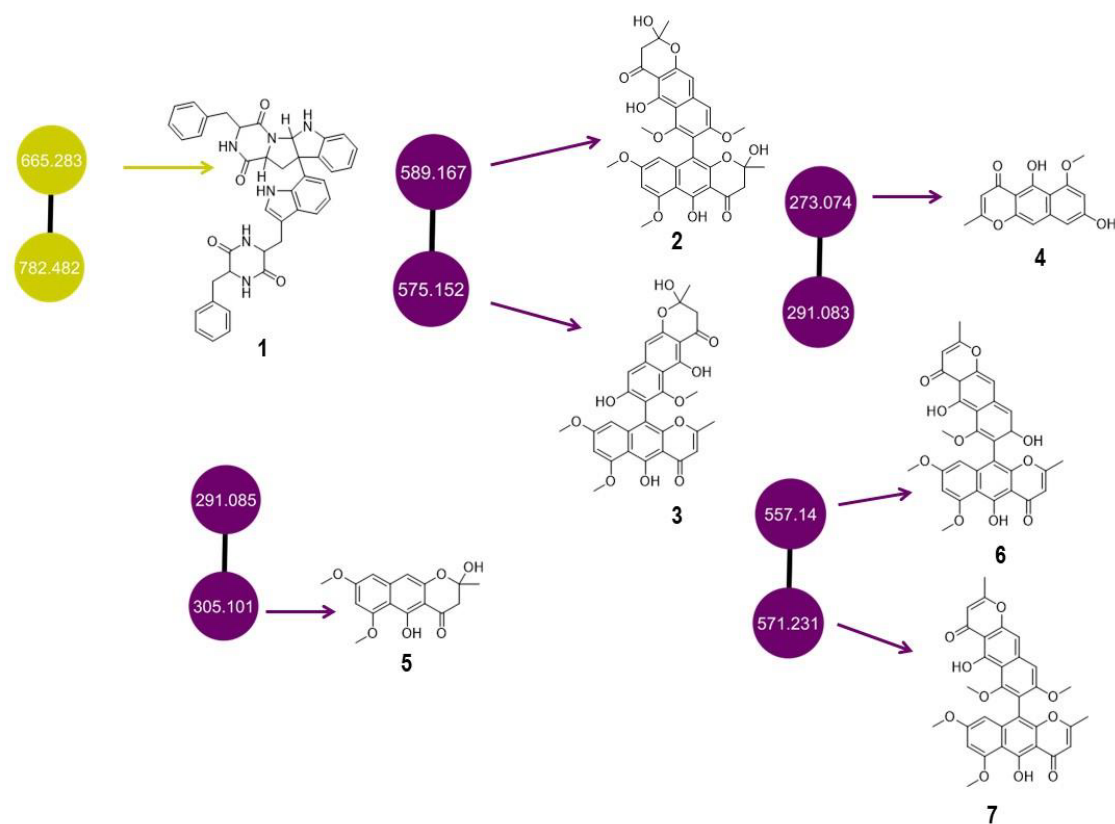


Figura 34. Moléculas aisladas e identificadas en la red molecular de GNPS.

La asperazina (**1**) es una dicetopiperazina que inhibe el crecimiento de líneas celulares de leucemia humana y murina, y de colon humano. Se aisló de *A. niger* marino⁶¹. En 2020, Zulqarnain y colaboradores¹⁰⁰ reportaron la actividad antifúngica de la asperazina (**1**) contra *Fusarium oxysporum* (60 µg/mL). Además, un estudio más reciente en 2021 mostró que **1** inhibe la proliferación de células de cáncer de cuello uterino¹⁰¹. Hasta la fecha, este es el primer informe de esta molécula como inhibidor del crecimiento de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* multirresistentes (CI₅₀: 6.9 ± 0.7 µg/mL, 1.5 ± 0.3 µg/mL y 104.0 ± 1.6 µg/mL, respectivamente). Los compuestos **2-7** (aurasperona B, aurasperona F, TMC 256-A1, fonsecina B, dianhidroaurasperona C y aurasperona A) son benzofenonas derivadas de *Aspergillus* spp., principalmente *A. niger*, sin embargo, este tipo de moléculas y otras benzofenonas (por ejemplo, penibenzofenonas, tenelonas, asperfenina) también se han aislado de *Penicillium* spp., *Diaporthe* spp. y *Phomopsis* spp.¹⁰². Los metabolitos **2** y **3**, aurasperonas B y F, han sido reportados

con actividad antioxidante^{103,104}, antifúngica¹⁰⁴, anticancerígena^{65,105} y antimicrobiana frente a *B. subtilis* y *E. coli*^{66,106}. En este proyecto se encontró que **2** y **3** presentan actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas bacterianas de estudio (compuesto **2**: CI₅₀: 9.9 ± 0.8 µg/mL para *A. baumannii*, 6.6 ± 0.4 µg/mL para *K. pneumoniae*, y 28 ± 2 % para *P. aeruginosa*; compuesto **3**: CI₅₀: 8.3 ± 0.9 µg/mL para *A. baumannii*, 29.5 ± 0.6 µg/mL *K. pneumoniae*, 40 ± 1 % *P. aeruginosa*), e interacción con la enzima AbFtsZ (215 ± 5 % y 141 ± 2, respectivamente). El compuesto TMC-256A1 (**4**) presenta actividad antioxidante¹⁰³ y actividad anticancerígena contra células del cuello uterino humano⁶⁷, de hígado¹⁰⁷, de cerebro¹⁰⁷ y de células mamarias¹⁰⁷, y mostró inhibición de la actividad de los anticuerpos IgE, razón por la cual se propuso como agente antialérgico⁶⁷; hasta la fecha, este es el primer reporte del compuesto **4** como inhibidor bacteriano (CI₅₀: 7 ± 1 µg/mL, 18.2 ± 0.6 µg/mL y 40 ± 5 %, respectivamente con las bacterias de estudio) e inhibidor de la actividad de AbFtsZ (51 ± 4 % de inhibición). El compuesto **5**, la fonsecina B, posee capacidad antioxidante¹⁰⁸ y afecta a la expresión de genes específicos implicados en la producción de inmunoglobulinas en células germinales¹⁰⁹, no hay actualmente muchos reportes que le atribuyan actividades biológicas a esta molécula, en este trabajo se determinó que **5**, aumentó la actividad enzimática de AbFtsZ (136 ± 2 %). El compuesto **6**, la dianhidroaurasperona C, es una naftopirona con actividad contra el cáncer de piel. Este compuesto aumenta la concentración intracelular de vinblastina en las células cancerosas KB-8-5 e impide su eflujo, aumentando potencialmente la eficacia de la vinblastina en el tratamiento del cáncer resistente a los fármacos¹¹⁰; aquí se encontró que **6** aumenta la actividad enzimática de la proteína AbFtsZ (244 ± 5 %). El compuesto **7**, aurasperona A, ha presentado actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *E. coli* y *P. fluorescencia*, y actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*¹¹¹. En este estudio no se detectó actividad inhibitoria frente a las bacterias de estudio, pero actúa como un modificador de la actividad enzimática de AbFtsZ (142 ± 4 %).

Los resultados indican que los compuestos **1-4** inhibieron el crecimiento de *A. baumannii* (A564), *K. pneumoniae* (K1) y *P. aeruginosa* (48M), aislados intrahospitalarios y multirresistentes. En particular, la inhibición del crecimiento

bacteriano por parte de estas moléculas (**1-4**) superó a la del control positivo gentamicina (20 ± 1 % a 100 ppm, antibiótico de amplio espectro) respecto a *A. baumannii*, y para las otras dos cepas bacterianas (*K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) presentaron inhibiciones muy prometedoras (CI_{50} 1.5-104.0 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados ponen en manifiesto el potencial de las benzofenonas **2-4** y la asperazina (**1**) como candidatos adecuados para desarrollar agentes antibacterianos contra *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, resistentes a fármacos de última generación (ciprofloxacino, gentamicina, meropenem, imipenem, doripenem, cefepima, ceftriaxona, ceftazidima, piperacilina y ampicilina). Además, los compuestos **2-7** tienen el potencial de ser antimicrobianos dirigidos contra FtsZ. La inhibición del crecimiento bacteriano observada en *A. baumannii* por los compuestos **2-4** apoya esta hipótesis. A pesar de ser modificadores de la actividad de *AbFtsZ*, los compuestos **5-7** no demostraron inhibición del crecimiento bacteriano frente a *A. baumannii*, lo que sugiere la activación de diversos mecanismos de resistencia en esta cepa.

El compuesto **4** (TMC-256A1), fue el único que mostró inhibición de la actividad de *AbFtsZ*, e inhibición del crecimiento bacteriano (**Tabla 12**), sugiriendo a *AbFtsZ* como una posible diana molecular. En 2008, Rai y colaboradores¹¹² descubrieron que la curcumina incrementa la actividad GTPasa de la enzima FtsZ en *E. coli*. Del mismo modo, en 2012, Ma y colaboradores³³ informaron de un grupo de benzimidazoles trisustituidos aumentan la actividad GTPasa de FtsZ en *M. tuberculosis*. Además, la vitamina K favorece la actividad GTPasa de la enzima FtsZ de *Streptococcus pneumoniae*¹¹³. En estos informes, los autores comentaron que el aumento de la actividad enzimática eleva la concentración de GDP en la célula bacteriana, conduciendo a la despolimerización del anillo Z y, posteriormente, a la inhibición de la división celular, provocando el ensanchamiento de la célula y, finalmente, la lisis bacteriana. Actualmente no existe ningún inhibidor de origen natural documentado para la enzima *AbFtsZ* que inhiba simultáneamente el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, el compuesto **4** presenta una oportunidad potencial para desarrollar antibióticos con un nuevo mecanismo de acción.

En resumen, estos resultados sugieren que los compuestos **1-4** pueden ser candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos para combatir la RAM, lo que podría ser de gran importancia en la lucha contra las infecciones intrahospitalarias resistentes a los fármacos de última generación.

La estrategia de trabajo implementada (ensayo biodirigido: actividad antibacteriana) es altamente similar con lo reportado por Wang y colaboradores³⁶, donde cribaron 100.000 extractos de origen natural (plantas, bacterias y hongos) con un ensayo de inhibición de la polimerización de FtsZ de *E. coli*, y encontraron en total un compuesto de origen fúngico (*Aspergillus viridinutans*) que inhibió la formación de los polímeros de la proteína y, posteriormente presentó inhibición del crecimiento bacteriano sobre *S. aureus* (resistente a meticilina), *Staphylococcus* sp., *Enterococcus faecalis* (resistente a vancomicina), *Streptococcus pneumoniae* (resistente a quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y β -lactámicos) y *E. coli*, dicho compuesto es la viriditoxina (**Figura 6**), un policétido dimérico con dos grupos de pirona, similar a los compuestos **2-3** y **6-7**. A diferencia del trabajo reportado por Wang y colaboradores³⁶ aquí se inició el cribado de 250 extractos fúngicos por medio del ensayo de actividad antibacteriana, y al final se evaluaron las moléculas sobre el ensayo de actividad enzimática de AbFtsZ.

7. Conclusiones

Los productos naturales procedentes de hongos han sido una fuente importante para el desarrollo de fármacos antimicrobianos. En este estudio se analizaron 250 extractos de hongos de manglares mexicanos frente a tres cepas bacterianas multirresistentes (*A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*). Los estudios biodirigidos, combinados con análisis metabolómicos no dirigidos, taxonómicos y herramientas de desreplicación, permitieron priorizar el hongo (IQ-548, *Aspergillus* sp.) más prometedor para aislar compuestos con potencial antimicrobiano. Aplicando estos criterios, el estudio químico del aislado fúngico priorizado dio lugar al aislamiento de siete compuestos (**1-7**) con actividad biológica, bien como inhibidores del crecimiento bacteriano, o bien como modificadores de la enzima AbFtsZ.

El compuesto **4** (TMC-256A1) es el primer inhibidor fúngico de la enzima AbFtsZ del que se tiene constancia. Además, esta molécula inhibió el crecimiento bacteriano de tres cepas multirresistentes de relevancia clínica, *A. baumannii* (A564), *K. pneumoniae* (K1) y *P. aeruginosa* (48M). Por otro lado, los compuestos **1-3** mostraron actividad antibacteriana frente a las cepas bajo estudio (*A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*), mientras que los productos **5-8** interactuaron con AbFtsZ y potenciaron su actividad enzimática.

Con base en estos hallazgos, los compuestos **1-4** se proponen como posibles referentes para el desarrollo de antibióticos que ayuden a combatir la RAM, especialmente contra las cepas de estudio, ya que están catalogadas por la OMS como bacterias de gran prioridad en la búsqueda de antimicrobianos.

En conclusión, este estudio resalta la importancia de estudiar la microbiota de ecosistemas poco explorados en México para obtener andamiajes moleculares para desarrollar antibióticos con diferentes clases estructurales y con blancos novedosos que puedan contribuir a la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

8. Perspectivas

- Realizar el estudio químico y aislamiento biodirigido de los dos extractos fúngicos pre-seleccionados IQ-503 (*Aspergillus* sp.) e IQ-567 (*Talaromyces* sp.) para encontrar los metabolitos responsables de su actividad antibacteriana, ya que junto con el extracto IQ-548 (*Aspergillus* sp.) pasaron el cribado biológico desarrollado en este proyecto.
- Determinar experimentalmente el tipo de inhibición del compuesto **4** (TMC-256A1) sobre *AbFtsZ*₁₋₄₁₂.
- Realizar estudios *in-silico* con la secuencia de *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ de los compuestos modificadores de la actividad de esta enzima, con el fin de conocer un poco mejor su interacción.
- Estudios de microscopía con *A. baumannii* multirresistente y *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ (marcada) expuesta a los modificadores enzimáticos para confirmar el mecanismo de acción.
- Expresar y purificar *KpFtsZ* y *PaFtsZ* para implementar su ensayo enzimático y así evaluar los compuestos **1-4**, ya que fueron los metabolitos que presentaron actividad antibacteriana sobre *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

9. Referencias

1. OMS. Antimicrobial resistance. Consultado el: 18 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>.
2. OMS. WHO publishes the WHO Medically Important Antimicrobials List for Human Medicine. Consultado el: 18 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/08-02-2024-who-medically-important-antimicrobial-list-2024>.
3. Durand, G. A., Raoult, D., Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53, 371–382 (2019).
4. OMS. La escasez mundial de antibióticos innovadores favorece la aparición y propagación de la farmacorresistencia. Consultado el: 18 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>.
5. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Consultado el: 18 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
6. OMS. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Consultado el: 18 de febrero de 2024. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/255204> (2016).
7. Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., Echániz, G. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública Méx*: 50, S480–S487 (2008).
8. Garza-González, E. *et al.* A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*: 14, e0209865 (2019).
9. Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana. Estado Actual de La Resistencia Antimicrobiana México 2018. (2019).
10. Novović, K., Jovčić, B. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. *Antibiotics*: 12, 516 (2023).

11. Vázquez-López, R. *et al.* *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics*: 9, 205 (2020).
12. Ashurst, J. V., Dawson, A. *Klebsiella* Pneumonia en *StatPearls*. Editorial StatPearls Publishing, (2023).
13. Hafiz, T. A. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia epidemiology: resistance profiles and clinical outcome of King Fahad Medical City isolates, Riyadh, Saudi Arabia. *BMC Infect Dis*: 23, 579 (2023).
14. Jacoby, G., A. Extended-spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- β -lactams. *Infectious disease clinics of North America*: 11, 875–887 (1997).
15. Li, Y., Kumar, S., Zhang, L., Wu, H. & Wu, H. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine*: 18, 20230707 (2023).
16. Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S. & Wu, Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*: 19, 1 (2020).
17. Yayan, J., Ghebremedhin, B., Rasche, K. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PLoS ONE*: 10, e0139836 (2015).
18. Lister, P. D., Wolter, D. J. Hanson, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin Microbiol Rev*: 22, 582–610 (2009).
19. Langendonk, R. F., Neill, D. R. & Fothergill, J. L. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*: 11, 665759 (2021).
20. Chegini, Z. *et al.* Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*: 19, 45 (2020).
21. Chellat, M. F., Raguž, L., Riedl, R. Targeting Antibiotic Resistance. *Angew Chem Int Ed*: 55, 6600–6626 (2016).
22. Seija, V., Vignoli, R. Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*: 2, 631–648 (2006).

23. Calvo, J., Martínez-Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*: 27, 44–52 (2009).
24. Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *IDR*: 12, 3903–3910 (2019).
25. Kusuma, K. D., Payne, M., Ung, A. T., Bottomley, A. L., Harry, E. J. FtsZ as an Antibacterial Target: Status and Guidelines for Progressing This Avenue. *ACS Infect. Dis.*: 5, 1279–1294 (2019).
26. Barrows, J. M., Goley, E. D. FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? *Current Opinion in Cell Biology*: 68, 163–172 (2021).
27. Adams, D. W., Errington, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol*: 7, 642–653 (2009).
28. Battaje, R. R., Piyush, R., Pratap, V., Panda, D. Models versus pathogens: how conserved is the FtsZ in bacteria? *Bioscience Reports*: 43, BSR20221664 (2023).
29. Tripathy, S. & Sahu, S. K. FtsZ inhibitors as a new genera of antibacterial agents. *Bioorganic Chemistry*: 91, 103169 (2019).
30. Egan, A. J. F., Errington, J. & Vollmer, W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol*: 18, 446–460 (2020).
31. Haranahalli, K., Tong, S., Ojima, I. Recent advances in the discovery and development of antibacterial agents targeting the cell-division protein FtsZ. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*: 24, 6354–6369 (2016).
32. Hurley, K. A. *et al.* Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *J. Med. Chem.*: 59, 6975–6998 (2016).
33. Ma, S. *et al.* Synthesis and on-target antibacterial activity of novel 3-elongated arylalkoxybenzamide derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 23, 4076–4079 (2013).
34. Schneider, Y. K. Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics*: 10, 842 (2021).

35. Li, X. *et al.* Design, synthesis and antibacterial activity of cinnamaldehyde derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. *European Journal of Medicinal Chemistry*: 97, 32–41 (2015).
36. Wang, J. *et al.* Discovery of a Small Molecule That Inhibits Cell Division by Blocking FtsZ, a Novel Therapeutic Target of Antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*: 278, 44424–44428 (2003).
37. Cragg, G. M. Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*: 1830, 3670–3695 (2013).
38. Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G. Counting on natural products for drug design. *Nature Chem*: 8, 531–541 (2016).
39. Wright, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.*: 34, 694–701 (2017).
40. Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.*: 83, 770–803 (2020).
41. Carugati, L. *et al.* Impact of mangrove forests degradation on biodiversity and ecosystem functioning. *Sci Rep*: 8, 13298 (2018).
42. Elavarasi, A., Peninal, S., Priya, R. S., Kalaiselvam, M. CYTOTOXIC AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM MANGROVES. *World Journal of Pharmaceutical Research*: 7, 1, 954-961, (2017).
43. The Nature Conservancy. State of the World's Mangroves. *The Nature Conservancy*. Consultado el: 19 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.nature.org/en-us/what-we-do/our-insights/perspectives/state-of-world-mangroves/>.
44. López Portillo, J., Ezcurra, E. Los manglares de México: una revisión. *MYB*: 8, 27–51 (2002).
45. Nash, M. H. The 200 Most (& Least) Biodiverse Countries. *The Swiftest*. Consultado el: 19 de febrero de 2024. Disponible en: <https://theswiftest.com/biodiversity-index/> (2022).
46. CONABIO. Sistema de Monitoreo de Manglares de México (SMMM). *Biodiversidad Mexicana*. Consultado el: 19 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/monitoreo/smmm>.

47. Holguin, G., Bashan, Y. La importancia de los manglares y su microbiología para el sostenimiento de las pesquerías costeras. *Microbiología agrícola*: 233–235 (2007).
48. UNESCO. Mexico: Women lead the way in saving the mangroves. Consultado el: 19 de febrero de 2024. Disponible en: <https://courier.unesco.org/en/articles/mexico-women-lead-way-saving-mangroves>.
49. Murray, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*: 399, 629–655 (2022).
50. O'Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. Disponible en: <https://apo.org.au/node/63983> (2016).
51. Carrillo Jaimes, K. *et al.* Antibacterial Activity and AbFtsZ Binding Properties of Fungal Metabolites Isolated from Mexican Mangroves. *Rev. Bras. Farmacogn*: (2024).
52. Jiménez Arreola, B. S. *et al.* Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry*: 101, 103893 (2020).
53. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*: (2015).
54. Mahuku, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol Biol Rep*: 22, 71–81 (2004).
55. Schoch, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: 109, 6241–6246 (2012).
56. Aron, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature protocols*: 15, 1954–1991 (2020).
57. Van Der Hooft, J. J. J., Wandy, J., Barrett, M. P., Burgess, K. E. Rogers, S. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 113, 13738–13743 (2016).
58. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*: 13, 2498–2504 (2003).
59. Mohimani, H. *et al.* Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature communications*: 9, 4035 (2018).

