

Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

**“Exploración de la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios
producidos por el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col aislado de una
colonia de hormigas *Apterostigma dentigerum*”**

Trabajo de Grado como requisito para optar por el título de:
Licenciado en Química

Abraham Isaac Mordock Pinzón
8-972-1620

Asesor: Dr. Humberto Ortega

Panamá
2025

Dr. Humberto Ortega
Asesor
Departamento de Química Orgánica

CONTENIDO

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas.....	6
Lista de abreviaturas y términos.....	7
Agradecimientos.....	9
Dedicatoria.....	10
Resumen	11
Introducción.....	13
Capítulo 1: Marco Teórico	14
1.1 Simbiosis en las colonias de hormigas cultivadoras de hongos	15
1.2 Compuestos previamente aislados del hongo <i>Luteomyces thricodermoides</i> 0.8col 16	
1.3 Clasificación de <i>Escovopsis</i>	17
1.4 Importancia del descubrimiento de nuevos compuestos antifúngicos.....	18
Capítulo 2 :Objetivos.....	19
2.1 Objetivo General:	20
2.2 Objetivos Específicos:	20
Capítulo 3: Metodología.....	21
3.1 Equipos, disolventes y materiales utilizados	22
3.2 Aislamiento del hongo <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col.....	23
3.3 Cultivo y selección de medios para <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col	23
3.4 Cultivo a gran escala del hongo <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col.....	24
3.5 Purificación de compuestos obtenidos del hongo <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col 24	
3.6 Aislamiento del compuesto TP-68-3 de un cultivo previo del mismo hongo	26
3.7 Bioensayo contra hongos <i>Aspergillus brasiliensis</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	27
3.8 Bioensayo contra <i>Escovopsis sp</i> y Hongos Mutualistas.....	27
3.9 Bioensayo contra <i>Candida albicans</i>	28
3.9.1 Preparación del estándar de turbidez	28
3.9.2 Preparación del inóculo	28
3.9.3 Siembra de la muestra.....	28
3.10 Medición de rotación específica de compuestos	29

Capítulo 4: Resultados y Discusión.....	30
4.1 Comparación del crecimiento del hongo <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col en medios de cultivo comerciales.....	31
4.2 Elucidación estructural de compuestos aislados del hongo <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col	32
4.2.1 Compuesto Roussoellide	32
4.2.2 Compuesto Arthrospolide A.....	34
4.2.3 Compuesto TP-68-3.....	37
4.2.4 Compuestos TP-98-1	41
4.3 Bioensayos Antifúngicos.....	44
4.3.1 Bioensayo de fracciones contra <i>Aspergillus brasiliensis</i>	44
4.3.2 Bioensayo de fracciones contra <i>Fusarium oxysporum</i>	45
4.3.3 Bioensayo de TP-68-3 contra <i>Candida albicans</i>	46
4.3.4 Bioensayo de TP-68-3 contra <i>Escovopsis</i> sp.....	46
4.3.5 Bioensayo de TP-68-3 contra hongos mutualistas	47
Conclusiones.....	48
Recomendaciones	49
Referencias Bibliográficas.....	50
Anexos	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los compuestos TP-38-2, TP-39-5 y TP-44-3.....	16
Figura 2. Estructura química del compuesto TP-43-2 y sus análogos.	17
Figura 3. Comparación de la morfología de hongos Escovopsis (A) Escovopsis weberi ATCC 64542; (B) Escovopsis aspergilloides CBS 423.93; (C) Escovopsis moelleri CBS 135748; (D) Escovopsis lentecrescens CBS 135750; (E) Escovopsis microspora CBS 13575; (F) Escovops nivea CBS 135749 (Augustin et al., 2013).....	18
Figura 4. Estructura del compuesto Roussoellide.	32
Figura 5. Principales correlaciones vistas en el COSY y HMBC del compuesto Roussoellide.	33
Figura 6. Estructura del compuesto Arthrospolide A.....	34
Figura 7. Principales correlaciones en el espectro COSY y HMBC del compuesto Arthrospolide A.	34
Figura 8. Análisis de la configuración relativa de los compuestos Roussoellide.....	36
Figura 9. Análisis de la configuración relativa de los compuestos Arthrospolide A.	37
Figura 10. Estructura del compuesto TP-68-3.....	37
Figura 11. Principales correlaciones en el espectro COSY y HMBC del compuesto TP-68-3.	38
Figura 12. Análogos de compuesto TP-68-3.....	38
Figura 13. Equilibrio de isómeros de TP-68-3, vía retro-Aldol y Aldol.	39
Figura 14. Análisis de la configuración relativa del compuesto TP-68-3.	40
Figura 15. Estructura del compuesto TP-98-1.....	41
Figura 16. Principales correlaciones en el espectro gCOSY y gHMBC del compuesto TP-98-1.....	41
Figura 17. Análisis de la configuración relativa del compuesto TP-98-1.	43
Figura 18. Resultados de bioensayo contra el hongo Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 obtenido de blueberry: A) Control positivo frontal (Nistatina). B) Control positivo posterior (Nistatina). C) Compuesto TP-68-3. D) Control negativo.	44
Figura 19. Resultados de bioensayo contra el hongo Fusarium oxysporum ATCC 48112: A) Control positivo frontal (Nistatina). B) Control positivo posterior (Nistatina). C) Compuesto TP-68-3. D) Control negativo.	45
Figura 20. Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> : A) TP-68-3 (25 µg), B) Nistatina (25 µg).....	46
Figura 21. Actividad antifúngica contra Escovopsis sp.: A) TP-68-3, B) Control Negativo.	46
Figura 22. Actividad antifúngica contra hongos mutualistas (4 días a 26 °C): A) TP-68-3 (50 µg) vs Apt7, B) Nistatina (50 µg) vs Apt7, C) DMSO (control negativo) vs Apt7.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Masas obtenidas de la inoculación del hongo <i>Luteomyces trichodermoides</i> 08.col en diversos medios comerciales.	31
Tabla 2. Comparación de datos experimentales de RMN- ¹ H y ¹³ C de Roussoellide en CDCl ₃ a 500 (¹ H) y 125 (¹³ C) MHz y los datos de la literatura 300 (¹ H) y 75 (¹³ C) MHz... 33	33
Tabla 3. Comparación de datos experimentales de RMN- ¹ H y ¹³ C de Arthrospolide A en CDCl ₃ a 500 (¹ H) y 125 (¹³ C) MHz y los datos de la literatura 300 (¹ H) y 75 (¹³ C) MHz. . 35	35
Tabla 4. Datos de ¹ H y ¹³ C NMR de los compuestos TP-68-3A y TP-68-3B en CDCl ₃ 500 (¹ H) y 125 (¹³ C) MHz.	39
Tabla 5. Datos de ¹ H y ¹³ C NMR del compuesto TP-98-1 en CDCl ₃ 500 (¹ H) y 125 (¹³ C) MHz.	42

LISTA DE ABREVIATURAS Y TÉRMINOS

AcOEt = Acetato de etilo

ACN = Acetonitrilo

ATCC = American Type Culture Collection

brd = Doblete ancho

brs = Singulete ancho

cm = Centímetro

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures

CDCl₃ = Cloroformo deuterado

CD₃OD = Metanol deuterado

DMSO = Dimetilsulfóxido

d = Doblete

dd = Doble doblete

ddd = Doble doble doblete

ddq = Doble doble cuarteto

ESI = Ionización por electrospray

gCOSY = Gradient correlation spectroscopy

gHSQC = Gradient heteronuclear single-quantum correlation

gHMBC = Gradient heteronuclear multiple-bond correlation

gNOESY = Gradient Nuclear Overhauser effect spectroscopy

HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Resolución

MEA = Malt Extract Agar

MeOH = Metanol

MHz = Megahercio

MS = Espectrometría de Masas

μL = Microlitro

mg = Miligramo

mm = Milímetro

m = Multiplete

OMS = Organización mundial de la salud

PDA = Agar de papa y dextrosa

RMN = Resonancia Magnética Nuclear

RMN ¹³C = Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H = Resonancia Magnética Nuclear de Protón

s = Singulete

SAB = Sabouraud

TSA = agar tripticasa de soya

UPLC = Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución

UV = Ultravioleta

°C = Grados Celsius

δ = Desplazamiento químico

AGRADECIMIENTOS

Al Sistema Nacional de Investigación (SNI) y la SENACYT por financiar la investigación presentada en esta tesis.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá y al Laboratorio de Bioorgánica Tropical por facilitar los laboratorios y equipos para realizar la mayoría de los experimentos presentados en esta tesis.

Al Profesor Daniel Torres por ayudar a obtener los espectros de masas de las muestras analizadas.

Al Licenciado Ricardo Santamaría y Randy Mojica por ayudar a obtener los espectros de RMN en INDICASAT-AIP.

A la Magíster Nivia Ríos por ayudar a realizar los bioensayos antifúngicos.

Al Dr. Hermógenes Fernández-Marín por realizar la colecta de la colonia de hormigas *Apterostigma dentigerum*, y por el aislamiento del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col.

Al Dr. Humberto Ortega por permitirme formar parte de su proyecto, por asesorarme en cada paso y guiarme durante toda la investigación.

DEDICATORIA

A Dios, quien ha sido mi luz y mi guía en cada paso de este camino. Sin su amor incondicional y su fortaleza en los momentos difíciles, este sueño no habría sido posible.

A mis padres Enick y Adria, cuyo amor, sacrificio y apoyo infinito me han formado y llevado hasta aquí. Gracias por ser mi pilar, por cada consejo y por enseñarme el valor de la perseverancia.

A mi tía Melitza, quien ha sido como una segunda madre para mí. Su cariño y respaldo inquebrantable han hecho de este proceso un trayecto más llevadero.

A mis primos Jair y Adrianis, por su compañía, por las risas, por estar siempre pendientes de mí y por llenar mi vida de recuerdos hermosos que atesoro con el alma.

A mi hermano Enick, mi cómplice y confidente, gracias por estar ahí, por apoyarme en cada decisión y brindarme un cariño genuino.

A mi fiel compañero Marshall, que con su silenciosa compañía en las largas noches de estudio me recordó que incluso en la soledad, nunca estuve solo.

A mis queridas abuelas Oreida y Lola, quienes, aunque ya no están físicamente, viven en mi corazón. Sé que desde donde estén, sonríen con orgullo al ver este logro cumplido.

A Ana, mi compañera de laboratorio y mejor amiga, por compartir este viaje lleno de desafíos, por su apoyo incondicional y por demostrarme que la amistad verdadera trasciende cualquier obstáculo.

A mis grandes amigas Sara, Cecifel y Gissel por su sinceridad, por cada palabra de aliento y por ser refugio en los momentos de estrés. Su amistad ha sido un regalo invaluable en esta etapa de mi vida.

A todas aquellas personas que, con su apoyo, conocimiento y guía, contribuyeron a mi formación académica y a mi crecimiento personal durante este periodo. Su compañía ha sido fundamental en este camino, y les expreso mi más sincero agradecimiento.

A todos ustedes, con amor y gratitud eterna. Esta meta alcanzada también es suya.

RESUMEN

Los hongos del género *Escovopsis* poseen la capacidad de producir metabolitos especializados con propiedades antibacterianas, insecticidas y antifúngicas que afectan significativamente el ecosistema de las hormigas del género *Attini*. Estos metabolitos inhiben el crecimiento de bacterias y hongos mutualistas que son fundamentales para la dieta y la salud de las hormigas, alterando así su equilibrio ecológico. Además, *Escovopsis* afecta el comportamiento de las hormigas, interfiriendo en sus actividades de cultivo y cuidado de los hongos mutualistas. No solo incide en las colonias de hormigas individuales, sino que también tiene la capacidad de inhibir hongos del mismo género presentes en distintas colonias, demostrando su amplia capacidad de propagación y su impacto en la dinámica ecológica de estas comunidades.

Esta investigación se centró en el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col, previamente identificado con el género *Escovopsis* y estudiado por el laboratorio del Dr. Hermógenes Fernández Marín del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP), así como por el Dr. Humberto Ortega del laboratorio de Bioorgánica Tropical de la Universidad de Panamá.

Con el objetivo de comparar los perfiles químicos de diferentes medios de cultivo comerciales, se realizó un cultivo a pequeña escala de *Luteomyces trichodermoides* 08.col. Durante este proceso, se obtuvo el extracto crudo utilizando acetato de etilo, el cual fue analizado mediante UPLC-UV-ESI-MS. Los resultados obtenidos indicaron que el medio PDA (Potato Dextrose Agar) favorecía un mejor crecimiento del hongo en comparación con otros medios de cultivo comerciales.

Posteriormente, se procedió a un cultivo a gran escala utilizando PDA como medio de cultivo para optimizar la producción de metabolitos. Tras el crecimiento del hongo, se cortó el medio de cultivo y se sometió a liofilización para garantizar una mayor eficiencia en la maceración y la posterior obtención del extracto crudo. El extracto se obtuvo mediante el uso de acetato de etilo como disolvente y fue sometido a un fraccionamiento mediante extracción en fase sólida con fase reversa (SPE) a distintas polaridades, lo que permitió la separación de los componentes presentes en el extracto. Este proceso dio lugar a la obtención de 10 fracciones

distintas. De estas fracciones, las tres primeras fueron seleccionadas para purificar los compuestos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se determinaron sus estructuras por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de masas.

Se aislaron cuatro compuestos de interés, entre los cuales se identificaron dos compuestos previamente registrados: Arthrospolide A y Roussoellide, los cuales están documentados en la literatura. Además, se identificaron dos policétidos no descritos anteriormente. El primer compuesto, TP-68-3, aunque presenta ciertas similitudes con el Arthrospolide A, muestra diferencias en la estructura, particularmente en el carbono C-7, donde se encuentra un éster. Además, en el carbono C-10 se detecta un grupo carbonilo. El segundo compuesto, TP-98-1, a diferencia del TP-68-3, tiene un éster en el carbono C-8 y su carbono C-10 está reducido a un grupo hidroxilo.

Los resultados de los bioensayos mostraron que solo el compuesto TP-68-3 presentó actividad antifúngica contra *Aspergillus brasiliensis*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, hongos mutualistas, e incluso contra hongos del género *Escovopsis sp.*

INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Escovopsis* han generado gran interés por sus propiedades biológicas, como su actividad antimicrobiana y antifúngica. A pesar de su potencial, pocos compuestos de estos hongos han sido identificados en la literatura, por lo que se estima que aún existen muchos más por descubrir.

Bajo este contexto, esta tesis continúa el trabajo iniciado por Tania Pérez y el Dr. Humberto Ortega, centrado en el estudio de los metabolitos secundarios del hongo *Luteomyces thricodermoides* 08.col, aislado de una colonia de hormigas *Apterostigma dentigerum*. En su investigación realizada, se lograron aislar cuatro compuestos no descritos previamente en la literatura: tres policétidos (TP-39-5, TP-38-2 y TP-44-3) y una butenolida aromática (TP-43-2) (Pérez, 2022).

Al comparar los compuestos identificados en el estudio de este hongo, se observó que varios de los policétidos analizados son análogos de la familia de los spiroleptosphols. Entre estos análogos se encuentran compuestos como el Spiroleptosphol B, conocido por su actividad citotóxica (Hashimoto et al., 2008), y el Oxaspirol A, que ha mostrado propiedades antimicrobianas (Doi et al., 1985). Debido a estas similitudes estructurales, se hipotetizó que los compuestos descubiertos podrían tener actividad biológica. Sin embargo, los bioensayos realizados no arrojaron resultados positivos en cuanto a la actividad esperada. A pesar de ello, las fracciones obtenidas sí demostraron actividad antifúngica y antimicrobiana, lo que motivó la decisión de continuar con la investigación.

Luego de la sustentación de tesis de Tania Pérez, se logró determinar la metodología óptima para el aislamiento del compuesto activo TP-68-3. Este compuesto, en el cultivo actual, se produjo en cantidades limitadas, por lo que se optó por trabajar con el extracto previamente obtenido, con el fin de poder realizarle los bioensayos en la tesis a continuación y obtener resultados más consistentes.

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1 SIMBIOSIS EN LAS COLONIAS DE HORMIGAS CULTIVADORAS DE HONGOS

En la literatura, el término "simbiosis" tiene dos acepciones. La clásica se refiere a cualquier asociación entre organismos, sin especificar la interacción, mientras que la moderna se limita a relaciones donde ambos organismos obtienen beneficios mutuos, sinónimo de "mutualismo" (Hilje, 1984). Las relaciones simbióticas son una fuente clave de innovación evolutiva, promoviendo la diversidad en interacciones mutualistas y parasitarias. En las últimas décadas, ha mejorado la comprensión de las interacciones microbio-insecto, especialmente en las hormigas Attini y sus simbioses microbianas, uno de los ejemplos más estudiados de coevolución parasítica y mutualista entre insectos y microbios (Meirelles et al., 2015). Las hormigas Attini cultivan hongos basidiomicetos como única fuente de alimento de las larvas y principal fuente de alimento para las hormigas adultas. Proveen al hongo simbiote de un sustrato nutritivo para que puedan desarrollarse y las nuevas reinas puedan transportarlo a nuevas colonias (Branstetter et al., 2017).

Otra relación simbiótica en estos ecosistemas ocurre entre las hormigas Attini y las bacterias Actinomycetes (*Pseudonocardia* y *Streptomyces*). Estas bacterias crecen y se nutren sobre el exoesqueleto de las hormigas y producen metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de los hongos parásitos *Escovopsis*, los cuales pueden destruir los jardines de las hormigas attines (Currie, Mueller, & Malloch, 1999). Las hormigas favorecen el crecimiento de las Actinobacterias, a través de la transmisión vertical a nuevas colonias y le ofrecen alimento, a través de glándulas subcuticulares en el exoesqueleto de las hormigas (Currie et al. 2003; Haeder et al., 2009).

