UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LA NEOSARTORINA DE *ASPERGILLUS* SP. (CC7-12), ESPECIE FÚNGICA AISLADA DE LA RESERVA ECOLÓGICA DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

NATALIA MARCELA FONTAINE ROEL

CDMX, MÉXICO **2019**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dra. Martha Menes Arzate
VOCAL:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
SECRETARIO:	Dra. Carmina Montiel Pacheco
1er. SUPLENTE:	Dr. Juan Manuel German Acacio
2do. SUPLENTE:	L. en M. Manuel Esteban Enríquez Villeda

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

_____

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SUSTENTANTE:

_____

Natalia Marcela Fontaine Roel

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT CB 236564), a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM IA205017) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ 5000-9145) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

Mi más sincera admiración al Dr. Mario A. Figueroa Saldívar, por la paciencia, comprensión, dedicación, enseñanza y guía que me dio en todo momento durante el proyecto. Gracias por confiar en mí y apoyarme hasta el final.

A los Dres. Valeria Souza y Luis Eguiarte del Instituto de Ecología, UNAM, por proporcionar la muestra para realizar el aislamiento de los organismos fúngicos objeto de estudio, y a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por el permiso otorgado a la Dra. Souza (oficio no. SGPA/DGVS/02002/16), para la recolección de muestras con fines académicos y/o de investigación.

A la Dra. Isabel Rivero por siempre dar su valioso y desinteresado consejo. Por su apoyo técnico y académico.

A la Dra. Martha Lydia Macías Ruvalcaba del Instituto de Química, UNAM, por proporcionar las cepas utilizadas para la evaluación biológica.

Al personal de la USAII, por el registro de todos los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

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

A todos los que pasamos por el laboratorio 125, el tiempo de cada quien ahí llega a su final paulatinamente, pero siempre se ha logrado un gran ambiente de trabajo donde pueden nacer y fortalecerse las más sinceras amistades.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

	Página
Lista de cuadros	6
Lista de figuras	6
Lista de abreviaturas y símbolos	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 La agricultura en México	8
1.1.1 Fitopatógenos de importancia agrícola	11
1.1.2 Principales agroquímicos empleados	12
1.2 Importancia de los productos naturales en el control de plagas	16
1.2.1 Productos naturales con actividad fungicida y/o fungistática	18
1.3 Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila	19
1.4 Generalidades sobre el género *Aspergillus*	21
1.4.1 Estudios químicos del género *Aspergillus*	21
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	26
5.1 Acondicionamiento y preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala	26
5.2 Obtención de extractos orgánicos	26
5.3 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos en pequeña escala	27
5.4 Estudio químico de la especie CC7-12	27
5.5 Caracterización de los productos naturales	28
5.6 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1 Evaluación de la actividad antifúngica	29
6.2 Estudio químico de CC7-12	31
7. CONCLUSIONES	39
8. PERSPECTIVAS	39
9. BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Patógenos de los principales productos agrícolas exportados por México a nivel mundial.	12
2	Ejemplos de resistencia a los fungicidas sintéticos (FRAC, 2007).	13
3	Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos en pequeña escala.	30
4	Resultados de la actividad antifúngica de los extractos en pequeña escala de los taxones en la serie CC7.	31
5	Resumen del fraccionamiento primario del extracto orgánico de CC7-12.	32
6	Datos espectroscópicos de RMN (^{1}H, 400 MHz y ^{13}C, 100 MHz en $CDCl_3$) del compuesto **1**.	36
7	Resultados de la actividad antifúngica de las fracciones primarias del hongo CC7-12.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales mercados agroalimentarios de México en el 2017 (unidades en millones de dólares). (Atlas agroalimentario 2012-2018, SAGARPA, SIAP)	8
2	Principales productos de exportación agroalimentaria y tipo de bienes 2017. (Atlas agroalimentario 2012-2018, SAGARPA, SIAP)	9
3	Pesticidas más utilizados en cultivos selectos en los EE.UU.: (H) herbicida, (I) insecticida, (F) fungicida y (O) otros.	13
4	Estructura química de estrobilurinas, espinosad y avermectinas.	17
5	Ejemplos selectos de bioplaguicidas comercializados como pesticidas.	17
6	Ejemplos selectos de pesticidas sintéticos a partir de productos vegetales.	18
7	Estructura química de la fusapirona y desoxifusapirona.	19
8	Estructura química del timol.	19
9	Ubicación del valle de CC en la República Mexicana.	20
10	Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos de *Aspergillus*.	22
11	Ejemplos selectos de metabolitos de *Aspergillus* con actividad antifúngica.	23
12	Evaluación de la actividad antifúngica por el método de difusión en agar.	30
13	Cromatograma del fraccionamiento primario por cromatografía tipo flash del extracto orgánico CC7-12. Detección en el UV (amarillo) y por ELSD (verde).	32
14	Cromatogramas por HPLC de la fracción CC7-12-F_7 en el UV (λ 270 nm) (**a**) y ELSD (**b**). Espectro de UV del pico en t_R 25.0 min (**c**).	33
15	HRESIMS del compuesto **1** en modo positivo (arriba) y negativo (abajo).	34
16	Espectro de RMN ^{1}H del compuesto **1** (400MHz, $CDCl_3$).	34
17	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **1** (100MHz, $CDCl_3$).	35
18	Estructura química de la neosartorina (**1**).	37

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo	MeOH-d_4	Metanol deuterado
CH_3CN	Acetonitrilo	m^2	Metro cuadrado
APD	Medio de agar, papa y dextrosa	μL	Microlitro
EPA	Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos de América	μm	Micrómetro
$CHCl_3$	Cloroformo	mg	Miligramo
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado	mL	Mililitro
J	Constante de acoplamiento	mmol	Milimol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	min	Minuto
δ	Desplazamiento químico	nm	Nanómetro
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	N_2	Nitrógeno
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	ppm	Partes por millón
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado	*m/z*	Relación masa-carga
d	Doblete	CC	Cuatro Ciénegas
HRESIMS-MS/MS	Espectrometría de masas por la Técnica de Electrospray-masas/masas	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ºC	Grado celsius	RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
g	Gramo	RMN ^{1}H	Resonancia magnética nuclear de protón
Hz	Hertz	rpm	Revoluciones por minuto
h	Hora	SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
IDH	Índice de deficiencia de hidrógeno	s	Singulete
L	Litro	sa	Singulete ancho
YESD	Medio de extracto de levadura, peptona de soya y dextrosa	t_R	Tiempo de retención
MHz	Megahertz	uma	Unidad de masa atómica
MeOH	Metanol		

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La agricultura en México

De manera general los productos con la leyenda “Hecho en México” son exportados a más de 160 países alrededor del mundo, lo que coloca a nuestro país como uno de los más importantes en materia de exportación (**Figura 1**). En este sentido, el sector agroalimentario es el que más contribuye a esta actividad, en gran medida, gracias a su ubicación geográfica. Por otra parte, y dadas las condiciones climáticas favorables, en nuestro país es posible cultivar numerosos productos durante todo el año, lo que implica una mayor competencia sobre otros países productores, y que posiciona a México en el lugar 11 en producción mundial de alimentos y cultivos agrícolas. Así, debido al crecimiento que ha tenido en nuestro país en los últimos años, la industria agrícola promete seguir jugando un papel crucial en el desarrollo del país (Atlas agroalimentario 2012-2018, SAGARPA, SIAP).

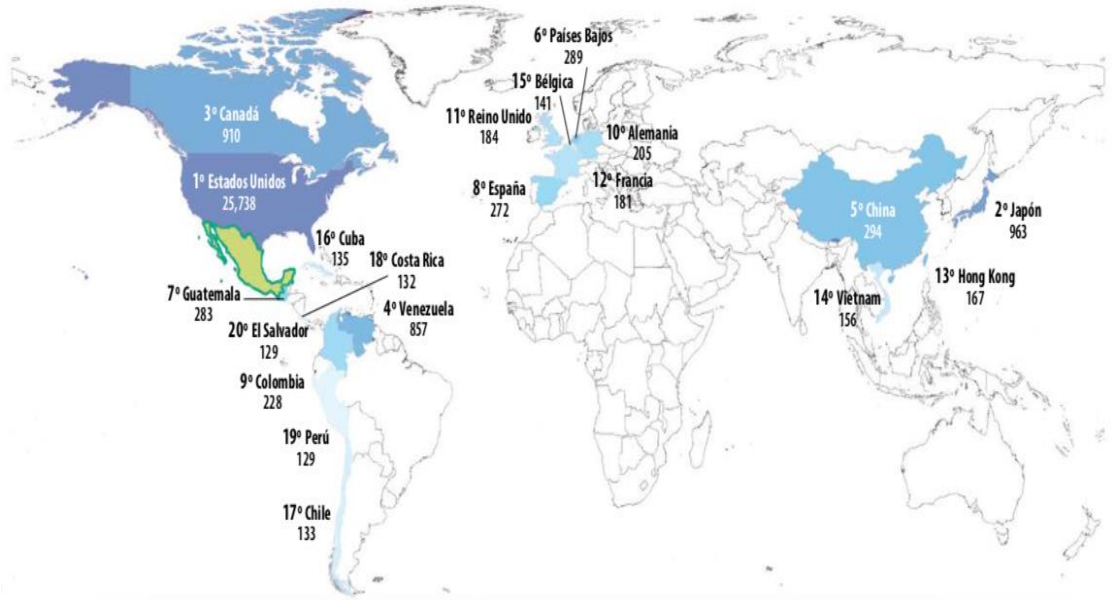


Figura 1. Principales mercados agroalimentarios de México en el 2017 (unidades en millones de dólares). (Atlas agroalimentario 2012-2018, SAGARPA, SIAP)

Dentro de los productos agrícolas que se producen en nuestro país y que más se comercializan en el mercado de los EE.UU. están: el aguacate, el jitomate, el melón, la zarzamora y la fresa (**Figura 2**). En este sentido, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en su informe de 2013 declaró que se

tienen más de cinco mil hectáreas plantadas con cultivos de: fresa, frambuesa, zarzamora y arándano, en los estados de Jalisco, Michoacán, Baja California y Colima, siendo las empresas productoras más importantes: Driscoll's, M. Steta, Aldo Mares y Berrymex. Cabe señalar que en la producción e industrialización de la fresa se cuenta también con la participación de las compañías: Ocean Garden, Imperial Frozen Foods, Del Mar y Rarnsay Laboratories, Bimbo, Marbrand, Betters Foods Sales e Intermex, Griffin y Holder, lo que hace a México el principal exportador de fresa y zarzamora hacia los EE.UU. y Europa, abarcando el 96% del total de este tipo de importaciones.

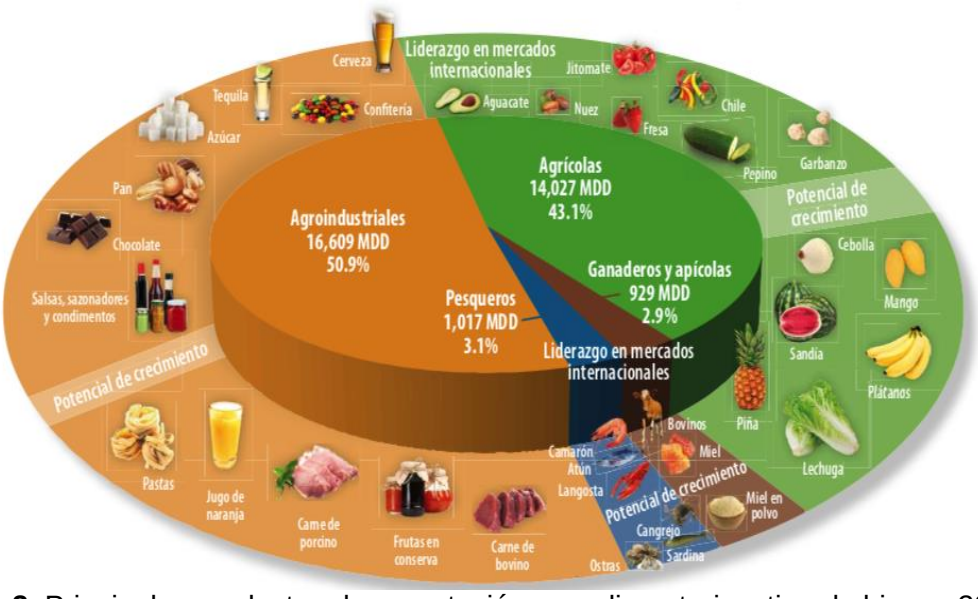


Figura 2. Principales productos de exportación agroalimentaria y tipo de bienes 2017. (Atlas agroalimentario 2012-2018, SAGARPA, SIAP)

Por otra parte, las autoridades competentes del sector agrícola en México han destacado que cada año se pierde entre el 20 y 40% de la producción de alimentos debido a insectos, plagas o enfermedades presentes en los cultivos; siendo específicamente, los hongos los principales agentes causales de pérdidas hasta por un 30% (Machorro, 2015).Es por lo anterior el gran interés por parte de autoridades, empresarios y agricultores, en buscar alternativas que permitan garantizar la integridad del suelo y la salud, ante los problemas recurrentes que provocan la merma y a las enfermedades por transmisión de alimentos contaminados (Komarek *et al*., 2009).