60. Ernst, M. *et al.* MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*: 9, 144 (2019).
61. Varoglu, M., Corbett, T. H., Valeriote, F. A. & Crews, P. Asperazine, a Selective Cytotoxic Alkaloid from a Sponge-Derived Culture of *Aspergillus niger*. *J. Org. Chem.*: 62, 7078–7079 (1997).
62. Loach, R. P., Fenton, O. S. & Movassaghi, M. Concise Total Synthesis of (+)-Asperazine, (+)-Pestalazine A, and (+)-*iso*-Pestalazine A. Structure Revision of (+)-Pestalazine A. *J. Am. Chem. Soc.*: 138, 1057–1064 (2016).
63. Priestap, H. A. New Naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*. *Tetrahedron*: 40, 3617–3624 (1984).
64. Siriwardane, A. M. D. A., Kumar, N. S., Jayasinghe, L., Fujimoto, Y. Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic *Aspergillus* sp. isolated from *Limonia acidissima*. *Natural Product Research*: 29, 1384–1387 (2015).
65. Antonov, A. S. *et al.* Naphto- Γ -pyrones from the marine-derived fungus *Aspergillus foetidus*. *Natural Product Research*: 35, 131–134 (2021).
66. Bouras, N., Mathieu, F., Coppel, Y. Lebrihi, A. Aurasperone F – a new member of the naphtho-gamma-pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger*. *Natural Product Research*: 19, 653–659 (2005).
67. Sakurai, M. *et al.* TMC-256A1 and C1, New Inhibitors of IL-4 Signal Transduction Produced by *Aspergillus niger* var *niger* TC 1629. *The Journal of Antibiotics*: 55, 685–692 (2002).
68. Priestap, H. A. C NMR Spectroscopy of Naphtho- γ -pyrones. *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*: 24, 875–878 (1986).
69. Pilevneli, A. D., Ebada, S. S., Kaşkatepe, B. & Konuklugil, B. Penicacids H–J, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus oryzae*. *RSC Adv.*: 11, 34938–34944 (2021).
70. Campos, F. R., Barison, A., Daolio, C., Ferreira, A. G. & Rodrigues-Fo, E. Complete H and C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*. *Magnetic Reson in Chemistry*: 43, 962–965 (2005).

71. Chen, Y., Bjornson, K., Redick, S. D. Erickson, H. P. A Rapid Fluorescence Assay for FtsZ Assembly Indicates Cooperative Assembly with a Dimer Nucleus. *Biophysical Journal*: 88, 505–514 (2005).
72. Chen, Y. Erickson, H. P. FtsZ filament dynamics at steady state: subunit exchange with and without nucleotide hydrolysis. *Biochemistry*, 48, 6664–6673 (2009).
73. Lacerda, L. D. *et al.* American Mangroves. *Mangrove Ecosystems*: 1–62, editorial Springer Berlin Heidelberg (2002).
74. Sosa Rodríguez, T., Sánchez Nieves, J. Melgarejo, L. M. Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar. *BIM*: 38, (2016).
75. Devadatha, B. *et al.* Occurrence and geographical distribution of mangrove fungi. *Fungal Diversity*: 106, 137–227 (2021).
76. García-Patiño, M. G., García-Contreras, R., Licona-Limón, P. The Immune Response against *Acinetobacter baumannii*, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. *Front. Immunol.*: 8, 441 (2017).
77. Raorane, C. J., Lee, J.-H., Lee, J. Rapid Killing and Biofilm Inhibition of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains and Other Microbes by Iodoindoles. *Biomolecules*: 10, 1186 (2020).
78. Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., Tragiannidis, A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*: 10, 373 (2021).
79. Nikaido, H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*: 78, 119–146 (2009).
80. Frisvad, J. C. & Larsen, T. O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*: 99, 7859–7877 (2015).
81. Li, Y. *et al.* *Aspergillus candidus* is a newly recognized source of sphaeropsidin A: Isolation, semi-synthetic derivatization and anticancer evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 27, 5436–5440 (2017).
82. Le, H. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Metabolites from the Marine Fungi *Penicillium* sp. Isolated from Sediments of Co to Island, Vietnam. *Molecules*: 24, 3830 (2019).

83. Bazioli, J., Amaral, L., Fill, T. & Rodrigues-Filho, E. Insights into *Penicillium brasilianum* Secondary Metabolism and Its Biotechnological Potential. *Molecules*: 22, 858 (2017).
84. Jakubczyk, D., Dussart, F. Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. *Molecules*: 25, 911 (2020).
85. Zhang, X. *et al.* Structures and bioactivities of secondary metabolites from *Penicillium* genus since 2010. *Fitoterapia*: 163, 105349 (2022).
86. Natural Products Atlas. Natural Products Atlas. Consultado el: 20 de febrero de 2024. Disponible en: <https://www.npatlas.org/discover/overview>.
87. Wang, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol*: 34, 828–837 (2016).
88. Wang, M. *et al.* Mass spectrometry searches using MASST. *Nat Biotechnol*: 38, 23–26 (2020).
89. Nothias, L.-F., Petreas, D., Schmid, R., Duhrkop, K., Rainer, J. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*: 17, 905–908 (2020).
90. Flajs, D. Peraica, M. Toxicological Properties of Citrinin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*: 60, 457–464 (2009).
91. Kmetič, I. *et al.* Sterigmatocistin–prekursor aflatoksin B1 u hrani i hrani za životinje. *Hrvat. čas. prehranbene tehnol. biotehnol. nutr.*: 14, 105–112 (2020).
92. Hamed, A. *et al.* Meleagrín from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: crystal structure and diverse biological activity studies. *Natural Product Research*: 35, 3830–3838 (2021).
93. Gupta, R. C., Gupta, R. C., Ochratoxins and citrinin. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles* 1019–1027, Editorial Academic Press, Amsterdam London, (2007).
94. Quan, A., Robinson, P. J. Rapid purification of native dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Methods in enzymology*: 404, 556–569 (2005).
95. Martín-García, F. *et al.* Molecular dynamics simulation of GTPase activity in polymers of the cell division protein FtsZ. *FEBS Letters*: 586, 1236–1239 (2012).

96. Baykov, A., Evtushenko, O., Avaeva, S. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical biochemistry*: 171, 266–270 (1988).
97. Detlefsen, N. S., Hauberg, S., Boomsma, W. Learning meaningful representations of protein sequences. *Nat Commun*: 13, 1914 (2022).
98. Breda, A., Valadares, N. F., de Souza, O. N., Garratt, R. C. Chapter A06. Protein Structure, Modelling and Applications: Protein Structure, editorial National Center for Biotechnology Information, 2006).
99. Domadia, P. N., Bhunia, A., Sivaraman, J., Swarup, S., Dasgupta, D. Berberine Targets Assembly of Escherichia coli Cell Division Protein FtsZ. *Biochemistry* 47, 3225–3234 (2008).
100. Zulqarnain *et al.* Antifungal activity of compounds isolated from *Aspergillus niger* and their molecular docking studies with tomatinase. *Natural Product Research*: 34, 2642–2646 (2020).
101. Abdou, R., Alqahtani, A. M. & Attia, G. H. Anticancer natural products from *Aspergillus neoniger*, an endophyte of *Ficus carica*. *Bull Natl Res Cent*: 45, 74 (2021).
102. Ibrahim, S. R. M., Fahad ALSiyud, D., Alfaeq, A. Y., Mohamed, S. G. A. Mohamed, G. A. Benzophenones-natural metabolites with great Hopes in drug discovery: structures, occurrence, bioactivities, and biosynthesis. *RSC Adv.*: 13, 23472–23498 (2023).
103. Leutou, A. S., Yun, K., Son, B. W. Induced production of 6,9-dibromoflavasperone, a new radical scavenging naphthopyranone in the marine-mudflat-derived fungus *Aspergillus niger*. *Arch. Pharm. Res.* 39, 806–810 (2016).
104. Zhang, Y., Li, X.-M. & Wang, B.-G. Nigerasperones A-C, New Monomeric and Dimeric Naphtho-g-pyrone from a Marine Alga-derived Endophytic Fungus *Aspergillus niger* EN-13.
105. Fang, W. *et al.* Asperpyrone-Type Bis-Naphtho- γ -Pyrone with COX-2-Inhibitory Activities from Marine-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Molecules*: 21, 941 (2016).
106. Song, Y. C. *et al.* Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*: 241, 67–72 (2004).

107. Huang, H.-B. *et al.* Cytotoxic Naphtho-g-pyrones from the Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus tubingensis* (GX1-5E). *Helvetica Chimica Acta*: 94, (2011).
108. Carboué, Q. *et al.* Naphtho-Gamma-Pyrones Produced by *Aspergillus tubingensis* G131: New Source of Natural Nontoxic Antioxidants. *Biomolecules*: 10, 29 (2019).
109. Lee, H.-M. *et al.* Identification of natural product Fonsecain B as a stabilizing ligand of c-myc G-quadruplex DNA by high-throughput virtual screening. *Chem. Commun.*: 46, 4680 (2010).
110. Ikeda, S.I. *et al.* *Aspergillus* species strain m39 produces two naphtho- γ -pyrones that reverse drug resistance in human KB cells. *Int. J. Cancer*: 45, 508–513 (1990).
111. Lu, S. *et al.* Bis-naphtho- γ -pyrones from Fungi and Their Bioactivities. *Molecules*: 19, 7169–7188 (2014).
112. Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., Panda, D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal*: 410, 147–155 (2008).
113. Pushpakaran, A., Battaje, R. R., Panda, D. Vitamin K3 inhibits FtsZ assembly, disrupts the Z-ring in *Streptococcus pneumoniae* and displays anti-pneumococcal activity. *Biochemical Journal*: 479, 1543–1558 (2022).
114. Subeh, A.I., Raja, H.A., Obike, J.C., Croatt, M. P., Oberlies, N. H. Media and strain studies for the scaled production of cis-enone resorcylic acid lactones as feedstocks for semisynthesis. *Journal of Antibiotics*: 74, 496–507 (2021).

10. ANEXOS

Tabla A 1. Capacidad antibacteriana de los 250 extractos fúngicos sobre las 3 cepas bacterianas resistentes.

Extracto fúngico	A. baumannii	K. pneumoniae	P. aeruginosa	Extracto fúngico	A. baumannii	K. pneumoniae	P. aeruginosa
IQ-497	64 ± 4	NP	NP	IQ-520	79 ± 4	74 ± 3	NP
IQ-498	NP	22 ± 5	NP	IQ-521	NP	NP	NP
IQ-499	39 ± 2	36 ± 4	NP	IQ-522	NP	NP	NP
IQ-500	NP	NP	NP	IQ-523	NP	NP	NP
IQ-501	NP	NP	NP	IQ-524	NP	NP	NP
IQ-502	25 ± 1	15 ± 5	NP	IQ-525	NP	NP	NP
IQ-503	59 ± 3	21 ± 6	NP	IQ-526	NP	NP	NP
IQ-504	33 ± 5	NP	NP	IQ-527	NP	NP	NP
IQ-505	NP	23 ± 2	NP	IQ-528	NP	NP	NP
IQ-506	NP	NP	NP	IQ-529	NP	NP	NP
IQ-507	NP	NP	NP	IQ-530	NP	NP	NP
IQ-508	21 ± 7	25 ± 4	NP	IQ-531	NP	NP	NP
IQ-509	NP	NP	NP	IQ-532	NP	NP	NP
IQ-510	NP	NP	NP	IQ-533	NP	NP	NP
IQ-511	NP	30 ± 8	NP	IQ-534	NP	NP	NP
IQ-512	64 ± 5	39 ± 9	NP	IQ-535	NP	NP	NP
IQ-513	NP	NP	NP	IQ-536	NP	NP	NP
IQ-514	35 ± 5	26 ± 3	NP	IQ-537	NP	NP	NP
IQ-515	NP	26 ± 4	NP	IQ-538	NP	NP	NP
IQ-516	NP	24 ± 5	NP	IQ-539	NP	NP	NP
IQ-517	26 ± 7	18 ± 4	NP	IQ-540	NP	NP	NP
IQ-518	53 ± 8	NP	NP	IQ-541	NP	NP	NP
IQ-519	46 ± 5	39 ± 2	NP	IQ-542	NP	NP	NP

IQ-543	NP	NP	NP	NP	IQ-572	NP	NP	NP
IQ-544	NP	NP	NP	NP	IQ-573	43 ± 3	47 ± 2	NP
IQ-545	54 ± 3	78 ± 2	NP	NP	IQ-574	40 ± 2	52 ± 5	NP
IQ-546	24 ± 1	25 ± 9	NP	NP	IQ-575	NP	17 ± 3	NP
IQ-547	46 ± 3	56 ± 5	NP	NP	IQ-576	NP	38 ± 1	NP
IQ-548	42 ± 2	73 ± 5	19 ± 8	IQ-577	49 ± 2	50 ± 6	NP	NP
IQ-549	NP	25 ± 2	NP	IQ-578	NP	NP	NP	NP
IQ-550	NP	24 ± 3	NP	IQ-579	NP	NP	NP	NP
IQ-551	NP	NP	NP	IQ-580	NP	NP	NP	NP
IQ-552	NP	NP	NP	IQ-581	33 ± 4	NP	NP	NP
IQ-553	NP	NP	NP	IQ-582	NP	NP	NP	NP
IQ-554	NP	NP	NP	IQ-583	NP	NP	NP	NP
IQ-555	NP	NP	NP	IQ-584	27 ± 4	NP	NP	NP
IQ-556	NP	NP	NP	IQ-585	NP	NP	NP	NP
IQ-557	NP	NP	NP	IQ-586	NP	34 ± 4	NP	NP
IQ-558	NP	NP	NP	IQ-587	51 ± 4	NP	64 ± 4	NP
IQ-559	NP	NP	NP	IQ-588	NP	NP	NP	NP
IQ-560	NP	NP	NP	IQ-589	NP	NP	NP	NP
IQ-561	NP	NP	NP	IQ-590	NP	NP	NP	NP
IQ-562	NP	NP	NP	IQ-591	NP	NP	NP	NP
IQ-563	NP	26 ± 8	NP	IQ-592	42 ± 6	NP	NP	NP
IQ-564	NP	NP	NP	IQ-593	NP	NP	NP	NP
IQ-565	NP	NP	NP	IQ-594	21 ± 6	NP	NP	NP
IQ-566	54 ± 4	57 ± 7	NP	IQ-595	NP	NP	NP	NP
IQ-567	75 ± 2	68 ± 4	NP	IQ-596	NP	NP	NP	NP
IQ-568	42 ± 2	83 ± 3	NP	IQ-597	NP	NP	NP	NP
IQ-569	NP	27 ± 3	NP	IQ-598	NP	NP	NP	NP
IQ-570	NP	22 ± 5	NP	IQ-599	NP	NP	NP	NP
IQ-571	NP	22 ± 6	NP	IQ-600	51 ± 7	34 ± 2	20 ± 8	NP

IQ-601	20 ± 3	NP	NP	NP	IQ-630	NP	NP	NP
IQ-602	NP	NP	14 ± 9	NP	IQ-631	53 ± 5	49 ± 1	NP
IQ-603	NP	NP	NP	NP	IQ-632	69 ± 6	44 ± 3	NP
IQ-604	29 ± 8	NP	NP	NP	IQ-633	NP	30 ± 1	NP
IQ-605	NP	33 ± 3	NP	NP	IQ-634	29 ± 2	35 ± 5	NP
IQ-606	NP	36 ± 3	NP	NP	IQ-635	47 ± 3	57 ± 4	NP
IQ-607	NP	NP	NP	NP	IQ-636	43 ± 3	47 ± 5	NP
IQ-608	19 ± 4	NP	NP	NP	IQ-637	NP	26 ± 5	NP
IQ-609	28 ± 4	NP	NP	NP	IQ-638	50 ± 3	50 ± 6	NP
IQ-610	NP	NP	NP	NP	IQ-639	24 ± 2	NP	NP
IQ-611	NP	NP	NP	NP	IQ-640	NP	NP	NP
IQ-612	NP	NP	NP	NP	IQ-641	15 ± 2	25 ± 8	NP
IQ-613	NP	NP	NP	NP	IQ-642	NP	NP	NP
IQ-614	NP	16 ± 3	NP	NP	IQ-643	NP	NP	NP
IQ-615	NP	NP	NP	NP	IQ-644	44 ± 6	37 ± 8	NP
IQ-616	NP	NP	NP	NP	IQ-645	25 ± 5	30 ± 6	32 ± 8
IQ-617	NP	NP	23 ± 5	NP	IQ-646	NP	NP	NP
IQ-618	NP	NP	NP	NP	IQ-647	NP	NP	NP
IQ-619	NP	NP	NP	NP	IQ-648	NP	NP	NP
IQ-620	NP	NP	NP	NP	IQ-649	NP	NP	NP
IQ-621	NP	NP	NP	NP	IQ-650	NP	17 ± 5	NP
IQ-622	NP	NP	NP	NP	IQ-651	47 ± 9	40 ± 2	NP
IQ-623	NP	NP	NP	NP	IQ-652	NP	NP	NP
IQ-624	NP	NP	NP	NP	IQ-653	NP	NP	NP
IQ-625	29 ± 8	NP	NP	NP	IQ-654	NP	NP	NP
IQ-626	NP	NP	NP	NP	IQ-655	NP	NP	NP
IQ-627	NP	NP	NP	NP	IQ-656	NP	NP	NP
IQ-628	NP	NP	NP	NP	IQ-657	NP	26 ± 3	NP
IQ-629	NP	NP	NP	NP	IQ-658	NP	NP	NP

IQ-717	31 ± 8	17 ± 5	12 ± 6	IQ-734	NP	NP	NP
IQ-718	NP	NP	NP	IQ-735	NP	NP	NP
IQ-719	NP	NP	NP	IQ-736	13 ± 4	28 ± 7	NP
IQ-720	44 ± 9	55 ± 3	NP	IQ-737	23 ± 4	NP	NP
IQ-721	NP	NP	NP	IQ-738	NP	NP	NP
IQ-722	NP	NP	NP	IQ-739	NP	NP	NP
IQ-723	NP	NP	NP	IQ-740	NP	NP	NP
IQ-724	NP	NP	NP	IQ-741	NP	NP	NP
IQ-725	NP	NP	NP	IQ-742	NP	NP	NP
IQ-726	NP	NP	NP	IQ-743	NP	NP	NP
IQ-727	NP	NP	NP	IQ-744	NP	NP	NP
IQ-728	17 ± 5	20 ± 8	16 ± 7	IQ-745	21 ± 5	27 ± 8	NP
IQ-729	21 ± 6	32 ± 6	NP	IQ-746	NP	NP	NP
IQ-730	17 ± 5	NP	NP	IQ-747	NP	NP	NP
IQ-731	NP	NP	NP	IQ-748	NP	NP	NP
IQ-732	42 ± 7	NP	39 ± 5	IQ-749	NP	NP	NP
IQ-733	NP	NP	NP	IQ-750	NP	NP	NP
Gentamicina	20 ± 1	100 ± 2	100 ± 1	-	-	-	-
NP: No presentó inhibición. n=3.							

Tabla A 2. Relación de los extractos preseleccionados respecto a las micotoxinas identificadas.