La asociación hormiga-cultivo-parásito-bacteria es, por tanto, una simbiosis cuatripartita, considerada una de las más complejas descubiertas en la naturaleza. Las hormigas Attini parecen haber cultivado hongos durante más de 50 millones de años. Este mutualismo se caracteriza por una congruencia evolutiva ancestral, donde grupos específicos de hormigas Attini se han especializado en cultivar hongos particulares (Currie et al., 2003).

1.2 COMPUESTOS PREVIAMENTE AISLADOS DEL HONGO *LUTEOMYCES THRICODERMOIDES* 0.8COL

Este hongo presenta principalmente compuestos policétidos análogos de la familia de los spiroleptosphols. En una investigación previa, se logró identificar compuestos registrados en la literatura, como el Arthrospolide D, pero también se detectaron compuestos que no fueron previamente reportados, tales como TP-38-2 y TP-39-5, los cuales se diferencian en la posición axial de los grupos hidroxilo en los carbonos C-7 y C-8. Además, se encontró el compuesto TP-44-3, que presenta un grupo éster en el carbono C-7 (**Figura 1**) (Pérez, 2022). Algunos análogos de estos compuestos incluyen spiroleptosphol, spiroleptosphol B, spiroleptosphol C, norleptosphol C y hydroleptosphol, los cuales fueron aislados previamente del hongo *Leptosphaeria doliolum*. El compuesto spiroleptosphol B destaca por su actividad citotóxica (Hashimoto et al., 2008). Por otro lado, el compuesto Oxaspirol A, otro análogo de esta familia ha demostrado tener actividad antimicrobiana (Jun Doi et al., 1985).

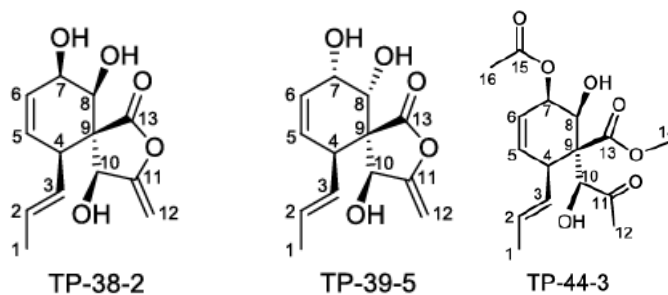


Figura 1. Estructura de los compuestos TP-38-2, TP-39-5 y TP-44-3.

También se logró identificar una butenolida aromática, el compuesto TP-43-2, el cual es muy similar al compuesto malfilamentoside A (Pérez, 2022). La diferencia principal radica en la presencia de un grupo metoxilo en el carbono C-6', y en comparación con el análogo gotjawaside, se distingue por tener un grupo hidroxilo en el carbono C-11 (**Figura 2**) (Xu et al., 2008; Pérez, 2022).

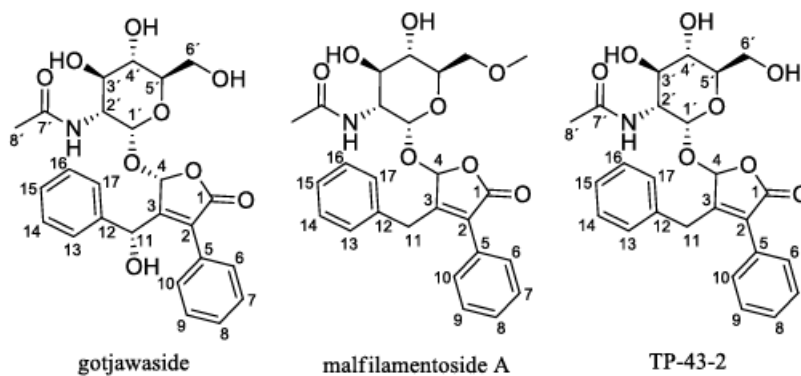


Figura 2. Estructura química del compuesto TP-43-2 y sus análogos.

1.3 CLASIFICACIÓN DE ESCOVOPSIS

Este hongo patógeno se ha logrado clasificar recientemente en tres diferentes géneros, los cuales son: *Sympodiorosea*, que tiende a crecer de manera más lenta y posee un color rosado; *Luteomyces*, que suele ser de color amarillo; y *Escovopsis*, de color marrón (Montoya et al., 2021).

Dentro de las especies que están formalmente descritas del género *Escovopsis*, se han aislado cuatro de colonias de hormigas cortadoras de hojas en Brasil, incluida *Escovopsis moelleri* y *Escovopsis microspora* de nidos de *Acromyrmex subterraneo molestantis*; *Escovopsis weberi* de un nido de *Atta* sp.; y *Escovopsis lentecrescens* de un nido de *Acromyrmex subterraneus*. La quinta especie, *Escovopsis aspergilloides* fue aislado de un nido de *Trachymyrmex ruthae* de Trinidad (**Figura 3**). La sexta especie considerada como nueva, *Escovopsis trichodermoides*, fue aislada de un jardín de hongos de la hormiga *Mycocepurus goeldii* (Masiulionis et al., 2015). Recientemente, *E. kreiselii* y *E. trichodermoides* se renombraron en dos nuevos géneros, *Sympodiorosea kreiselii* y *Luteomyces trichodermoides*, respectivamente (Montoya et al., 2021).

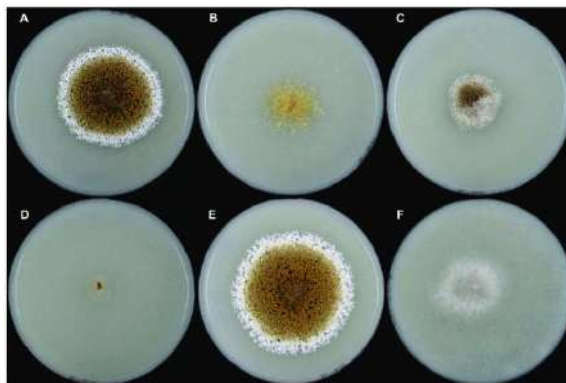


Figura 3. Comparación de la morfología de hongos *Escovopsis* (A) *Escovopsis weberi* ATCC 64542; (B) *Escovopsis aspergilloides* CBS 423.93; (C) *Escovopsis moelleri* CBS 135748; (D) *Escovopsis lentescens* CBS 135750; (E) *Escovopsis microspora* CBS 13575; (F) *Escovopsis nivea* CBS 135749 (Augustin et al., 2013).

1.4 IMPORTANCIA DEL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS

En la actualidad, las enfermedades fúngicas representan una carga significativa para la salud pública, afectando a un gran número de personas en todo el mundo (Havlickova et al., 2008). Y también las plantas se encuentran amenazadas por los hongos fitopatógenos, los cuales provocan enfermedades que generan pérdidas considerables en los cultivos (Chatterjee et al., 2016).

En respuesta a la problemática planteada y considerando los resultados obtenidos en un estudio previo, en el cual se determinó que ciertas fracciones obtenidas del extracto orgánico del cultivo en medio sólido del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col, presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes cepas de hongos del género *Escovopsis*, se decidió llevar a cabo esta investigación con el objetivo de continuar con el proceso de descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. Además, se busca identificar aquellos compuestos responsables de la actividad antifúngica observada, lo que podría abrir nuevas vías para el desarrollo de tratamientos eficaces contra infecciones fúngicas.

CAPÍTULO 2 :OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

- Explorar la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Cultivar a gran escala el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col en PDA y realizar extracciones con acetato de etilo para obtener el extracto crudo.
- Fraccionar el extracto crudo por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE-C18) y analizar las fracciones por UPLC-UV-ESI-MS.
- Purificar los compuestos producidos por el hongo utilizando el HPLC.
- Establecer la estructura química de los compuestos aislados por medio de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de masas.
- Realizar bioensayos de los compuestos obtenidos contra diferentes hongos.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 EQUIPOS, DISOLVENTES Y MATERIALES UTILIZADOS

Para el cultivo de los hongos se utilizó un autoclave Thermo Scientific Harvey SterileMax (modelo: ST75925), una cámara de flujo laminar (Labconco), y una incubadora BOD (Precision™), ubicados en los laboratorios 219, 202 y 213 de los edificios gemelos, respectivamente.

Para la obtención del extracto crudo, los medios de cultivo fueron congelados previo al tratamiento de extracción a -20°C en congelador y liofilizados con un liofilizador (Labconco) ubicados en el laboratorio 202 de los edificios de los gemelos.

El disolvente empleado para la extracción fue Acetato de etilo (Grado ACS). Los disolventes empleados para el fraccionamiento en el HPLC y para los análisis de LC-UV-Masas fueron: Agua (MilliQ) y Acetonitrilo (grado HPLC). Los disolventes para obtener los datos de Resonancia Magnética Nuclear fueron: cloroformo deuterado y metanol deuterado.

Para el fraccionamiento del extracto crudo obtenido a gran escala se utilizó un cartucho de SPE-C18 (45 µm, 10 g/70 Chromabond) y un colector de vacío (Chromabond para 12 posiciones, Macherey Nagel), ubicados en el laboratorio 219 de los edificios gemelos.

Para secar los disolventes al vacío se utilizaron los rotavapores R-215 Buchi y LABOROTA 4002-digital Heidolph, y un SpeedVac (SC210A Speedvac® plus) ubicados en el laboratorio 219 y 212 de los edificios gemelos, respectivamente.

Para el aislamiento de los compuestos se utilizó en un inicio el HPLC (Waters®, Delta 600) con la columna XTerra C18 (10µm, 250 x 10 mm) para obtener los compuestos y la columna XBridge C18 (5µm, 250 x 4.6 mm) para su purificación. Al instalarse el nuevo HPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000) se utilizó para obtener mejor resolución al purificar los compuestos en conjunto con la columna Hypersil GOLD™ (5µm, 250 x 4.6 mm).

Los datos de espectrometría de masas fueron obtenidos en el UPLC-MS (Waters® ACQUITY class H – Waters® XEVO TDQ) y una columna Shim-pack GISS (C18, 1.9 µm, 100 x 2.1 mm), ubicados en el laboratorio 208 de los edificios gemelos.

Los datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C , gHSQC, gHMBC, gCOSY y gNOESY fueron adquiridos en el Resonancia Magnética Nuclear de 500 MHz de marca JEOL, ubicado en el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).

Las rotaciones específicas fueron determinadas en un polarímetro Jasco P-2000, ubicado en el laboratorio 219 de los edificios gemelos.

3.2 AISLAMIENTO DEL HONGO *LUTEOMYCES TRICHODERMOIDES* 08.COL

Para el aislamiento del hongo se tomaron muestras de los jardines encontrados en las colonias de hormigas *Apterostigma dentigerum*, colectada en Gamboa, provincias de Panamá. Se tomaron pedazos del jardín de hongos con una pinza estéril. Se mantuvieron en contenedores de plástico esterilizados con luz ultravioleta, luego se sembraron en un medio de cultivo de PDA (39 g por litro de agua destilada), utilizando fragmentos pequeños 0.5–1 cm de diámetro, y se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 14 días. Las placas se revisaron en busca de hongos y se sub-cultivaron en nuevas placas de PDA cuando se hizo visible el crecimiento de hongo. Este proceso fue realizado por el laboratorio del Dr. Hermógenes Fernández Marín del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).

3.3 CULTIVO Y SELECCIÓN DE MEDIOS PARA *LUTEOMYCES TRICHODERMOIDES* 08.COL

Para el desarrollo del experimento, se emplearon diversos medios comerciales: avena (25 g + 100 mL de agua), arroz (25 g + 150 mL de agua), maíz (25 g + 100 mL de agua), PDA (5.85 g + 150 mL de agua), MEA (7.5 g + 150 mL de agua), pasta (25 g + 100 mL de agua) y SAB (4.5 g de Sabouraud + 2.25 g de Agar + 150 mL de agua) en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Aquellos que se encontraban en estado sólido fueron previamente pulverizados con una licuadora. Posteriormente, se procedió a la inoculación del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col en cada medio.

Las muestras inoculadas fueron incubadas a 26 °C en condiciones de oscuridad durante 14 días. Al finalizar el periodo de incubación, se realizaron extracciones con acetato de etilo. Los extractos resultantes se analizaron mediante UPLC-MS.

3.4 CULTIVO A GRAN ESCALA DEL HONGO *LUTEOMYCES TRICHODERMOIDES* 08.COL

Para el cultivo a gran escala se prepararon 20 matraces Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de medio de cultivo PDA. Se inoculó cada matraz con una solución de 2 a 3 mg de esporas en 30 mL de PDA diluido (29 g de PDA por litro de agua destilada). Luego se mantuvieron en una incubadora a 26 °C en la oscuridad durante 14 días.

3.5 PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS OBTENIDOS DEL HONGO *LUTEOMYCES TRICHODERMOIDES* 08.COL

La mitad del cultivo fue cortado en pequeños cubos y congelados a -20 °C. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de liofilización durante 3 días. Todo el material seco se transfirió en vasos químicos y se dejó con acetato de etilo durante 24 horas. Luego se colocaron en un sonicador durante 10 minutos y posteriormente se filtró el disolvente para evaporarlo al vacío. Este procedimiento de extracción sólido-líquido se repitió tres veces para obtener el extracto crudo (2.3119 g). A la otra mitad del cultivo se le realizó el mismo proceso de extracción, pero sin realizar la liofilización y se obtuvo una cantidad menor de extracto (1.9416 g). Estos resultados indican que el proceso de liofilización incrementa el rendimiento de extracción en un 16 %. La masa total obtenida de extracto crudo fue de 4.2535 g.

Por cada gramo del extracto se fraccionó con un cartucho de SPE-C18 (55 µm, 10 g/60 mL) utilizando el siguiente gradiente: 100 mL (20 % Acetonitrilo-Agua, **F1**: 1488.6 mg), 100 mL (30 % Acetonitrilo-Agua, **F2**: 1445.6 mg), 100 mL (40 % Acetonitrilo-Agua, **F3**: 235.9 mg), 100 mL (50 % Acetonitrilo-Agua, **F4**: 40.8 mg), 100 mL (60 % Acetonitrilo-Agua, **F5**: 24.2 mg), 100 mL (70 % Acetonitrilo-Agua, **F6**: 100.4 mg), 100 mL (80 % Acetonitrilo-Agua, **F7**: 160.7 mg), 100 mL (90 % Acetonitrilo-Agua, **F8**: 41.7 mg) , 100 mL (100 % Acetonitrilo, **F9**: 163.2 mg) y 100 mL (100 % Acetona, **F10**: 241.3 mg).

La fracción **F1** se inyectó en el HPLC (Waters®, Delta 600), utilizando una columna (XTerra) C18 (10 µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (20 % Acetonitrilo-Agua) a B (100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 20 % B; min 10-20, gradiente de 20 % a 100 % B; min 20-25, flujo isocrático de 100 % B; min 25-26, gradiente de 100 % a 20 % B; min 26-30, flujo isocrático de 20 % B. Se obtuvieron diez fracciones: **F1.1** (min 6.4, 2.2 mg), **F1.2** (min 7.2, 3.1 mg), **F1.3** (min 7.7, 1.4 mg), **F1.4** (min 8.6, 1.1 mg), **F1.5** (min 9.8, 1 mg), **F1.6** (min 10.6, 1.4 mg), **F1.7** (min 12.4, 2 mg), **F1.8** (min 14.3, 8.4 mg), **F1.9** (min 17.3, 1.7 mg) y **F1.10** (min 19.8, 2.2 mg).

La fracción **F2** se inyectó en el HPLC (Waters®, Delta 600), utilizando una columna (XTerra) C18 (10 µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (20 % Acetonitrilo-Agua) a B (100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 30 % B; min 10-20, gradiente de 30 % a 100 % B; min 20-25, flujo isocrático de 100 % B; min 25-26, gradiente de 100 % a 30 % B; min 26-30, flujo isocrático de 30 % B. Se obtuvieron seis fracciones: **F2.1** (min 11.4, 29.1 mg), **F2.2** (min 13.3, 11 mg), **F2.3** (min 14.8, 40.4 mg), **F2.4** (min 15.6, 14.2 mg), **F2.5** (min 17, 8.3 mg) y **F2.6** (min 19.7, 49.7 mg).

La fracción **F2.1** se inyectó en el HPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000) utilizando una columna Hypersil GOLD™ (5 µm, 250 x 4.6 mm) con un gradiente de A (100 % Agua) a B (100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 15 % B; min 5-20, gradiente de 15 % a 100 % B; min 20-26, flujo isocrático de 100 % B; min 26-27, gradiente de 100 % a 15 % B; min 27-30, flujo isocrático de 15 % B. Se obtuvieron tres fracciones: **F2.1.1** (min 11.6, 6.6 mg), **F2.1.2** (min 13.5, 0.2 mg), **F2.1.3** (min 24.4, 0.1 mg).

La fracción **F2.3** se inyectó en el HPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000) utilizando una columna Hypersil GOLD™ (5 µm, 250 x 4.6 mm) con un gradiente de A (100 % Agua) a B (100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 15 % B; min 5-20, gradiente de 15 % a 100 % B; min 20-25, flujo isocrático de 100 % B; min 25-26, gradiente de 100 % a 15 % B; min 26-30, flujo isocrático de 15 % B. Se obtuvieron tres fracciones: **F2.3.1** (min 12.8, **compuesto Arthrospolide A**: 5.8 mg), **F2.3.2** (min 13.2, **compuesto Rousoellide**: 4.5 mg), **F2.3.3** (min 13.6, 0.5 mg).