En la actualidad, se han planteado dos problemas específicos a solucionar, uno es la preocupación del público por la contaminación de los alimentos con residuos de agroquímicos (por ejemplo, con fungicidas sintéticos a base de cobre) y el segundo, es la resistencia generada por algunos organismos fitopatógenos (Tripathi y Dubey, 2003). Algunos ejemplos particulares de estos problemas en algunas regiones de nuestro país se describen en los párrafos siguientes:

- En Chihuahua, la presencia de plagas por insectos y enfermedades causadas por hongos afectan a una de las principales actividades económicas del estado, el cultivo de manzana en la región de Bachíniva-Cuauhtémoc-Guerrero-Namiquipa, que además es la zona productora más importante de Latinoamérica. Sin embargo, por estos problemas su producción se ha visto mermada al igual que los costos. El control de las plagas se ha limitado al uso de fungicidas sintéticos, sin embargo, su uso ha sido restringido debido a la baja eficiencia presentada a causa del manejo inadecuado del producto, la resistencia de los organismos fitopatógenos, la eliminación de microorganismos antagónicos nativos y por problemas de salud relacionados con el uso (por el consumidor y el agricultor).

- El estado de Veracruz ocupa el primer lugar en la producción en cítricos. Este tipo de cultivos es afectado por la plaga *Diaphorina citri*, vector de la bacteria *Candidatus liberibacter* ycausante del enverdecimiento de cítricos (Huanglongbing). Esta enfermedad es mortal para los miembros de la familia de las rutáceas y su tratamiento y erradicación es complicado (Hernández-Landa *et al*., 2017).

- En Guanajuato, la producción de granos se ha visto disminuida por el uso excesivo de fertilizantes sintéticos y otros agroquímicos. En consecuencia, el suelo se ha deteriorado, y los mantos freáticos han sido abatidos. Lo anterior, aunado a la usanza de prácticas tradicionales de labranza de campo, la rotación cereal-cereal y la quema de residuos de la cosecha, han provocado un importante decaimiento de las reservas orgánicas en el suelo del Bajío; y como un círculo vicioso, se siguen utilizando mayores cantidades de agroquímicos, ocasionando un daño total respecto a la contaminación de los mantos acuíferos y la infertilidad del suelo.

En conjunto, estos problemas sugieren la implementación de nuevas estrategias tecnológicas para solucionar los problemas imperantes de los suelos y las plagas, como la siembra directa (sembrar sobre los residuos de cosecha de los cultivos sin utilizar medidas de labranza mecánicas), la cual podría ser viable a mediano plazo en la mejora de la calidad agrícola de los suelos, el empleo de leguminosas en rotación o asociar cultivos, o el "control biológico" mediante la incorporación de microorganismos antagónicos que hayan sido eliminados anteriormente por las malas prácticas. En este último punto se han logrado avances significativos en la reactivación de terrenos para cultivos que se consideraban perdidos, con el uso de especies de actinomicetos y bacterias fijadoras de nitrógeno que ayudan a los hospederos, además de ser productoras de metabolitos secundarios que inhiban el crecimiento de los fitopatógenos (Báez-Pérez *et al*., 2012; Pérez-Corral *et al*., 2015).

1.1.1 Fitopatógenos de importancia agrícola

Gran parte de las pérdidas en los cultivos de frutas y vegetales en nuestro país se debe a la descomposición causada por los fitopatógenos. Sin embargo, la sobrevivencia de estos organismos depende de las condiciones en las que se encuentren. Estas condiciones no son muy estrictas ya que el rango de temperatura para que sobreviva un micelio varía entre los -5 y 45ºC y la humedad puede proveerla el ambiente o el hospedero. En el caso de las esporas, la sobrevivencia es mayor debido a que los rangos tanto de temperatura como de humedad son más extremos (Velásquez-Valle *et al*., 2017). En el caso de las frutas, el pH ácido (entre 4 y 5), el elevado contenido de agua (entre 70 y 95 %) y la composición (se alimentan de micro y macro elementos que utilizarán como sustrato), son factores que las hacen susceptibles a los ataques por hongos, desencadenando varios factores negativos como la pudrición y la producción de micotoxinas (Tripathi y Dubey, 2004).

En el **Cuadro 1** se muestran los principales patógenos que afectan a los productos de exportación más importantes de nuestro país y su posicionamiento a nivel mundial (Atlas agroalimentario 2012-2018, SAGARPA, SIAP).

Cuadro 1. Patógenos de los principales productos agrícolas exportados por México a nivel mundial.

Producto	Ranking mundial	Fitopatógeno
aguacate	1º	*Colletotrichum gloeosporioide,*[b] *Dothiorella gregaria, Cladosporium* spp*., Penicillium* sp*., Trichoderma* spp*., Fusarium* sp.,[d] *Botryodiplodia theobromae, Trichothecium roseum, Diplodia natalensis, Alternaria alternata, Rhizopus stolonifer*[e]
zarzamora	1º	*A. alternata,*[a] *Botrytis cinerea, Mucor* spp*., Rhizopus* spp*, Colletotrichum* spp*., Phomopsis* spp*., Cladosporium* spp*., Penicillium* spp*., Pestalotia* spp.,[d] *R. stolonifer*[e]
limón	2º	*A. alternata,*[a] *Penicillium digitatum, Penicillium italicum, C. gloeosporioides*,[d] *D. natalensis*[e]
chile verde	2º	*Rhizotocnia* spp*., Fusarium* spp*., Verticillium* spp.[g]
arándano	3º	*A. alternata*,[a] *B. cinerea, Mucor* spp*., Rhizopus* spp*., Colletotrichum* spp*., Phomopsis* spp*., Cladosporium* sp., *Penicillium* sp*., Pestalotia* sp.[d]
espárrago	3º	*Fusarium* spp.[e]
fresa	3º	*A. alternata,*[a] *B. cinerea, Mucor* spp*., Rhizopus* spp*., Colletotrichum* spp*., Phomopsis* spp*., Cladosporium* spp*., Penicillium* spp*., Pestalotia* spp*.,*[d] *Mucor piriformis, R. stolonifer*[e]
papaya	3º	*C. gloeosporioides, B. theobromae, Phomopsis* spp*., R. stolonifer, Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp.,[d] *A. alternata, C. herbarum, Phyllosticta caricae-papayae, R. stolonifer*[e]
frambuesa	4º	*A. alternata,*[a] *B. cinerea, Mucor* spp*., Rhizopus* spp*., Collecotrichum* spp*., Phomopsis* spp*., Cladosporium* spp*., Penicillium* spp*., Pestalotia* spp*.,*[d] *M. piriformis, R. stolonifer*[e]
guayaba	4º	*B. theobromae*[f]
mango	4º	*C. gloeosporioides,*[b] *A. alternata,*[d] *D. natalensis*[e]
toronja	4º	*P. digitatum, D. natalensis, C. gloeosporioides, Dothiorella* sp*., Fusarium* sp.[c]
brócoli	5º	*A. alternata, B. cinerea*[e]
coliflor	5º	*A. alternata, B. cinérea*[e]
naranja	5º	*A. alternata,*, *P. digitatum, P. italicum,*[d] *D. natalensis*[e]
nuez	5º	*A. alternata*[a]
maíz de grano	5º	*Fusarium* spp[e]
[a]Fernández-Cruz *et al*. 2010, [b]Prusky *et al*. 1993, [c]Sinclair, 1972, [d]Barkai-Golan, 2001, [e]Singh *et al*. 2018, [f]Hashem *et al*. 2009, [g]Velázquez-Valle *et al*. 2017		

En este sentido, es claro que el género *Alternaria* contribuye con el mayor número de especies involucradas en el deterioro severo de plantas, infectando el campo durante la etapa de pre-cosecha y disminuyendo la producción mediante la mengua de los productos en el periodo post-cosecha (vida media de anaquel) (Patriarca, 2016).

1.1.2 Principales agroquímicos empleados

Durante décadas, el control de plagas en cultivos de interés se ha realizado mediante el uso de diversos pesticidas (**Figura 3**). Sin embargo, debido a la gran demanda de productos

agrícolas, se ha realizado una sobreexplotación de los campos, y esto aunado al uso excesivo de plaguicidas, ha generado la aparición de fenómenos de resistencia por los organismos patógenos blanco (**Cuadro 2**), además de tener un impacto negativo en el medio ambiente y la salud (Halling-Sørensen *et al*., 1998). Es importante señalar que la resistencia que han desarrollado diferentes malezas hacia compuestos como el glifosato o la liberación al medio ambiente de agentes como el bromuro de etilo, han provocado daños irreversibles a la capa de ozono, además de acumularse en los cultivos dañados (Patriarca, 2016).

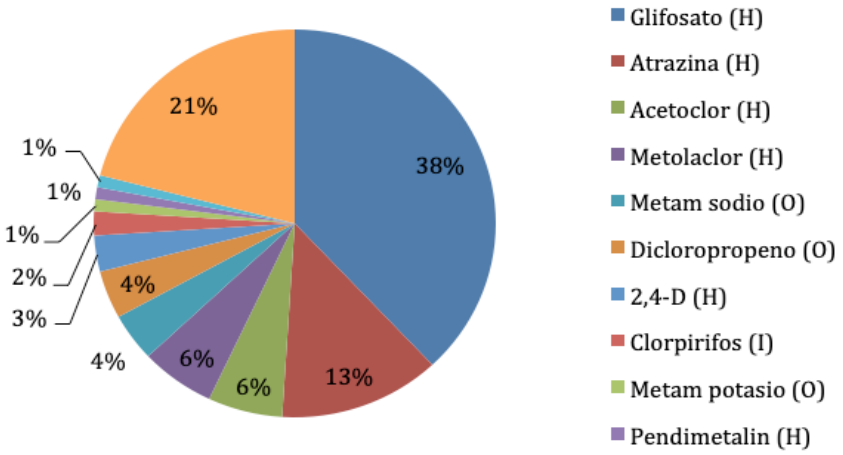
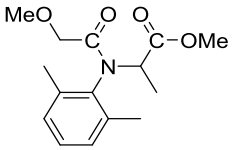
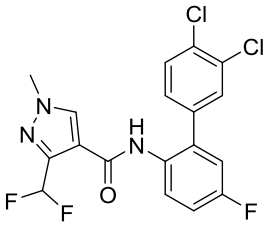
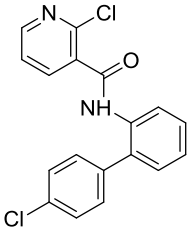
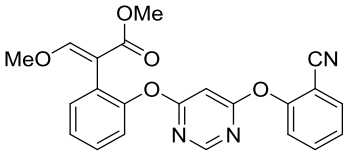
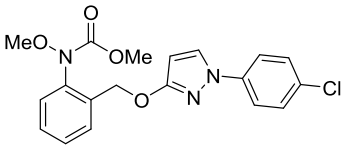
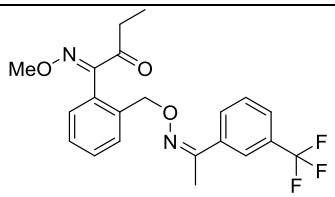
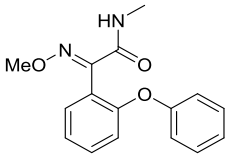
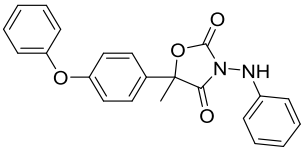
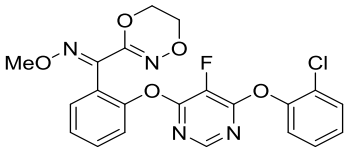
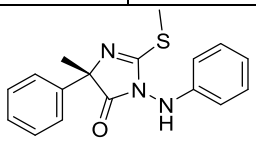
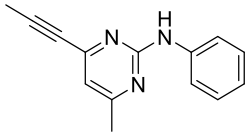
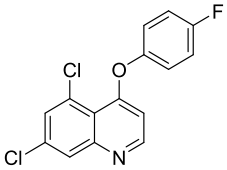
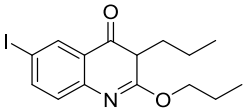
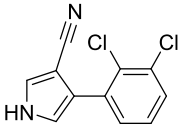
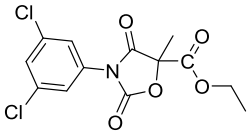


Figura 3. Pesticidas más utilizados en cultivos selectos en los EE.UU.: (H) herbicida, (I) insecticida, (F) fungicida y (O) otros.