N°	Hongo	Inhibición bacteriana			Micotoxina identificada	Observación
		<i>A. baumannii</i> (A564)	<i>K. pneumoniae</i> (K1)	<i>P. aeruginosa</i> (48M)		
1	IQ497	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio
2	IQ503	54 ± 4	NP	66 ± 6	-	Continuó bajo estudio
3	IQ512	76 ± 4	44 ± 4	58 ± 2	Esterigmatocistina, citrinina	No continuó bajo estudio
4	IQ518	71 ± 6	28 ± 3	NP	Preusina, Polanrazina	No continuó bajo estudio
5	IQ519	40 ± 2	NP	NP	Preusina, Ocratoxina A	No continuó bajo estudio
6	IQ520	NP	NP	NP	Glandicolina, Harmano, Roquefortina, Meleagrina, Polanrazina	No continuó bajo estudio
7	IQ545	NP	28 ± 6	40 ± 3	Meleagrina, Harmano, Polanrazina	No continuó bajo estudio
8	IQ547	35 ± 3	NP	NP	Meleagrina, Harmano	No continuó bajo estudio
9	IQ548	60 ± 2	78 ± 13	60 ± 6	-	Continuó bajo estudio
10	IQ566	NP	NP	NP	Polanrazina, Harmano	No continuó bajo estudio
11	IQ567	75 ± 5	55 ± 5	31 ± 2	-	Continuó bajo estudio
12	IQ568	42 ± 6	48 ± 4	40 ± 3	Meleagrina, Citrinina	No continuó bajo estudio
13	IQ573	43 ± 7	NP	NP	Citrinina, Polanrazina, Harmano	No continuó bajo estudio
14	IQ574	41 ± 6	NP	NP	Polanrazina	No continuó bajo estudio

15	IQ577	NP	NP	44 ± 9	Harmano	No continuó bajo estudio
16	IQ587	NP	NP	NP	Roquefortina, Polanrazina	No continuó bajo estudio
17	IQ592	NP	NP	NP	Polanrazina, Harmano	No continuó bajo estudio
18	IQ600	NP	NP	NP	Polanrazina	No continuó bajo estudio
19	IQ631	NP	NP	NP	Harmano	No continuó bajo estudio
20	IQ632	NP	NP	NP	Polanrazina	No continuó bajo estudio
21	IQ635	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio
22	IQ636	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio
23	IQ638	NP	NP	NP	Meleagrina	No continuó bajo estudio
24	IQ644	NP	NP	NP	Meleagrina	No continuó bajo estudio
25	IQ651	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio
26	IQ705	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio
27	IQ720	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio
28	IQ732	NP	NP	NP	-	No continuó bajo estudio

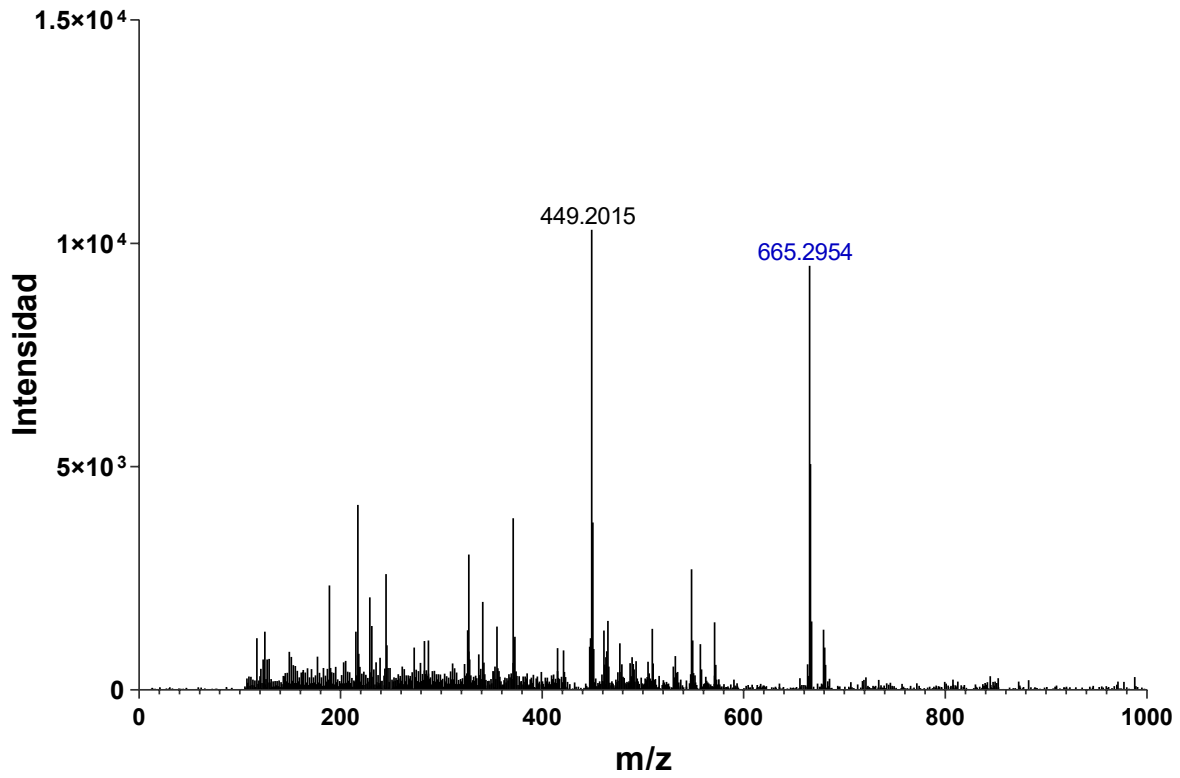


Figura A 1. Espectro por HR-DART⁺ [M+H]⁺ m/z 665.2954, C₄₀H₃₇N₆O₄⁺ (665.2876), Δ 11.7ppm, para el compuesto **1**: asperazina.

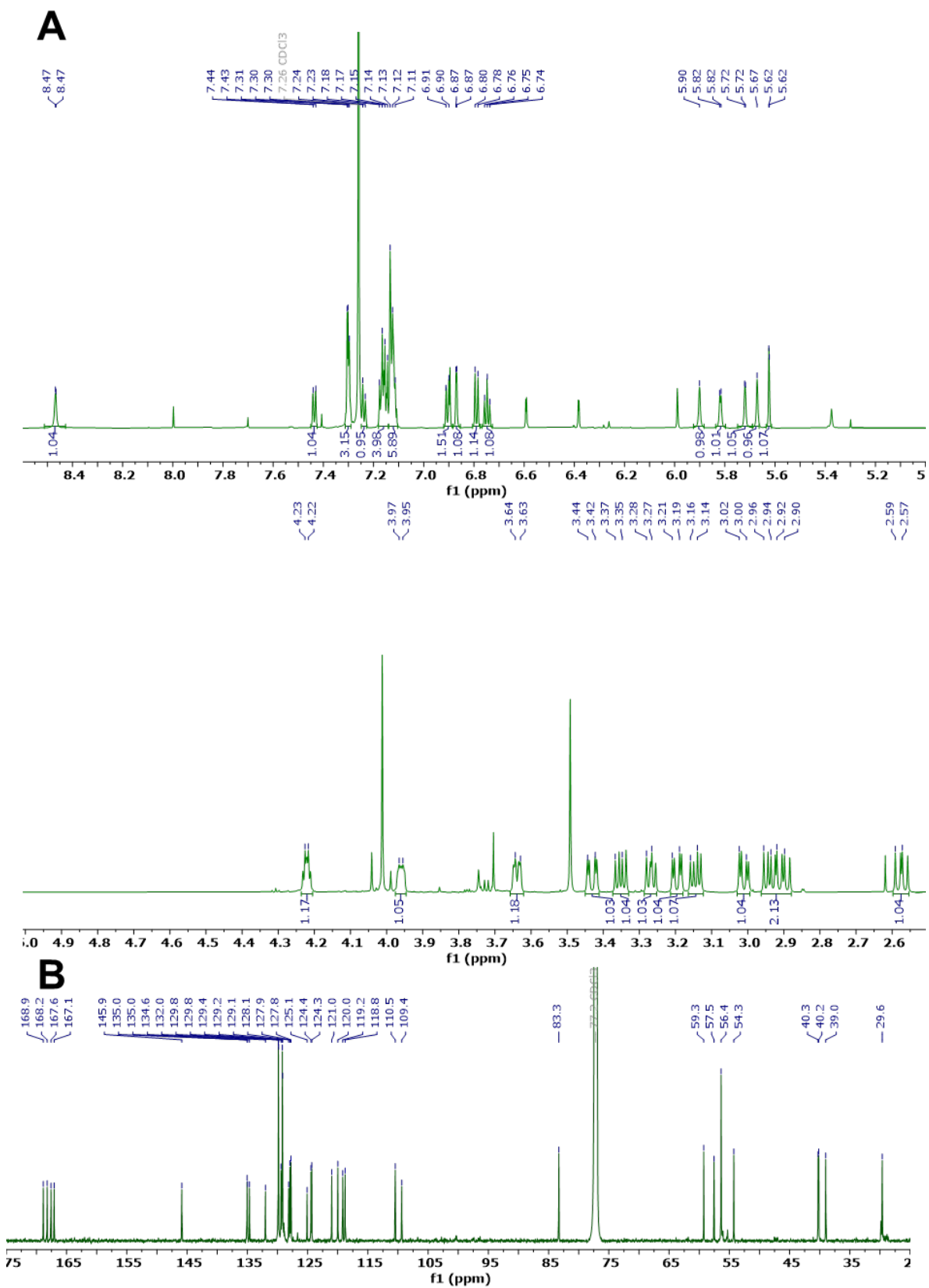


Figura A 2. A, espectro de RMN-¹H (700 MHz-CDCl₃) y B, espectro de RMN-¹³C (175 MHz-CDCl₃) para el compuesto **1**: asperazina.

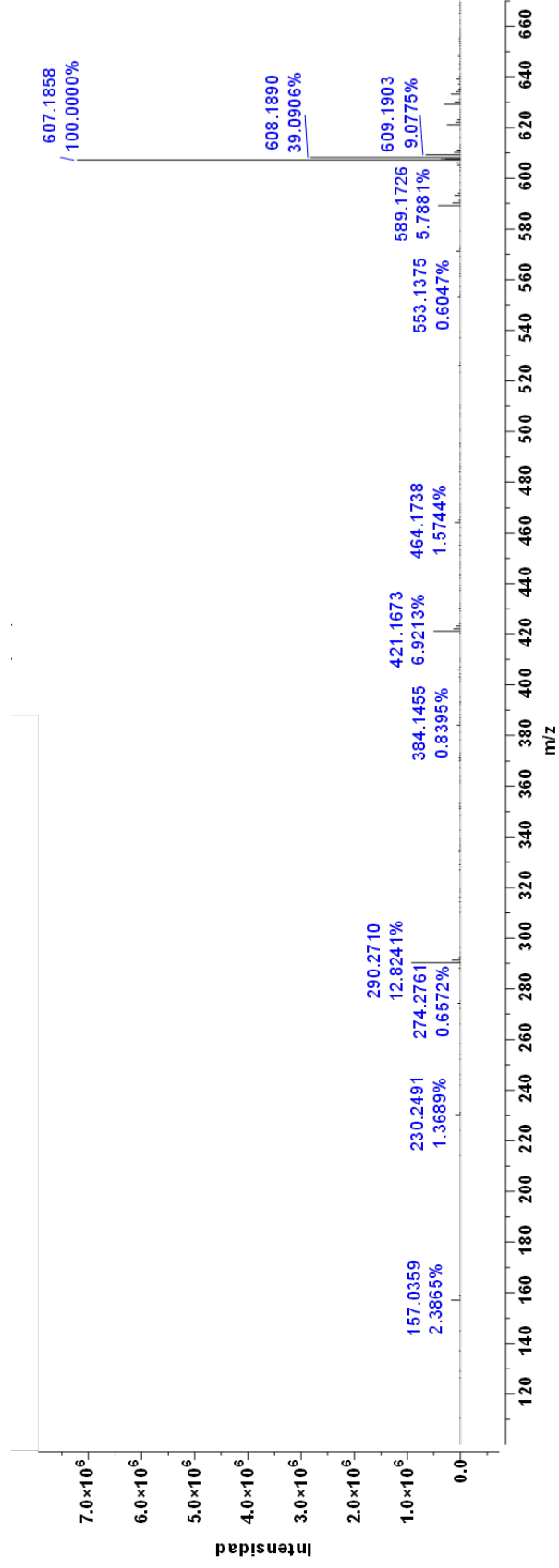


Figura A 3. Espectro por HR-ESI⁺-MS [M+H]⁺ m/z 607.1858, C₃₂H₃₁O₁₂⁺ (607.1816), Δ 6.9 ppm, para el compuesto 2: aurasperona B.

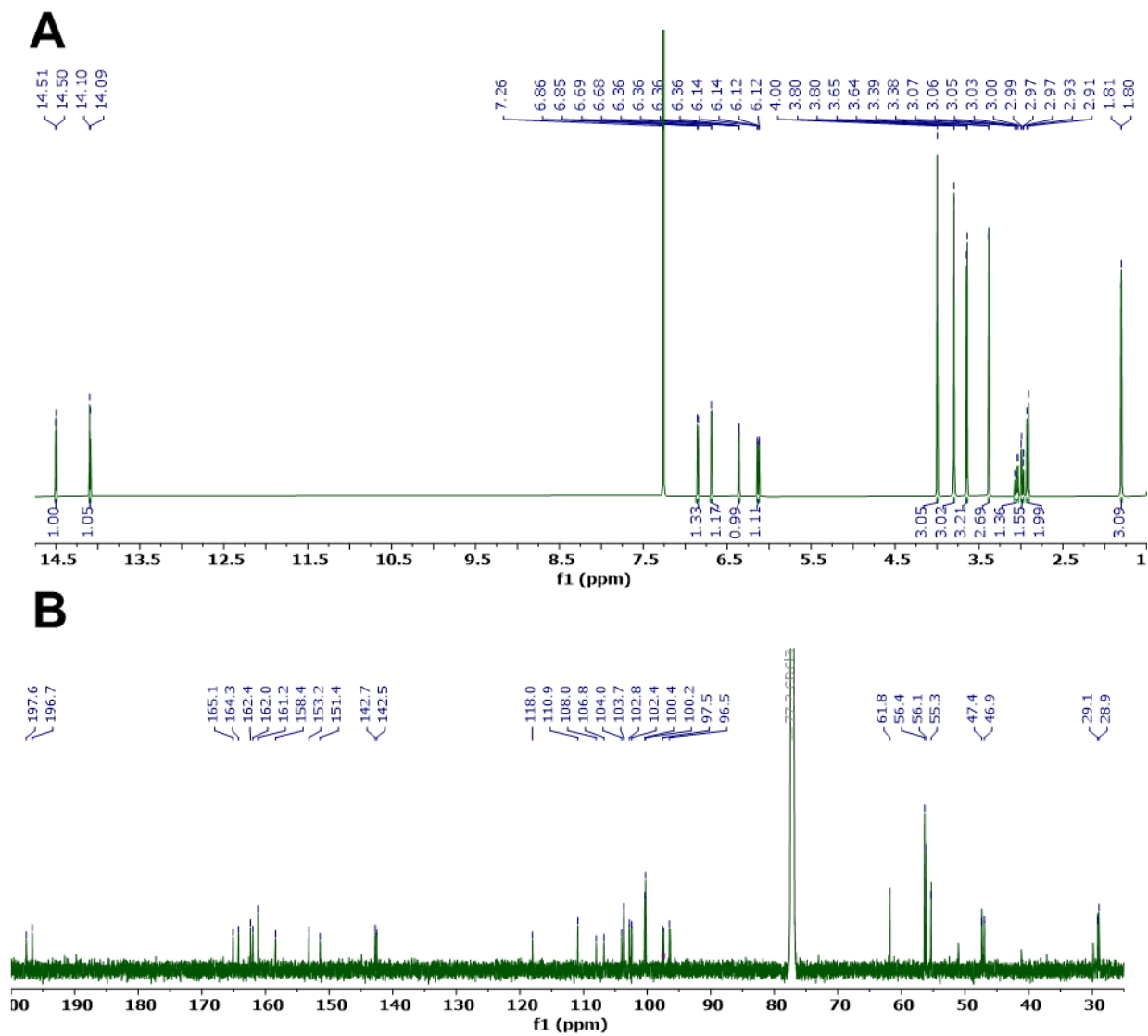


Figura A 4. A, espectro de RMN- ^1H (700 MHz- CDCl_3) y **B**, espectro de RMN- ^{13}C (175 MHz- CDCl_3) para el compuesto **2**: aurasperona B.

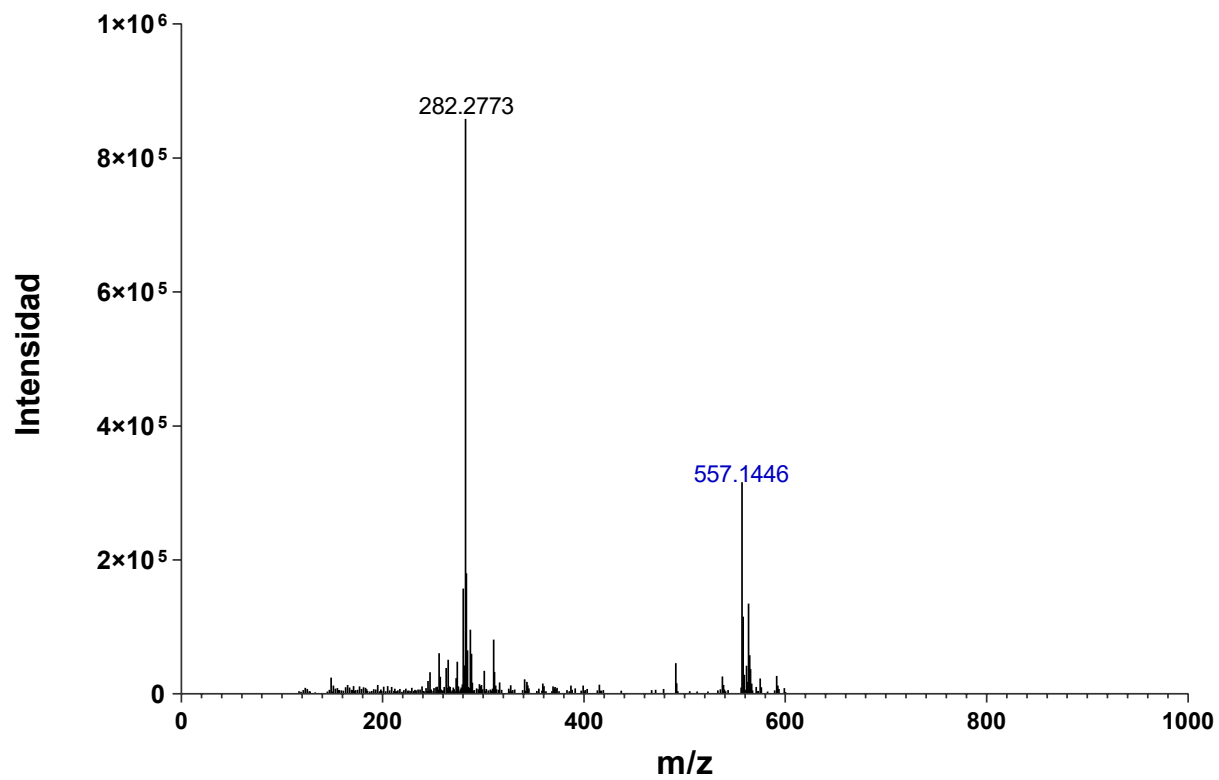


Figura A 5. Espectro por HR-DART⁺ [M+H-H₂O]⁺ m/z 557.1446, C₃₁H₂₅O₁₀⁺ (557.1448), Δ 0.7 ppm, para el compuesto **3**: aurasperona F.

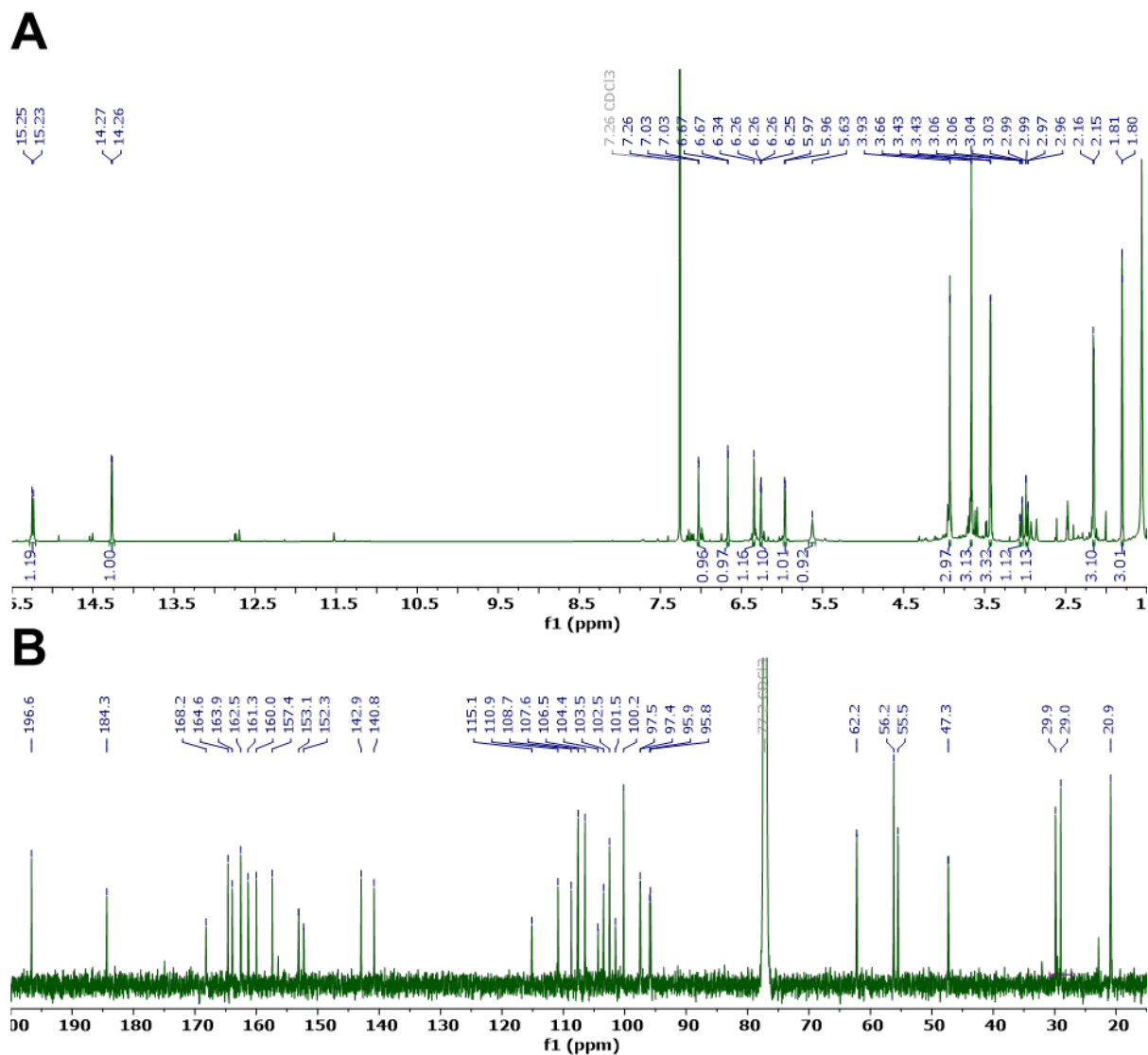


Figura A 6. A, espectro de RMN- ^1H (700 MHz- CDCl_3) y **B**, espectro de RMN- ^{13}C (175 MHz- CDCl_3) para el compuesto **3**: aurasperona F.