La fracción **F2.6** se inyectó en el HPLC (Waters®, Delta 600), utilizando una columna XBridge C18 (5 µm, 250 x 4.6 mm), con un gradiente de A (20 % Acetonitrilo-Agua) a B

(100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 100 % A; min 5-20, gradiente de 100 % A a 60 % B; min 20-25, flujo isocrático de 60 % B; min 25-26, gradiente de 60 % a 100 % B; min 26-29, flujo isocrático de 100 % B; min 29-30, gradiente de 100 % B a 100 % A; min 30-34, flujo isocrático de 100 % A. Se obtuvo el **F2.6.1** (min 11.4, **compuesto TP-98-1**: 11.3 mg).

La fracción **F3** se inyectó en el HPLC (Waters®, Delta 600), utilizando una columna (XTerra) C18 (10 µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (20 % Acetonitrilo-Agua) a B (100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 40 % B; min 10-20, gradiente de 40 % a 100 % B; min 20-25, flujo isocrático de 100 % B; min 25-26, gradiente de 100 % a 40 % B; min 26-30, flujo isocrático de 40 % B. Se obtuvieron tres fracciones: **F3.1** (min 15.7, 30.0 mg), **F3.2** (min 19.5, 7.8 mg), **F3.3** (min 20.4, 13.3 mg).

La fracción **F3.1** se inyectó en el HPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000) utilizando una columna Hypersil GOLDTM (5 µm, 250 x 4.6 mm) con un gradiente de A (100 % Agua) a B (100 % Acetonitrilo), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 15 % B; min 5-20, gradiente de 15 % a 100 % B; min 20-26, flujo isocrático de 100 % B; min 26-27, gradiente de 100 % a 15 % B; min 27-30, flujo isocrático de 15 % B. Se obtuvieron dos fracciones: **F3.1.1** (min 14.6, 4.9 mg), **F3.1.2** (min 24.5, 0.4 mg).

3.6 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO TP-68-3 DE UN CULTIVO PREVIO DEL MISMO HONGO

El crudo (6.55 g) se fraccionó por extracción en fase sólida utilizando un cartucho de SPE-C₁₈ (45 µm, 10 g/70 Chromabond). Por cada gramo de extracto se realizó el siguiente gradiente: 100 mL (10 % MeOH-H₂O, **F1**: 1296 mg); 100 mL (20 % MeOH-H₂O, **F2**: 1781.4 mg); 100 mL (30 % MeOH-H₂O, **F3**: 586.2 mg); 100 mL (40 % MeOH-H₂O, **F4**: 1146.2 mg); 100 mL (50 % MeOH-H₂O, **F5**: 344.9 mg); 100 mL (60 % MeOH-H₂O, **F6**: 118.5 mg); 100 mL (70 % MeOH-H₂O, **F7**: 73.7 mg); 100 mL (80 % MeOH-H₂O, **F8**: 145.5 mg); 100 mL (90 % MeOH-H₂O, **F9**: 625.4 mg); 100 mL (100 % MeOH, **F10**: 182.9 mg); y 200 mL (100 % acetona, **F11**: 215.9 mg).

La fracción **F5** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C₁₈ (10µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (20 % MeCN-H₂O) a B (100 % MeCN), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-1, un flujo isocrático de 50 % B; min 1-15, gradiente de 50 % a 100 % B; min 15-20, flujo isocrático de 100 % B; min 22-23, gradiente de 100 % a 50 % B; min 23-27, flujo isocrático de 50 % B. **F5.1** (min 8.7, 7.3 mg), **F5.2** (min 13, 16.3 mg), **F5.3** (min 13.8, 7.2 mg), **F5.4** (min 15.2, 19.4 mg).

La fracción **F5.4** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna YMC-Pack SIL (5 µm, 150 x 10 mm), con un gradiente de A (100 % isopropanol) a B (100 % Hexano), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 90 % B; min 10-20, gradiente de 90 % a 50 % B; min 20-22, flujo isocrático de 50 % B; min 22-23, gradiente de 50 % a 90 % B; min 23-28, flujo isocrático de 90 % B. Se obtuvieron cinco fracciones: **F5.4.1** (7.5 min, 0.9 mg), **F5.4.2** (8.8 min, 0.4 mg), **F5.4.3** (9.2 min, **compuesto TP-68-3**: 8.2 mg), **F5.4.4** (11 min, 3.2 mg), **F5.4.5** (12.8 min, 4.7 mg).

3.7 BIOENSAYO CONTRA HONGOS *ASPERGILLUS BRAZILIENSIS* Y *FUSARIUM OXYSPORUM*

Se utilizaron los siguientes hongos fitopatógenos: *Aspergillus braziliensis* y *Fusarium oxysporum*. Se cultivó previamente cada hongo en un plato Petri en medio PDA. Un pedazo de agar con esporas de cada hongo se colocó en la mitad de un plato Petri con PDA. Los compuestos (0.05 mg) se colocaron directamente en el agar con una micropipeta a 3 cm del hongo inoculado. Para el control positivo se utilizó Nistatina (0.05 mg). Los platos Petri se incubaron a 26 °C en la oscuridad y luego se monitoreo durante una semana para revisar si había un halo de inhibición.

3.8 BIOENSAYO CONTRA *ESCOVOPSIS SP* Y HONGOS MUTUALISTAS

Se utilizaron los siguientes hongos: *Escovopsis sp.* (hongo patógeno de las hormigas Attini), y un hongo mutualista de las hormigas Attini. En un tubo falcon de 50 mL se preparaba una solución de esporas para cada hongo (2 a 3 mg en 40 mL de PDA diluido a 40 °C aproximadamente), se utilizó un Vortex para homogenizar la solución, luego se vertieron 10

mL en un plato Petri (100 x 20 mm) y se dejaba enfriando hasta que se solidificara completamente. Los compuestos (0.05 mg) se colocaron directamente sobre el medio sólido con una micropipeta. Para el control positivo se utilizó Nistatina (0.05 mg). Los platos Petri se incubaron a 26 °C en la oscuridad y luego se monitoreo durante una semana para revisar si había un halo de inhibición.

3.9 BIOENSAYO CONTRA *CANDIDA ALBICANS*

Las fracciones o compuestos también se probaron contra *Candica albicans*, utilizando la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por la técnica Kirby Bauer (difusión en agar).

3.9.1 Preparación del estándar de turbidez

Para preparar el estándar de turbidez se agregó 0.5 mL de BaCl₂·2H₂O (1.175 %) a 99.5 mL de H₂SO₄ 0.36 N (1%), y se mezcló en constante movimiento para mantener la suspensión. Luego se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro cuya absorbancia a 625 nm fue 0.08 a 0.10 para establecer el estándar a 0.5 de Mcfarland. Se mantuvo la solución en oscuridad a 22-26 °C (Hudzicki, 2009; Jorgensen and Ferraro, 2009).

3.9.2 Preparación del inóculo

Las bacterias de referencia se incubaron en platos Petri con agar tripticasa de soya (TSA). Antes de cumplir las 24 horas de incubación se tomaron de 3 a 5 colonias para suspender en 9 mL de solución salina estéril, luego se procedió a comparar visualmente con el tubo solución Mcfarland, utilizando de contra fondo la tarjeta Wickerham; esta suspensión contenía aproximadamente 1-2 x 10⁸ (Hudzicki, 2009).

3.9.3 Siembra de la muestra

Se esparció 100 µL del inóculo bacteriano en platos Petri de Mueller-Hinton Agar. Se distribuyó homogéneamente con ayuda de un esparcidor estéril, y luego se dejó secar el inóculo a temperatura ambiente dentro de la cámara de flujo laminar durante 15 min para lograr una mayor fijación (Jorgensen and Turnidge, 2015). Las fracciones (0.1 mg) o compuestos (0.05 mg) se colocan directamente sobre el agar con una micropipeta. La ciprofloxacina se utilizó como control positivo. Los platos Petri se incubaron a 37 °C durante

la noche y luego se observó visualmente en busca de zonas de inhibición (Adnani et al., 2015).

3.10 MEDICIÓN DE ROTACIÓN ESPECÍFICA DE COMPUESTOS

Las rotaciones específicas de los tres compuestos fueron determinadas en metanol a las siguientes concentraciones: TP-98-1 (0.59 g/mL), Arthrospolide A (0.325 g/mL) y Roussoellide (0.24 g/mL).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO *LUTEOMYCES TRICHODERMOIDES* 08.COL EN MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES

Los resultados presentados muestran que el compuesto activo esperado (TP-68-3), con un tiempo de retención de alrededor de 14.2 minutos, fue detectado en los medios de maíz, PDA, pasta, SAB y avena (**Tabla 1** y **Anexo A**). En el medio PDA se obtuvo mayor cantidad de extracto y se observa mayor abundancia del compuesto, lo que indica que es el más adecuado para la producción de los metabolitos secundarios del hongo. Por esta razón, se decidió utilizar exclusivamente el medio PDA en los pasos experimentales posteriores.

Tabla 1. Masas obtenidas de la inoculación del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col en diversos medios comerciales.

Medio	Masa final (hongo)	Masa final (blanco)	Diferencia de masa
PDA	70.8 mg	3.3 mg	67.5 mg
SAB	67.6 mg	14.3 mg	53.3 mg
Avena	193.2 mg	175.3 mg	17.9 mg
Pasta	22.2 mg	9 mg	13.2 mg
MEA	25.2 mg	12.6 mg	12.6 mg
Maíz	22.3 mg	12.6 mg	9.7 mg
Arroz	16.6 mg	8.7 mg	7.9 mg

4.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS AISLADOS DEL HONGO *LUTEOMYCES TRICHODERMOIDES* 08.COL

4.2.1 Compuesto Rousoellide

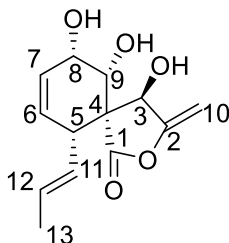


Figura 4. Estructura del compuesto Rousoellide.

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **Rousoellide** (un sólido aceitoso incoloro) presentó 13 carbonos [δ_{C} : 175.4 (C-1), 158.2 (C-2), 69.9 (C-3), 57.0 (C-4), 40.3 (C-5), 130.7 (C-6), 127.3 (C-7), 64.7 (C-8), 68.0 (C-9), 88.8 (C-10), 128.1 (C-11), 131.5 (C-12) y 18.0 (C-13)] (**Anexo B**). Los espectros de RMN ^1H y gHSQC mostraron la presencia de un grupo metilo [δ_{H} 1.64 (H-13)]; tres protones oximetinos [δ_{H} 5.46 (H-3), 4.17 (H-8) y 3.82 (H-9)]; dos hidrógenos vinílicos [δ_{H} 4.62 (H-10a) y 4.80 (H-10b)]; un grupo metino [δ_{H} 3.40 (H-5)]; cuatro hidrógenos de alqueno [δ_{H} 5.61 (H-6), 6.03 (H-7), 5.33 (H-11), y 5.68 (H-12)]; y tres hidrógenos provenientes de grupos hidroxilos [δ_{H} 2.59 (OH-3), 3.49 (OH-9) y 3.91 (OH-8)] (**Anexo C y D**). La estructura plana del compuesto **Rousoellide** (**Figura 4**) se determinó a través de las correlaciones observadas en el espectro de gHMBC y gCOSY (**Figura 5**) (**Anexo E y F**). El espectro de masa mostró la presencia de una molécula cationizada con sodio [$M + \text{Na}]^+ = 275$ (**Anexo G**), que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$, lo cual confirma la estructura base del compuesto **Rousoellide**. Los datos experimentales de RMN son muy próximos a los de la literatura (Sommar et al., 2021) (**Tabla 2**), lo cual sugiere que es la misma molécula.

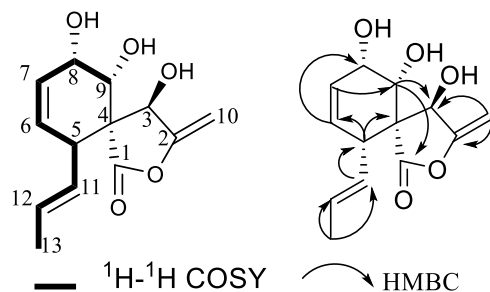


Figura 5. Principales correlaciones vistas en el COSY y HMBC del compuesto Rousoellide.

Tabla 2. Comparación de datos experimentales de RMN- ^1H y ^{13}C de Rousoellide en CDCl_3 a 500 (^1H) y 125 (^{13}C) MHz y los datos de la literatura 300 (^1H) y 75 (^{13}C) MHz.

No.	Tipo	Datos experimentales		Datos de la literatura	
		δ_{C}	δ_{H} , mult. (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J, Hz)
1	C	175.4	--	175.3	--
2	C	158.2	--	158.5	--
3	CH	69.9	5.46, dt (8.6, 2.3)	70.2	5.46, brs
4	C	57.0	--	57.1	--
5	CH	40.3	3.40, dd (8.9, 1.6)	40.4	3.41, ddd (8.7, 3.0, 1.8)
6	CH	130.7	5.61, dt (10.1)	130.7	5.61, dt (9.9, 1.8)
7	CH	127.3	6.03, ddd (10.1, 4.6, 3.0)	127.5	6.03, ddd (9.9, 4.8, 3.0)
8	CH	64.7	4.17, m	64.8	4.17, m
9	CH	68.0	3.82, dd (7.8, 5.7)	68.3	3.81, d (5.7)
10	CH ₂	88.8	4.80, t (2.7) 4.62, t (2.7)	88.6	4.80, t (2.7) 4.62, t (2.7)
11	CH	128.1	5.33, ddq (15.2, 8.9, 1.6)	128.4	5.33, ddq (15.3, 8.7, 1.5)
12	CH	131.5	5.68, dq (15.2, 6.4)	131.5	5.68, dq (15.3, 6.6)
13	CH ₃	18.0	1.64, dd (6.4, 1.6)	17.8	1.64, dd (6.6, 1.5)
OH-3			2.59, d (7.2)		2.60, brs
OH-8			3.91, d (12.0)		3.91, d (12.0)
OH-9			3.49, d (7.2)		

4.2.2 Compuesto Arthrosolide A

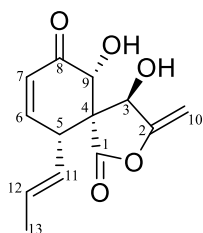


Figura 6. Estructura del compuesto Arthrosolide A.

El espectro de RMN ^{13}C en CDCl_3 del compuesto **Arthrosolide A** (cristales incoloros) presentó trece carbonos [δ_{C} 171.4 (C-1), 157.1 (C-2), 69.8 (C-3), 61.3 (C-4), 41.2 (C-5), 149.5 (C-6), 126.2 (C-7), 196.7 (C-8), 72.1 (C-9), 88.7 (C-10), 126.5 (C-11), 133.1 (C-12) y 18.1 (C-13)] (**Anexo H**). Los espectros de RMN ^1H y gHSQC mostraron la presencia de 1 metilo [δ_{H} 1.67 (H-13)]; dos hidrógenos vinílicos [δ_{H} 4.60 (H-10a) y 4.79 (H-10b)]; dos protones oximetinos [δ_{H} 5.35 (H-3) y 4.32 (H-9)]; un grupo metino [δ_{H} 3.90 (H-5)]; cuatro hidrógenos de alqueno [δ_{H} 6.63 (H-6), 6.25 (H-7), 5.45 (H-11), y 5.75 (H-12)]; y dos hidrógenos provenientes de grupos hidroxilos [δ_{H} 2.79 (OH-3) y 4.05 (OH-9)] (**Anexo I y J**). La estructura plana del compuesto **Arthrosolide A** (**Figura 6**) se determinó a través de las correlaciones observadas en el espectro de gHMBC y gCOSY (**Figura 7, Anexo K y L**). El espectro de masa mostró la presencia de una molécula cationizada con sodio [$M + \text{Na}$] $^+ = 273$ (**Anexo M**), que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{Na}$, lo cual confirma la estructura base del compuesto **Arthrosolide A**. Los datos experimentales de RMN son muy próximos a los datos de la literatura (Sommar et al., 2021) (**Tabla 3**), lo cual sugiere que es la misma molécula.

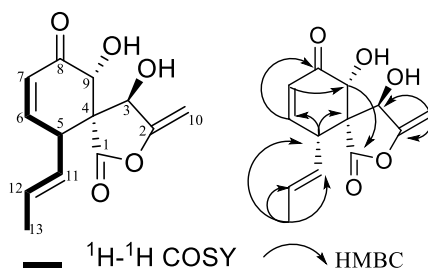


Figura 7. Principales correlaciones en el espectro COSY y HMBC del compuesto Arthrosolide A.

Tabla 3. Comparación de datos experimentales de RMN-¹H y ¹³C de Arthrospolide A en CDCl₃ a 500 (¹H) y 125 (¹³C) MHz y los datos de la literatura 300 (¹H) y 75 (¹³C) MHz.