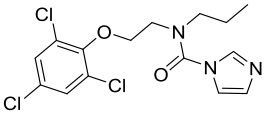
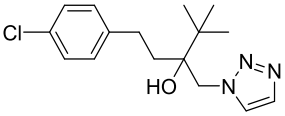
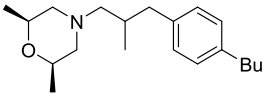
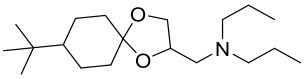
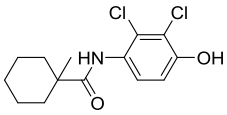
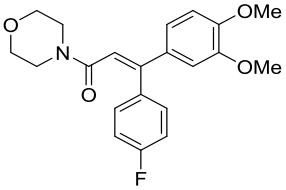
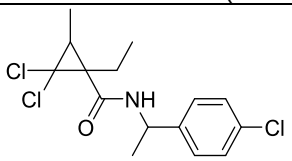
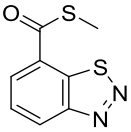
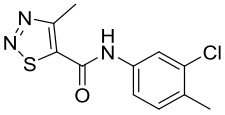
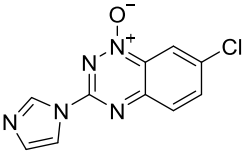
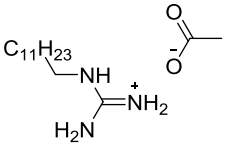
Cuadro 2. Ejemplos de resistencia a los fungicidas sintéticos (FRAC, 2007).

Mecanismo de acción	Clasificación	Grupo químico (ejemplo)		Resistencia
A: metabolismo de ácidos nucleicos	fungicidas PA	 acilalaninas (metalaxil)		común y cruzada con oomicetos
B: respiración	inhibidores de la succinato deshidrogenasa	 pirazol-4-carboxamida (bixafen)	 piridina-carboxamida (boscalid)	cruzada y presentaron factores de mediana resistencia

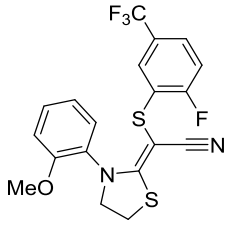
Cuadro 2. Ejemplos de resistencia a los fungicidas sintéticos (FRAC, 2007) (continuación).

Mecanismo de acción	Clasificación	Grupo químico (ejemplo)		Resistencia
B: respiración	fungicidas Qo (inhibidores de la quinona)	 metoxi-acrilatos (azoxistrobina)	 metoxi-carbamatos (piraclostrobina)	común con varias especies fúngicas y resistencia cruzada con todos los miembros del grupo Qo
		 oximino-acetatos (trifloxystrobina)	 oximino-acetamidas (metominostrobina)	
		 oxazolidina-dionas (famoxadona)	 dihidro-dioxazinas (fluoxastrobina)	
		 imidazolinonas (fenamidona)		
C: síntesis de aminoácidos y proteínas	fungicidas AP	 anilino-pirimidinas (mepaniprim)		desconocida
D: transducción de señal	quinolinas	 ariloxiquinolina (quinoxifen)	 quinazolina (proquinazida)	cruzada
	fungicidas PP	 fenilpirroles (fenpiclonil)		
	dicarboximidas	 dicarboximidas (clozolinato)		

Cuadro 2. Ejemplos de resistencia a los fungicidas sintéticos (FRAC, 2007) (continuación).

Mecanismo de acción	Clasificación	Grupo químico (ejemplo)		Resistencia
E: biosíntesis de esterol en membrana	inhibidores de la demetilación (DMIs) o inhibidor de biosíntesis de esteroles (SBI) clase I	 imidazoles (procloraz)	 triazoles (tebuconazol)	común
	SBI clase II	 morfolinas (fenpropimorf)	 espirocetal-amina (espiroxamina)	cambios de sensibilidad a la resistencia observados
	SBI clase III o fungicidas KRI (inhibidores cetoreductores)	 hidroxianilida (fenhexamida)		
F: biosíntesis de pared celular	fungicidas CAA	 amidas ácido cinámico (flumorf)		desconocida
G: síntesis de la melanina en la pared celular	MBI-D (deshidratasa del inhibidor de biosíntesis de melanina)	 ciclopropano carboxamida (carpropamida)		común
H: inducción de defensa en la planta por hospedero	benzo-tidiazol (BTH)	 benzo-tidiazol (acibenzolar-*S*-metil)		desconocida
P: inducción de defensa en la planta por hospedero	tidiazol-carboxamida	 tidiazol-carboxamida (tiadinil)		desconocida
U: desconocido	benzotriazinas	 benzotriazinas (triazóxido)		desconocida
	guanidinas	 guanidinas (dodina)		conocida en *Venturia inaequialis*

Cuadro 2. Ejemplos de resistencia a los fungicidas sintéticos (FRAC, 2007) (continuación).

Mecanismo de acción	Clasificación	Grupo químico (ejemplo)	Resistencia
U: desconocido	tiazolidina	 ciano-metilen-tiazolidina (flutianil)	conocida en *Venturia inaequialis*

1.2 Importancia de los productos naturales en el control de plagas

Con base en lo antes descrito, el uso de productos naturales para el control de plagas ha sido históricamente una excelente alternativa, ya que se ha demostrado que estos compuestos son más seguros para el ambiente y el hombre, generalmente tienen mecanismos de acción novedosos, y la mayoría son biodegradables (Lam, 2007). En este sentido, los microorganismos han sido la fuente natural de mayor relevancia para la obtención de dichos productos (Cantrell *et al*., 2012). Algunos de los bioplaguicidas naturales de mayor relevancia industrial se describen a continuación: las estrobilurinas (**Figura 4**) aisladas del hongo *Strobilurus tenacellus*, han sido empleadas para el tratamiento de infecciones fúngicas en cultivos de pepino, sandía, tomate, fresa, lechuga, apio, cebolla, zanahoria, etc. A partir de estos metabolitos se sintetizaron una serie de análogos con propiedades antifúngicas y son empleados en las prácticas agrícolas actuales: la azoxistrobina, la piraclostrobina y la trifloxistrobina (**Cuadro 2**). El espinosad (**Figura 4**), metabolito sintetizado por el actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*, es empleado como insecticida contra plagas de termitas, hormigas y “trips” (DNP, 2019), mientras que las avermectinas (**Figura 4**), que además de tener propiedades antiparasitarias de uso en la clínica (fitosanitarios) y en la veterinaria, son insecticidas, acaricidas y antihelmínticas (DNP, 2019). El bialafos (bilanafos), las quinazolinas, la blasticidina, la validamicina, la estreptomicina, la milbemectina (**Figura 5**) son otros ejemplos de bioplaguicidas comercializados como pesticidas. Finalmente, otro caso de éxito son los extractos hidrolizados de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *B. subtilis*, que han servido para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas en cultivos de cítricos, algodón, papaya, durazno, nuez, cacahuate,

entre otros, y los de esporas de *Streptomyces griseoviridis*, empleados para el control de especies de *Alternaria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Pythium*, entre otras, y el cuidado de plantas ornamentales y árboles de coníferas (Slusarenko, 2008).

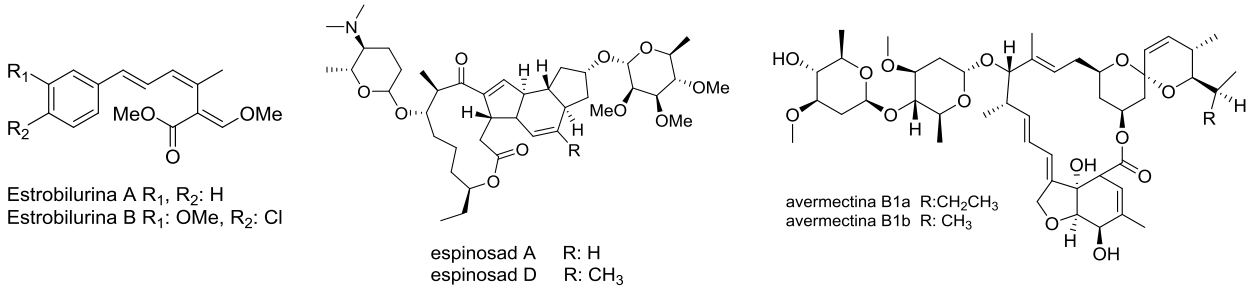


Figura 4. Estructura química de estrobilurinas, espinosad y avermectinas.

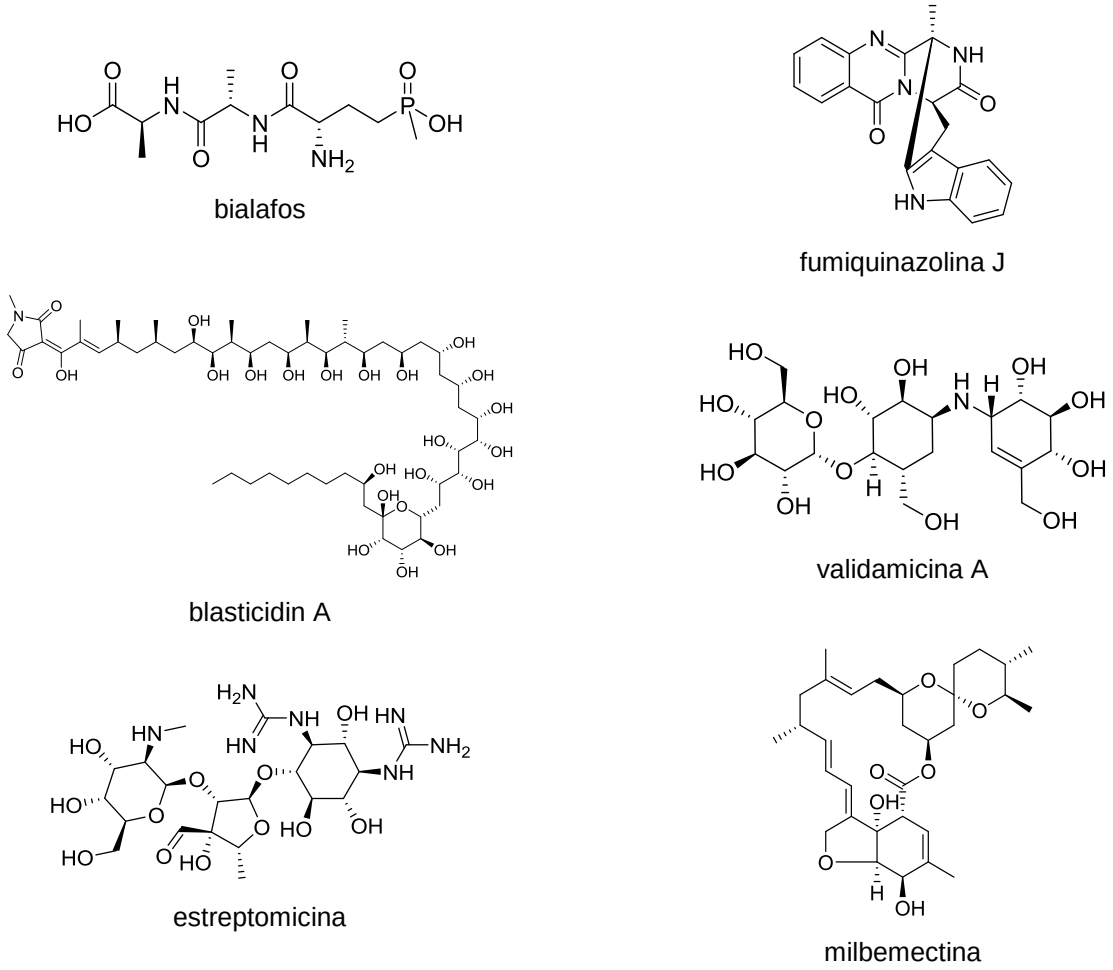
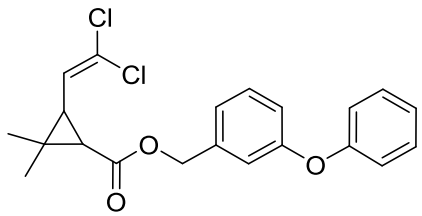


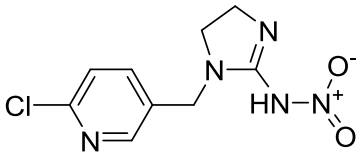
Figura 5. Ejemplos selectos de bioplaguicidas comercializados como pesticidas.