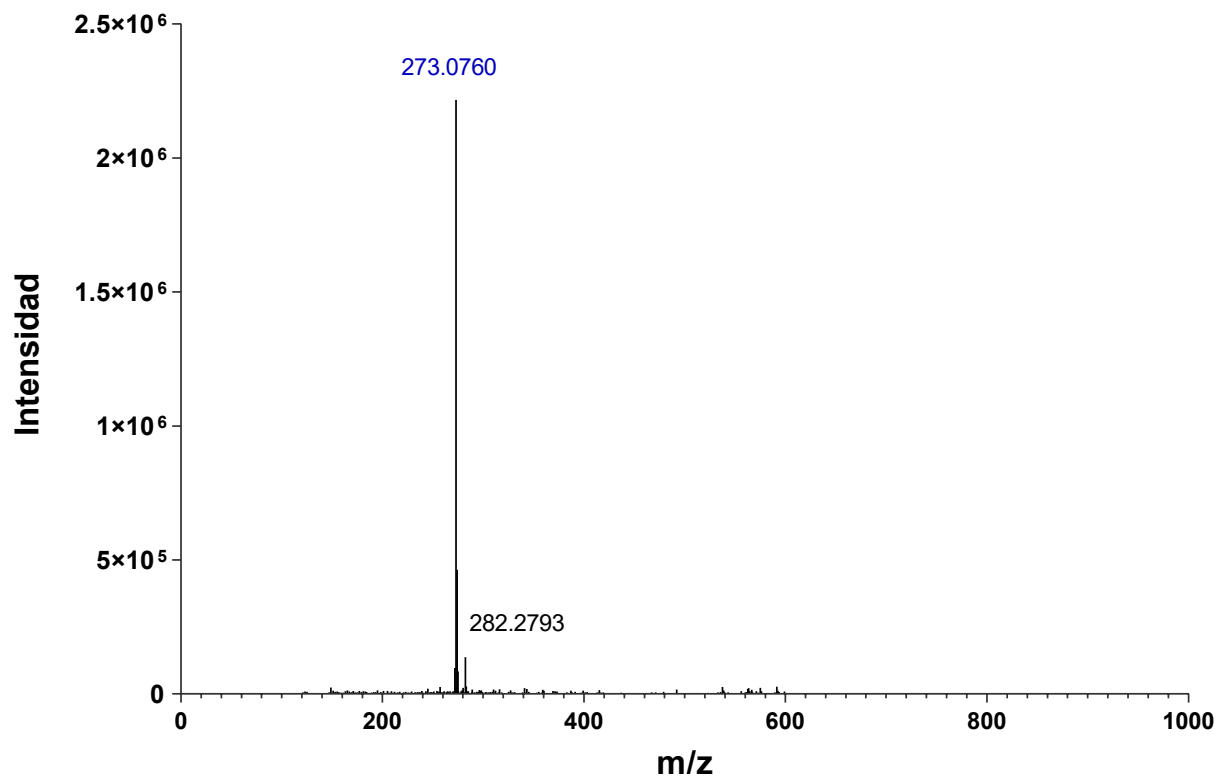


Figura A 7. Espectro por HR-DART⁺ [M+H]⁺ m/z 273.0760, C₁₅H₁₃O₅⁺ (273.0763), Δ 1.1 ppm, para el compuesto **4**: TMC-256A1.

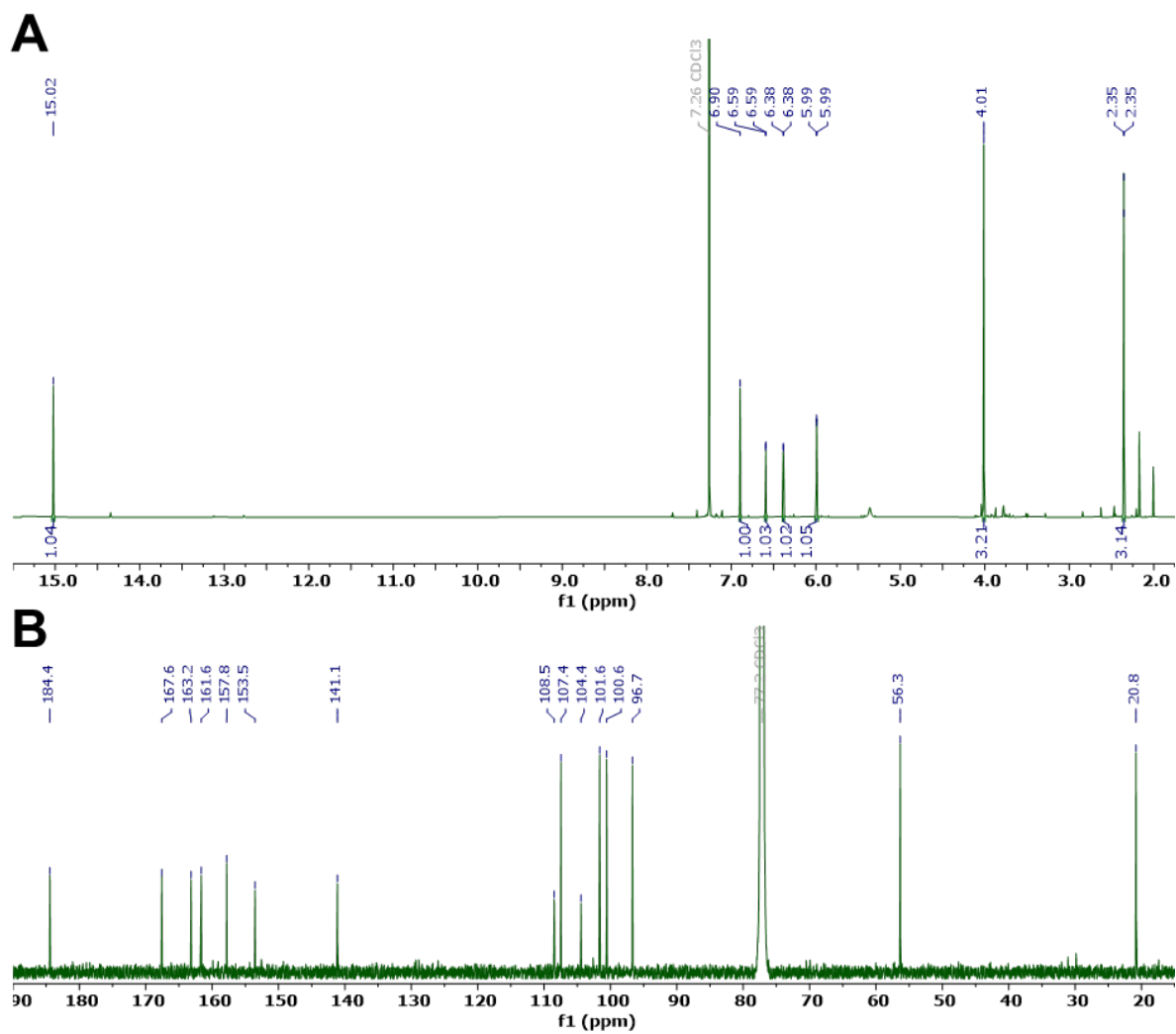


Figura A 8. **A**, espectro de RMN- ^1H (700 MHz- CDCl_3) y **B**, espectro de RMN- ^{13}C (175 MHz- CDCl_3) para el compuesto **4**: TMC-256A1.

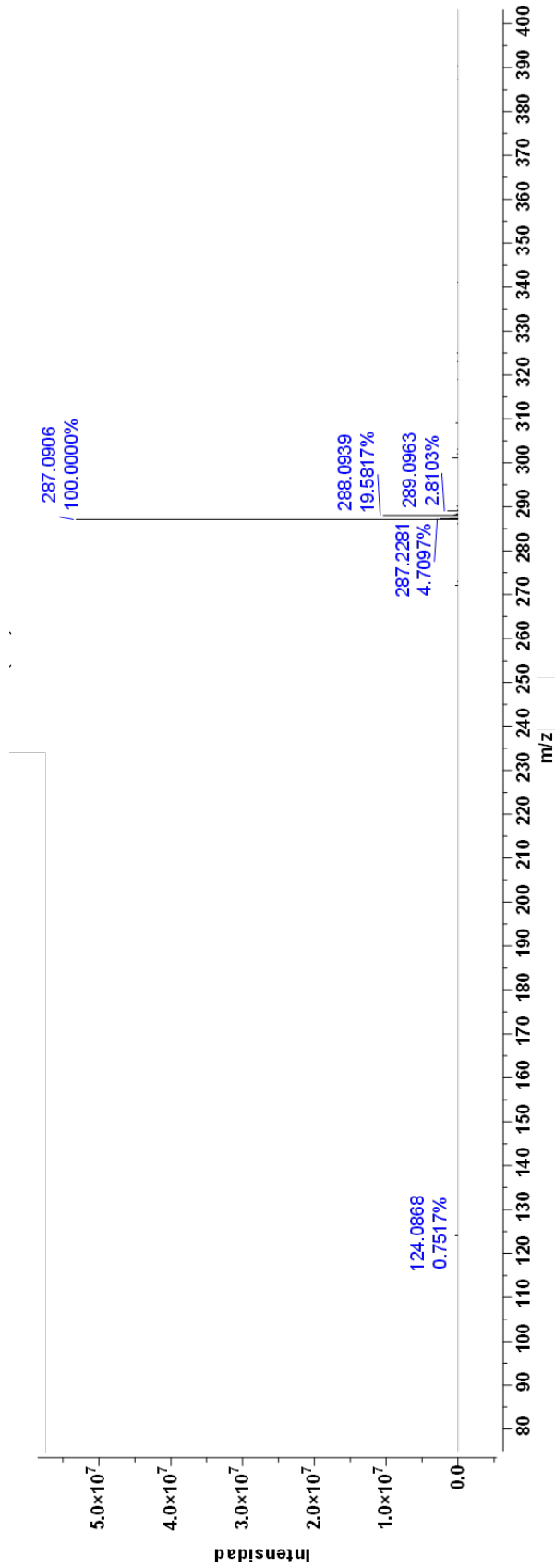


Figura A 9. Espectro por HR-ESI⁺-MS [M+H-OH]⁺ m/z 287.0906, C₁₆H₁₅O₅⁺ (287.0914), Δ 2.8 ppm, para el compuesto **5**: Fonseca B.

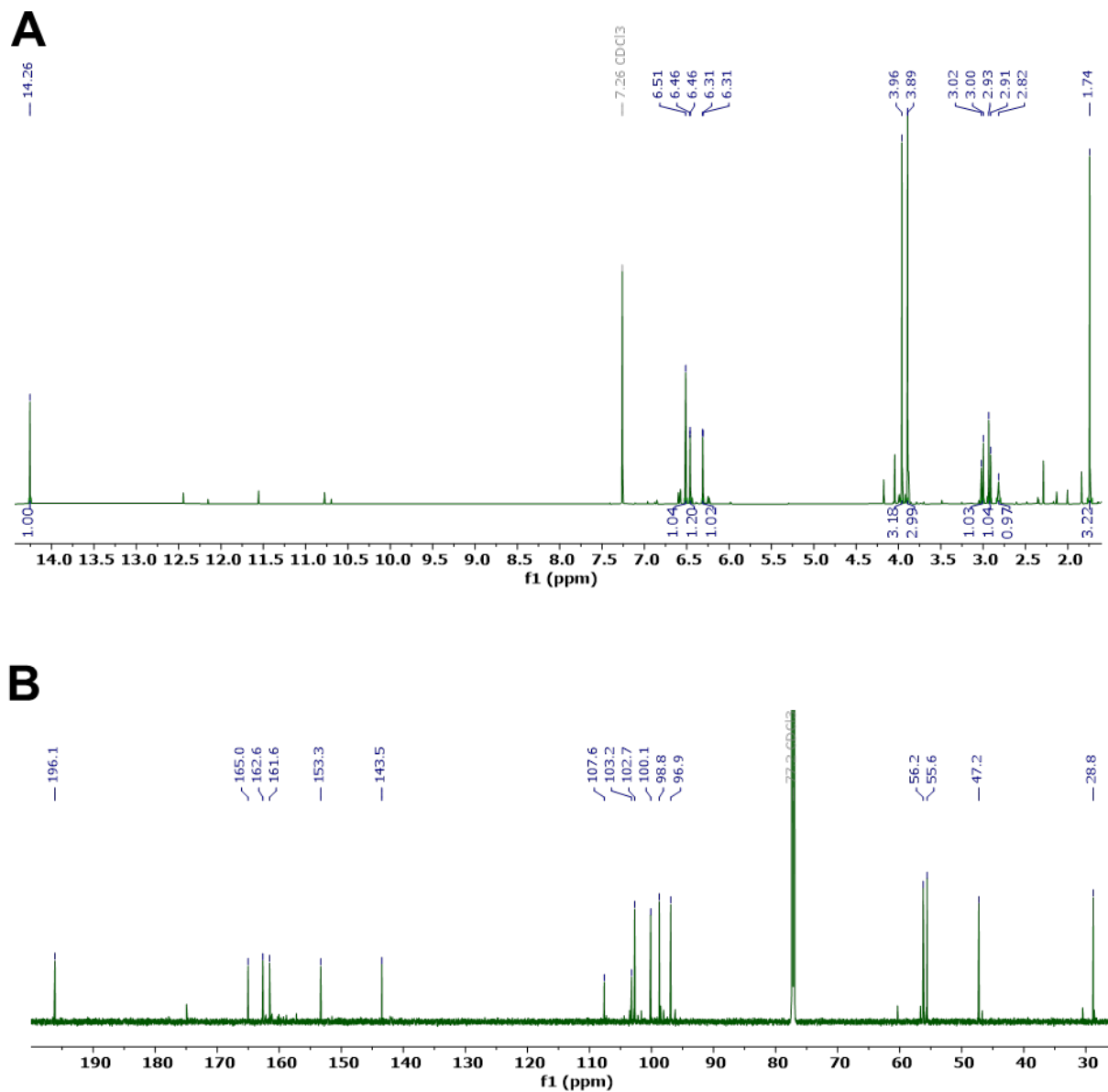


Figura A 10. **A**, espectro de RMN-¹H (700 MHz-CDCl₃) y **B**, espectro de RMN-¹³C (175 MHz-CDCl₃) para el compuesto **5**: Fonsecina B.

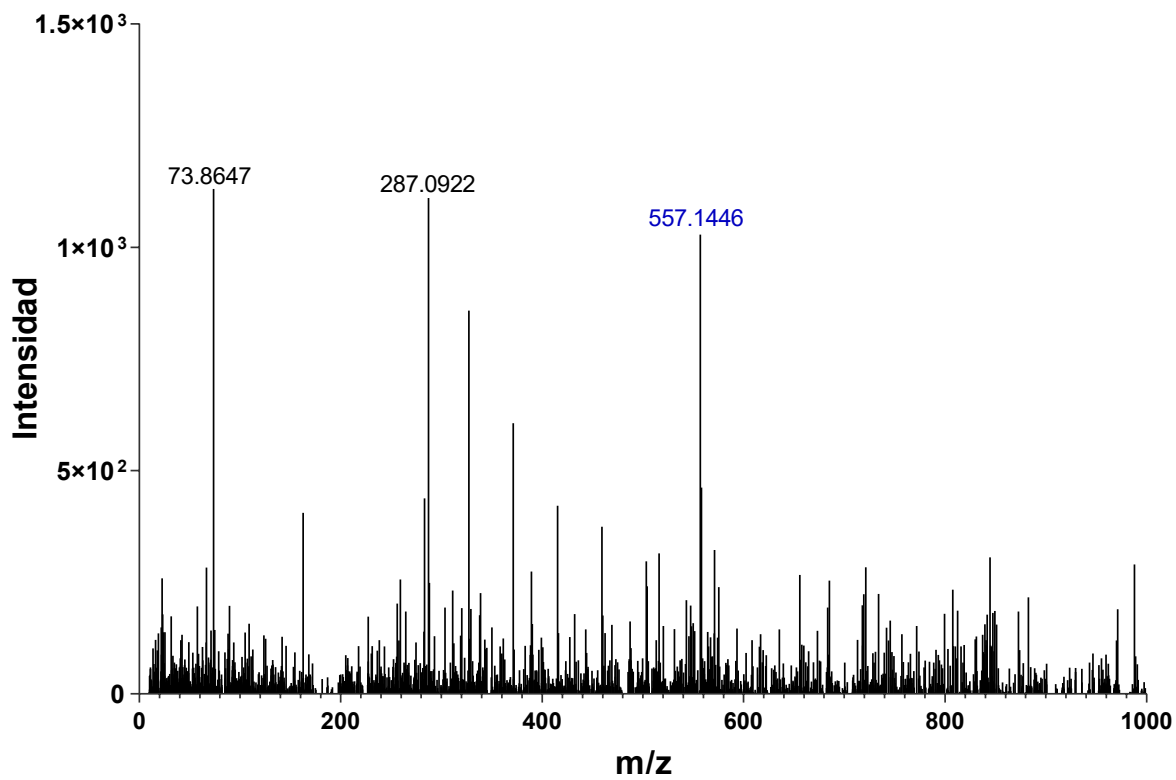


Figura A 11. Espectro por HR-DART⁺ [M+H]⁺ m/z 557.1446, C₃₁H₂₅O₁₀⁺ (557.1448), Δ 0.7 ppm, para el compuesto **6**: dianhidroaurasperona C.