No.	Tipo	Datos experimentales		Datos de la literatura	
		δ _C	δ _H , mult. (J, Hz)	δ _C	δ _H , mult. (J, Hz)
1	C	171.4	--	170.9	--
2	C	157.1	--	157.3	--
3	CH	69.8	5.35, d (7.3)	69.2	5.36, brs
4	C	61.3	--	61.8	--
5	CH	41.2	3.90, d (8.2)	40.8	3.90, m
6	CH	149.5	6.63, d (10.3)	149.1	6.63, dd (10.2, 2.4)
7	CH	126.2	6.25, d (10.1)	126.2	6.25, dd (10.2, 3.3)
8	C	196.7	--	196.2	--
9	CH	72.1	4.32, s	72.2	4.46, s
10	CH ₂	88.7	4.79, s 4.60, s	88.3	4.61, t (2.7) 4.31, t (2.7)
11	CH	126.5	5.45, dd (15.1, 8.7)	126.8	5.45, ddq (15.6, 8.7, 1.5)
12	CH	133.1	5.75, dq (15.2, 6.3)	133.0	5.76, dq (15.6, 6.6)
13	CH ₃	18.1	1.67, d (6.1)	17.8	1.67, dd (6.6, 1.5)
3-OH			2.79, d (7,8)		
9-OH			4.05, s		

Los datos espectroscópicos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto **Roussoellide** son similares a los datos del compuesto **Arthrospolide A** a excepción de la presencia de una señal adicional de un protón oximetino (δ_H 4.17, m, H-8) y la sustitución de la señal del carbono carbonílico de cetona (δ_C 196.7) en **Arthrospolide A** por la señal de un carbono oximetino (δ_C 64.7) en **Roussoellide**. Estos resultados indicaron que el grupo carbonílico de cetona en **Arthrospolide A** fue reducido a un alcohol secundario en **Roussoellide** (Sommart et al., 2021).

En el espectro gNOESY del compuesto **Rousoellide** (**Anexo N**), se observaron correlaciones entre los protones H-9 y H-5, así como entre los protones H-9 y H-8 (**Figura 8**). La correlación entre los ángulos de los protones H-8 y H-9 muestra una constante de acoplamiento ${}^3J_{\text{H-8-H-9}} = 5.7 \text{ Hz}$, lo que sugiere un ángulo aproximado de 40° entre estos dos hidrógenos. Esta distancia angular indica que los protones H-8 y H-9 se encuentran en una configuración espacial gauche o sinclinal, alternando sus posiciones en el espacio.

Además, el compuesto **Rousoellide** presenta una rotación específica de $[\alpha]_D^{25} = -107.7$ (0.24, *MeOH*) que, al compararse con la rotación específica de la literatura de $[\alpha]_D^{25} = -77.5$ (1.00, *MeOH*), muestra valores similares. Esto sugiere que el compuesto no está completamente puro, lo que podría estar relacionado con la presencia de impurezas.

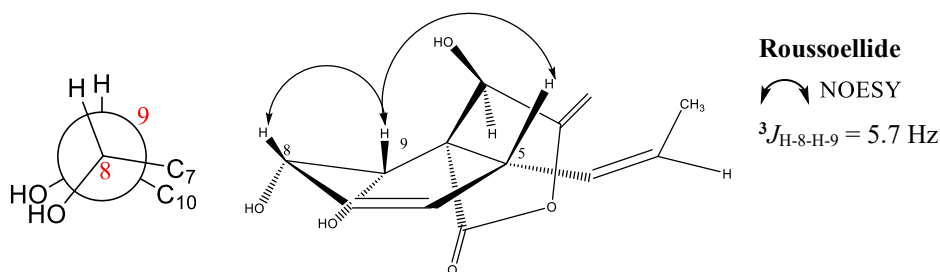


Figura 8. Análisis de la configuración relativa de los compuestos Rousoellide.

Por otro lado, en el caso del compuesto **Arthropsolide A**, el espectro gNOESY (**Anexo Ñ**) mostró correlaciones entre los protones H-9 y H-5, lo que indica que estos protones se encuentran en el mismo plano axial (**Figura 9**). Este resultado sugiere que ambos protones están orientados de manera que permiten la interacción espacial en la misma dirección, lo que puede ser indicativo de una conformación específica de la molécula.

Este compuesto tiene una rotación específica de $[\alpha]_D^{25} = -225.5$ (0.325, *MeOH*), que, al compararse con la rotación específica de la literatura de $[\alpha]_D^{25} = -303.7$ (1.00, *MeOH*), demuestra que el compuesto podría no estar completamente puro (Sommar et al., 2021).

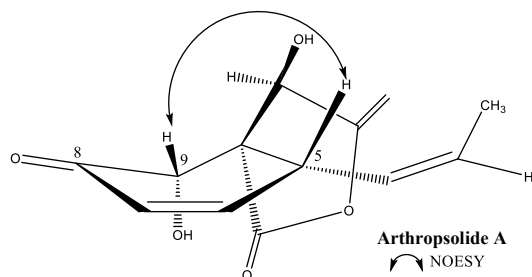


Figura 9. Análisis de la configuración relativa de los compuestos Arthrospolide A.

4.2.3 Compuesto TP-68-3

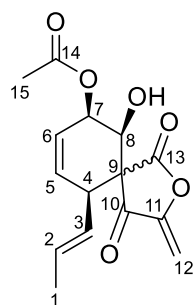


Figura 10. Estructura del compuesto TP-68-3.

El compuesto TP-68-3 se obtuvo como un sólido aceitoso incoloro. Los datos de RMN de **TP-68-3** (**Tabla 4**) sugieren que es una mezcla de dos isómeros inseparables (**TP-68-3 A** y **TP-68-3 B**). El espectro de RMN ^{13}C del isómero **TP-68-3 A** presentó 15 carbonos [δ_{C} 17.96 (C-1), 132.81 (C-2), 124.90 (C-3), 45.27 (C-4), 129.41 (C-5), 125.08 (C-6), 74.57 (C-7), 73.41 (C-8), 59.34 (C-9), 194.74 (C-10), 150.77 (C-11), 95.31 (C-12), 171.93 (C-13), 173.24 (C-14), 21.27 (C-15)] (**Anexo O**). Los espectros de RMN ^1H y gHSQC mostraron la presencia de dos grupos metilos [δ_{H} 1.60 (H-1) y 2.14 (H-15)]; dos protones oximetinos [δ_{H} 5.65 (H-7) y 4.25 (H-8)]; dos hidrógenos vinílicos [δ_{H} 5.06 (H-12a) y 5.39 (H-12b)]; un grupo metino [δ_{H} 3.47 (H-4)]; y cuatro hidrógenos de alqueno [δ_{H} 5.68 (H-2), 5.10 (H-3), 5.59-5.64 (H-5), y 5.62-5.70 (H-6)] (**Anexos P y Q**).

Para el isómero **TP-68-3 B** el espectro de RMN ^{13}C presentó 15 carbonos: δ_{C} 17.96 (C-1), 132.78 (C-2), 125.12 (C-3), 44.75 (C-4), 129.98 (C-5), 124.87 (C-6), 75.24 (C-7), 73.19 (C-8), 59.56 (C-9), 196.10 (C-10), 151.07 (C-11), 95.42 (C-12), 169.51 (C-13), 173.55 (C-14), 21.27 (C-15). Los espectros de RMN ^1H y gHSQC mostraron la presencia de dos grupos

metilos [δ_H 1.60 (H-1) y 2.15 (H-15)]; dos protones oximetinos [δ_H 5.67 (H-7) y 4.21 (H-8)]; dos hidrógenos vinílicos [δ_H 5.08 (H-12a) y 5.41 (H-12b)]; un grupo metino [δ_H 3.36 (H-4)]; y cuatro hidrógenos de alqueno [δ_H 5.58 (H-2), 5.19 (H-3), 5.59-5.64 (H-5), y 5.62-5.70 (H-6)].

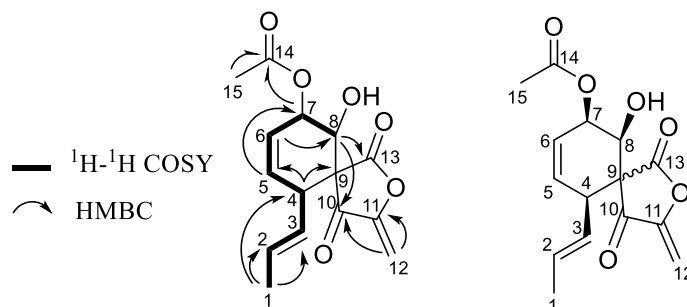


Figura 11. Principales correlaciones en el espectro COSY y HMBC del compuesto TP-68-3.

La estructura plana del compuesto TP-68-3 (**Figura 10**) se determinó a través de las correlaciones observadas en el espectro de gHMBC y gCOSY (**Figura 11, Anexo R y S**). El espectro de masas mostró la presencia de una molécula cationizada $[M+Na]^+ = 315$ (**Anexo T**), correspondiente a la fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_6Na$. Se han reportado en la literatura algunos análogos de **TP-68-3**: mycosporulone (Guiraud et al., 1999), arthrospolide B y C (Ayer et al., 2011), y oxaspirol B (Wijeratne et al., 2016) (**Figura 12**).

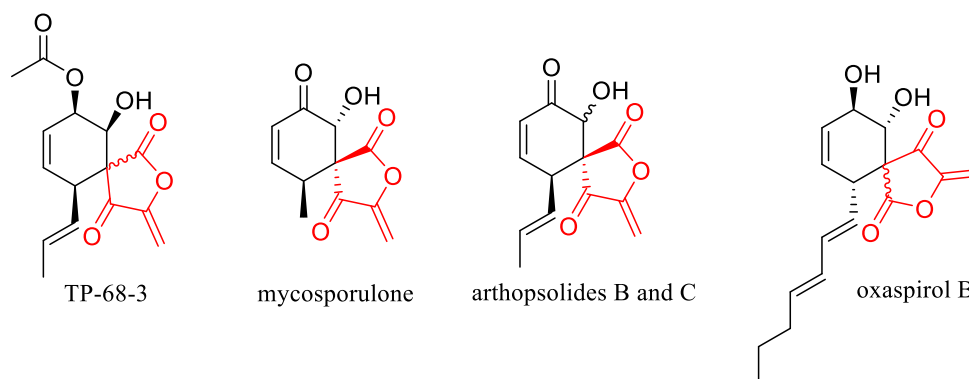


Figura 12. Análogos de compuesto TP-68-3

El compuesto **TP-68-3** puede ser una mezcla de dos epímeros inseparables que están en equilibrio (**Figura 13**). El mismo fenómeno se ha reportado para el compuesto oxaspirol B (Wijeratne et al., 2016).

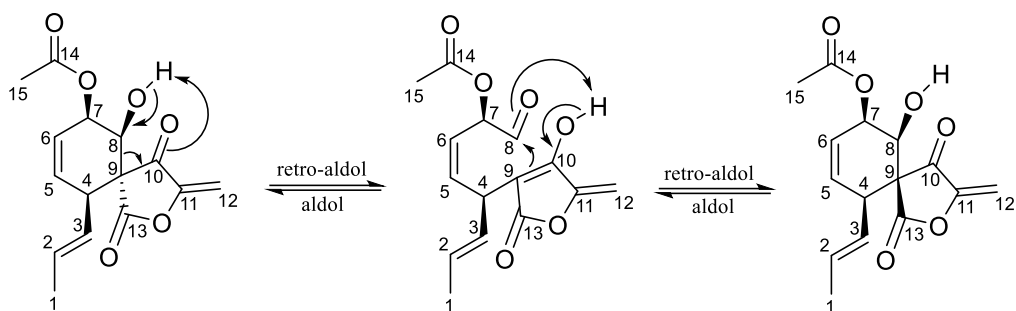


Figura 13. Equilibrio de isómeros de TP-68-3, vía retro-Aldol y Aldol.

Tabla 4. Datos de ^1H y ^{13}C NMR de los compuestos TP-68-3A y TP-68-3B en CDCl_3 500 (^1H) y 125 (^{13}C) MHz.

No.	Tipo	TP-68-3A + TP-68-3B			
		δ_{C}	δ_{H} , mult. (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J, Hz)
1	CH ₃	17.96	1.60, dd (1.2, 6.6)	17.96	1.60, dd (1,2, 6.6)
2	CH	132.81	5.68, m	132.78	5.58, dq (0.7, 6.5, 15.1)
3	CH	124.90	5.10, ddq (1.7, 7.6, 15.1)	125.12	5.19, ddq (1.7, 9.2, 15.2)
4	CH	45.27	3.47, m	44.75	3.36, m
5	CH	129.41	5.59-5.64, m	129.98	5.59-5.64, m
6	CH	125.08	5.62-5.70, m	124.87	5.62-5.70, m
7	CH	74.57	5.65, m	75.24	5.67, m
8	CH	73.41	4.25, d (7.7)	73.19	4.21, d (7.6)
9	C	59.34	---	59.56	---
10	C	194.74	---	196.10	---
11	C	150.77	---	151.07	---
12	CH ₂	95.31	5.06, d (2.9) 5.39, d (2.9)	95.42	5.08, d (2.9) 5.41, d (2.9)
13	C	171.93	---	169.51	---
14	C	173.24	---	173.55	---
15	CH ₃	21.27	2.14, s	21.27	2.15, s

El compuesto **TP-68-3** presenta un grupo acetato en el carbono C-7 y un carbonilo de cetona en el carbono C-10. Los estereoisómeros **TP-68-3 A** y **TP-68-3 B** exhiben constantes de acoplamiento y correlaciones idénticas en los espectros ^1H - ^1H NOESY entre los hidrógenos en las posiciones 4 y 8, así como entre los hidrógenos en las posiciones 7 y 8, lo que indica que la diferencia entre ellos radica en la configuración del carbono C-9 (**Figura 14**) (**Anexo U**). La correlación entre los hidrógenos H-7 y H-8 muestra una constante de acoplamiento de $^3J_{\text{H-7-H-8}} = 7.7 \text{ Hz}$, lo que sugiere que estos hidrógenos se encuentran en ángulos aproximadamente de 20° . Esta distancia angular indica que los protones H-7 y H-8 están en una configuración espacial gauche o sinclinal, lo que implica que alternan sus posiciones en el espacio.

En este contexto, la molécula no presenta rotación óptica neta, ya que, aunque las partes individuales puedan inducir rotaciones, la simetría interna de la molécula provoca que estas se reorganicen de tal forma que no produzcan un efecto neto de rotación del plano de luz. Este fenómeno es similar al observado en el compuesto Oxaspirol B, donde la simetría interna de la molécula anula la rotación óptica debido a la cancelación de las contribuciones individuales de las partes quirales de sus estereoisómeros.

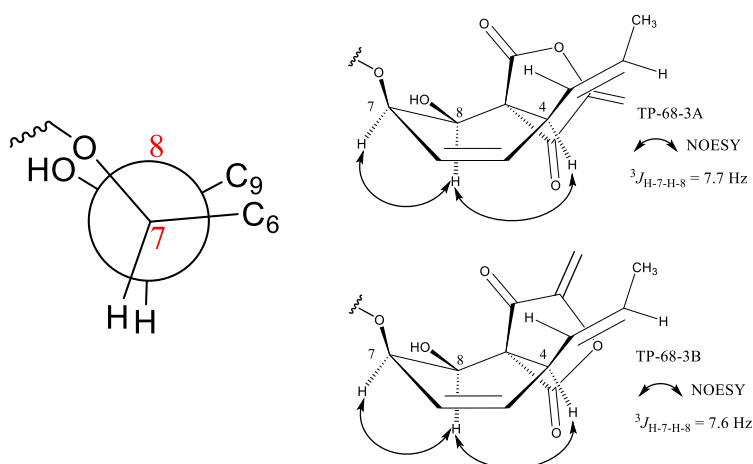


Figura 14. Análisis de la configuración relativa del compuesto TP-68-3.

4.2.4 Compuestos TP-98-1

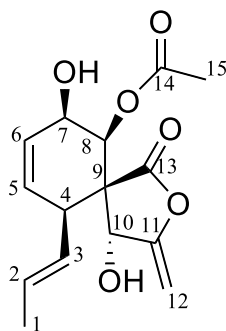


Figura 15. Estructura del compuesto TP-98-1.

El espectro de RMN ^{13}C (Tabla 5) del compuesto **TP-98-1** presentó quince carbonos [δ_{C} 17.944 (C-1), 131.481 (C-2), 127.847 (C-3), 39.739 (C-4), 123.991 (C-5), 131.359 (C-6), 69.949 (C-7), 71.411 (C-8), 57.637 (C-9), 75.042 (C-10), 157.771 (C-11), 88.484 (C-12), 172.970 (C-13), 172.534 (C-14) y 21.366 (C-15)](Anexo V). Los espectros de RMN ^1H y gHSQC mostraron la presencia de dos grupos metilos [δ_{H} 1.62 (H-1) y 2.14 (H-15)]; tres protones oximetinos [δ_{H} 5.28-5.36 (H-7), 3.91 (H-8) y 5.88 (H-10)]; dos hidrógenos vinílicos [δ_{H} 4.68 (H-12a) y 4.77 (H-12b)]; un grupo metino [δ_{H} 3.50 (H-4)]; cuatro hidrógenos de alqueno [δ_{H} 5.53-5.71 (H-2), 5.26-5.37 (H-3), 5.58-5.66 (H-5), y 5.53-5.71 (H-6)]; y un hidrógeno proveniente de un grupo hidroxilos [δ_{H} 2.76 (OH-10)] (Anexos W y X). La estructura plana del compuesto **TP-98-1** (Figura 15) se determinó a través de las correlaciones observadas en el espectro de gHMBC y gCOSY (Anexo Y y Z)(Figura 16). El espectro de masa mostró la presencia de una molécula cationizada con sodio [$M + \text{Na}]^+ = 317$ (Anexo AA), correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$.