Cabe mencionar que algunos productos vegetales han servido también de inspiración para la elaboración de pesticidas sintéticos, como los piretroides (permetrina), los

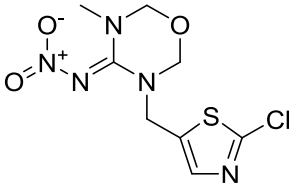
neonicotinoides y las triquetonas (leptospermona) (**Figura 6**), además de la introducción de semillas de maíz, soya y algodón transgénicos, las cuales protegen a las plantas contra insectos (bioproducción de toxinas Bt, un biopesticida PIP) y ha disminuido considerablemente el uso de insecticidas (Tabashnik, *et al*. 2011). Los semioquímicos, o sustancias químicas de detección/comunicación, son otra clase prometedora de bioplaguicidas para la protección de algunos cultivos y plagas relacionadas. Estos productos incluyen: feromonas, alomonas, kairomonas y otros atrayentes y repelentes. Finalmente, podemos mencionar a los imitadores de feromonas biosintetizadas en plantas, como los que se encuentran en las hojas de pera y combaten a la polilla carpocapsa (*Cydia pomonella*), una plaga mundial de la manzana, pera, nuez y almendras (Light, *et al*. 2001).



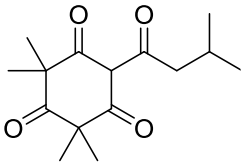
permetrina (insecticida)



imidacloprid (insecticida)



tiametoxam (insecticida)



leptospermona (herbicida)

Figura 6. Ejemplos selectos de pesticidas sintéticos a partir de productos vegetales.

1.2.1 Productos naturales con actividad fungicida y/o fungistática

Además de los presentados anteriormente de compuestos con aplicación industrial para el control de plagas, existen numerosos metabolitos con actividad fungicida y/o fungistática y que podrían servir de base para el desarrollo de nuevos compuestos más potentes, selectivos y menos agresivos con el medio ambiente y el humano. A continuación de ilustran algunos ejemplos de dichos productos naturales: la fusapirona y su derivado la desoxofusapirona (**Figura 7**), aisladas del organismo saprotrófo *Fusarium semitectum,* presentan una importante actividad inhibitoria contra el crecimiento de *B. cinerea*, hongo presente en los cultivos de uva (Evidente *et al*., 1999); el propóleo, resina natural originada

a partir de las yemas de los árboles de coníferas o álamos y que se encuentra como parte de las colmenas de las abejas, contiene proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerales y flavonoides, con actividad antibiótica, antibacteriana y antifúngica contra los fitopatógenos como *B. cinerea* y al género *Penicillium* (Gallez, *et al*. 2017); por último, el timol (**Figura 8**) componente mayoritario presente en la esencia del tomillo, es ampliamente utilizado en la agricultura para fumigar cultivos de cerezas y tener un control post-cosecha contra *B. cinerea* y *Monilinia fructicola* que causa la podredumbre marrón (Tripathi *et al*., 2003).

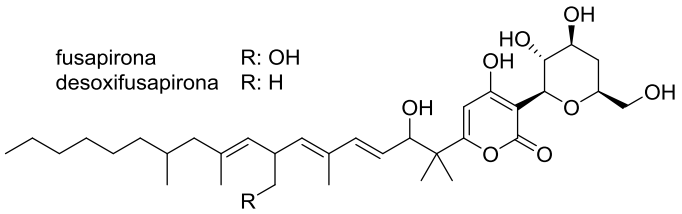


Figura 7. Estructura química de la fusapirona y la desoxifusapirona.

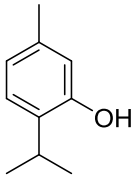


Figura 8. Estructura química del timol.

1.3 Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila

México es el sexto país a nivel mundial en biodiversidad y contiene cerca del 10% de la diversidad total del planeta. Una región que recientemente ha atraído a numerosos investigadores por sus características ambientales, diversidad climática y biodiversidad única, es el valle de Cuatro Ciénegas (CC), en el estado de Coahuila (**Figura 9**). Esta región en el norte del país cuenta con una extensión de aproximadamente 150,000 km^2, una altitud promedio de 735 msnm, y está encerrada entre altas serranías formadas principalmente por rocas calizas que alcanzan hasta 3000 m de altura. A pesar de contar con un clima es seco, semicálido, con pocas lluvias en verano y ocasionalmente algunas en invierno, CC cuenta con una gran diversidad de ambientes acuáticos, entre los que destacan los humedales tipo pantanos, complejos sistemas de corrientes subterráneas, manantiales, canales, ríos, lagos y estanques temporales. Otra característica de esta región es su

extrema oligotrofía en fósforo, y se ha establecido que sus sistemas acuáticos habitan más de 70 especies endémicas de organismos invertebrados, vertebrados y estromatolitos, lo que convierte a esta región en el oasis con el más alto nivel de biodiversidad endémica de América del Norte. (Prieto-Barajas et. al., 2017)

Figura 9. Ubicación del valle de CC en la República Mexicana.

Las causas de esta diversidad han sido poco exploradas, pero se ha sugerido que el valle sirvió como refugio para la flora acuática y terrestre durante las glaciaciones, brindando las condiciones adecuadas para que se mantuviera una gran diversidad de organismos y microambientes, que han permanecido a lo largo del tiempo debido a su estabilidad ambiental y aislamiento geográfico (Souza, *et al*. 2004). Estudios recientes han documentado parte de la abundancia y diversidad de arqueas, bacterias, hongos y virus en los ecosistemas de CC.

Específicamente, y dado que se estima que en nuestro país existen aproximadamente 200,000 especies de hongos de las cuales sólo se tiene un conocimiento taxonómico del 5%, la información sobre la diversidad y distribución de los hongos microscópicos en esta región junto con aquella derivada de su bioprospección es escasa. Cabe destacar que nuestro grupo de investigación es el único que ha realizado este tipo estudios, lográndose el aislamiento de numerosos hongos y bacterias y sus principales metabolitos (Fajardo-Hernández, 2017; Villedas-Hernández, 2018; Camiña-Blando, 2018; Yeverino-Sánchez, 2018; Vilchis-Romero, 2018; Aparicio-Cuevas, 2019). Entre los hongos más abundantes aislados de esta región se encuentran distintos taxones del género *Aspergillus*. Dichos organismos han sido explorados químicamente con la finalidad de encontrar compuestos

químicos novedosos, que dado las condiciones bióticas y abióticas particulares del valle de CC, representan una fuente importante para la obtención de moléculas bioactivas con posible aplicación agroquímica o terapéutica.

1.4 Generalidades sobre el género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* comprende más de 340 especies de hongos filamentosos. Las especies de este género pueden tener efectos benéficos o perjudiciales para la salud y el medio ambiente (De Vries *et al.*, 2016). Asimismo, se consideran los hongos más abundantes en el suelo y aire, y frecuentemente se usan para formar colonias con restos de plantas y cultivos agrícolas en descomposición (Barkai-Golan, 2011).

Algunas especies han sido explotadas biotecnológicamente, como el caso de *A. niger* que se utiliza para la producción de ácido cítrico, enzimas extracelulares, sustancias antioxidantes y para biotransformación de sustancias químicas. Otras como *A. fumigatus* y *A. flavus* son nocivas para la salud al generar los tipos de aspergilosis invasiva o broncopulmonar alérgica; *A. flavus* y *A. parasiticus* contaminan alimentos de origen vegetal con aflatoxinas, agentes carcinógenos que provocan aflatoxicosis, necrosis hepática o cáncer de hígado (Meyer *et al.*, 2011). Además, cabe destacar la utilidad de las especies del género como fuentes potenciales para la obtención de compuestos con actividades farmacológicas de interés para tratar enfermedades como la diabetes, Alzheimer, trastornos neuronales y fisiológicos, entre otros (Yadav, 2019).

1.4.1 Estudios químicos del género *Aspergillus*

Durante décadas, las especies de *Aspergillus* han demostrado su potencial en la producción de compuestos biodinámicos, y a pesar de que existen numerosos metabolitos secundarios ya caracterizados y reportados en el género, sigue existiendo la posibilidad de descubrir nuevas moléculas (Frisvad y Larsen, 2015).

El género *Aspergillus* está dividido en cinco subgéneros: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Cremei* y *Aspergillus*, y los estudios químicos de las distintas especies han permitido el aislamiento de numerosos metabolitos secundarios con una gran variedad de actividades farmacológicas (antimicrobianas, antivirales, citotóxicas, antiinflamatorias, antioxidantes, etc.) (Frisvad y Larsen, 2015, Monti *et al*., 1999, Liu *et al*., 2015, Cutler *et al*., 1979, TePaske *et al*., 1990, Macías *et al*., 2000, Hamed *et al*., 2019) (**Figura 10**).

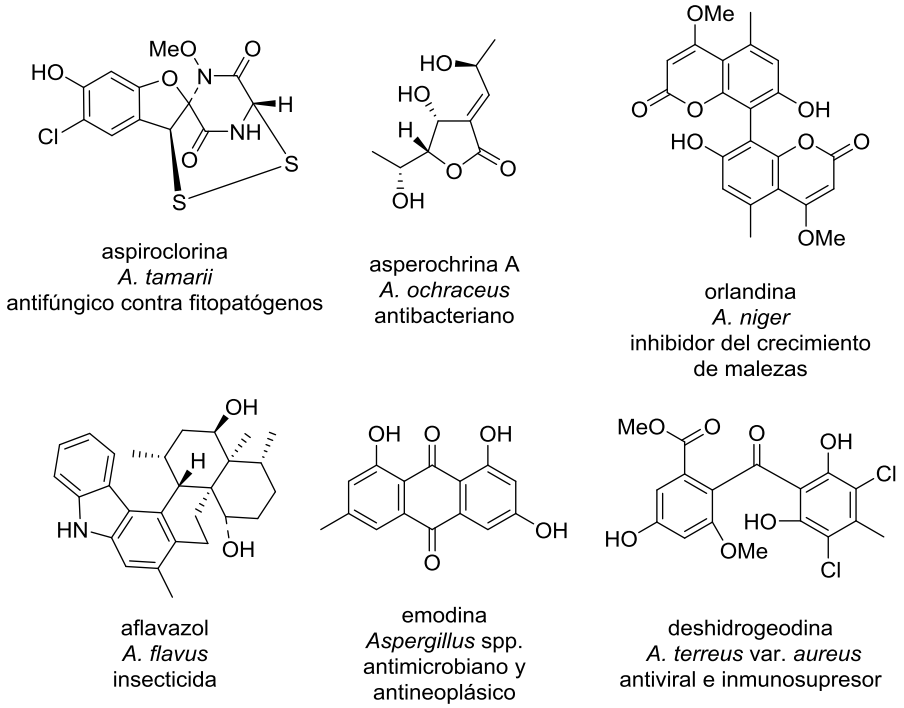
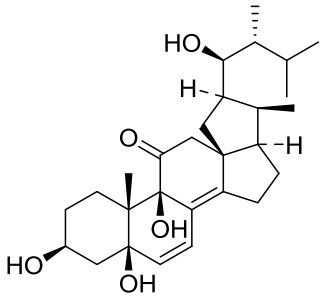
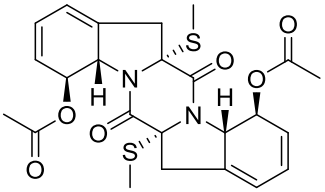


Figura 10. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos de *Aspergillus.*

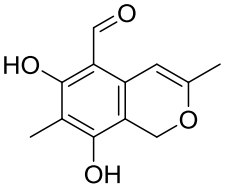
Actualmente, se encuentran reportados más de 2500 productos naturales obtenidos de *Aspergillus*, y muchos de éstos presentan actividad antifúngica de interés para el desarrollo de nuevos productos agroquímicos (DNP, 2019, Sakai *et al*., 1994, Suzuki *et al*., 2000, Fujimoto *et al*., 1993, Hosoe *et al*., 2011, Mühlenfeld *et al*., 1988, Qiao *et al*., 2010) (**Figura 11**).



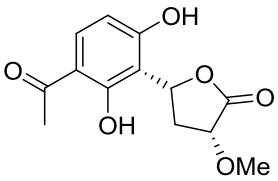
Mer-NF 8054X
Aspergillus spp.