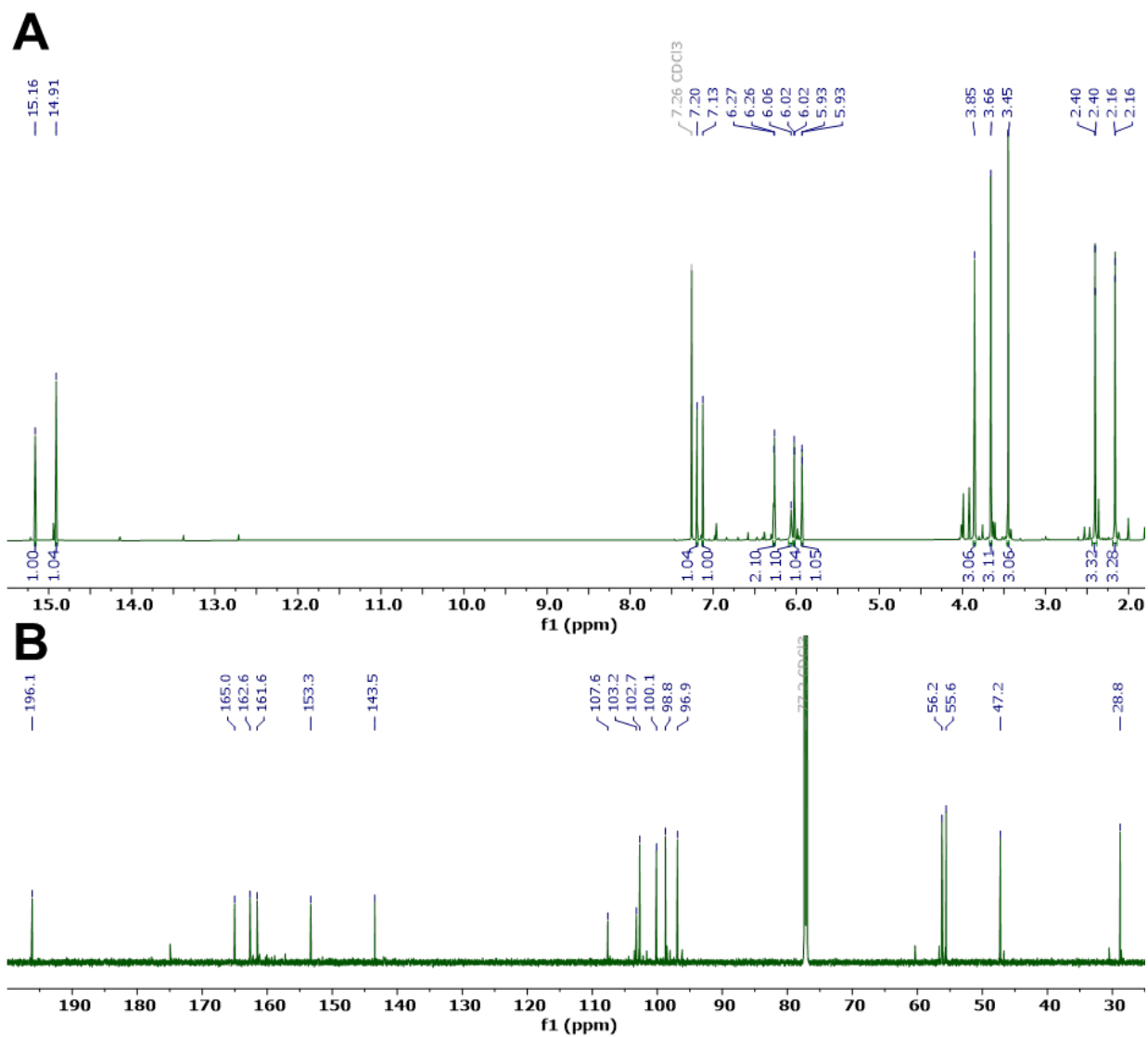


Figura A 12. **A**, espectro de RMN-¹H (700 MHz-CDCl₃) y **B**, espectro de RMN-¹³C (175 MHz-CDCl₃) para el compuesto **6**: Dianhidroaurasperona C.

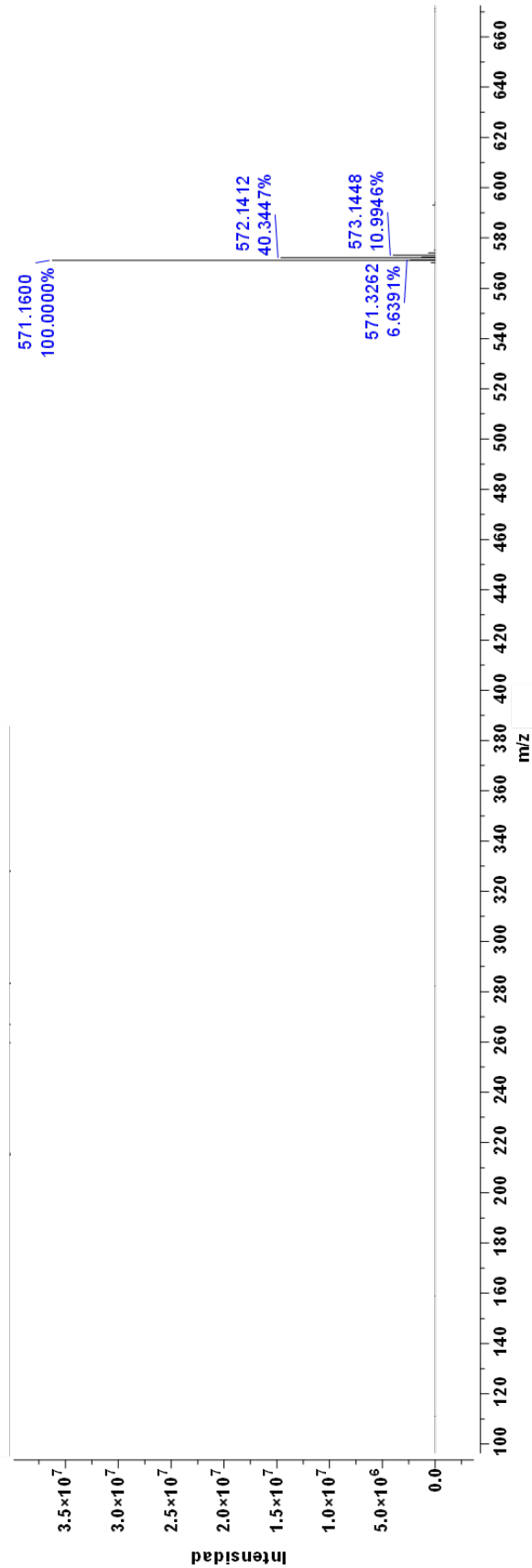


Figura A 13. Espectro por HR-ESI⁺-MS [M+H]⁺ m/z 571.1600, C₃₂H₂₇O₁₀⁺ (571.1604), Δ 0.2 ppm, para el compuesto **7**: aurasperona A.

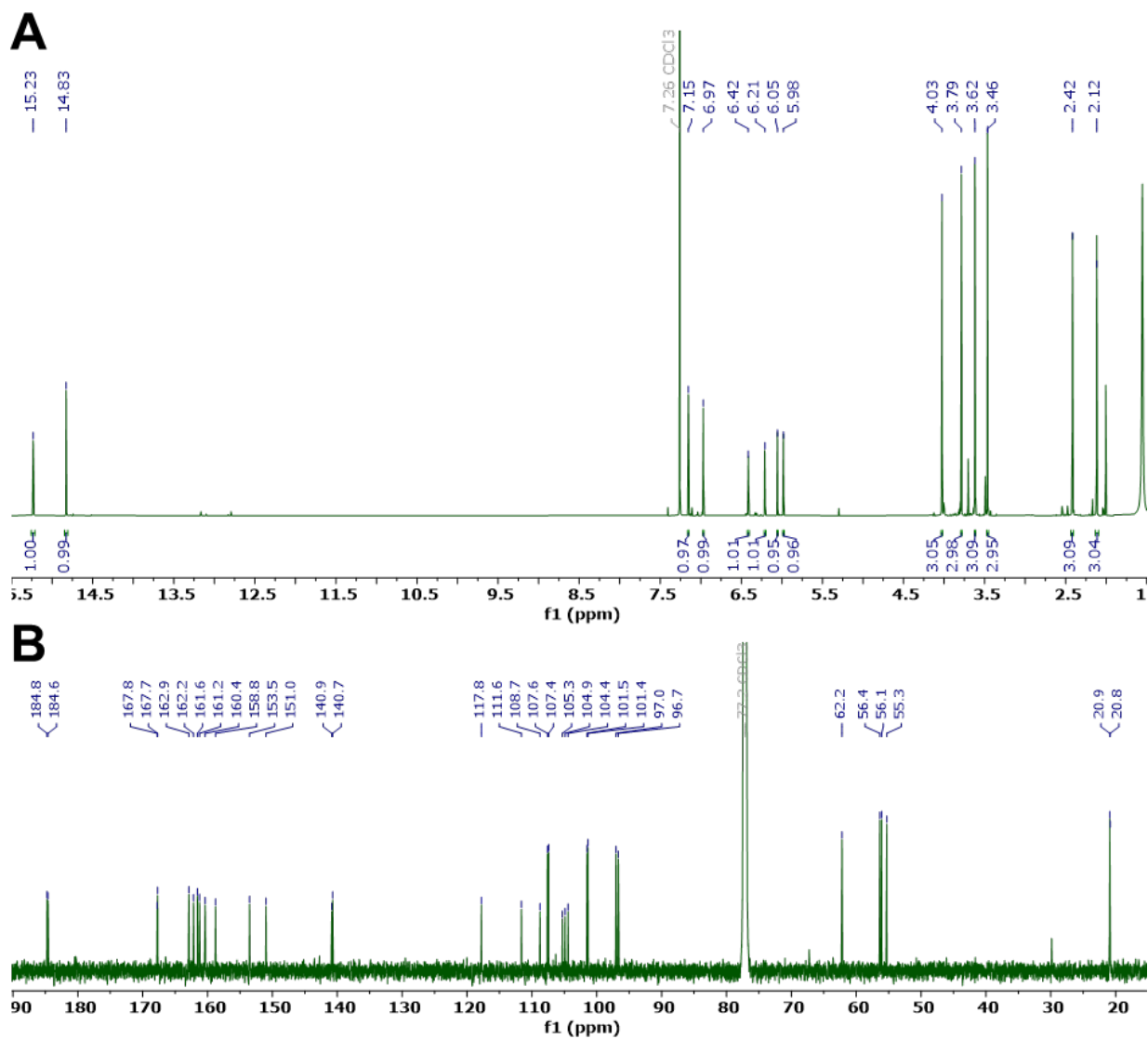


Figura A 14. **A**, espectro de RMN-¹H (700 MHz-CDCl₃) y **B**, espectro de RMN-¹³C (175 MHz-CDCl₃) para el compuesto 7: Aurasperona A.



EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM

OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Karol Carrillo Jaimes, Fernanda Hernández Sedano, Patricia Cano Sánchez,
Everardo Tapia Mendoza y José Alberto Rivera Chávez

POR PRESENTAR EL TRABAJO:

Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana e inhibición de la actividad de AbFtsZ

en el Simposio 2022 del Instituto de Química,
que se llevó a cabo el 13 de diciembre de 2022

Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
DIRECTOR



EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM

OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Karol Carrillo Jaimes

POR PRESENTAR EL TRABAJO:

Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana e inhibición de la actividad de AbFtsZ

**QUE RECIBIÓ EL RECONOCIMIENTO COMO UNO DE LOS
DOS MEJORES TRABAJOS DE LA CATEGORÍA DE:**

Doctorado

entre los presentados en el Simposio 2022 del Instituto de Química,
que se llevó a cabo el martes 13 de diciembre de 2022.

Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
DIRECTOR



FACULTAD
DE MEDICINA



Amipronat
Asociación Mexicana de Investigación
en Productos Naturales

LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES OTORGAN LA PRESENTE:

CONSTANCIA

Karol Carrillo Jaimes, Enrique Aguilar Ramírez, Marlen Parra Sánchez, José Alberto Rivera Chávez.

a:

Por haber presentado el trabajo titulado:

Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana mediante técnicas de derreplicación

En el marco de las actividades de la 17ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, que se llevó a cabo en **modalidad híbrida** (presencial y virtual) del 18 al 20 de mayo de 2022 .

Monterrey, Nuevo León; a 20 de Mayo de 2022.

**Dra. C. María Luisa del Carmen
Garduño Ramírez**
Presidenta de la AMIPRONAT

Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
Director de la Facultad de Medicina de la
UANL

Búsqueda de metabolitos fúngicos con actividad antibacteriana e inhibición de la actividad de $AbFtsZ_{1-412}$

Karol Carrillo Jaimes*, Carlos Fajardo*, Fernanda Hernández Sedano*, Patricia Cano Sánchez*, y José Alberto Rivera Chávez*

*Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México.

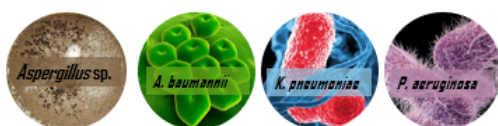
karolcarrillojaimes@gmail.com, jrivera@quimica.unam.mx



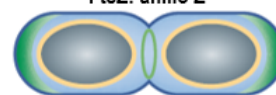
PROBLEMÁTICA Y OBJETIVO

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública que debe ser atendido de manera integral. Una estrategia para abordar la problemática se centra en el desarrollo de nuevos antibióticos con mecanismos de acción novedosos. Este trabajo se centra en el descubrimiento y/o reposicionamiento de antibacterianos con mecanismos de acción novedosos a partir de hongos.

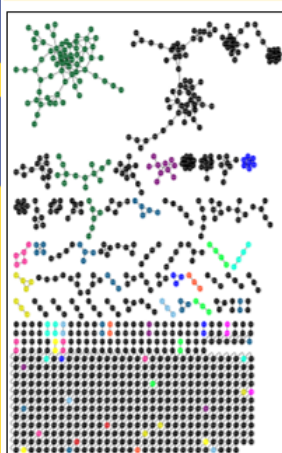
RESULTADOS



FtsZ: anillo Z

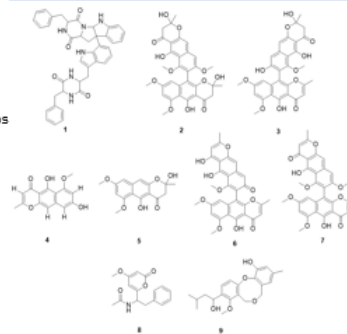


Red molecular: GNPS & HPLC-MS/MS

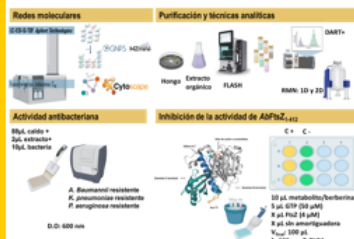


- Ácidos Benzóicos
- Piranos-piranosas
- Aminoácidos y péptidos
- Quinonas-quinolonas-quinolinas
- Sulfonamidas-benzodiazepinas
- Flavonoides
- Carbohidratos-alcoholes-éteres
- Cumarinas-Furanonas
- Lactonas
- Terpenoides/terpenos
- Esteroides
- Ácidos cinámicos-ácidos carboxílicos
- Indoles
- No clasificado
- Citrulina Esterigmatocistina

N°	AA_Ab,%	AA_Kp,%	AA_Pa,%	Act. FtsZ,%	Inh. FtsZ,%
1	62±11	70±6	50±6	88±3	NP
2	66±7	43±5	28±2	215±5	-
3	52±5	48±4	40±1	141±2	-
4	56±9	43±6	40±5	49±2	51±4
5	NP	NP	NP	136±2	-
6	NP	NP	NP	244±5	-
7	NP	NP	NP	142±4	-
8	NP	NP	NP	123±7	-
9	40±9	NP	NP	122±5	-



METODOLOGÍA



Referencias

- OMS, Marco jurídico internacional para abordar la resistencia a los antimicrobianos. 2015.
- CLSI, M26-A: *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents*. 1999.

Agradecimientos

Beca Conacyt, otorgada al autor: CVU 954406. CONACyT CF-263977. PROYECTO DGAPA-PAPIIT IA203220 y IA207422.



INSTITUTO DE QUÍMICA MERCK



Antibacterial Activity and *AbFtsZ* Binding Properties of Fungal Metabolites Isolated from Mexican Mangroves

Karol Carrillo-Jaimes¹ · Carlos A. Fajardo-Hernández¹ · Fernanda Hernández-Sedano¹ · Patricia Cano-Sánchez¹ · Jesús Morales-Jiménez^{2,3} · Beatriz Quiroz-García¹ · José Rivera-Chávez¹

Received: 24 October 2023 / Accepted: 9 December 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Antimicrobial resistance is emerging as a global health challenge that requires immediate and concerted attention. Accordingly, the WHO has issued alerts urging to continue developing antibiotics with novel mechanisms of action toward clinically important pathogens, including *Acinetobacter baumannii*. In this context, fungi have played a crucial role in the discovery and development of antibiotics. Therefore, in this work, three fungal strains were prioritized based on their metabolic profiles and antibacterial activity against a pan-resistant isolate of *A. baumannii*, to identify potential antibiotic molecules. Chemical investigation of the selected fungi (mangrove endophytes) led to the isolation of asperazine (**1**), aurasperone B (**2**), aurasperone F (**3**), TMC-256A1 (**4**), fonsecin B (**5**), dianhydroaurasperone C (**6**), aurasperone A (**7**), pyrophen (**8**), and penicillide (**9**). Moreover, an *in vitro* assay to detect ligands of the filamentous temperature-sensitive mutant Z enzyme of *A. baumannii* (*AbFtsZ*), a GTPase that plays a central role in bacterial division, was developed to correlate the antibacterial properties of the isolated molecules to a mechanism of action. Compounds **1–4** and **9** inhibited the growth of *A. baumannii*. Interestingly, compounds **2**, **3**, and **5–9** interacted with *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, increasing its GTPase activity. Conversely, compound **4** exhibited an outstanding ability to act as an inhibitor of both the enzymatic activity and the growth of the strain under study.

Keywords Antimicrobial resistance · Untargeted-metabolomics · Multi-informative approach · FtsZ

Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has emerged as a major health challenge of the twenty-first century and is considered the most serious infectious syndrome in developing countries (Murray et al. 2022). In 2019, infectious diseases caused by bacterial organisms resulted in 4.95 million deaths, of which 1.27 million were directly attributable to resistant bacterial strains (Murray et al. 2022). The top six

pathogens responsible for AMR-related deaths are *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* (WHO 2017; Murray et al. 2022). In Mexico, antimicrobial resistance is already a significant healthcare challenge. Major infections are caused by pan-drug-resistant *A. baumannii*, penicillin-resistant *E. coli*, and third-generation cephalosporins-resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (Founou et al. 2017; Sosa-Hernández et al. 2020). Considering the ever-growing rate of resistant infections, the World Health Organization (WHO) has called for increased efforts in the discovery and development of antibiotics with novel mechanisms of action to combat AMR. If current trends continue, AMR is projected to become the leading cause of death by 2050, resulting in approximately 10 million deaths annually worldwide (O'Neill 2016; Founou et al. 2017; Tacconelli et al. 2018).

One strategy for preventing bacterial growth is to inhibit cell division, which is a fundamental process in the spread of infections. In bacteria, the protein FtsZ (a GTPase enzyme) plays a key role in cell division. It is the first protein to be located at the

✉ José Rivera-Chávez
jriviera@iquimica.unam.mx

¹ Department of Natural Products, Institute of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

² Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a sección, 78216 San Luis Potosí, Mexico

³ Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana, 04690 Mexico City, Mexico

dividing site (Adams and Errington 2009). Through autopolymerization processes, it assembles a ring-like structure (the Z-ring) that facilitates the generation of two new cells from one. FtsZ consists of two domains connected by an α -helix (Tripathy and Sahu 2019). The N-terminal domain contains a parallel β -strand surrounded by two and three helices and holds the nucleotide binding site. In addition, the C-terminal domain is a central β -strand supported by two helices, and it harbors the T7 loop, which is essential for the formation of the catalytic site (Kusuma et al. 2019). This enzyme offers several advantages as a molecular target for antibiotic development: (i) it is indispensable for bacterial growth (Carro 2019); (ii) it is highly conserved in prokaryotes and absent in eukaryotic animal cells (Carro 2019); (iii) ligands that inhibit or enhance the activity of this protein can disrupt the Z-ring structure, preventing bacterial division (Carro 2019); and (iv) currently there are no approved drugs targeting this protein, even less *AbFtsZ* ligands (Hurley et al. 2016; Carro 2019).

Based on these considerations, in this study, a multi-informative approach joining in bioassay-guided methodologies was used to find fungal antimicrobial metabolites against a pandrug-resistant *A. baumannii* strain (A564); to establish a putative molecular target for the isolated molecules, an *in vitro* assay to monitor the binding properties of candidate molecules toward *A. baumannii* FtsZ (*AbFtsZ*) was developed. Chemical investigation of three selected mangrove endophytes identified as *Aspergillus* sp. IQ-503, *Aspergillus* sp. IQ-548, and *Talaromyces* sp. I-567 led to the isolation and characterization of asperazine (**1**), aurasperone B (**2**), aurasperone F (**3**), TMC-256A1 (**4**), fonsecin B (**5**), dianhydroaurasperone C (**6**), aurasperone A (**7**), pyrophen (**8**), and penicillide (**9**). Among these metabolites, compounds **1–4** exhibited bacterial growth inhibition with IC_{50} values ranging from 6.9 ± 0.7 to 9.9 ± 0.8 $\mu\text{g/ml}$, while compounds **2**, **3**, and **5–9** increased the activity of *AbFtsZ*. In addition, compound **4** acted as the sole inhibitor of the activity of *AbFtsZ* while inhibiting bacterial growth.