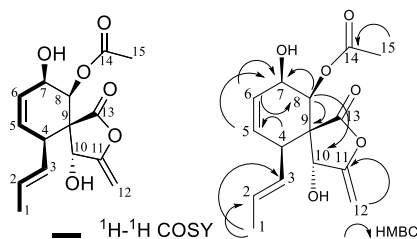


Figura 16. Principales correlaciones en el espectro gCOSY y gHMBC del compuesto TP-98-1.

Tabla 5. Datos de ^1H y ^{13}C NMR del compuesto TP-98-1 en CDCl_3 500 (^1H) y 125 (^{13}C) MHz.

No.	Tipo	TP-98-1	
		δ_{C}	δ_{H} , mult. (J, Hz)
1	CH ₃	17.944	1.62, dd (1.15, 5.35)
2	CH	131.481	5.53-5.71, m
3	CH	127.847	5.26-5.37, m
4	CH	39.739	3.50, dd (2.10, 6.87)
5	CH	123.991	5.58-5.66, m
6	CH	131.359	5.53-5.71, m
7	CH	69.949	5.28-5.36, m
8	CH	71.411	3.91, d (7.06)
9	C	57.637	--
10	CH	75.042	5.88, m
11	C	157.771	--
12	CH ₂	88.484	4.77, t (2.48) 4.68, t (2.48)
13	C	172.970	--
14	C	172.534	--
15	CH ₃	21.366	2.14, s
10-OH			2.76, d (7.83)

Por otro lado, el compuesto **TP-98-1** contiene el grupo acetato en el carbono C-8 y un grupo hidroxilo en el carbono C-10. Este compuesto muestra correlaciones de ^1H - ^1H NOESY entre los hidrógenos en las posiciones 7 y 8, así como entre los hidrógenos en las posiciones 8 y 10 proveniente del protón del hidroxilo, lo que indica que estos protones se encuentran en el mismo plano (**Anexo BB**) (**Figura 17**). Este compuesto tiene una rotación óptica específica de $[\alpha]_D^{25} = -214.6$ (0.59, *MeOH*). Además de que en la literatura no se encuentra información sobre este compuesto, lo cual sugiere que podría tratarse de un compuesto nuevo.

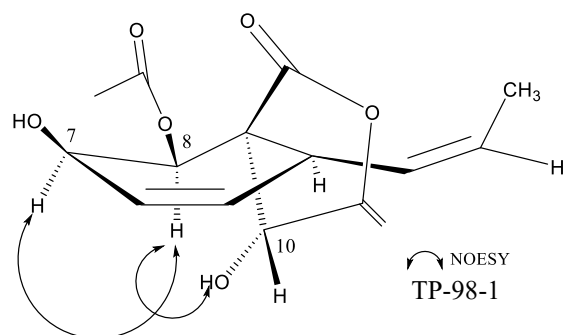


Figura 17. Análisis de la configuración relativa del compuesto TP-98-1.

4.3 BIOENSAYOS ANTIFÚNGICOS

4.3.1 Bioensayo de fracciones contra *Aspergillus brasiliensis*

Se realizó un bioensayo utilizando los compuestos del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col contra el hongo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, aislado de arándano (blueberry). Se observó un halo de inhibición generado por el compuesto TP-68-3, similar al del control positivo. Este hallazgo sugiere que el compuesto TP-68-3 presenta capacidad inhibitoria frente a *Aspergillus brasiliensis* (Figura 18).

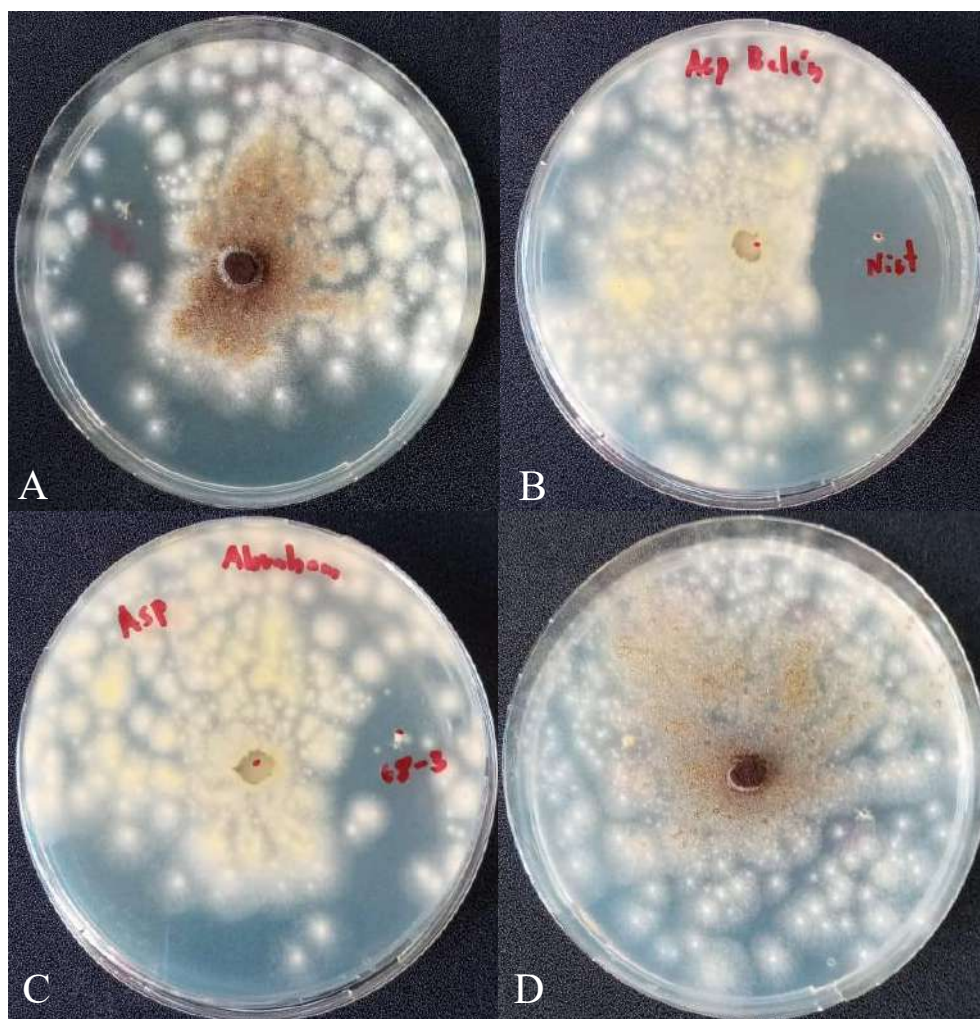


Figura 18. Resultados de bioensayo contra el hongo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 obtenido de blueberry: A) Control positivo frontal (Nistatina). B) Control positivo posterior (Nistatina). C) Compuesto TP-68-3. D) Control negativo.

4.3.2 Bioensayo de fracciones contra *Fusarium oxysporum*

Los resultados de los bioensayos de los compuestos aislados del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col frente al hongo *Fusarium oxysporum* ATCC 48112 revelaron halos de inhibición solamente por parte del compuesto TP-68-3, similar al del control positivo. Este resultado demuestra la capacidad inhibitoria del compuesto TP-68-3 frente a *Fusarium oxysporum* (**Figura 19**).

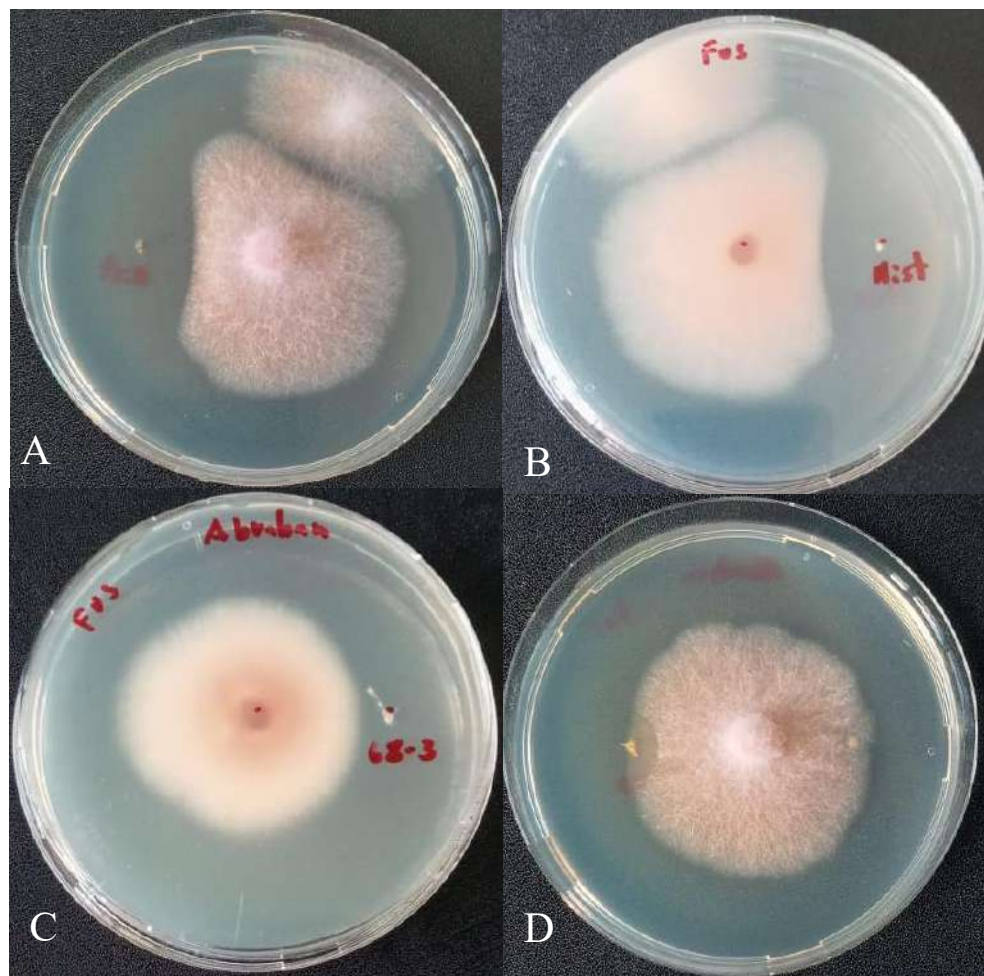


Figura 19. Resultados de bioensayo contra el hongo *Fusarium oxysporum* ATCC 48112: A) Control positivo frontal (Nistatina). B) Control positivo posterior (Nistatina). C) Compuesto TP-68-3. D) Control negativo.

4.3.3 Bioensayo de TP-68-3 contra *Candida albicans*

Los resultados del bioensayo del compuesto **TP-68-3**, aislado del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col, evidenciaron la formación de un pequeño halo de inhibición frente a *Candida albicans* (**Figura 20**). Este efecto sugiere que, aunque la actividad observada fue limitada debido a la baja concentración del compuesto, **TP-68-3** posee capacidad inhibitoria contra *Candida albicans*.

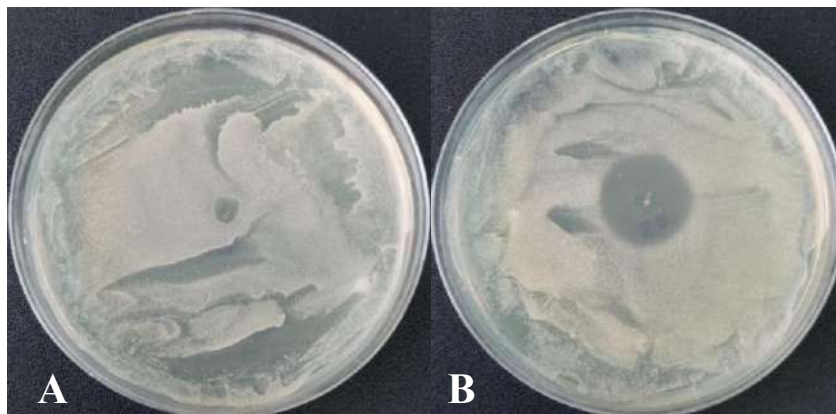


Figura 20. Actividad antifúngica contra *Candida albicans*: A) TP-68-3 (25 µg), B) Nistatina (25 µg).

4.3.4 Bioensayo de TP-68-3 contra *Escovopsis* sp.

Los resultados de los bioensayos realizados con los compuestos aislados del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col frente a otra colonia del hongo *Escovopsis* sp. mostraron resultados negativos para la mayoría de los compuestos, con excepción del compuesto **TP-68-3**, el cual presentó un halo de inhibición, evidenciando así su actividad antifúngica para inhibir el crecimiento de *Escovopsis* sp (**Figura 21**).

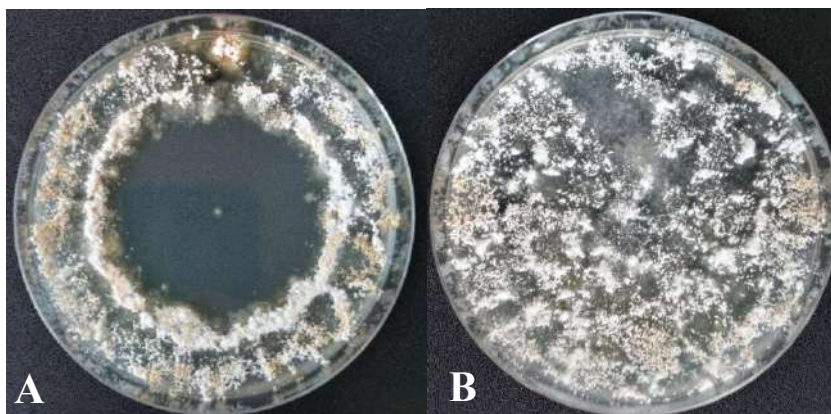


Figura 21. Actividad antifúngica contra *Escovopsis* sp.: A) TP-68-3, B) Control Negativo.

4.3.5 Bioensayo de TP-68-3 contra hongos mutualistas

Los resultados del bioensayo del compuesto **TP-68-3** contra hongos mutualistas evidenciaron una potente actividad antifúngica (**Figura 22**). Al comparar la inhibición provocada por **TP-68-3** con la del control positivo, **Nistatina**, se observó una mayor capacidad inhibitoria por parte del compuesto **TP-68-3**. Estos hallazgos destacan su notable potencial como agente antifúngico.

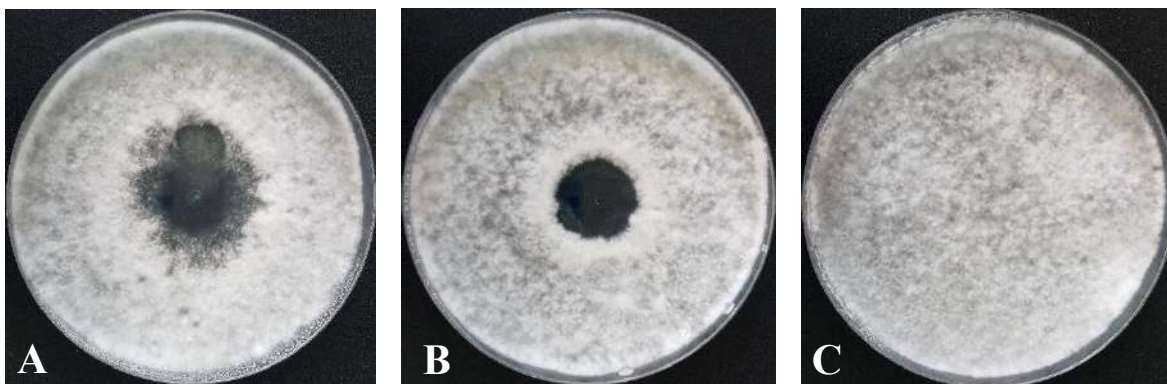


Figura 22. Actividad antifúngica contra hongos mutualistas (4 días a 26 °C): A) TP-68-3 (50 µg) vs Apt7, B) Nistatina (50 µg) vs Apt7, C) DMSO (control negativo) vs Apt7.

CONCLUSIONES

Una posible función ecológica de los compuestos producidos por el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col en las colonias de hormigas *Attini* podría estar relacionada con la regulación de las poblaciones de hongos dentro de su ecosistema. Los metabolitos de este hongo ejercen efectos antifúngicos sobre los hongos cultivados por las hormigas, que son fundamentales para su nutrición. Al interferir con estos microorganismos, el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col altera el equilibrio ecológico de la colonia, afectando las prácticas de cultivo y cuidado de los hongos por parte de las hormigas.

En cuanto a las condiciones de cultivo, se analizó el crecimiento del hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col en diversos medios comerciales, determinando que el medio PDA (Potato Dextrose Agar) favorece la producción óptima de metabolitos secundarios, lo que lo convierte en la mejor opción para la obtención de compuestos bioactivos.

Se identificaron dos nuevos policétidos, denominados TP-68-3 y TP-98-1, cuyas estructuras químicas son análogas a las de la familia de los spiroleptosphol. Además, se aislaron los compuestos Roussoellide y Arthropsolide A, previamente reportados en la literatura. En las pruebas de actividad antifúngica, el compuesto TP-68-3 demostró un alto potencial inhibitorio. La principal diferencia estructural que distingue al compuesto activo TP-68-3 de otros compuestos aislados radica en la presencia de dos grupos carbonilo en el anillo de cinco carbonos. Este detalle estructural es de gran relevancia, ya que, según la literatura, compuestos estructuralmente similares, como mycosporulone, arthropsolide B y C, y oxaspirol B, también exhiben actividad antifúngica y citotóxica. Por lo tanto, la presencia de un carbonilo adicional en esa posición podría ser un factor clave en la actividad biológica del compuesto.