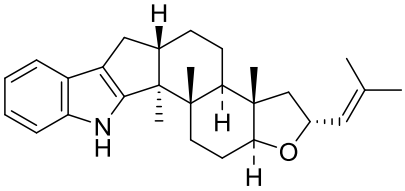
haematocina
A. terreus



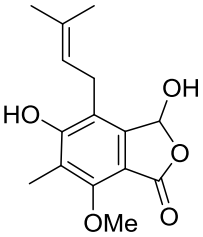
anishidiol
A. nishimurae



antafumicina B
A. niger



JBIR 03
A. oryzae



asperdurina
A. duricaulis

Figura 11. Ejemplos selectos de metabolitos de *Aspergillus* con actividad antifúngica.

2. JUSTIFICACIÓN

Con base en los antecedentes antes descritos, queda plenamente justificada la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas *per se* o como prototipos para el desarrollo de nuevos agentes fungicidas. En este contexto, los microorganismos (hongos y bacterias) que habitan ambientes inexplorados y que en la mayoría de los casos crecen en condiciones ambientales extremas, como el valle de CC, son las fuentes naturales idóneas para la obtención de éstos metabolitos, debido a su capacidad para biosintetizar compuestos biodinámicos novedosos y/o con actividad biológica potencial, de utilidad para el desarrollo de agentes de interés para la industria agroquímica.

3. HIPÓTESIS

El estudio químico de hongos y/o bacterias provenientes de hábitats poco explorados como el valle de Cuatro Ciénegas (CC), Coahuila, utilizando los ensayos de actividad biológica adecuados, permite la selección de los candidatos idóneos para el aislamiento de nuevos fungicidas de origen natural.

4. OBJETIVOS

Como parte de un proyecto multidisciplinario enfocado en la obtención de nuevos metabolitos secundarios biodinámicos a partir de microorganismos de hábitats inexplorados de México, surge la presente propuesta de investigación que tiene por objetivo principal el descubrimiento de nuevos fungicidas a partir de hongos y/o bacterias aislados del valle de CC. Para lograr este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Recopilar la información biológica y química de las especies fúngicas seleccionadas para el desarrollo de la presente investigación.

2. Preparar los cultivos en pequeña escala de las especies seleccionadas y obtener sus correspondientes extractos orgánicos utilizando las técnicas de maceración y reparto.

3. Determinar la actividad biológica de los extractos fúngicos preparados en el objetivo anterior con la finalidad de seleccionar a las especies idóneas, para continuar con su estudio químico.

4. Realizar el estudio químico preliminar de al menos una de las especies seleccionadas con base en su actividad biológica, mediante los procedimientos cromatográficos convencionales y de vanguardia.

5. Evaluar a los constituyentes mayoritarios obtenidos en el estudio químico utilizando el mismo ensayo que permitió establecer la actividad biológica preliminar de los extractos orgánicos.

6. Correlacionar los resultados obtenidos en la presente investigación con aquellos descritos en la literatura.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Acondicionamiento y preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala

Se realizó el acondicionamiento mediante resiembras en caja Petri en medio de agar papa dextrosa (APD) de los taxones identificados con las claves CC7-1-CC7-12 previamente aislados a parir de una muestra de suelo de la base de la montaña La Becerra, en CC (26°52'42'' N; 102°8'8'' O, 761.7 msnm) (Fajardo-Hernández, 2017). Una vez verificada la viabilidad y pureza de cada organismo, un fragmento de cada cultivo fue transferido a 15 mL de un medio líquido (YESD) compuesto por extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%), y de dejaron crecer en agitación constante (100 rpm) por 5 días, con la finalidad de incrementar la biomasa. Posteriormente, cada cultivo líquido fue vertido sobre un sustrato sólido compuesto por arroz húmedo (15 g de arroz/30 mL agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL, y se dejaron crecer durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 h.

Para realizar la preparación de los cultivos en mediana escala, se siguió la misma estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior utilizando 100 g arroz y 200 mL agua por cultivo.

5.2 Obtención de los extractos orgánicos

La obtención de los extractos orgánicos se realizó a partir de cada cultivo sólido mediante un proceso de maceración con 90 mL de una mezcla de $CHCl_3$-MeOH (1:1), a temperatura ambiente y con agitación constante (100 rpm) durante 12 h. Transcurrido el tiempo de extracción, se adicionaron 60 mL de H_2O y 40 mL de $CHCl_3$ a la mezcla y se mantuvo en agitación constante durante 20 min. Enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta última se sometió a un proceso de extracción con $CHCl_3$ (2×20 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron a presión reducida. Posteriormente, esta fracción fue resuspendida en 60 mL de una mezcla de CH_3CN-MeOH (1:1) y se realizó un proceso de desgrase con hexano; la fracción hexánica se desechó y la de CH_3CN-MeOH se evaporó a sequedad a presión reducida.

5.3 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos en pequeña escala

La determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos se realizó mediante la evaluación de su efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de dos microorganismos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*, utilizando el método de difusión en agar. Brevemente, todos los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio APD, inoculadas en la parte media con el microorganismo de prueba por un período de 5 días o hasta que la colonia hubiera alcanzado un diámetro de 1 cm. Posteriormente, se colocaron sobre la superficie de las cajas discos de papel filtro (0.5 cm de diámetro) impregnados con el extracto o compuesto a evaluar a las concentraciones de 25 y 250 μg/mL disuelto en MeOH y dejándolo secar bajo una corriente de aire. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las cajas se incubaron durante un período de 3 a 4 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 h. Como controles se emplearon MeOH (negativo) y nistatina (positivo; a diferentes concentraciones: 1, 2.5, 5,7.5 y 10 μg/mL).

5.4 Estudio químico de la especie CC7-12

El fraccionamiento primario del extracto orgánico activo de la especie CC7-12 en mediana escala se realizó mediante una cromatografía en columna tipo flash (CCF), en un cromatógrafo CombiFlash Rf system (Teledyne ISCO) equipado con una bomba binaria, y los detectores de UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA; λ 200-400 nm) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (40 g, RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil, un gradiente de polaridad creciente con mezclas entre hexano, $CHCl_3$ y MeOH.

Posteriormente, todas las fracciones se analizaron por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) en un cromatógrafo marca Waters equipado con los detectores de PDA y ELSD, y utilizando las condiciones de análisis siguientes: Columna: Phenomenex Gemini C18 (5 μm, 250 × 21.0 mm); fase móvil: CH_3CN (**A**) y ácido fórmico 0.1% en agua (**B**); gradiente de elución: 15% (**A**), 5 min, 15% a 100% (**A**) en 15 min, 100% (**A**), 5 min, y 15%

(**A**), 7 min; tiempo de corrida: 32 min; flujo: 1 mL/min; y temperatura de la columna, 40 °C. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 3.0 (Waters).

5.5 Caracterización de los productos naturales

Los espectros de ^{1}H y ^{13}C RMN (400 MHz) se registraron en un equipo JEOL ECS 400. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y el disolvente empleado para los registros fue $CDCl_3$. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas de alta resolución Thermo LTQ Orbitrap XL con ionización por electrospray (HRESIMS). En este análisis, la muestra se introdujo a través de un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (CLUE). Los resultados se adquirieron en los modos de ionización positivo y negativo (ESI+ y ESI-). El registro de los espectros de RMN se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), Facultad de Química, y los de masas en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro (UNCG), NC, EE.UU.

5.6 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos

La identificación taxonómica de la especie fúngica seleccionada para su estudio químico se realizó mediante el análisis de sus características morfológicas y genéticas del espaciador de transcripción interno (ITS) del ADN ribosomal. En esta técnica se realiza la secuenciación de la región ITS, ya que esta posee un alto grado de conservación. Posteriormente, se comparó la secuencia obtenida con aquellas descritas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Yeverino-Sánchez, 2018). Este trabajo se hizo en colaboración con el Dr. Huzefa A. Raja de la UNCG.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antifúngica de 12 hongos aislados a partir de CC, utilizando una estrategia metodológica convencional para el descubrimiento de nuevos agentes pesticidas. En primer lugar, se realizó la resiembra de los taxones objeto de estudio, utilizando los métodos microbiológicos convencionales; posteriormente, cada aislamiento se cultivó en pequeña escala utilizando las condiciones de crecimiento descritas en la parte experimental. Una vez cultivados los microorganismos se realizó la preparación de los extractos orgánicos correspondientes con la finalidad de determinar su potencial antifúngico. Este último proceso permitió la selección de los organismos activos idóneos para la obtención de los compuestos bioactivos. Por último, se realizó el estudio químico de la especie más activa con la finalidad de aislar a los compuestos responsables de la actividad biológica mostrada por el extracto.

Siguiendo la estrategia desarrollada en el párrafo anterior se obtuvieron los resultados que se describirán en dos secciones, en la primera se discutirá los aspectos relacionados con la evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos de los organismos aislados; y en la segunda, se describirá el estudio químico realizado con la especie fúngica seleccionada con base en los resultados de actividad biológica.

6.1 Evaluación de la actividad antifúngica

La determinación de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos en pequeña escala (**Cuadro 3**) se realizó utilizando el método de difusión en agar contra los microorganismos de prueba *F. oxysporum* y *A. solani* (**Figura 12**). Los resultados obtenidos a partir de estas evaluaciones se resumen en el **Cuadro 4**.

Cuadro 3. Rendimiento obtenido de los extractos orgánicos en pequeña escala.

Clave	Peso (mg)
CC7-1	191.8
CC7-2	200.4
CC7-3	137.6
CC7-4	53.5
CC7-5	135.4
CC7-6	26.0
CC7-7	142
CC7-8	13.7
CC7-9	13.2
CC7-10	66.4
CC7-11	7.4
CC7-12	276.6

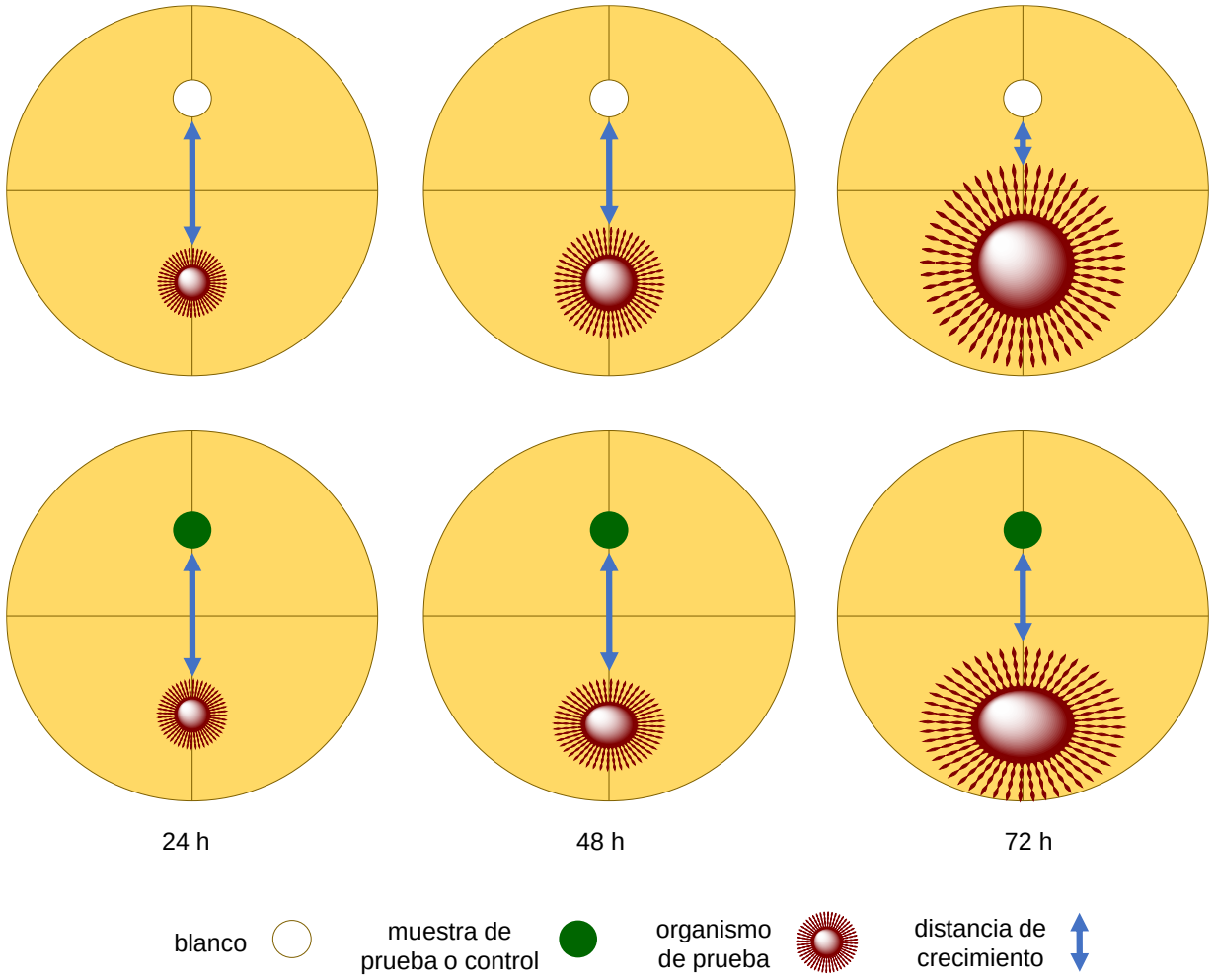


Figura 12. Evaluación de la actividad antifúngica por el método de difusión en agar.