Material and Methods

Fungal Isolation

Biological samples for fungal isolation were collected from lagoons in Guerrero (Tecomate: $16^{\circ} 41' 29.6''\text{N}$ $99^{\circ} 19' 42.6''\text{W}$; Chautengo: $16^{\circ} 36' 51.5''\text{N}$ $99^{\circ} 07' 17.5''\text{W}$) and Oaxaca (Corralero: $16^{\circ} 13' 23.9''\text{N}$ $98^{\circ} 11' 07.8''\text{W}$, Chacahua: $16^{\circ} 00' 00.3''\text{N}$ $97^{\circ} 44' 16.0''\text{W}$; Ventanilla: $15^{\circ} 40' 20.5''\text{N}$ $96^{\circ} 34' 47.5''\text{W}$), Mexico, by the Rivera-Chávez Natural Products Research Laboratory in February 2020. Samples collected included mangrove soil, leaf, and root samples (from *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa*). Fungal microorganisms were isolated from soil samples using a serial dilution

protocol, starting with a suspension of 1 g of soil in 9 ml of water. From this suspension, four serial dilutions (concentrations of 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} g/ml) were prepared. Then, 100 μl of each solution was plated on potato dextrose agar (PDA) supplemented with amoxicillin (500 mg/l). Mangrove leaves and roots were sampled in small pieces and placed on PDA plates containing amoxicillin. The plates were then incubated at room temperature for 48–72 h until clear growth was observed. Emerging microorganisms were then transferred to new plates. This procedure resulted in a collection of 250 axenic cultures (Jiménez-Arreola et al. 2020).

Antibacterial Activity

Test Microorganisms

The multidrug-resistant clinical bacterial strain of *Acinetobacter baumannii* (A564) was supplied by the National Institute of Pediatrics, Mexico City. It was cultured in Müller-Hinton broth at 37°C and then stored in Müller-Hinton broth and sterile glycerol (4:1) at -80°C .

Antibacterial Assay

This assay was performed according to the method described in CLSI M07-A10 guidelines (microdilution assay) (CLSI 2015). The bacterial strain was suspended in Müller-Hinton broth at 37°C for 12 h and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standard units (10^8 CFU/ml). Molecules were evaluated at 100 $\mu\text{g/ml}$ and extracts and fractions were evaluated at 250 $\mu\text{g/ml}$ in DMSO. The microdilution setup consisted of 10 μl bacterial suspension, 2 μl sample (extracts/fractions/molecules), and 88 μl Müller-Hinton broth. The optical density of the plate was then measured at 600 nm (OD_{600}) using a plate reader. The plate was then incubated at 37°C for 24 h, and the measurement was repeated to calculate the inhibition percentage and growth rate. Gentamicin was used as a positive control in the assay (100 $\mu\text{g/ml}$). Inhibition values were calculated by nonlinear regression using GraphPad Prism 8.0 software.

$$\% \text{Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{S.OD}_{t=24} - \text{S.OD}_{t=0}}{\text{C.OD}_{t=24} - \text{C.OD}_{t=0}} \right) * 100\% \quad (1)$$

where S.OD is sample optical density, and C.OD is negative control optical density.

Equation 2 was used to calculate IC_{50} values using Graph Pad Prism 8.0 software.

$$\% \text{Inhibition} = \frac{100}{1 + 10^{[\log IC_{50} - X] * S}} \quad (2)$$

where X is the concentration and S is the Hill slope of each curve.

Molecular Network Analysis

Of the initial 250 isolates, 222 were discarded based on the antibacterial activity of their extracts (Fig. S1). The remaining 28 microorganisms were grown on a larger scale to increase the yield of organic extracts, and these extracts were analyzed through molecular networking. The complexity of the extract was then analyzed using UPLC-MS/MS. Chromatographic analyses were performed using an Agilent 1260 Infinity HPLC system coupled to an Agilent G6530BA MS-(ESI+)-SQ-TOF mass spectrometer, and a Gemini NX-C₁₈ reverse phase column (3 μ m, 2.0 \times 75 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used for separation, with a binary elution system of MeCN-H₂O (0.1% formic acid). The gradient started at a ratio of 15:85 and reached 100:0 over 8 min, followed by isocratic hold for 1.5 min at a flow rate of 0.4 ml/min. The parameters for the mass spectrometric analysis were as follows: positive ionization mode in the range of 100–2500 *m/z*, selecting the two most abundant ions per cycle for fragmentation in automatic mode (Auto MS²). The mass spectra in .d format were converted to .mzML format using the ProteoWizard tool MsConvert (version 3.0.20239). The resulting files were analyzed on the Global Natural Products Social (GNPS) platform (<https://gnps.ucsd.edu>) using the methodology described by Aron et al. (2020). The data was filtered by removing all MS/MS fragment ions within ± 17 Da of the precursor *m/z*. MS/MS spectra were window filtered by choosing only the top six fragment ions in the ± 50 -Da window throughout the spectrum. The precursor ion mass tolerance was set to 2.0 Da and a MS/MS fragment ion tolerance of 0.5 Da. A network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than six matched peaks. Further, edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 10 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 100, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against GNPS spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.7 and at least 6 matched peaks. The molecular networks generated on GNPS were dereplicated using the Derreplicator+ and MolNetEnhancer algorithms (Shannon et al. 2003; Van Der Hoof et al. 2016; Mohimani et al. 2018; Ernst et al. 2019). The criteria considered for a reliable tentative identification were an error < 10 ppm (Δ ppm) and a cosine score > 0.7 (Table S1-S2). Each of the identified compounds was compared with the databases on the GNPS platform (MIADB, CASMI, MASSBANK, and NIST) (Aron, et al. 2020).

Molecular networks were visualized using Cytoscape 3.8.1. (Shannon et al. 2003).

Fermentation and Extraction

Seed cultures for each fungus were prepared in centrifuge tubes containing 15 ml of potato dextrose broth (PDB). After 5 days of agitation, the seed cultures were poured onto 10 g of commercially available Cheerios® cereal ($\times 10$). The cultures were allowed to grow and undergo fermentation for a span of 30 days, under regular light and dark cycles and at room temperature. After fermentation, each organic extract was obtained by maceration and liquid-liquid partition. Initially, 80 ml of a 9:1 mixture of AcOEt-Me₂CO was added to each replicate. The biomass underwent fragmentation with stirring for 24 h. Following this period, the cultures were vacuum filtered, and the filtrate was concentrated. The extract was reconstituted using a 1:1 mixture of aqueous MeOH (4:1):CH₂Cl₂. The resulting two-phase system was transferred to a separation funnel. The organic layer was further concentrated *in vacuo*. Finally, the organic extract was reconstituted with a mixture of MeOH:MeCN (1:1) and hexane. The two-phase mixture was transferred to a separation funnel and the MeOH:MeCN phase was concentrated and stored for further analysis (Jiménez-Arreola et al. 2020).

Analytical Techniques

NMR experiments were performed in CDCl₃ or MeOD-*d*₄. Spectra were acquired using a BRUKER-AVANCE 700 spectroscope operating at 700 MHz for ¹H and 175 MHz for ¹³C. All chemical shifts (δ) were referenced to the deuterated solvent peak. The exact masses of compounds were determined using either a JEOL AccuTOF JMS-T100LC spectrometer (HR-DART-MS) with PEG-600 as an internal standard or HPLC (Agilent 1260 Infinity) coupled with MS-(ESI⁺)-SQ-TOF (Agilent 1260 Infinity-Agilent G6530BA).

HPLC separations were performed on a Waters system (2535 quaternary pump) connected to an autosampler and equipped with PDA (2998) and ELSD (2424) detectors. Data acquisition and analysis were performed using Empower 3 software (Waters). Analytical and semi-preparative HPLC was performed on C₁₈ Gemini-NX columns (5 μ m) (4.6 \times 250 mm for analytical and 10.0 \times 250 mm for semi-preparative; Phenomenex, Torrance, CA, USA) (Rivera-Chávez et al. 2019a, b, c).

Isolation and Purification

The fungal extracts IQ-503 (0.5 g), IQ-548 (1.1 g), and IQ-567 (1.2 g) underwent molecular exclusion chromatography using Sephadex LH-20 as the stationary phase and

MeOH as the mobile phase at a flow rate of 2 ml/min. These procedures were performed on a Buchi Pure C-810 instrument equipped with a PDA detector (190–800 nm), resulting in the acquisition of 10 fractions (F1–F10) for IQ-548 fungal extract, 26 fractions (F1–FXXVI) for IQ-503, and 14 fractions (FA–FN) for IQ-567 (Rivera-Chávez et al. 2019a, b, c).

For all the selected fungal extracts, the fractions showing promising antibacterial activity (> 40%, at 250 µg/ml) and good yield (> 10 mg) were selected to proceed with the isolation of the active metabolites. From the extract of the microorganism IQ-548, fractions F4–F7 were selected; for IQ-503, fraction FX was selected; and finally for the extract of fungus IQ-567, fraction FD was chosen. Metabolite isolations were performed by semi-preparative HPLC using a Gemini NX-C₁₈ column, 5 µm (10.0 × 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) as the stationary phase and an elution gradient specific for each fraction (solvent A, MeCN; solvent B, H₂O:0.1% formic acid). The resolution of fraction F4 was performed using a gradient of 30–50% solvent A for 30 min and led to the isolation of compounds **1** and **2** ($t_R = 12.9$ min, 4 mg; $t_R = 28.0$ min, 1.5 mg, respectively). Resolution of fraction F5 was performed using a gradient of 35–60% solvent A for 30 min and led to the isolation of **7** ($t_R = 34.0$ min, 1.5 mg). Resolution of fraction F6 was performed using a gradient of 30–60% solvent A for 30 min and led to the isolation of **4** ($t_R = 13.6$ min, 6.0 mg) and **5** ($t_R = 16.5$ min, 4.3 mg). Fraction F7 was resolved on the same column using a gradient of 30–50% solvent A for 30 min and led to the isolation of compounds **3** ($t_R = 25.2$ min, 6.0 mg) and **6** ($t_R = 33.7$ min, 4.3 mg). Fraction FX was resolved on the same column using a gradient of 30–70% solvent A for 30 min and led to the isolation of **8** ($t_R = 12.1$ min, 2.4 mg). FD fraction was eluted on the same column using a gradient of 35–65% solvent A for 30 min and led to the isolation of compound **9** ($t_R = 19.2$ min, 8.0 mg).

The chemical structure of each compound was determined by comparison of spectroscopic (1D and 2D NMR) and spectrometric (HR-DART-MS or MS-SQ-TOF) data with those reported in the literature: asperazine (**1**) (Varoglu et al. 1997; Loach et al. 2016), aurasperone B (**2**) (Priestap 1984; Siriwardane et al. 2015), aurasperone F (**3**) (Bouras et al. 2005; Antonov et al. 2021), TMC-256A1 (**4**) (Sakurai et al. 2002), fonsecin B (**5**) (Priestap 1986), dianhydroaurasperone C (**6**) (Pilevneli et al. 2021), aurasperone A (**7**) (Campos et al. 2005), pyrophen (**8**) (Zhang et al. 2010), and penicillide (**9**) (Suzuki et al. 1991).

Expression and Purification *AbFtsZ*₁₋₄₁₂

The codon-optimized sequence of the protein filament temperature-sensitive mutant *FtsZ*₁₋₄₁₂ of *Acinetobacter baumannii* (ID GenBank CU459141.1) was cloned into expression vector pET-28-HT (Addgene), which thrombin

site has been changed for TEV site. The construction was amplified by PCR using the specific oligonucleotide *FtsZ* Fwd 5'-CCGCATATGGCCTCATTGGAATTTATAGAA G-3' and *FtsZ* Rev 5'-TTCAAGCTTACTTACGTTGCT GATTTTC-3' which introduce 5'-NdeI and 3'-HindIII restriction sites. The resulting vector *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ was verified by DNA sequencing (Laragen, Inc) (Chen et al. 2005).

To express the recombinant protein, 20 ml of LB media containing kanamycin (50 µl/ml) and chloramphenicol (30 µl/ml) was inoculated with one colony of previously transformed *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain (Novagen, Madison, WI, USA) with *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ vector and grown overnight at 37 °C with continuous shaking. The next day, the culture was diluted at 1:20 in fresh LB media with antibiotics and incubated at 37 °C until it reached an OD₆₀₀ of 0.6. Protein expression was induced by addition 0.5 mM IPTG (Goldbio, USA) at 30 °C for 6 h. The cell pellet was harvested by centrifugation (5500 × g, 10 min, 4 °C) and kept at –20 °C until required for protein purification.

Purification of *FtsZ* (*A. baumannii*) was carried out following the procedure described by Jiménez-Arreola et al. (2020) and Chen et al. (2005) with some modifications. Briefly, the cell pellet from a 500-ml culture was thawed on ice and suspended in 40 ml of lysis buffer (300 mM KCl, 50 mM Tris, and 10% glycerol at pH 8). Lysis was carried out by sonication (Misonix 3000) with an output of 750 W, by intervals of 5 s on and 30 s off for a total of 4 min of total sonication time. The soluble fraction was clarified by centrifugation (45 min at 30,000 × g, 4 °C), after filtration with a PVDF membrane (pore size of 45 µm). *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ enzyme was purified by affinity chromatography (His-Trap). The affinity column was equilibrated with lysis buffer. The elution consisted of lysis buffer and imidazole (50 mM). The protein was used immediately or stored at –80 °C in the same lysis buffer.

Enzymatic Assay of *AbFtsZ*₁₋₄₁₂

This assay was performed according to the methodology reported by Quan and Robinson (2005), Martín-García et al. (2012), and Baykov et al. (1988). Briefly, the assay was completed in 96-well plates with a final volume of 100 µl. Each well contained final concentrations of *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ at 4 µM, GTP at 50 µM, test compounds at 100 µg/ml, and berberine at 186 µg/ml (or 500 µM). Assays were performed at pH 7 in assay buffer (300 mM KCl, 50 mM Tris, 2.5 mM MgCl₂). The negative control (used for percent inhibition) was prepared by mixing the enzyme (4 µM), GTP (50 µM), assay buffer, and DMSO (sample volume). The plate was then incubated at 37 °C for 30 min, followed by the addition of 20 µl of a final malachite green solution. The plate was further incubated at 37 °C with agitation for 5 min.

Finally, the absorbance of each well was read at 630 nm. The percentage of enzyme activity activation was calculated as a percentage relative to DMSO according to Eq. 3. The entire assay procedure up to incubation was performed in a cold room at 4 °C. The final malachite green solution was prepared by combining 500 µl of a stock solution of malachite green (1.22 mg/ml malachite green reagent in sulfuric acid (20% v/v)) with the addition of 125 µl ammonium molybdate (7.5% w/v in deionized water) and 10 µl Tween 20 (11% v/v).

$$\% \text{Activity} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{negativecontrol}}} \right) * 100\% \quad (3)$$

All experiments were performed in quadruple. Data are presented as mean ± standard deviation.

Results and Discussion

This study began with the isolation of fungi associated to Mexican wetlands along the Pacific coast (Guerrero and Oaxaca, Mexico). The outcome of this procedure was a collection of 250 axenic isolates. Then, each microorganism was fermented in a solid medium (PDA). After the incubation period, the organic extract for each fungal strain was prepared and evaluated against multidrug-resistant *A. baumannii* (Fig. S1). Through this process, the 28 most promising fungi (inhibition greater than 40%: preselected fungi) were selected for up-scaling in a solid medium (Cheerios® cereal), taxonomic identification, and subsequent antibacterial evaluation. This procedure selected strains IQ-503 (*Aspergillus* sp.), IQ-548 (*Aspergillus* sp.), and IQ-567 (*Talaromyces* sp.), from which nine active molecules were isolated (Fig. S1-S2).

Diversity of Mangrove Fungi

Mexico is ranked in the sixth position in mangrove abundance worldwide (Lacerda et al. 1993). Mangroves are highly biodiverse ecosystems that harbor a wide range of species, especially heterotrophic microorganisms such as fungi, with ecological, chemical, and economic importance (Sosa-Rodríguez et al. 2009). These microorganisms perform various functions in this environment, such as decomposition of wood or organic matter from sediments, fragmentation of leaves, and as endophytes in symbiotic processes with mangrove roots and leaves (Sosa-Rodríguez et al. 2009). A review by Devadatha et al. (2021) indicates that approximately 850 mangrove fungi have been identified by 2020, being *Xylaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., and *Fusarium* spp. the most represented, in agreement with outcomes from this work. In this scenario, endophytic fungi

isolated from Mexican mangroves were studied looking for molecules with promising biological activity.

The taxonomic identification of 24/28 preselected microorganisms was performed using molecular methods. For this purpose, the ITS region of the ribosomal DNA was amplified and sequenced. The data are available in GenBank. To show the evolutionary relationships among the organisms, the sequences were then aligned and placed in a phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood method (Fig. 1). In this study, 24 nucleotide sequences from fungi associated with Mexican Pacific wetlands and 38 reference sequences were included in the analysis. All identified fungi belong to the orders Botryosphaerales, Eurotiales, and Hypocreales of the phylum Ascomycota. Within the Eurotiales, the genera *Talaromyces*, *Aspergillus*, and *Penicillium* were the most abundant, while the genera *Phyllosticta* and *Lasiodiplodia*, Botryosphaerales, were less copious.

Prioritization of Microorganisms

Activity Screening

The 28 preselected isolates were cultured in solid medium (Cheerios®) to increase yields. The antibacterial potential of each extract was assessed against *A. baumannii* to confirm its activity. Extracts with growth inhibition greater than or equal to 40% at 250 µg/ml toward *A. baumannii* A564 were selected. Some of the most outstanding extracts were (Fig. S3) IQ-503 (*Aspergillus* sp., 54.3 ± 5), IQ-512 (*Aspergillus* sp., 75.9 ± 3%), IQ-547 (*Fusarium* sp., 35.0 ± 3%), IQ-548 (*Aspergillus* sp. 60.2 ± 2), IQ-567 (*Talaromyces* sp, 75.0 ± 5), IQ-568 (*Penicillium* sp., 41.9 ± 6), IQ-573 (*Penicillium* sp., 42.7 ± 7), and IQ-574 (*Talaromyces* sp., 40.3 ± 8). *Aspergillus* and *Penicillium* correspond to the two strains with the highest reported number of naturally occurring, structurally diverse products, with 2607 and 2192 products, respectively (NPAtlas, 2023).