RECOMENDACIONES

- Utilizar el PDA (Agar de Papa Dextrosa) como medio de cultivo para el hongo *Luteomyces trichodermoides* 08.col, ya que favorece una mayor producción de metabolitos por parte del hongo, optimizando así la obtención de compuestos bioactivos.
- Implementar la liofilización de los cultivos del hongo después de la cosecha, como tratamiento antes de la maceración, con el fin de mejorar la eficiencia en la extracción de metabolitos.
- Explorar la actividad antifúngica del compuesto TP-68-3 contra diferentes hongos considerados patógenos de humanos de importancia médica y contra hongos patógenos de plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbastabar, B., Azizi, M. H., Adnani, A., & Abbasi, S. (2015). Determining and modeling rheological characteristics of quince seed gum. *Food Hydrocolloids*, 43, 259-264.
- Adnani, N., Vazquez-Rivera, E., Adibhatla, S. N., Ellis, G. A., Braun, D. R., & Bugni, T. S. (2015). Investigation of interspecies interactions within marine Micromonosporaceae using an improved co-culture approach. *Marine Drugs*, 13(10), 6082–6098. <https://doi.org/10.3390/md13106082>
- Augustin, J. O., Groenewald, J. Z., Nascimento, R. J., Mizubuti, E. S., Barreto, R. W., Elliot, S. L., & Evans, H. C. (2013). Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. *PLoS One*, 8(12), e82265.
- Ayer, W. A., Craw, P. A., Neary, J., & NEARY Can Chern, J. J. (2011). Metabolites of the fungus *Arthrospira truncata*. <https://doi.org/10.1139/V92-172>, 70(5), 1338–1347. doi: 10.1139/V92-172
- Batey, S. F., Greco, C., Hutchings, M. I., & Wilkinson, B. (2020). Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. *Current Opinion in Chemical Biology*, 59, 172-181.
- Branstetter, M. G., Ješovnik, A., Sosa-Calvo, J., Lloyd, M. W., Faircloth, B. C., Brady, S. G., & Schultz, T. R. (2017). Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. *Proceedings. Biological Sciences*, 284(1852), 20170095. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0095>
- Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., and Karlovsky, P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiol.* 16, 83–83. doi: 10.1186/s12866-016-0698-3
- Currie, C. R., Wong, B., Stuart, A. E., Schultz, T. R., Rehner, S. A., Mueller, U. G., ... & Straus, N. A. (2003). Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, 299(5605), 386-388.

- Currie, C. R., Mueller, U. G., & Malloch, D. (1999). The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 7998-8002.
- Dhodary, B., Schilg, M., Wirth, R., & Spiteller, D. (2018). Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf-cutting ants. *Chemistry—A European Journal*, 24(17), 4445-4452.
- Doi, J., Hirota, A., Nakagawa, M., Sakai, H., & Isogai, A. (1985). Structure of a new antibiotic oxaspirol A. *Agricultural and biological chemistry*, 49(7), 2247-2248.
- Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., & De Gusmao, N. B. (1999). Antimicrobial and antitumor activities of mycosporulone. *Journal of Natural Products*, 62(9), 1222–1224. doi: 10.1021/NP9805084/ASSET/IMAGES/LARGE/NP9805084F1.JPEG
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2009). Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4742-4746.
- Hashimoto, M., Tsushima, T., Murakami, T., Nomiya, M., Takada, N., & Tanaka, K. (2008). Spiroleptoshol isolated from *Leptosphaeria doliolum*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(14), 4228-4231.
- Havlickova, B., Czaika, V. A. & Friedrich, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* (2008). doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x
- Hilje, L. (1984). Simbiosis: consideraciones terminológicas y evolutivas. *Uniciencia*, 1(1), 57-60.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, 15(1), 1-23.
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, 1253-1273.
- Masiulionis, V. E., Cabello, M. N., Seifert, K. A., Rodrigues, A., & Pagnocca, F. C. (2015). *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107, 731-740.

Meirelles, L. A., Solomon, S. E., Bacci, M., Jr, Wright, A. M., Mueller, U. G., & Rodrigues, A. (2015). Shared Escovopsis parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher attine fungus-growing ant symbiosis. *Royal Society Open Science*, 2(9), 150257. <https://doi.org/10.1098/rsos.150257>

Montoya, Q. V., Martiarena, M. J. S., Bizarria Jr, R., Gerardo, N. M., & Rodrigues, A. (2021). Fungi inhabiting attine ant colonies: reassessment of the genus *Escovopsis* and description of *Luteomyces* and *Sympodiorosea* gens. nov. *IMA fungus*, 12(1), 23.

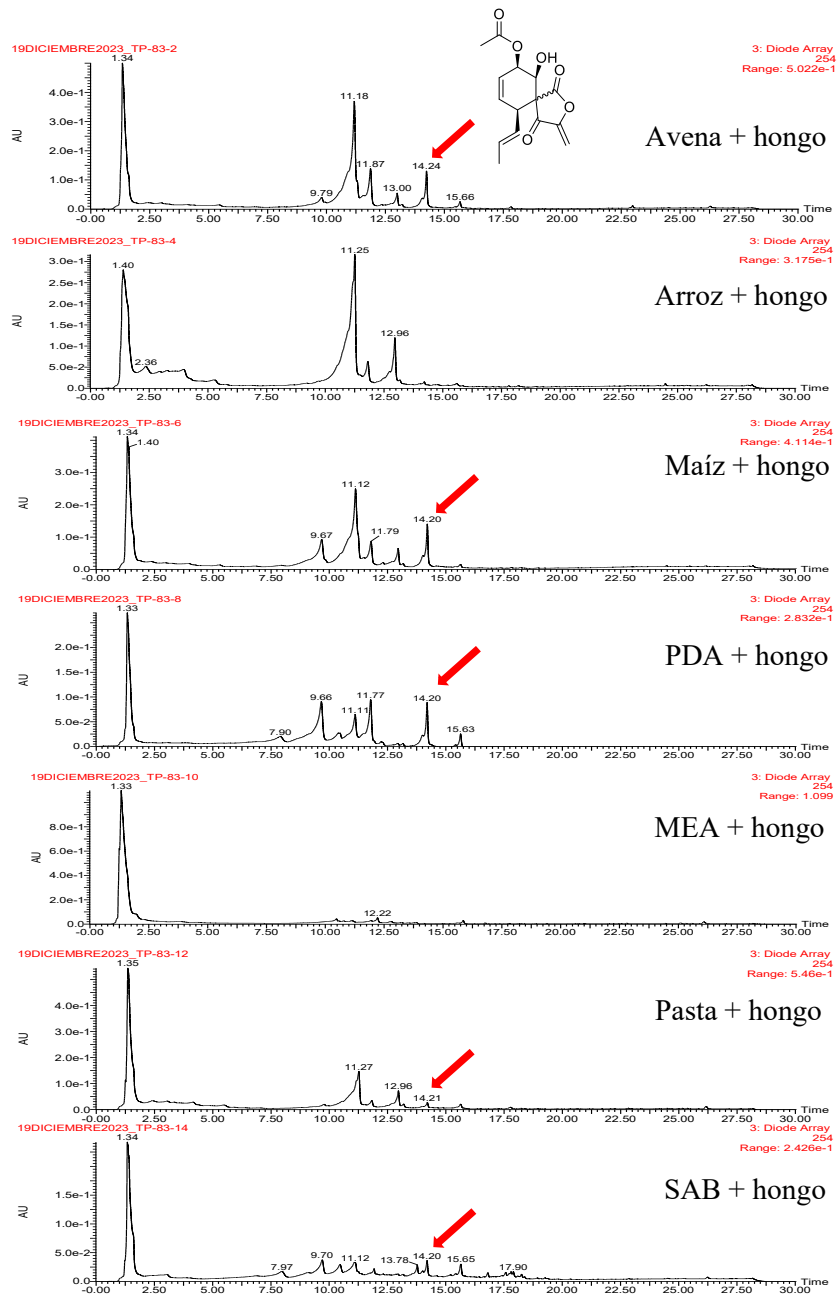
Pérez Vásquez, T. D. (2022). Estudio de los metabolitos secundarios del hongo *Escovopsis* sp. A. det. 08col aislado de una colonia de hormigas *Apterostigma dentigerum* (Trabajo de Graduación, Universidad de Panamá).

Sommart, U., Rukachaisirikul, V., Saithong, S., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J., Preedanon, S., ... Khunrong, T. (2021). 2-Oxaspiro[4.5]decane and α -pyrenocine derivatives from the endophytic fungus *Roussoella* sp. PSU-H51. *Natural Product Research*, 36(19), 4911–4920. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1910692>

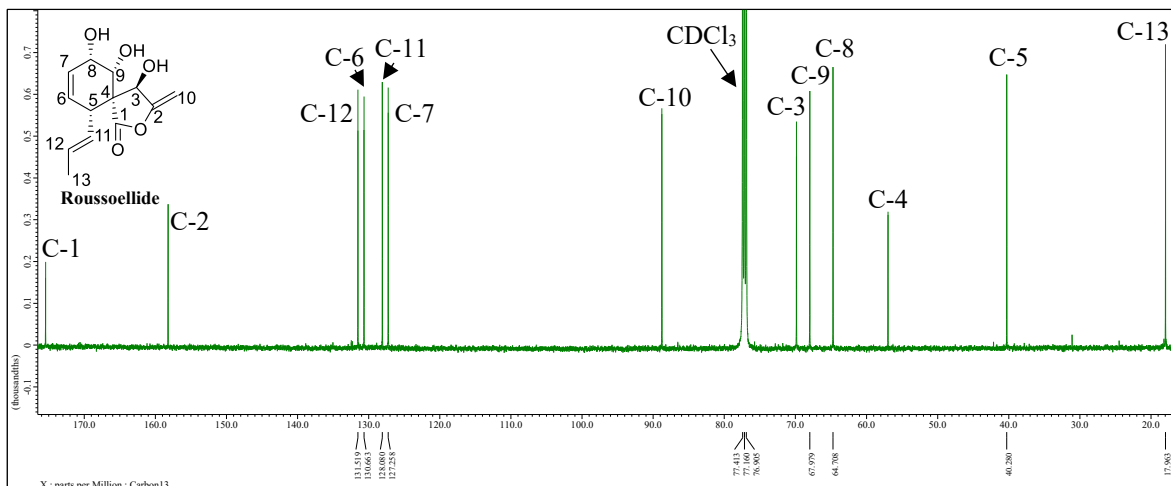
Wijeratne, E. M. K., Gunaherath, G. M. K. B., Chapla, V. M., Tillotson, J., De La Cruz, F., Kang, M. J., U'Ren, J. M., Araujo, A. R., Arnold, A. E., Chapman, E., & Gunatilaka, A. A. L. (2016). Oxaspirol B with p97 Inhibitory Activity and Other Oxaspirols from *Lecythophora* sp. FL1375 and FL1031, Endolichenic Fungi Inhabiting *Parmotrema tinctorum* and *Cladonia evansii*. *Journal of Natural Products*, 79(2), 340–352. doi: 10.1021/ACS.JNATPROD.5B00986/ASSET/IMAGES/LARGE/NP-2015-00986X_0008.JPEG

Xu, H., Wang, L., Zhang, L., Liu, W., Zhang, Q., Zhang, H., Zhang, C., & Zhang, W. (2022). Configurational assignment of malfilamentoside A and a new furanone glycoside malfilamentoside D. *Youji* <https://doi.org/10.6023/cjoc202110038> *Huaxue*, 42(4), 1229.

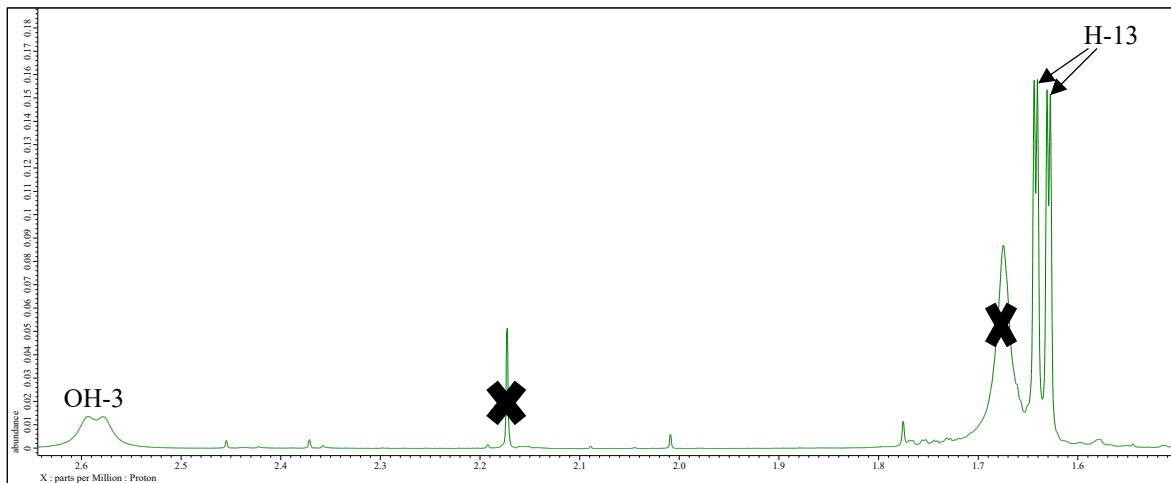
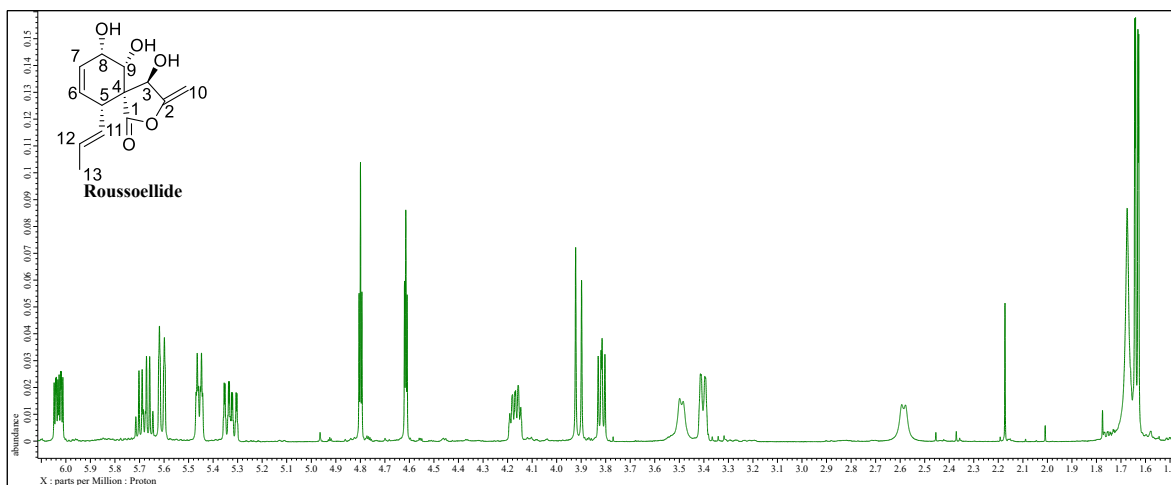
ANEXOS



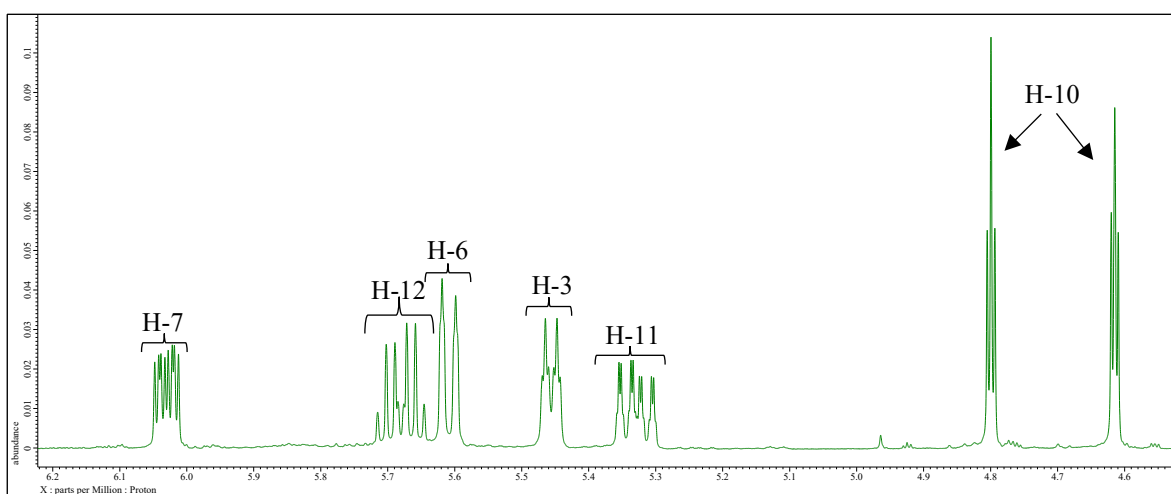
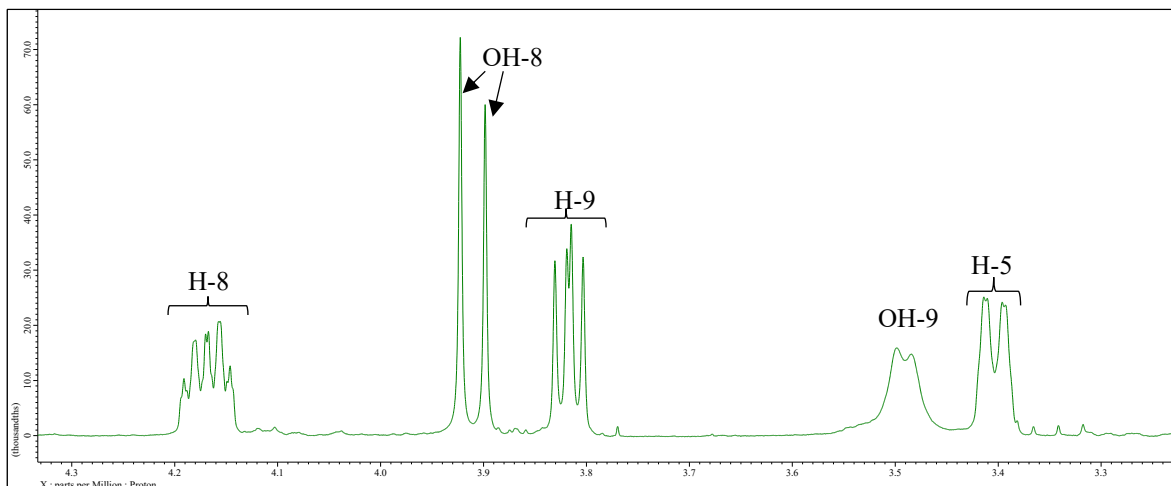
Anexo A. Cromatograma de los extractos obtenidos del cultivo de *Luteomyces trichodermoides* 08.col en diferentes medios.