Cuadro 4. Resultados de la actividad antifúngica de los extractos en pequeña escala de los taxones de la serie CC7.

Clave	**% de inhibición del crecimiento**									
	A. solani					*F. oxysporum*				
	250 μg		25 μg			250 μg		25 μg		
CC7-1	14.3		14.3			5.0		5.0		
CC7-2	9.5		9.5			10.5		0.0		
CC7-3	14.3		9.5			0.0		0.0		
CC7-4	0.0		0.0			0.0		0.0		
CC7-5	4.8		4.8			0.0		0.0		
CC7-6	4.8		4.8			0.0		0.0		
CC7-7	16.7		16.7			21.1		21.1		
CC7-8	0.0		0.0			5.3		5.3		
CC7-9	0.0		0.0			5.3		5.3		
CC7-10	0.0		0.0			5.3		5.3		
CC7-11	0.0		0.0			5.3		5.3		
CC7-12	33.3		0.00			31.6		5.3		
MeOH	0.0					0.0				
	1 μg	2.5 μg	5 μg	7.5 μg	10 μg	1 μg	2.5 μg	5 μg	7.5 μg	10 μg
Nistatina	40.9	45.5	50.0	54.5	54.5	48.0	48.0	52.0	52.0	52.0

Se puede observar que algunos de los extractos presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de uno o ambos patógenos *F. oxysporum* y *A. solani*, siendo el extracto de la cepa CC7-12, la que más afectó a los dos microrganismos a las dos concentraciones de prueba. Así, se seleccionó a este taxón para su estudio químico.

6.2 Estudio químico de CC7-12

Una vez realizada la selección de la especie objeto de estudio (CC7-12), se procedió a la preparación su cultivo en mediana escala y a la obtención del correspondiente extracto orgánico, el cual presentó un rendimiento final de 1.139 g. Enseguida, se realizó un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna tipo Flash (**Figura 13**). Este proceso generó un conjunto de 17 fracciones primarias, las cuales fueron reunidas con base en los perfiles cromatográficos en el UV y de ELSD (**Cuadro 5**).

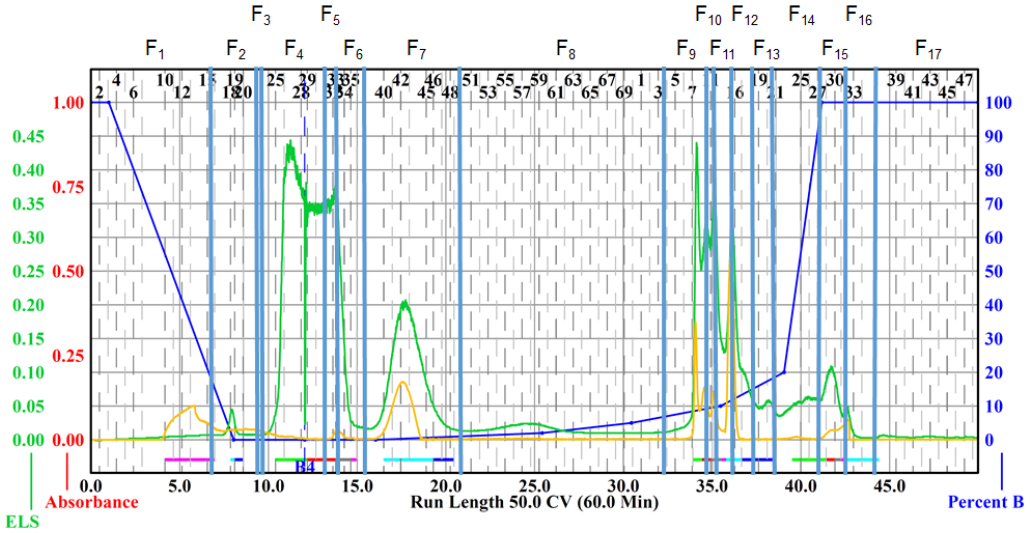


Figura 13. Cromatograma del fraccionamiento primario por cromatografía tipo flash del extracto orgánico de CC7-12. Detección en el UV (amarillo) y por ELSD (verde).

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento primario del extracto orgánico de CC7-12.

Fracciones	Clave	Cantidad de muestra (mg)
1-16	CC7-12-F_1	2.6
17-22	CC7-12-F_2	6.8
23	CC7-12-F_6	1.1
24-31	CC7-12-F_4	432.0
32-33	CC7-12-F_5	57.1
34-37	CC7-12-F_6	9.1
38-49	CC7-12-F_7	139.9
50-73	CC7-12-F_8	39.8
74-78	CC7-12-F_9	53.8
79-80	CC7-12-F_{10}	47.2
81-83	CC7-12-F_{11}	46.0
84-87	CC7-12-F_{12}	73.1
88-90	CC7-12-F_{13}	22.0
91-96	CC7-12-F_{14}	36.3
97-100	CC7-12-F_{15}	44.2
101-104	CC7-12-F_{16}	31.1
105-fin	CC7-12-F_{17}	12.7
	Total recuperado	1054.8
	% Recuperado	96.77

Todas las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC en fase reversa. La resolución de la fracción primaria CC7-12-F_7 permitió evidenciar que ésta se componía de un compuesto mayoritario (**Figura 14**). La caracterización de este producto se realizó mediante el análisis detallado de los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C y de HRESIMS, y como se describe a continuación:

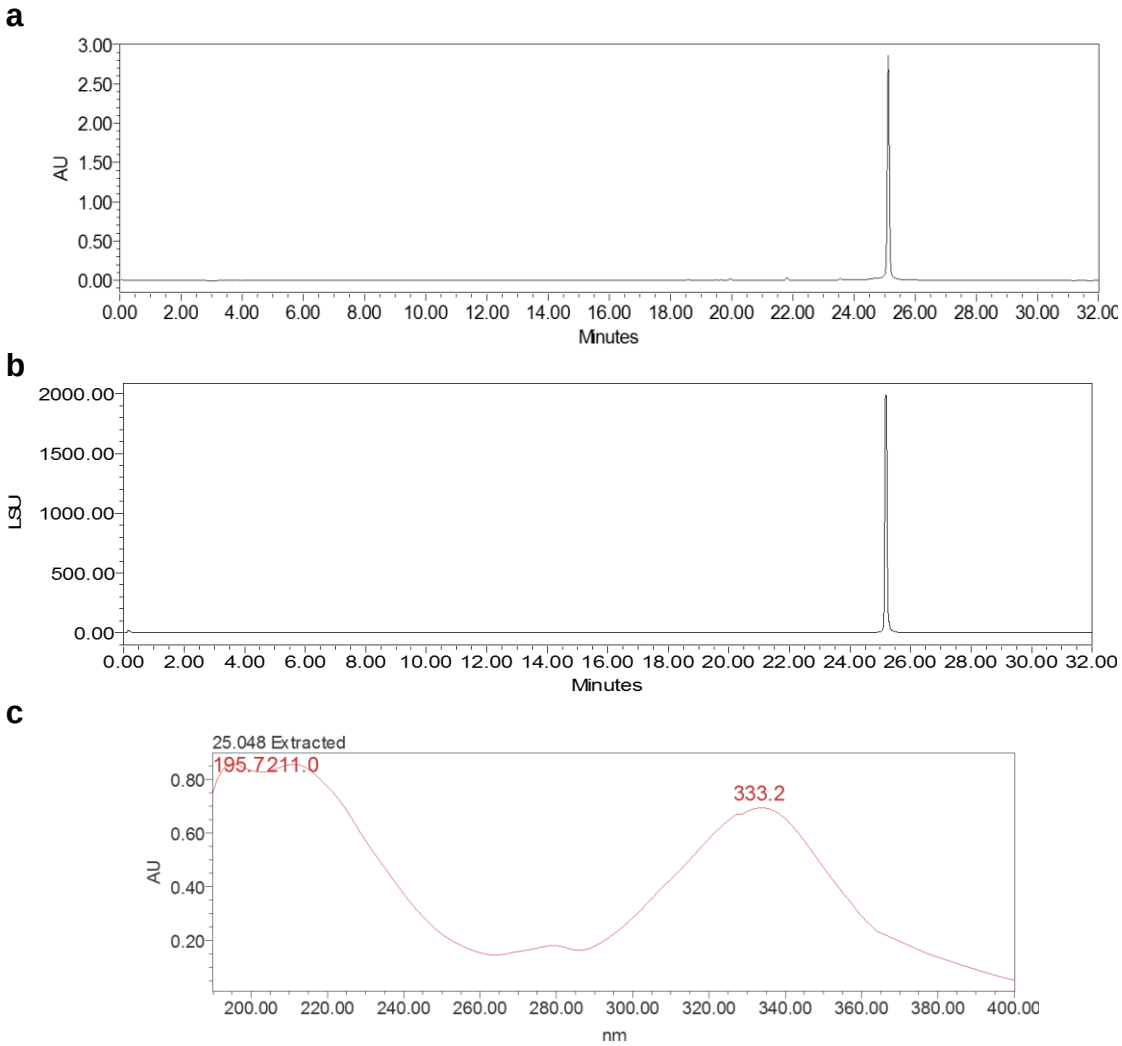


Figura 14. Cromatogramas por HPLC de la fracción CC7-12-F_7 en el UV (λ 270 nm) (**a**) y ELSD (**b**). Espectro de UV del pico en t_R 25.0 min (**c**).

El producto **1** se obtuvo como un sólido amarillo. Su fórmula molecular e índice de deficiencia de hidrógeno (IDH) se establecieron mediante el análisis de los iones *m/z* 681.1818 $[M+H]^+$ y 679.1670 $[M–H]^–$ como $C_{34}H_{32}O_{15}$, que permite 19 grados de insaturación (**Figura 15**). Por otra parte, este compuesto presentó un máximo de absorción característico para un grupo cromóforo de tipo cromanona en la longitud de onda de 333 nm (**Figura 14**). El análisis de los espectros de RMN (**Figura 16 Y 17**) y de HRESIMS permitió establecer que el producto **1** es un isómero de la eumitrina A_1 (Proksa *et al*., 1998) Las constantes espectroscópicas de este compuesto se resumen en el **Cuadro 6**.

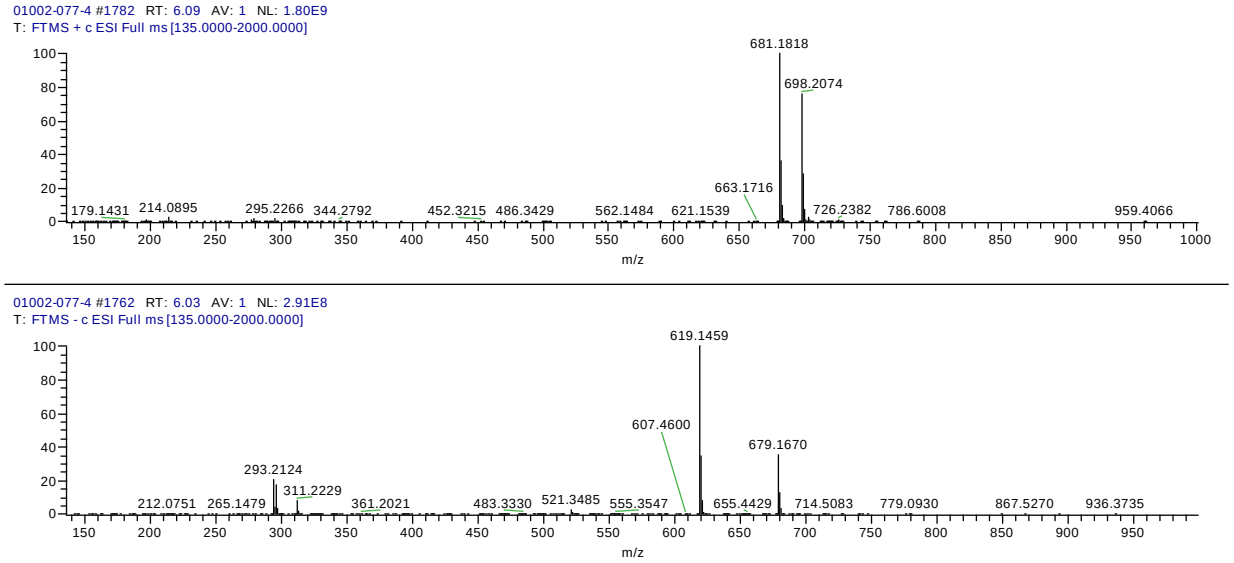


Figura 15. HRESIMS del compuesto **1** en modo positivo (arriba) y negativo (abajo).