Untargeted Metabolomic Studies

Simultaneously, the chemical composition information obtained by LC-MS/MS for the 28 extracts was organized into molecular networks using the GNPS platform with the Derreplicator⁺ and MolNetEnhancer algorithms. The molecular network was constructed with 6123 mass spectra grouped into 930 nodes and categorized into 13 groups of composite families (Fig. 2). The molecular families (clusters) illustrated in the molecular networks are based on the similarity of the mass spectra. The largest group was that of benzoic acids with 108 nodes, whereas the pyrones and pyrans group with 13 nodes was remarkable. In contrast, the smallest group comprised benzodiazepines with only two nodes. Furthermore, this analysis facilitated the dereplication

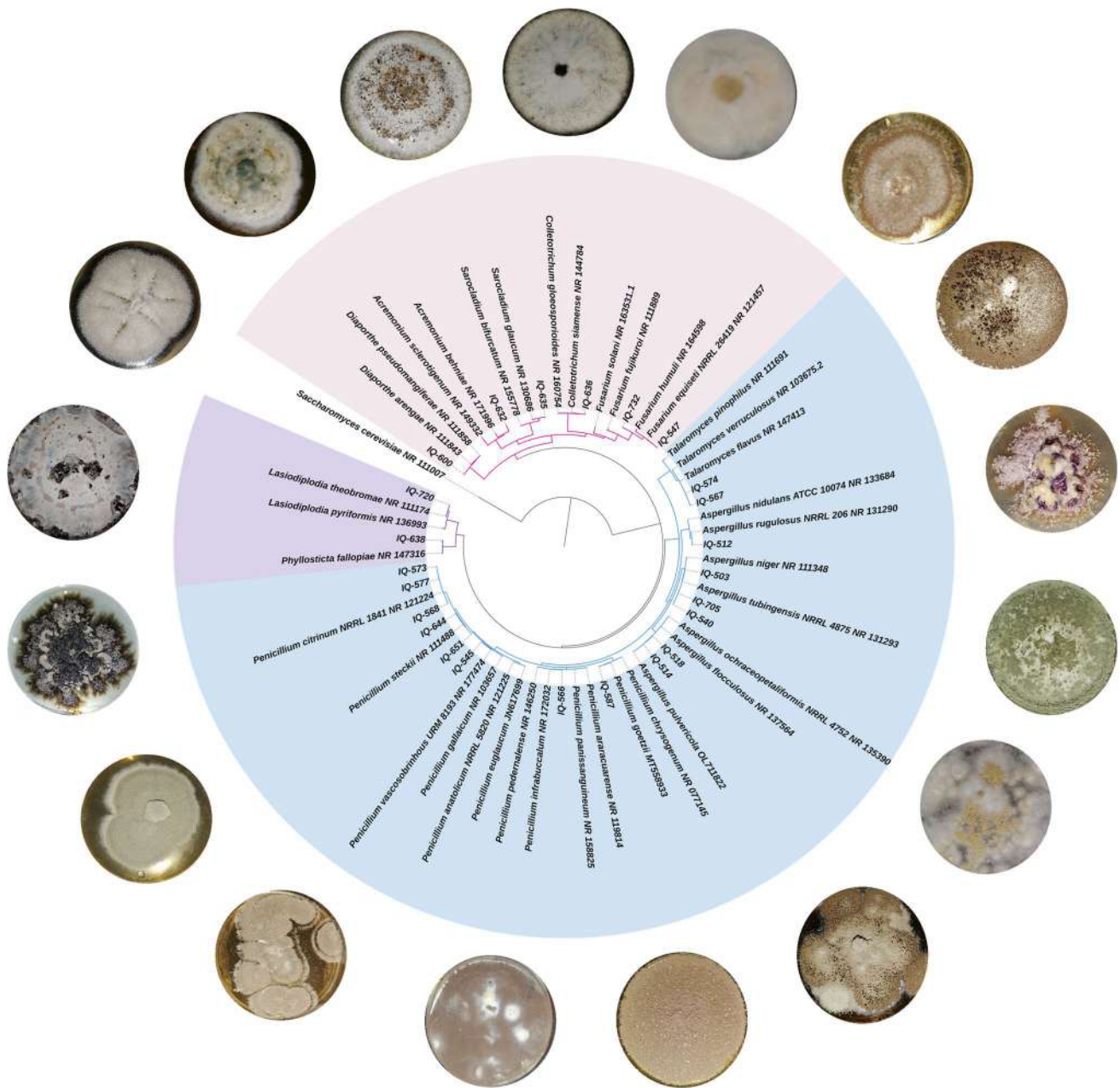


Fig. 1 The phylogenetic tree of 24/28 preselected fungal microorganisms. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site

of 32 metabolites (with mass error < 10 ppm and cosine similarity > 0.7, Table S2), including some mycotoxins such as citrinin, harmane, meleagrins, and sterigmatocystin (Fig. 2). It is worth noting that out of the 32 identified molecules, nine have been reported to possess hepatotoxic (Flajs and Peraica 2009), neurotoxic (Lešić et al. 2019), nephrotoxic (Hamed et al. 2021), and/or mutagenic activities (Gupta et al. 2018) (Table S1). This analysis was performed to exclude extracts containing previously reported cytotoxic compounds

(15 out of 28: Table S2) thus prioritizing the isolation of chemical entities with promising biological activity toward *A. baumannii*. Based on the results of antibacterial activity (inhibition > 40%, Fig. S1) and dereplication (Table S1), three extracts were prioritized. The selected microorganisms included *Aspergillus* sp. IQ-503, *Aspergillus* sp. IQ-548, and *Talaromyces* sp. IQ-567, all endophytic microorganisms from the species *Rhizophora mangle* (red mangrove), collected in Tecamate Lagoon, Guerrero, Mexico.

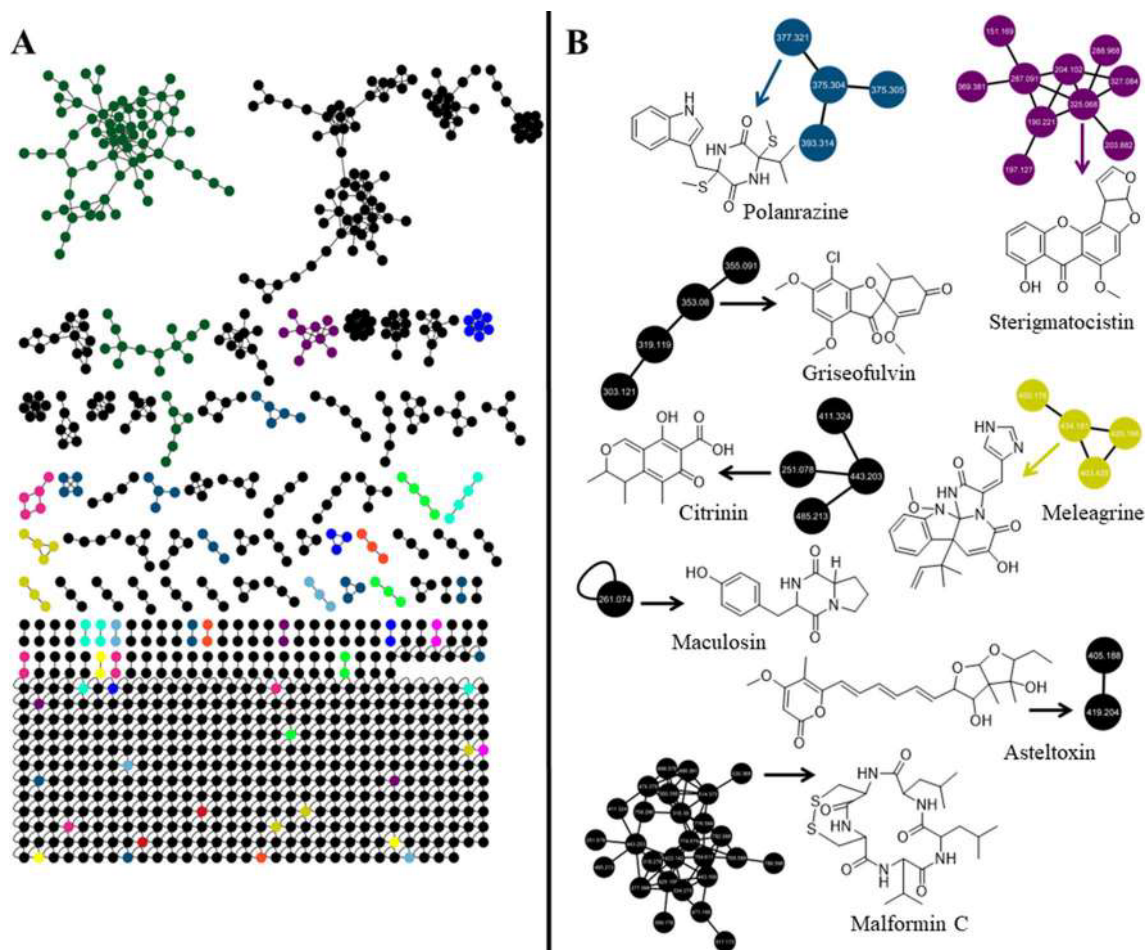
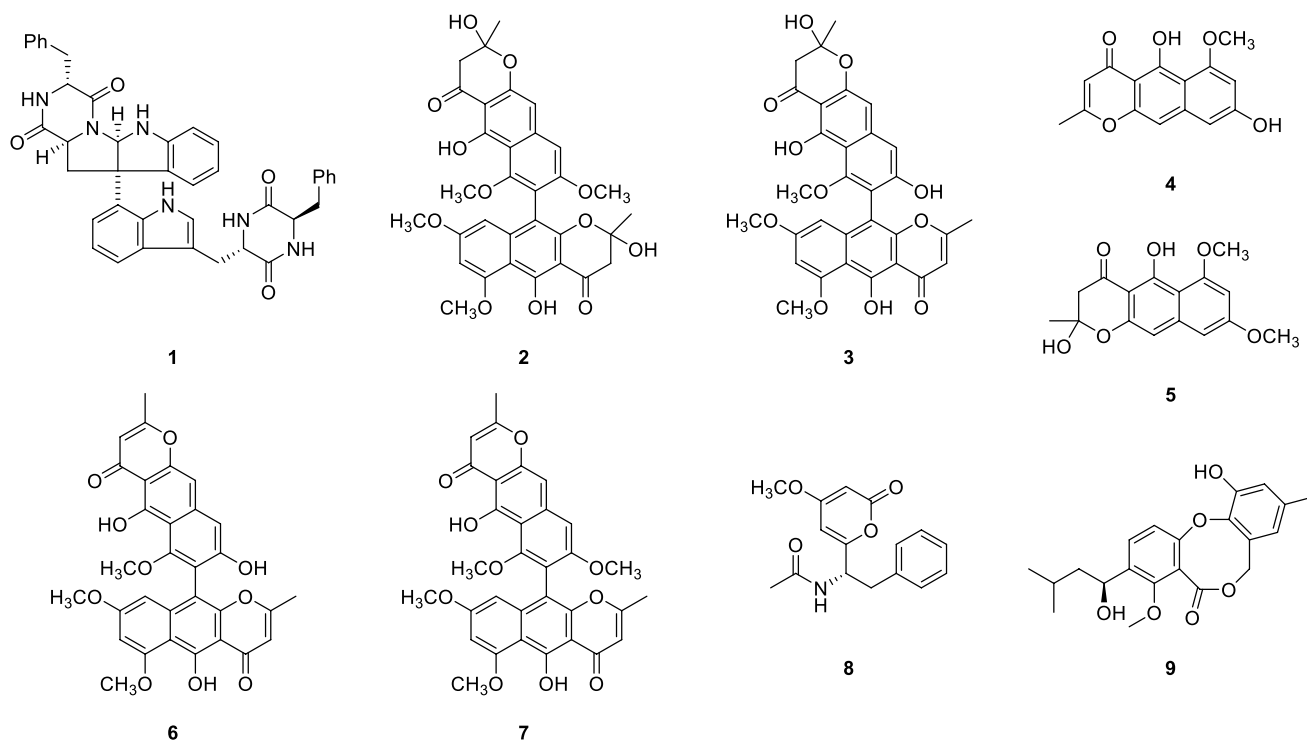


Fig. 2 Untargeted metabolomic studies. **A** Molecular network generated using the MS² data, obtained for 28 extracts from preselected fungi. **B** Selected examples of dereplicated compounds through the GNPS platform

Chemical Study

The bioassay-guided chemical study of the bioactive extract of *Aspergillus* sp. IQ-548 led to the isolation of seven molecules characterized as asperazine (**1**) (Varoglu et al. 1997; Loach et al. 2016), aurasperone B (**2**) (Siriwardane et al. 2015; Priestap 1986), aurasperone F (**3**) (Antonov et al. 2021), TMC-256A1 (**4**) (Sakurai et al. 2002), fonsecin B (**5**) (Priestap 1986), dianhydroaurasperone C (**6**) (Pilevneli et al. 2021), and aurasperone A (**7**) (Campos et al. 2005). In parallel, investigation of *Aspergillus* sp. IQ-503 and *Talaromyces* sp. IQ-567 allowed the isolation of pyrophen (**8**) (Zhang et al. 2010) and penicillide (**9**) (Suzuki et al. 1991), respectively. All isolated molecules were identified by matching their spectroscopic and spectrometric data with those reported in the literature (Supporting Information).

Asperazine (**1**) belongs to the diketopiperazine group and inhibits the growth of human leukemia, murine, and human colon cell lines. It was isolated from a marine *A. niger* (Varoglu et al. 1997). Compounds **2–7** (aurasperone F, TMC-256A1, fonsecin B, dianhydroaurasperone C, and aurasperone A) are benzophenones derived from *Aspergillus* spp., principally *A. niger*; however, this kind of molecules and other benzophenones (*e.g.*, penibenzophenones, tenellones, asperphenin) have also been isolated from *Penicillium* spp., *Diaporthe* spp., and *Phomopsis* spp. (Ibrahim et al. 2023). Pyrophen (**8**) is a pyrone that was first isolated from *A. niger* from maize in Puerto Rico (Barnes et al. 1990) and later in the species *A. brasiliensis* (Perrone et al. 2007). Finally, penicillide (**9**) is a benzodioxocin previously isolated from *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., and various *Talaromyces* species with relevant biological activities (see below) (Salituro et al. 1993; Tao et al. 2017).



After the structural characterization, compounds **1–9** were manually annotated into the constructed molecular networking (Fig. S4). Asperazine (**1**) falls within the indole derivatives group and can be observed within a two-node cluster. Compounds **2–7** are found in small clusters. Compounds **2** and **3** exhibit a high degree of similarity in their molecular structure, differing only in small changes at positions 2', 3', and 8, specifically a dehydration and loss of methoxy group, respectively. Likewise, compounds **6** and **7** also formed a single cluster because these benzophenones have distinct substituents at C-8, hydroxy, and methoxy groups, respectively. However, although compounds **4** and **5** are related, both were found in different clusters. Compound **8** appears as a member of a cluster formed by 10 nodes, indicating that some other analogues of pyrophen are present in fungal extracts. Penicillide (**9**) was found only in a single node.

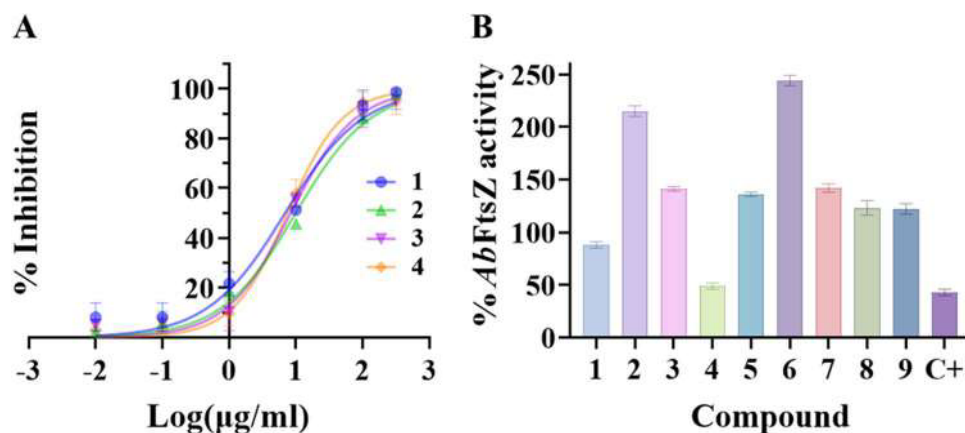
Antimicrobial Potential of Isolates

The antimicrobial potential of the isolated molecules was determined according to the CLSI guidelines (CLSI 2015). The results of this evaluation showed that compounds **1** (IC_{50} 6.9 ± 0.7 $\mu\text{g/ml}$), **2** (IC_{50} 9.9 ± 0.8 $\mu\text{g/ml}$), **3** (IC_{50} 8.3 ± 0.9 $\mu\text{g/ml}$), **4** (IC_{50} 7.4 ± 1 $\mu\text{g/ml}$), and **9** ($40 \pm 9\%$ inhibition, at 100 $\mu\text{g/ml}$) inhibited the growth of multidrug-resistant *A.*

baumannii A564 (Fig. 3A and Table S3) in a concentration-dependent manner, with IC_{50} values below 10 $\mu\text{g/ml}$ for compounds **1–4**. Compound **9** displayed an inhibition of $40 \pm 9\%$ at 100 $\mu\text{g/ml}$. In all cases, the inhibition of bacterial growth exceeded that of the positive control gentamicin ($20 \pm 1\%$ at 100 $\mu\text{g/ml}$). These results highlight the potential of benzophenones **2–4** and asperazine (**1**) as suitable candidates for developing antibacterial agents against *A. baumannii* A564, an intrahospital isolate resistant to last-generation drugs, including ciprofloxacin, gentamicin, meropenem, imipenem, doripenem, cefepime, ceftriaxone, ceftazidime, piperacillin, and ampicillin. In addition, it shows moderate resistance to colistin, a last-generation antibiotic (García-Patiño et al. 2017; Raorane et al. 2019). Based on these findings, compounds **1–4** and **9** are proposed as possible references for developing antibiotics to help combat AMR, particularly against *A. baumannii*, as it has become one of the main causes of resistant infections worldwide.

In 2018, Zulqarnain et al. (2020) reported the antifungal activity of asperazine (**1**) against *Fusarium oxysporum* (at a minimum inhibitory concentration of 60 $\mu\text{g/ml}$). Furthermore, a more recent study in 2021 showed that **1** inhibited the proliferation of cervical cancer cells (Abdou et al. 2021). To date, this is the first report of this molecule as a growth inhibitor of a multidrug-resistant *A. baumannii*. Compounds **2** and **3**, aurasperones B and F, are benzophenones

Fig. 3 Antimicrobial potential of isolated metabolites. **A** Concentration response curves for compounds 1–4 vs *A. baumannii* A564. **B** Effect of compounds 1–9 on the activity of *AbFtsZ*. C+ indicates positive control (berberine)



with antioxidant (Leutou et al. 2016; Zhang et al. 2007), antifungal (Zhang et al. 2007), anticancer (Antonov et al. 2021; Fang et al. 2016), and antimicrobial activities against *B. subtilis* and *E. coli* (Bouras et al. 2005; Song et al. 2004). However, there are no reports of these molecules as inhibitors of multidrug-resistant *A. baumannii* strains. Compound 4 belongs to the naphthopyrone group and has been reported as an antioxidant (Leutou et al. 2016); furthermore, it exhibits anticancer activity against human cervical (Sakurai et al. 2002), liver (Huang et al. 2011), brain (Huang et al. 2011), and mama (Huang et al. 2011) cells and showed inhibition of IgE antibody activity, leading to its proposal as an anti-allergic agent (Sakurai et al. 2002); to date, this is the first report of compound 4 as a bacterial inhibitor. Penicillide (9) has been reported to be an anticholesterolemic (Zeng et al. 2022), anticancer (Tao et al. 2017), and antimicrobial agent against strains such as *S. aureus*, *S. albus*, *Vibrio alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* (Song et al. 2022). This is the first report of compounds 1, 2, 3, 4, and 9 as growth inhibitors of *A. baumannii*.

*AbFtsZ*₁₋₄₁₂ as a Putative Mechanism of Action

To establish a possible mechanism of action for the isolated molecules with antimicrobial potential, the enzyme *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ was selected as a candidate. This selection was based on the fact that molecules with similar nuclei to compounds 2–7, such as mycopyranone and viriditoxin (binaphthopyranones), interact with FtsZ proteins of *S. aureus* and *E. coli* (Rivera-Chávez et al. 2019a, b, c), suggesting this protein as a putative molecular target. To test this hypothesis, *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ was cloned and expressed in a heterologous host (Supporting Information).

Enzymatic Assay Once the enzyme was obtained, a photometric assay was developed in a 96-well plate format at 37 °C to screen pure molecules as protein ligands. For this assay *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ (4 μM) and GTP (50 μM) were

used in a final volume of 100 μl at pH 7. Assay conditions were adapted from the literature with minor modifications (Quan and Robinson 2005, Baykov et al. 1988, Martín-García et al. 2012). Malachite green was used to monitor enzyme activity and inhibition at 630 nm. To validate the ability of the assay to detect molecules capable of altering the GTPase activity of *AbFtsZ*₁₋₄₁₂, berberine was used as a positive control. This alkaloid has previously been reported as an inhibitor of the FtsZ enzyme in *S. aureus* (Domadia et al. 2008). In this study, berberine was found to inhibit *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ activity by no more than 50% at a concentration of 186 $\mu\text{g/ml}$ (500 μM) (Fig. S6).

Compounds as *AbFtsZ* Binders Compounds 1–9 were evaluated against *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ at 100 $\mu\text{g/ml}$. Compound 4 showed inhibition of *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ activity, while compounds 2–3 and 5–9 showed interaction with the enzyme and enhanced its activity (Fig. 3B, Table S3). In addition, compound 4 also inhibited bacterial growth of *A. baumannii* A564 strain, suggesting *AbFtsZ* as a possible molecular target. In 2008, Rai et al. (2008) found that curcumin activates the GTPase activity of the FtsZ enzyme in *E. coli*. Similarly, in 2012, Ma et al. (2013) reported a group of trisubstituted benzimidazoles that activate GTPase activity of FtsZ in *M. tuberculosis*. In addition, vitamin K increases the GTPase activity of *Streptococcus pneumoniae* FtsZ enzyme (Pushpakaran et al. 2022). In these reports, the authors discussed that increasing the enzyme activity raises the concentration of GDP in the bacterial cell, leading to depolymerization of the Z-ring and subsequently inhibiting cell division, resulting in enlargement and finally death. None of the FtsZ binders (2–9) identified in this study has previously been reported as ligands of any FtsZ enzyme.

Compound 5, fonsecin B, has been previously reported (Carboué et al. 2019) to possess antioxidant capacity. Lee et al. (2010) demonstrated that fonsecin B has the ability to affect the expression of specific genes involved in the production of immunoglobulins in germinal cells. Compound

6, dianhydroaurasperone C, is also a naphthopyrone with activity against skin cancer. This compound increases the intracellular concentration of vinblastine in KB-8-5 cancer cells and prevents its efflux, potentially enhancing the efficacy of vinblastine in the treatment of drug-resistant cancer (Ikeda et al. 1990). Compound **7**, aurasperone A, has been reported to have antibacterial activity against *B. subtilis*, *E. coli*, and *P. fluorescence*, and antifungal activity against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum* (Lu et al. 2014). No inhibitory activity against *A. baumannii* was detected in this study, but it acts as a ligand for the enzyme *AbFtsZ*₁₋₄₁₂. Moreover, pyrophen (**8**) and penicillide (**9**) showed significant biological activity as *AbFtsZ* ligands.