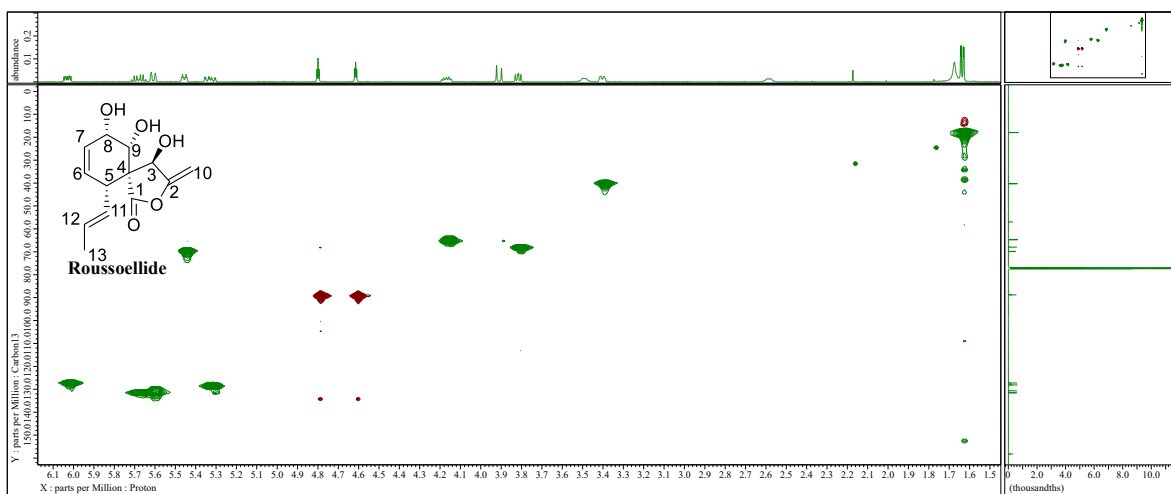
Anexo B. Espectro RMN ^{13}C del compuesto Rousoellide en CDCl_3 a 125 MHz.



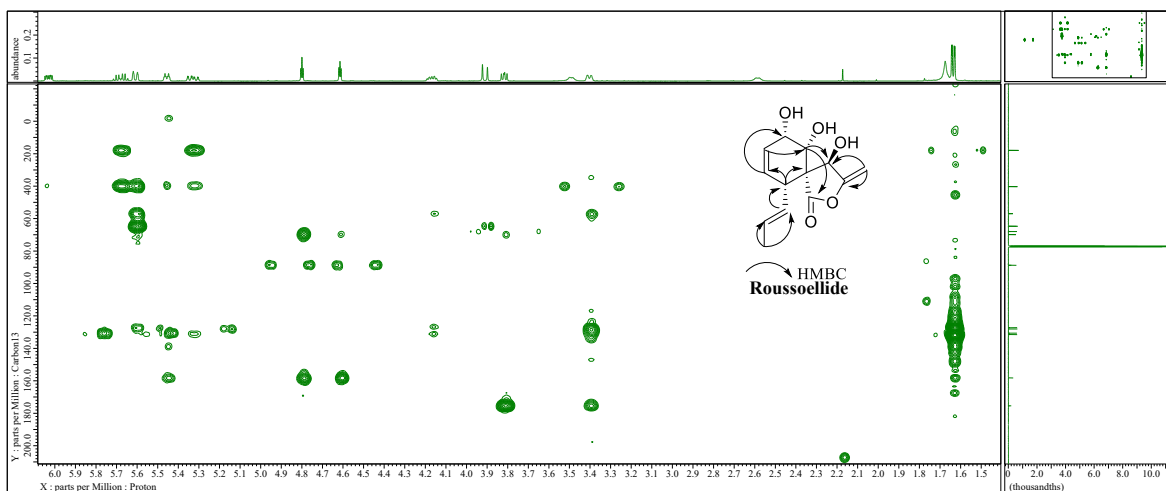
Anexo C. Espectro RMN ^1H del compuesto Rousoellide en CDCl_3 a 500 MHz.



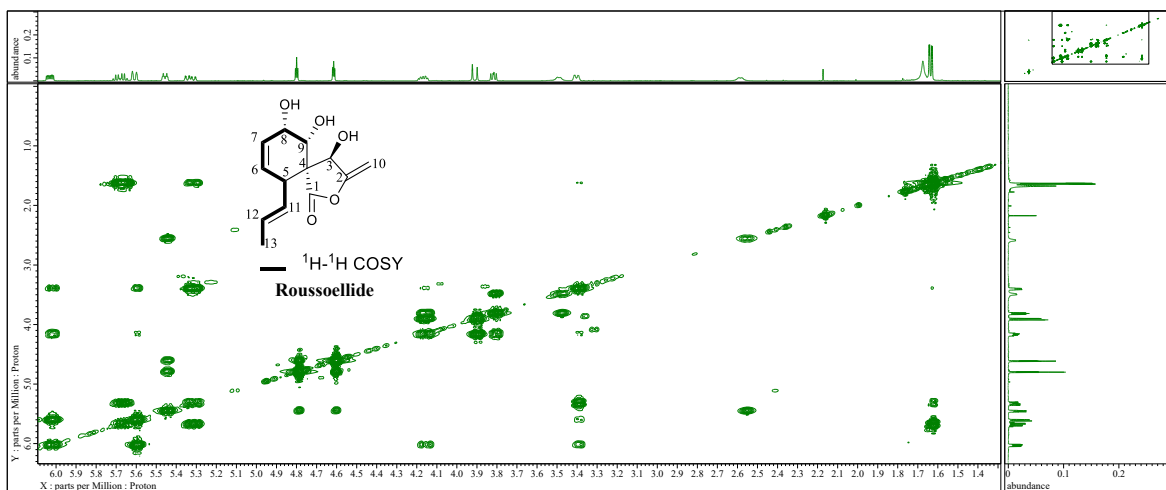
Anexo C (Cont.). Espectro RMN ^1H del compuesto Rousoellide en CDCl_3 a 500 MHz.



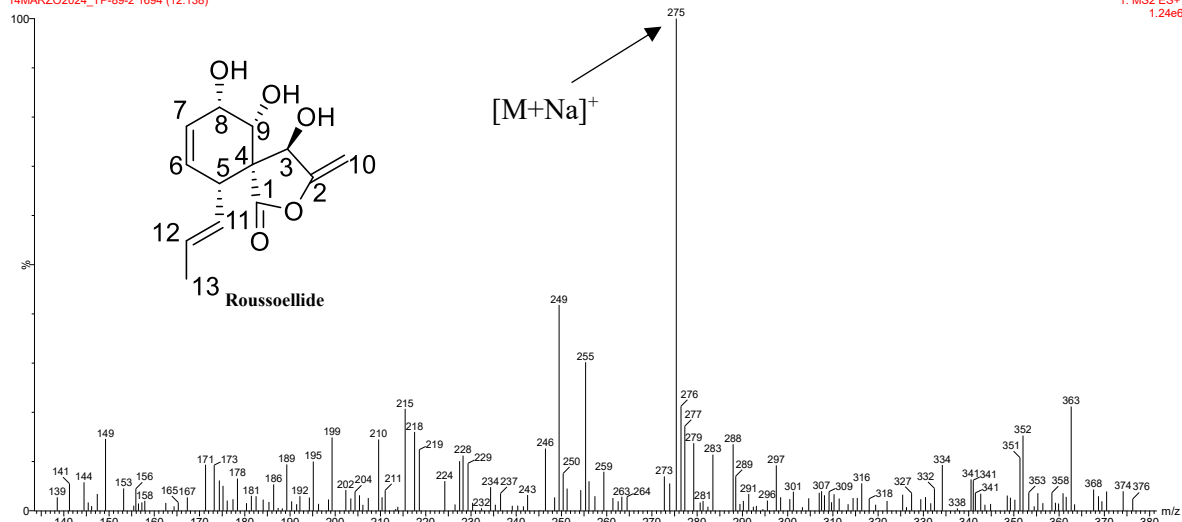
Anexo D. Espectro gHSQC del compuesto Rousoellide en CDCl_3 a 500 MHz.



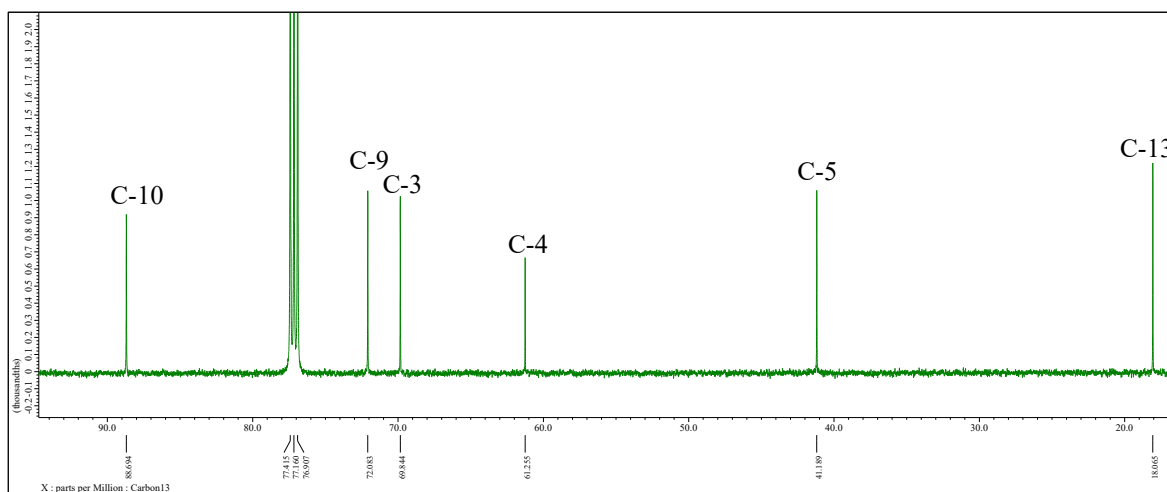
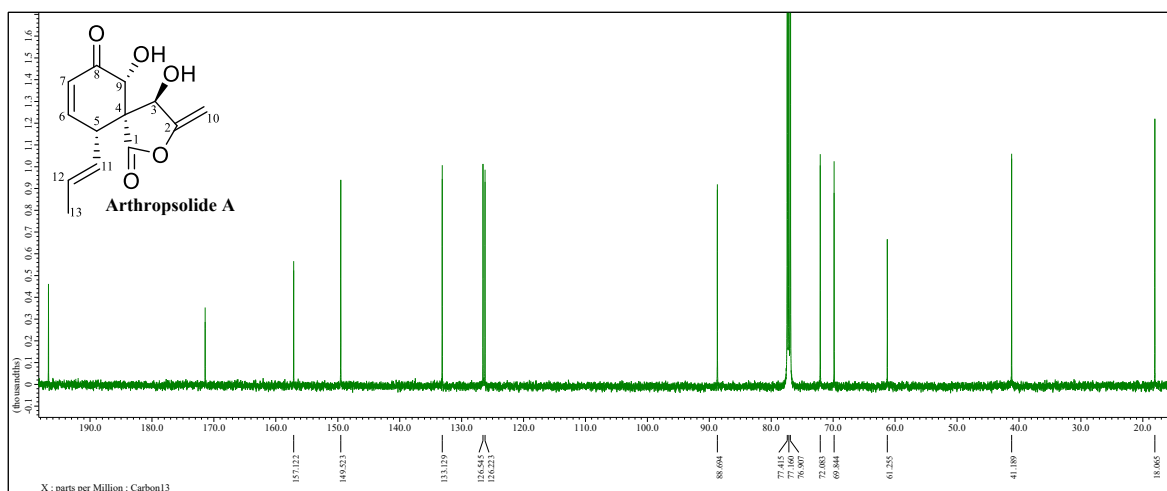
Anexo E. Espectro gHMBC del compuesto Roussoellide en CDCl_3 a 500 MHz.

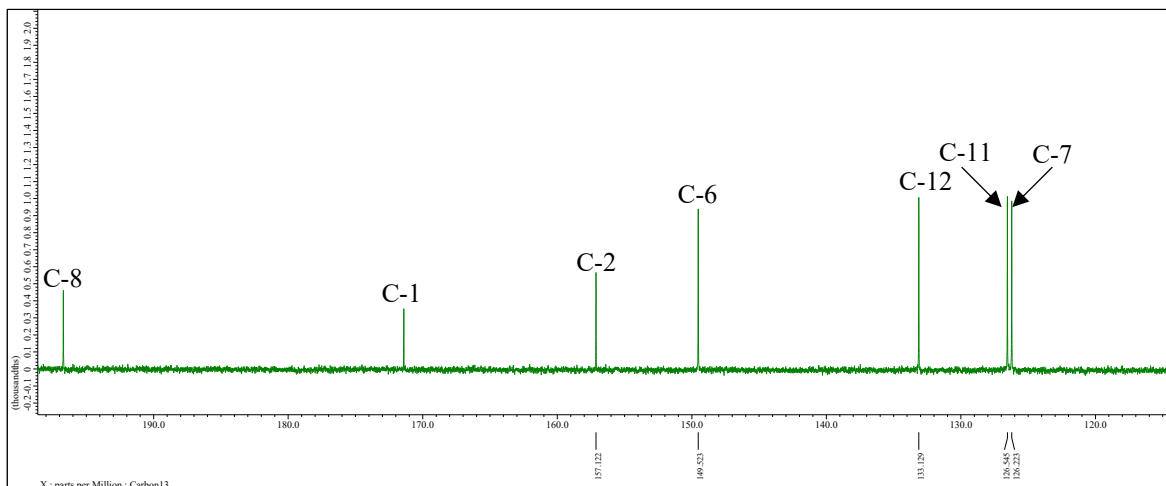


Anexo F. Espectro gCOSY del compuesto Roussoellide en CDCl_3 a 500 MHz.

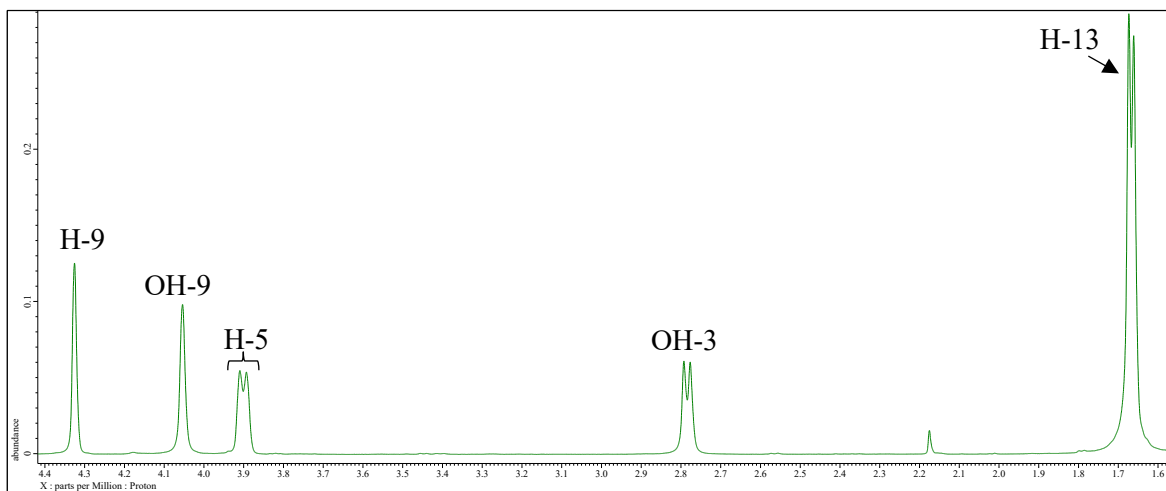
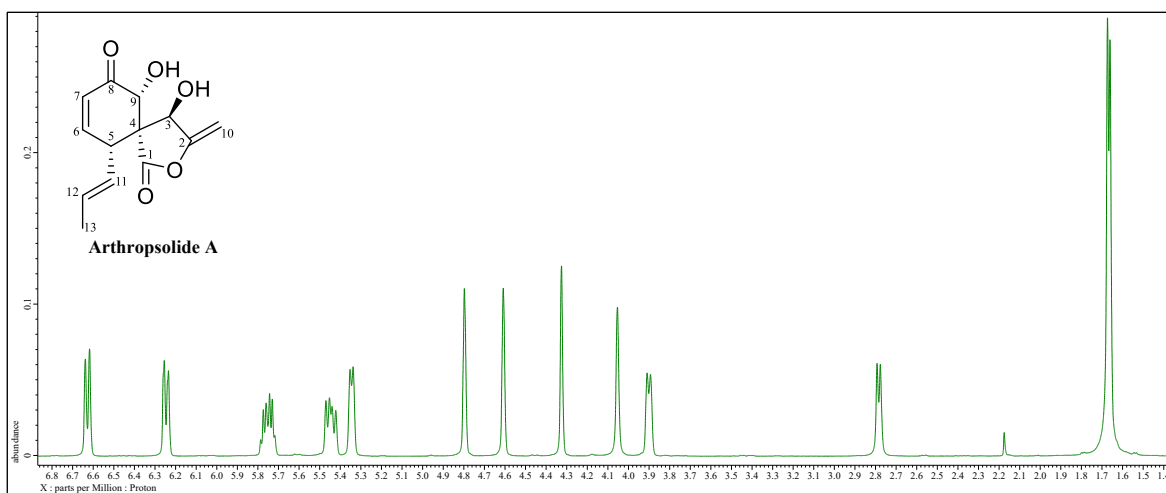


Anexo G. Espectro de masas del compuesto Rousoellide.