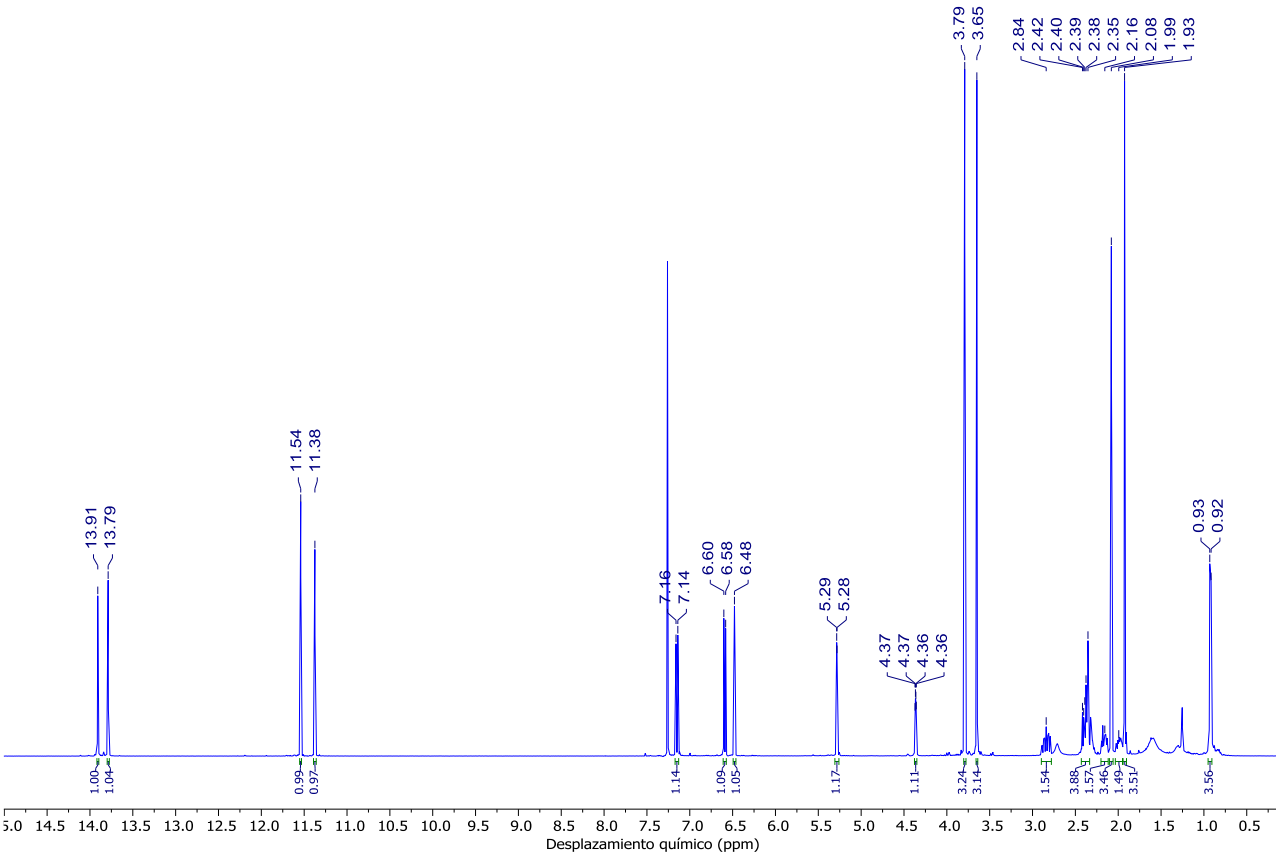


Figura 16. Espectros de RMN ^{1}H del compuesto **1** (400MHz, $CDCl_3$).

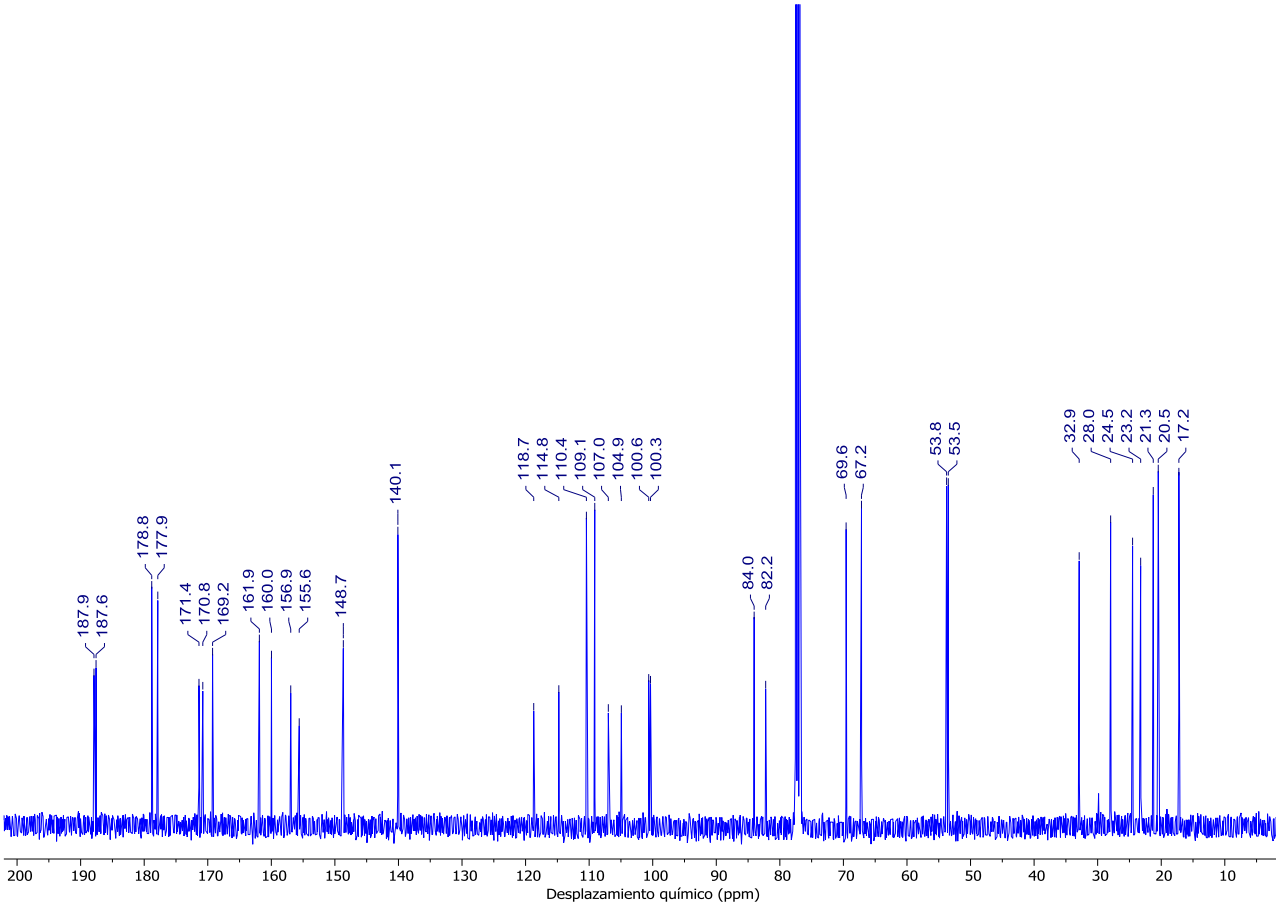


Figura 17. Espectros de RMN ^{13}C del compuesto **1** (100MHz, $CDCl_3$).

Los conjuntos de señales característicos en los espectros de RMN del producto **1** se describen a continuación:

a) Cuatro grupos hidroxilo quelatados en δ_H 13.90, 13.78, 11.54 y 11.37 (8-OH, 1'-OH, 1-OH y 8'-OH).

b) Cuatro señales simples en δ_H/δ_C 3.79 (s)/53.7; 3.64 (s)/54.5 y 2.08 (s)/20.5, y una señal doble en δ_H 0.92 (d, J = 6.4 Hz)/17.2. El desplazamiento químico (δ_H/δ_C) de las dos primeras señales es diagnóstica para la presencia de dos grupos metoxilo y la señal en δ_H 2.08 es congruente con la presencia de un grupo metilo sobre doble el sistema aromático.

c) Finalmente, un conjunto de dos señales dobles características de un sistema de tipo AB en armonía con la presencia de dos protones aromáticos en δ_H/δ_C 7.14 (1H, d, J = 8.6 Hz)/140.4 y 6.51 (1H, d, J = 8.6 Hz)/110.7 y una señal simple en δ_H/δ_C 6.47 (s)/109.4 atribuible a un tercer protón aromático.

Con base en el análisis anterior y el análisis comparativo de los datos espectroscópicos obtenidos con aquellos reportados en la literatura, el compuesto **1** caracterizó como la neosartorina (Proksa *et al*., 1998; **Figura 18**).

Cuadro 6. Datos espectroscópicos de RMN (^{1}H, 400 MHz y ^{13}C, 100 MHz en $CDCl_3$) del compuesto **1**.

Posición	δ_H, mult (*J* en Hz)	δ_C	δ_H, mult (*J* en Hz)[a]	δ_C[a]
1		160.3		159.9
1'		162.2		161.8
2		119.0		118.4
2'	6.58, d (8.6)	110.7	6.58, d (8.6)	110.0
3		149.0		148.5
3'	7.15, d (8.6)	140.4	7.12, d	139.8
4	6.48, s	109.4	6.47, s	108.9
4'		115.1		114.5
4a		157.2		156.7
4'a		155.9		155.3
5	4.36, dd (4.1, 2.0)	67.5	4.36, dd (4.1, 1.7)	66.8
5'	5.28, d (1.5)	69.9	5.28, d (1.4)	69.2
6		23.6		22.9
6'	2.31, m	28.3	2.31, m	27.6
6ec	2.15, m		2.14, m (7.0, 1.0)	
6ax	1.99 m		1.97, m (14.9, 11.4, 6.9)	
7		24.8		24.2
7'		33.2		32.4
7ax	2.84 ddd (18.7, 11.4, 7.0)		2.83, m (19.1)	
7ec	2.37, m		2.37, m	
7'ec	2.37, m		2.37, m (18.8)	
7'ax	2.37, m		2.37, m	
9		100.9		100.4
9'		100.7		100.0
9a		188.2		187.7
9'a		187.9		187.8
9b		105.2		104.7
9'b		107.0		106.7
10		84.1		83.8
10'		82.3		81.9
11		171.4		171.0
11'		170.8		170.5
12	3.79, s	53.7	3.78 s	53.6
12'	3.65, s	54.5	3.64, s	53.2
13'	0.92, d (6.2)	17.2	0.92, d	17.2
1-OH	11.54, s		11.53, s	
1'-OH	13.78, s		13.78, s	
CH_3	2.08, s	20.5	2.07, s	20.8
5'-OCO		169.2		169
5'-$OCOCH_3$	1.92, s	21.2	1.92, s	20.3
8-OH	13.90, s		13.90, s	
8'-OH	11.37, s		11.36, s	

[a]Proksa *et al*., 1998

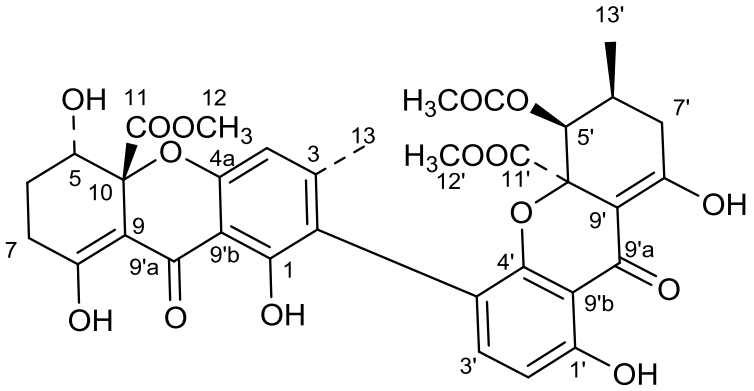


Figura 18. Estructura química de la neosartorina (**1**).

Este producto fue aislado por primera vez de *Neosartorya fischeri* en 1998 como un pigmento amarillo (Proksa *et al*., 1998), y posteriormente de las especies *Aspergillus fumigatiaffinis* (Ola *et al*. 2014), *A. novofumigatus* (Matsuda *et al*., 2018) y *A. lentulus* (Li *et al*., 2016). En este trabajo, la cepa CC7-12 fue caracterizada taxonómicamente como *Aspergillus* sp. con base al análisis de su secuencia ITS.