In prior studies, pyrophen (**8**) was found to hinder the growth of *Aeromonas hydrophila* (Agrawal et al. 2020), *Micrococcus luteus* (Agrawal et al. 2020), and *Listeria innocua* (Agrawal et al. 2020). Additionally, penicillide (**9**) exhibited inhibition against the microorganisms *S. aureus* (Song et al. 2004), *C. albicans* (Song et al. 2004), and *E. coli* (Song et al. 2004). This is the initial report of these compounds (**2–9**) with activity against FtsZ of *A. baumannii*.

Based on these considerations, it is proposed that compounds **2–9** have the potential to be FtsZ-targeting antimicrobials. The bacterial growth inhibition observed in *A. baumannii* by compounds **2–4** and **9** supports this hypothesis. Despite being activators of the *AbFtsZ* protein, compounds **5–8** did not demonstrate bacterial growth inhibition against *A. baumannii*, suggesting the activation of varied resistance mechanisms in *A. baumannii*, including changes in membrane permeability that inhibit the entry of molecules, as well as effluence of xenobiotics mediated by efflux pumps (García-Patiño et al. 2017; Raorane et al. 2019; Kyriakidis et al. 2021). Based on a structural analysis of compounds **2** and **3** in comparison to **6** and **7**, it can be inferred that having a hydroxy group at position C-2 in molecules **2** and **3** affects their antibacterial activity, probably due to the hybridization (sp³) of C-2 and in consequence, the geometry of itself. In contrast, compounds **6** and **7** lacking this moiety displayed no inhibition against multi-resistant *A. baumannii*. There is currently no other documented fungal inhibitor *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ enzyme that simultaneously inhibits bacterial growth. Therefore, compound **4** presents a potential opportunity to develop antibiotics targeting a novel molecular pathway.

Conclusions

Natural products from fungi have often been an important source for antimicrobial drug development. In this study, 250 axenic fungal extracts from Mexican mangroves were screened against a multidrug-resistant strain of *Acinetobacter*

baumannii. Bioassay-guided studies combined with untargeted metabolomic, taxonomic analyses, and dereplication tools enabled the prioritization of the most promising strains for isolating molecules with antimicrobial potential. By applying these criteria, the chemical study of three prioritized fungal isolates resulted in the isolation of nine molecules (**1–9**) with biological activity, either as inhibitors of bacterial growth or as ligands of the *A. baumannii* FtsZ enzyme.

Compound **4** (TMC-256A1) is the first reported fungal inhibitor of the *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ enzyme. Furthermore, this molecule inhibited bacterial growth of the multi-resistant clinical strain *A. baumannii* A564. Conversely, compounds **2**, **3**, and **9** increased FtsZ enzyme activity and showed antibacterial properties. Compounds **1–3** showed antibacterial activity only against *A. baumannii* A564, whereas products **5–8** interacted with *AbFtsZ*₁₋₄₁₂ and enhanced its enzymatic activity. In brief, this study highlights the importance of studying the mycobiota of under-explored ecosystems in Mexico to obtain and uncover molecular scaffolds to develop antibiotics with different structural classes and novel targets that can contribute to the fight against antimicrobial resistance.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00507-2>.

Acknowledgements We would like to thank Dr. Adriana Romo Pérez, Dr. María del Carmen García-González, MSc. Elizabeth Huerta (Instituto de Química, UNAM), and the LURMN laboratory for their assistance in the collection of spectroscopic and spectrometric data. We also thank Dr. Adela Rodríguez-Romero (Instituto de Química, UNAM) and Dr. Rodolfo García Contreras (Facultad de Medicina, UNAM) for their guidance and for providing bacterial strains. We also thank Dr. Armando Hernández García, Dr. Federico del Rio Portilla, and Dr. Corina Ceapa for providing the infrastructure to carry out the assays. MSc. Maricruz López López for handling and disposal of Hazardous Biological Infectious Waste material. Special thanks to MSc. Everardo Tapia for the acquisition of the MS/MS spectra. Special thanks to MSc. Enrique Aguilar for his guidance on preparative HPLC. KCJ is in debt to CONACyT/CONAHCyT for the fellowship provided to pursue graduate studies (CVU 954406).

Author Contribution All authors contributed to the conception and design of this study. Isolation of fungal microorganisms, extracts preparation, biodirected assay, isolation of compounds, and biological assays were performed by KCJ and FHS. Structural elucidation of the compounds and revision of the manuscript were done by CAFH and KCJ. Enzyme purification and enzyme assay were performed by PCS and KCJ. Identification of the fungal microorganisms was carried out by JMJ and JRC. BQG actively participated in the acquisition of the NMR spectra. The first draft of the manuscript was written by KCJ, and all authors commented on subsequent versions of the manuscript. All work was supervised by JRC. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This research received financial support from CONACyT/CONAHCyT through Frontline Science project (“Programa Ciencia de Frontera”) CF-2019-263977. It also received partial support by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico

(DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422 and IA203220).

Data Availability All the data generated in this work are available on request through the corresponding author.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Abdou R, Alqahtani AM, Attia GH (2021) Anticancer natural products from *Aspergillus neoniger*, an endophyte of *Ficus carica*. *Bull Natl Res Cent* 4:74. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00536-8>
- Adams DW, Errington J (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* 7:642–653. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>
- Agrawal S, Deshmukh SK, Reddy MS, Prasad R, Goel M (2020) Endolichenic fungi: a hidden source of bioactive metabolites. *S Afr J Bot* 134:163–186. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.008>
- Antonov AS, Leshchenko EV, Zhuravleva OI, Dyslovoy SA, Von Amsberg G, Popov RS, Denisenko VA, Kirichuk NN, Afiyatulloev SS (2021) Naptho- Γ -pyrones from the marine-derived fungus *Aspergillus foetidus*. *Nat Prod Res* 35:131–134. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1610954>
- Aron AT, Gentry EC, McPhail KL, Nothias LF, Nothias-Esposito M, Bouslimani A, Petras D, Gauglitz JM, Sikora N, Vargas F (2020) Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat Protoc* 15:1954–1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>
- Barnes CL, Steiner JR, Torres E, Pacheco R, Marquez H (1990) Structure and absolute configuration of pyrophen, a novel pryone derivative of L-phenylalanine from *Aspergillus niger*. *Int J Pept Protein Res* 36:292–296. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00981.x>
- Baykov A, Evtushenko O, Avaeva S (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* 171:266–270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90484-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90484-8)
- Bouras N, Mathieu F, Coppel Y, Lebrihi A (2005) Aurasperone F—a new member of the naphtho- γ -pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger* C-433. *Nat Prod Res* 19:653–659. <https://doi.org/10.1080/14786410412331286955>
- Breda A, Valadares NF, de Souza ON, Garratt RC (2006) Protein structure, modelling and applications. In: Gruber A, Durham AM, Huynh C et al (eds) *Bioinformatics in tropical disease research: a practical and case-study approach*, Chapter A06. National Center for Biotechnology Information, US, pp 1–3
- Campos FR, Barison A, Daolio C, Ferreira AG, Rodrigues-Fo E (2005) Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*. *Magn Reson Chem* 43:962–965. <https://doi.org/10.1002/mrc.1654>
- Carboué Q, Maresca M, Herbette G, Roussos S, Hamrouni R, Bombarda I (2019) Naphtho- γ -pyrones produced by *Aspergillus tubingensis* G131: new source of natural nontoxic antioxidants. *Biomolecules* 10:29. <https://doi.org/10.3390/biom10010029>
- Carro L (2019) Recent progress in the development of small-molecule FtsZ inhibitors as chemical tools for the development of novel antibiotics. *Antibiotics* 8:217. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040217>
- Chen Y, Bjornson K, Redick SD, Erickson HP (2005) A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus. *Biophys J* 88:505–514. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.044149>
- CLSI (2015) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically M07-A10 Standard. Clinical Laboratory Standards Institute 32:24–29
- Detlefsen N, Hauberg S, Boomsma W (2022) Learning meaningful representations of protein sequences. *Nat Commun* 13:1914. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29443-w>
- Devadatha B, Jones E, Pang K, Abdel-Wahab M, Hyde K, Sakayaroj J, Bahkali A, Calabon M, Sarma V, Sutreong S (2021) Occurrence and geographical distribution of mangrove fungi. *Fungal Diversity* 106:137–227. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00468-0>
- Domadia PN, Bhunia A, Sivaraman J, Swarup S, Dasgupta D (2008) Berberine targets assembly of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ. *Biochemistry* 47:3225–3234. <https://doi.org/10.1021/bi7018546>
- Ernst M, Kang KB, Caraballo-Rodríguez AM, Nothias LF, Wandy J, Chen C, Wang M, Rogers S, Medema MH, Dorrestein PC (2019) MolNetEnhancer: enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites* 9:144. <https://doi.org/10.3390/metabo9070144>
- Fang W, Lin X, Wang J, Liu Y, Tao H, Zhou X (2016) Asperpyrone-type bis-naphtho- γ -pyrones with COX-2-inhibitory activities from marine-derived fungus *Aspergillus niger*. *Molecules* 21:941. <https://doi.org/10.3390/molecules21070941>
- Flajs D, Peraica M (2009) Toxicological properties of citrinin. *Arh Hig Rada Toksikol* 60:457. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1992>
- Founou RC, Founou LL, Essack SY (2017) Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 12:e0189621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
- García-Patiño MG, García-Contreras R, Licona-Limón P (2017) The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial infections. *Front Immunol* 8:441. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00441>
- Gupta RC, Srivastava A, Lall R (2018) Ochratoxins and citrinin. In: Gupta RC. *Veterinary toxicology*, Chapter 72, Academic Press, pp 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00072-6>
- Hamed A, Abdel-Razek AS, Araby M, Abu-Elghait M, El-Hosari DG, Frese M, Soliman HS, Stammmer HG, Sewald N, Shaaban M (2021) Meleagrins from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: crystal structure and diverse biological activity studies. *Nat Prod Res* 35:3830–3838. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1741583>
- Huang HB, Xiao ZE, Feng XJ, Huang CH, Zhu X, Ju JH, Li MF, Lin YC, Liu L, She ZG (2011) Cytotoxic naphtho- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis*

- (GX1-5E). *Helv Chim Acta* 94:1732–1740. <https://doi.org/10.1002/hlca.201100050>
- Hurley KA, Santos TM, Nepomuceno GM, Huynh V, Shaw JT, Weibel DB (2016) Targeting the bacterial division protein FtsZ. *J Med Chem* 59:6975–6998. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01098>
- Ibrahim SR, ALSiyud DF, Alfaeq AY, Mohamed SG, Mohamed GA (2023) Benzophenones-natural metabolites with great Hopes in drug discovery: structures, occurrence, bioactivities, and biosynthesis. *RSC Adv* 13:23472–23498. <https://doi.org/10.1039/D3RA02788K>
- Ikedda SI, Sugita M, Yoshimura A, Sumizawa T, Douzono H, Nagata Y, Akiyama SI (1990) *Aspergillus* species strain m39 produces two naphtho- γ -pyrones that reverse drug resistance in human KB cells. *Int J Cancer* 45:508–513. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910450323>
- Jiménez-Arreola BS, Aguilar-Ramírez E, Cano-Sánchez P, Morales-Jiménez J, González-Andrade M, Medina-Franco JL, Rivera-Chávez J (2020) Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: insights into mechanistic kinetics from *in vitro* and *in silico* studies. *Bioorg Chem* 101:103893. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>
- Kusuma KD, Payne M, Ung AT, Bottomley AL, Harry EJ (2019) FtsZ as an antibacterial target: status and guidelines for progressing this avenue. *ACS Infect Dis* 5:1279–1294. <https://doi.org/10.1021/acscinfed.9b00055>
- Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A (2021) *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens* 10:373. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Lacerda L, Carvalho CEV, Tanizaki K, Ovalle ARC, Rezende CE (1993) The biogeochemistry and trace metals distribution of mangrove rhizospheres. *Biotropica* 25:252–257. <https://doi.org/10.2307/2388783>
- Lee HM, Chan DSH, Yang F, Lam HY, Yan SC, Che CM, Ma DL, Leung CH (2010) Identification of natural product fonsecin B as a stabilizing ligand of c-myc G-quadruplex DNA by high-throughput virtual screening. *Chem Commun* 46:4680–4682. <https://doi.org/10.1039/B926359D>
- Lešić T, Kmetič I, Kiš M, Vulić A, Kudumija N, Zdravec M, Murati T, Pleadin J (2019) Sterigmatocistin–prekursor aflatoksina B1 u hrani i hrani za životinje. *Croatian J Food Technol Biotechnol Nutr* 14:105–112. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.14.3-4.2>
- Leutou AS, Yun K, Son BW (2016) Induced production of 6, 9-dibromoflavasperone, a new radical scavenging naphthopyranone in the marine-mudflat-derived fungus *Aspergillus niger*. *Arch Pharmacol Res* 39:806–810. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0764-2>
- Loach RP, Fenton OS, Movassaghi M (2016) Concise total synthesis of (+)-asperazine, (+)-pestalazine a, and (+)-iso-pestalazine A. Structure revision of (+)-pestalazine a. *J Am Chem Soc* 138:1057–1064. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12392>
- Lu S, Tian J, Sun W, Meng J, Wang X, Fu X, Wang A, Lai D, Liu Y, Zhou L (2014) Bis-naphtho- γ -pyrones from fungi and their bioactivities. *Molecules* 19:7169–7188. <https://doi.org/10.3390/molecules19067169>
- Ma S, Cong C, Meng X, Cao S, Yang H, Guo Y, Lu X, Ma S (2013) Synthesis and on-target antibacterial activity of novel 3-elongated arylalkoxybenzamide derivatives as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ. *Bioorg Med Chem Lett* 23:4076–4079. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.056>
- Martín-García F, Salvarelli E, Mendieta-Moreno JI, Vicente M, Mingorance J, Mendieta J, Gómez-Puertas P (2012) Molecular dynamics simulation of GTPase activity in polymers of the cell division protein FtsZ. *FEBS Lett* 586:1236–1239. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.042>
- Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, Mikheenko A, Korobeynikov A, Cao L, Shcherbin E, Nothias LF, Dorrestein PC, Pevzner PA (2018) Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat Commun* 9:4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399:629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- O'Neill J (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom. <https://apo.org.au/node/63983>. Accessed 20 May 2023
- Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad J, Meijer M, Noomim P, Mahakaranchanakul W, Samson R (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud Mycol* 59:53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
- Pilevneli AD, Ebada SS, Kaşkatepe B, Konuklugil B (2021) Penicacids H-J, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus oryzae*. *RSC Adv* 11:34938–34944. <https://doi.org/10.1039/D1RA07196C>
- Priestap HA (1984) New naphthopyrones from aspergillus fonsecaeus. *Tetrahedron* 40:3617–3624. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)88792-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88792-5)
- Priestap HA (1986) ¹³C NMR spectroscopy of naphtho- γ -pyrones. *Magn Reson Chem* 24:875–878. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260241006>
- Pushpakaran A, Battaje RR, Panda D (2022) Vitamin K3 inhibits FtsZ assembly, disrupts the Z-ring in *Streptococcus pneumoniae* and displays anti-pneumococcal activity. *Biochem J* 479:1543–1558. <https://doi.org/10.1042/BCJ20220077>
- Quan A, Robinson PJ (2005) Rapid purification of native dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Methods Enzymol* 404:556–569. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)04049-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)04049-8)
- Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D (2008) Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J* 410:147–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20070891>
- Raorane CJ, Lee JH, Kim YG, Rajasekharan SK, García-Contreras R, Lee J (2019) Antibiofilm and antivirulence efficacies of flavonoids and curcumin against *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 10:990. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00990>
- Rivera-Chávez J, Caesar LK, García-Salazar JJ, Raja HA, Cech NB, Pearce CJ, Oberlies NH (2019a) Mycopyranone: a 8,8'-binaphthopyranone with potent anti-MRSA activity from the fungus *Phialemoniopsis* sp. *Tetrahedron Lett* 60:594–597. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.01.029>
- Rivera-Chávez J, El-Elimat T, Gallagher JM, Graf TN, Fournier J, Panigrahi GK, Deep G, Bunch RL, Raja HA, Oberlies NH (2019b) Delitpyrones: α -pyrone derivatives from a freshwater *Delitschia* sp. *Planta Med* 85:62–71. <https://doi.org/10.1055/a-0654-5850>
- Rivera-Chávez J, Zacatenco-Abarca J, Morales-Jiménez J, Martínez-Avina B, Hernández-Ortega SN, Aguilar-Ramírez E (2019c) Cuautepestalorin, a 7,8-dihydrochromene-oxoisochromane adduct bearing a hexacyclic scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011. *Org Lett* 21:3558–3562. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00962>
- Sakurai M, Kohno J, Yamamoto K, Okuda T, Nishio M, Kawano K, Ohnuki T (2002) TMC-256A1 and C1, new inhibitors of IL-4 signal transduction produced by *Aspergillus niger* var *niger* TC 1629. *J Antibiotics* 55:685–692. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.55.685>
- Salituro GM, Pettibone DJ, Clineschmidt BV, Williamson JM, Zink DL (1993) Potent, non-peptidic oxytocin receptor antagonists

- from a natural source. *Bioorg Med Chem Lett* 3:337–340. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80905-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80905-7)
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Siriwardane A, Kumar NS, Jayasinghe L, Fujimoto Y (2015) Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic *Aspergillus* sp. isolated from *Limonia acidissima*. *Nat Prod Res* 29:1384–1387. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1025230>
- Song Y, Li H, Ye Y, Shan C, Yang Y, Tan R (2004) Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiol Lett* 241:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.005>
- Song F, Dong Y, Wei S, Zhang X, Zhang K, Xu X (2022) New antibacterial secondary metabolites from a marine-derived *Talaromyces* sp. strain BTBU20213036. *Antibiotics* 11:222. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020222>
- Song F (2022) Antimicrobial natural products. *Antibiotics* 11:1765. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121765>
- Sosa-Hernández O, Vázquez-Zamora C, Gutiérrez-Muñoz VH, Lugo-Zamudio GE, Cureño-Díaz MA (2020) Resultados del Programa de Uso Racional de Antimicrobianos en un hospital de México, 2013–2018. *Rev Panam Salud Publica* 44:e45. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.45>
- Sosa-Rodríguez T, Sánchez-Nieves J, Melgarejo LM (2009) Papel funcional de los hongos en ecosistemas de manglar. *Bol Invest Mar Cost* 38:38–57
- Suzuki K, Nozawa K, Udagawa S, Nakajima S, Kawai K (1991) Penicillide and dehydroisopenicillide from *Talaromyces dextrii*. *Phytochemistry* 30:2096–2098. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85080-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85080-J)
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tao H, Wei X, Lin X, Zhou X, Dong J, Yang B (2017) Penixanthones A and B, two new xanthone derivatives from fungus *Penicillium* sp. SYFz-1 derived of mangrove soil sample. *Nat Prod Res* 31:2218–2222. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1297442>
- Tripathy S, Sahu B (2019) FtsZ inhibitors as a new genera of antibacterial agents. *Bioorg Chem* 91:103169. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103169>
- Van Der Hoof JJJ, Wandy J, Barrett MP, Burgess KE, Rogers S (2016) Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proc Natl Acad Sci* 113:13738–13743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608041113>
- Varoglu M, Corbett TH, Valeriote FA, Crews P (1997) Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*. *J Org Chem* 62:7078–7079. <https://doi.org/10.1021/jo970568z>
- WHO (2017) La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. from <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed 7 Sept 2023
- Zeng WN, Cai J, Wang B, Chen LY, Pan CX, Chen SJ, Huang GL, Zheng CJ (2022) A new bioactive isocoumarin from the mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. TGM112. *J Asian Nat Prod Res* 24:679–684. <https://doi.org/10.1080/10286020.2021.1952188>
- Zhang Y, Li XM, Wang BG (2007) Nigerasperones A–C, new monomeric and dimeric naphtho- γ -pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *J Antibiot* 60:204–210. <https://doi.org/10.1038/ja.2007.24>
- Zhang Y, Li XM, Feng Y, Wang BG (2010) Phenethyl- α -pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Nat Prod Res* 24:1036–1043. <https://doi.org/10.1080/14786410902940875>
- Zulqarnain ZI, Cox R, Anwar J, Ahmad N, Khan K, Iqbal M, Manzoor N, Khattak SU (2020) Antifungal activity of compounds isolated from *Aspergillus niger* and their molecular docking studies with tomatinase. *Nat Prod Res* 34:2642–2646. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548447>