El potencial antifúngico de la neosartorina (**1**), compuesto mayoritario presente en la fracción CC7-12-F_7, se ilustra en el **Cuadro 7**. Se puede observar que este producto inhibe el crecimiento de *A. solani* a las dos concentraciones evaluadas (250 y 25 μg/mL,) en un 22.3 y 9.1%, respectivamente. En el caso de *F. oxysporum*, la inhibición fue del 43.5 y 34.8% a las mismas concentraciones de prueba. Debido a que las demás fracciones no mostraron actividad o fue menor a la que contenía a la neosartorina (**1**), se puede establecer que ese compuesto es el agente activo presente en el extracto. Estos resultados muestran que la neosartorina (**1**) no solo presenta actividad contra bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Li *et al.* 2016), *S. epidermidis (*Lee *et al*. 2013*)*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp. y *Bacillus subtilis* (Ola *et al*. 2014), como se había descrito previamente, sino que también exhibe un efecto antifúngico. Finalmente, otros estudios han permitido establecer su potencial como agente anticancerígeno debido a su actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares (Lee *et al*. 2013; Wezeman *et al*., 2014).

Cuadro 7. Resultados de la actividad antifúngica de las fracciones primarias del hongo CC7-12.

Clave	**% de inhibición del crecimiento**									
	A. solani					*F. oxysporum*				
	250 μg			25 μg		250 μg			25 μg	
CC7-12-F_6	22.7			9.1		43.5			34.8	
CC7-12-F_7	22.3			9.1		43.5			34.8	
CC7-12-F_9	0.0			0.0		34.8			26.1	
CC7-12-F_{10}	22.7			18.2		0.0			0.0	
CC7-12-F_{11}	22.3			13.6		0.0			0.0	
MeOH	0.0					0.0				
	1 μg	2.5 μg	5 μg	7.5 μg	10 μg	1 μg	2.5 μg	5 μg	7.5 μg	10 μg
Nistatina	40.9	45.5	50.0	54.5	54.5	48.0	48.0	52.0	52.0	52.0
Nota: Las fracciones CC7-12-F_{1-5}, CC7-12-F_8 y CC7-12-F_{12-17} fueron inactivas.										

7. CONCLUSIONES

El trabajo realizado en este proyecto representa una contribución original al conocimiento científico en el campo de los productos naturales, en particular, de los microorganismos como fuentes potenciales para la obtención de moléculas con actividad contra patógenos de cultivos de importancia agrícola.

El estudio químico de los organismos aislados del valle de CC, en particular de la especie CC7-12 (*Aspergillus* sp.), permitió el aislamiento de la neosartorina (**1**), compuesto mayoritario presente con actividad antifúngica moderada.

8. PERSPECTIVAS

La caracterización estructural de otros compuestos obtenidos a partir de las fracciones activas CC7-12-F_9, CC7-12-F_{10} y CC7-12-F_{11}.

La evaluación de la neosartorina (**1**) y de los compuestos mencionados anteriormente contra otros patógenos de interés agronómico, así como el establecimiento de los valores de concentración efectiva 50.

Determinar el mecanismo de acción posible por el cual la neosartorina (**1**) ejerce su actividad antifúngica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aparicio-Cuevas M. A. (2019) Bioprospección de microorganismos de hábitats inexplorados de México para el descubrimiento de principios biodinámicos. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Atlas Agroalimentario 2012-2018, 1ra. Edición, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

- Báez-Pérez A., Arreola T. J., Triomphe B., Bautista C. A., Licea M. P. de J. (2012) Implementación de la siembra directa para producción de cebada maltera en el Estado de Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas,* 3(8), 1509-1519.

- Barkai-Golan R., Paster N. (Eds.). (2011) *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Elsevier, 15-185.

- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control*. Elsevier, 268-320.

- Camiña-Blando R.E. (2018) Actividad antimicrobiana y estudios de derreplicación y químicos de hongos saprófitos de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Cantrell C.L., Dayan F.E., Duke S.O. (2012) Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75, 1231-1242.

- Cutler H.G., Crumley F.G., Cox R.H., Hernandez O., Cole R. J., Dorner J.W. (1979) Orlandin: a nontoxic fungal metabolite with plant growth inhibiting properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(3), 592-595.

- Cutler H.G., Cutler S.J. (1999) *Biologically active natural products: pharmaceuticals*. CRC Press, p. 10-11.

- De Vries R.P., Gelber I.B., Andersen M.R. (Eds.) (2016) *Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era*. Caister Academic Press, p. 11-15.

- Dictionary of Natural Products (DNP) (2019) http://dnp.chemnetbase.com.

- Evidente A., Amalfitano C., Pengue R., Altomare C. (1999) High performance liquid chromatography for the analysis of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two antifungal α-pyrones from *Fusarium semitectum*. *Natural Toxins*, *7*(4), 133-137.

- Fajardo-Hernández C.A. (2017) Aislamiento e identificación de metabolitos biodinámicos a partir de la especie endófita *Biscogniauxia* sp. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Fernández-Cruz M.L., Mansilla M.L., Tadeo J.L. (2010) Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), 113-122.

-FRAC Code (The Fungicide Resistance Action Committee) (2007)

- Frisvad, J. C., Larsen, T. O. (2015). Chemodiversity in the genus Aspergillus. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 7859-7877.

- Fujimoto Y., Miyagawa H., Tsurushima T., Irie H., Okamura K., Ueno, T. (1993) Structures of antafumicins A and B, novel antifungal substances produced by the fungus *Aspergillus niger* NH-401. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(7), 1222-1224.

- Gallez L., Fernandez L., Cibanal I. (2017) Propóleos: su uso como biofungicida agrícola. *Ciencia hoy*, 26 (155), 55-59.

- Halling-Sørensen B., Nielsen S., Lanzky P., Ingerslev F., Lützhøft H., Jørgensen S. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393.

- Hamed A., Ismail M., El-Metwall M., Frese M., Stammler G., Sewald N., Shaaban M. (2019) X-ray, structural assignment and molecular docking study of dihydrogeodin from *Aspergillus terreus* TM8. *Natural Product Research*, 33(1), 117-121.

- Hashem M., Alamri S., (2009) The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava L*.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 123-130.

- Hernández-Landa L., López-Collado J., Nava-Tablada M. E., García-García C.G., Osorio-Acosta F. (2017) Percepción de la problemática del Huanglongbing por agentes relevantes en zonas urbanas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas,* 8(4), 993-1000.

- Hosoe T., Mori N., Kamano K., Itabashi T., Yaguchi T., Kawai K. (2011) A new antifungal yellow pigment from *Aspergillus nishimurae*. *The Journal of Antibiotics*, 64(2), 211-212.

Komarek M., Čadková E., Chrastný V., Bordas F., Bollinger J.C. (2009) Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environmental International*, 36, 138-151.

- Lam K.S. (2007) New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, 15(6), 279-289.

- Lee M., Park H., Son G., Lee C. (2013) Liquid chromatography-mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Aspergillus* spp. and evaluation of the biological activity of its unique metabolite, neosartorin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 932-941.

- Li T., Yang, M., Wang Y., Wang X., Luo J., Kong L. (2016) Unusual dimeric tetrahydroxanthone derivatives from *Aspergillus lentulus* and the determination of their axial chiralities. *Scientific Reports*, 6, 38958.

- Light D., Knight A., Henrick C., Rajapaska D., Lingren B., Dickens J., Reynolds K., Buttery R., Merrill G., Roitman J., Campbell B. (2001) A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Naturwissenschaften*, *88*(8), 333-338.

- Liu R., Li H., Yang J., An Z. (2018) Quinazolinones isolated from *Aspergillus* sp.*,* an endophytic fungus of *Astragalus membranaceus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54 (4), 808-810.

- Liu Y., Li X., Meng L., Wang B. (2015) Polyketides from the marine mangrove-derived fungus *Aspergillus ochraceus* MA-15 and their activity against aquatic pathogenic bacteria. *Phytochemistry Letters*, 12, 232-236.

- Machorro J. C. (2015) http://www.miambiente.com.mx/comunitarias/pierde-mexico-mas-del-20-de-sus-cultivos-por-plagas.

- Macías M., Ulloa M., Gamboa A., Mata R. (2000) Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Journal of Natural Products*, 63(6), 757-761.

- Matsuda, Y., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O. (2018). Genetic Characterization of Neosartorin biosynthesis provides insight into heterodimeric natural product generation. *Organic Letters*, *20*(22), 7197-7200.

- Meyer V., Wu B., Ram A.F. (2011) *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters*, *33*(3), 469-476.

- Monti F., Ripamonti F., Hawser S., Islam K. (1999) Aspirochlorine: A highly selective and potent inhibitor of fungal protein synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 52(3), 311-318.

- Mühlenfeld A., Achenbach H. (1988) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 35. Mitt. Asperdurin, ein neues antimykotisches Phthalid aus *Aspergillus duricaulis*. *Archiv der Pharmazie*, 321(11), 803-805.

- Ola A., Debbab A., Aly A., Mandi A., Zerfass I., Hamacher A., Proksch P. (2014) Absolute configuration and antibiotic activity of neosartorin from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*. *Tetrahedron Letters*, 55(5), 1020-1023.

- Patriarca A. (2016) *Alternaria* in food products. *Food Mycology*, 11, 1-9.

- Pérez-Corral D.A., García-González N.Y., Gallegos-Morales G., Ruiz-Cisneros M.F., Berlanga-Reyes D. Ríos-Velasco C. (2015) Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagónicos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1629-1638.

-Prieto-Barajas C. M., Valencia-Cantero E., Santoyo G. (2017) Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity and biotechnological application*, Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 48-56.

- Proksa B., Uhrin D., Liptaj T., Sturdíková M. (1998) Neosartorin, an ergochrome biosynthesized by *Neosartorya fischeri*, *Phytochemistry*, 48(7), 1161-1164.

- Prusky, D., Keen, N. T. (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease, 77*(2), 114-119.

- Qiao M., Ji N., Liu X., Li K., Zhu Q., Xue Q. (2010) Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(19), 5677-5680.

- Sakai K., Chiba H., Kaneto R., Sakamoto M., Okamura K., Tone H. (1994) Mer-NF8054A and X, novel antifungal steroids, isolated from *Aspergillus* sp. *The Journal of Antibiotics*, 47(5), 591-594.

- Sinclair, W. B. (1972). *The grapefruit: its composition, physiology & products*. UCANR Publications.

- Singh D., Sharma R. (2018) Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management, *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, India, Academic Press, p. 2-5.

- Slusarenko A.J., Patel A., Portz D. (2008) Control of plant diseases by natural products, *European Journal of Plant Patholog*y, 121, 313-322.

- Souza V., Escalante A., Espinoza L., Valera A. (2004) *Ciencias*, 75, 4-12.

- Suzuki Y., Takahashi H., Esumi Y., Arie T., Morita T., Koshino H., Yamaguchi,I. (2000) Haematocin, a new antifungal diketopiperazine produced by *Nectria haematococca*

- Tabashnik B., Huang F., Ghimire M., Leonard B., Siegfried B., Rangasamy M., Yang Y., Wu Y., Gahan L., Heckel D., Bravo A., Soberón M. (2011) Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature biotechnology*, *29*(12), 1128.

- TePaske M.R., Gloer J.B., Wicklow D.T., Dowd P.F. (1990) Aflavazole: a new antiinsectan carbazole metabolite from the sclerotia of *Aspergillus flavus*. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(18), 5299-5301.

- Tripathi P., Dubey N. (2004) Exploitation of natural products as alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables, *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 235-245.

- Velásquez-Valle R., Reveles-Hernández M., Reveles-Torres L (2017) Identificación de enfermedades causadas por hongos en cultivos de Aguascalientes, Durango y Zacatecas. Folleto Técnico 90. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP, p. 86.

- Vilchis-Romero V. (2018) Potencial herbicida de hongos saprófitos y marinos facultativos de México. Tesis que obtener el título de Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Villedas-Hernández O. (2018) Bioprospección de hongos de Cuatro Ciénegas Coahuila, para el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Wezeman T., Bräse S., Masters K. (2014) Xanthone dimers: a compound family wich is both common and privileged, *Natural Product Reports*, 32(1), 6-28.

- Yeverino-Sánchez I.Y. (2018) Obtención de metabolitos biodinámicos a partir de hongos selectos de la reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Yadav, A.N. (2019). *Recent advancement in white biotechnology through fungi:* Volume 2: Perspective for value-added products and environments, Springer, India, p. 1-15.