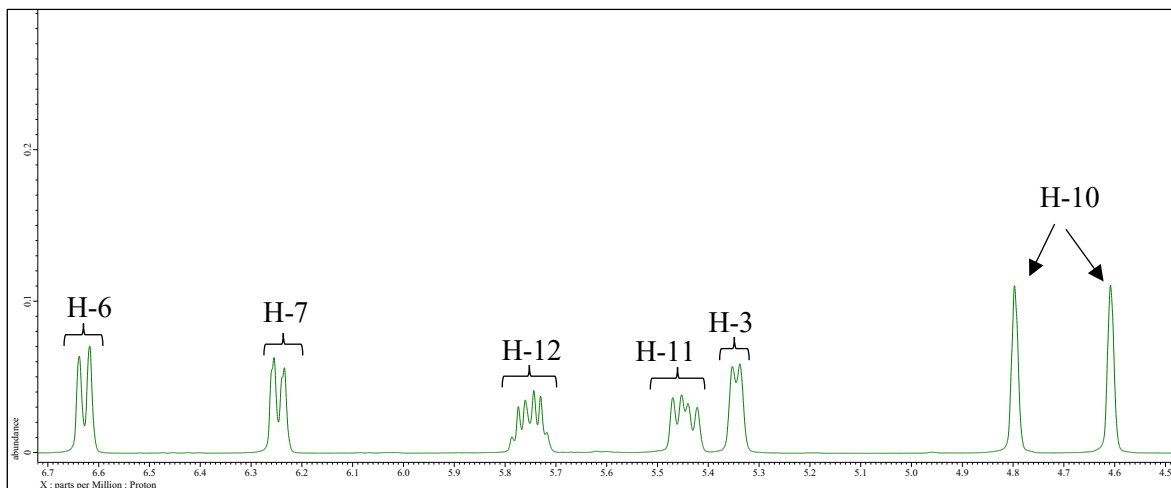
Anexo H. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto Arthroside A en $CDCl_3$ a 125 MHz.



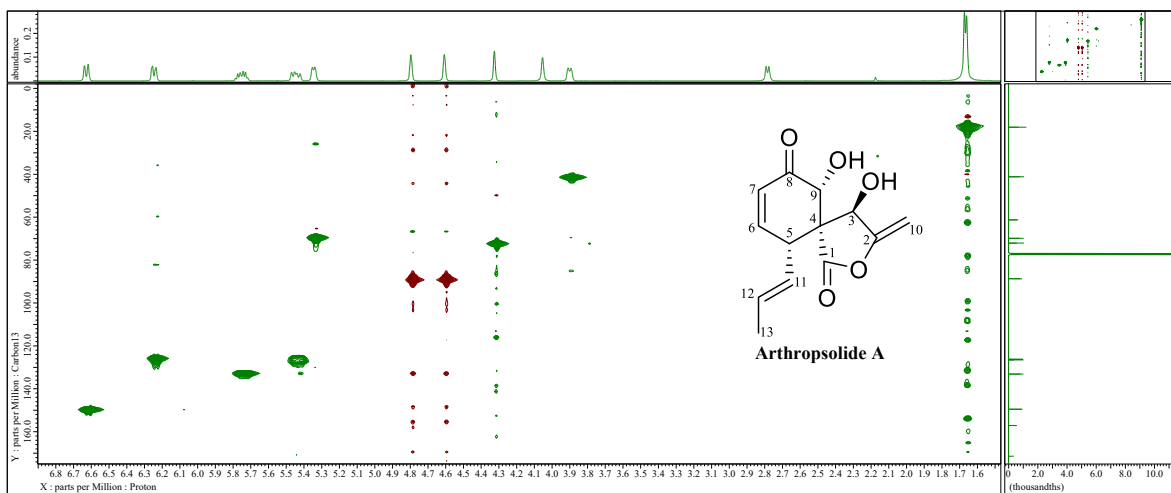
Anexo H (Cont.). Espectro de RMN ¹³C del compuesto Arthrospolide A en CDCl₃ a 125 MHz.



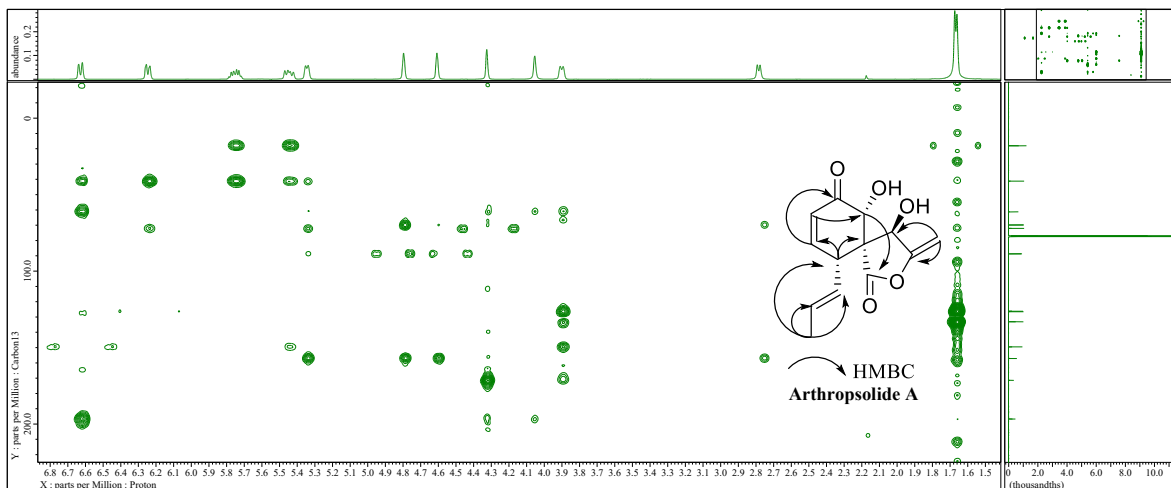
Anexo I. Espectro RMN ¹H del compuesto Arthrospolide A en CDCl₃ a 500 MHz.



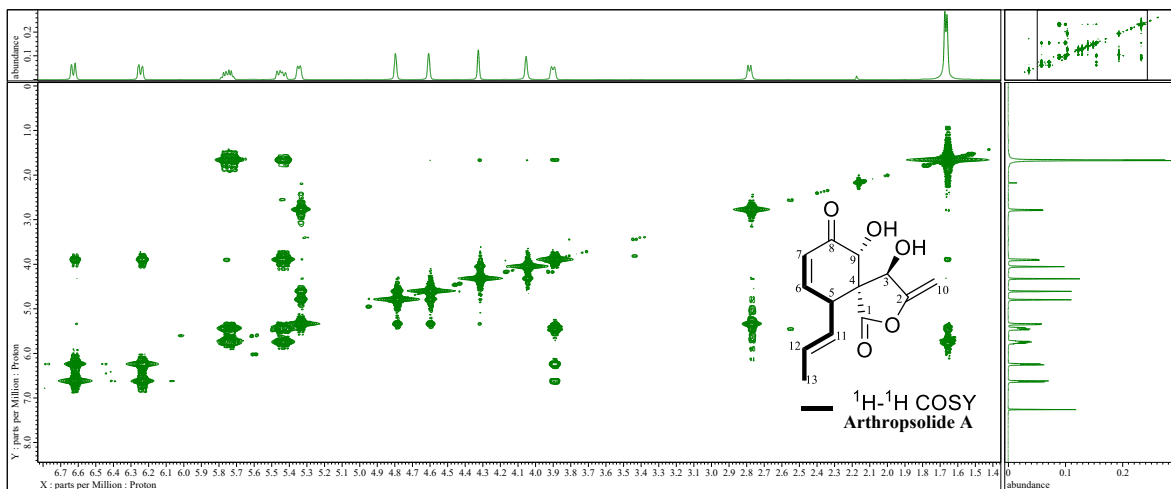
Anexo I (Cont.). Espectro RMN ^1H del compuesto Arthropsolide A en CDCl_3 a 500 MHz.



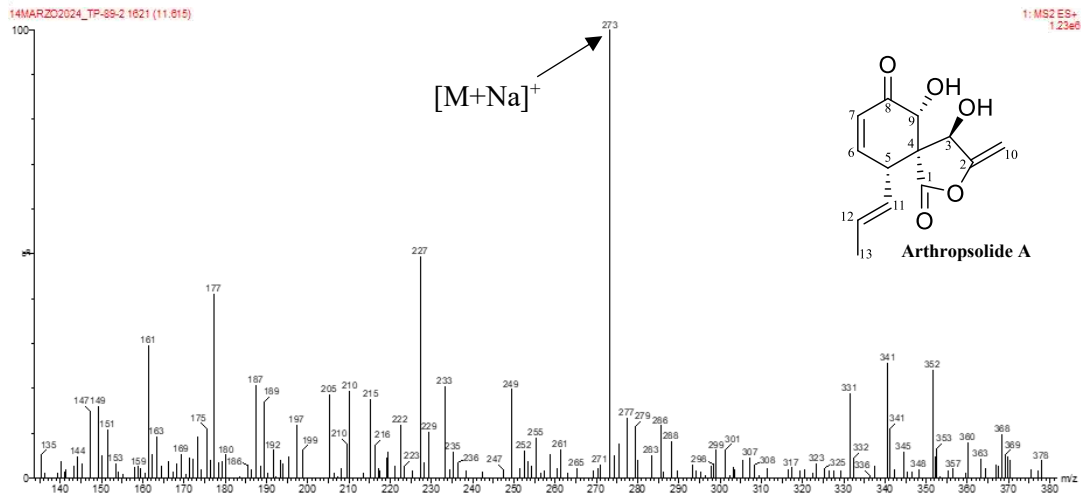
Anexo J. Espectro gHSQC del compuesto Arthropsolide A en CDCl_3 a 500 MHz.



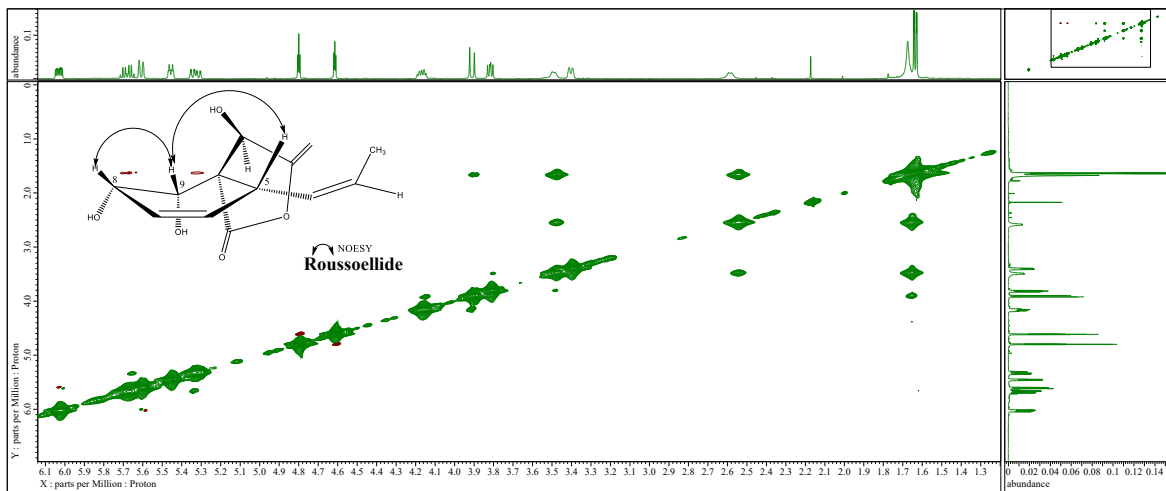
Anexo K. Espectro gHMBC del compuesto Arthrospolide A en CDCl_3 a 500 MHz.



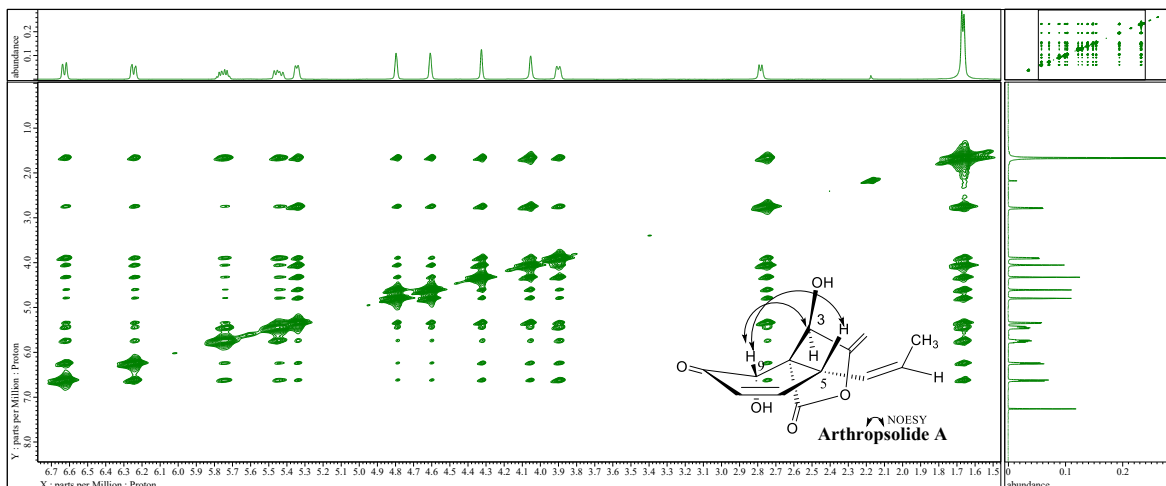
Anexo L. Espectro gCOSY del compuesto Arthrospolide A en CDCl_3 a 500 MHz.



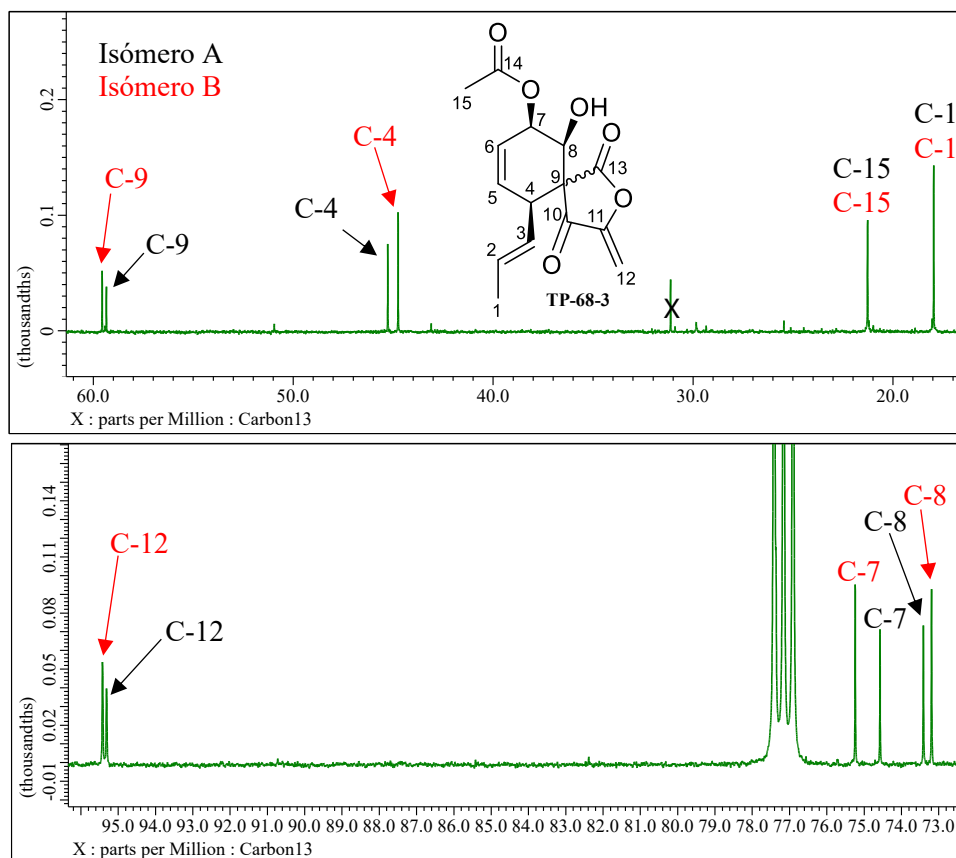
Anexo M. Espectro de masas del compuesto Arthrospolide A.



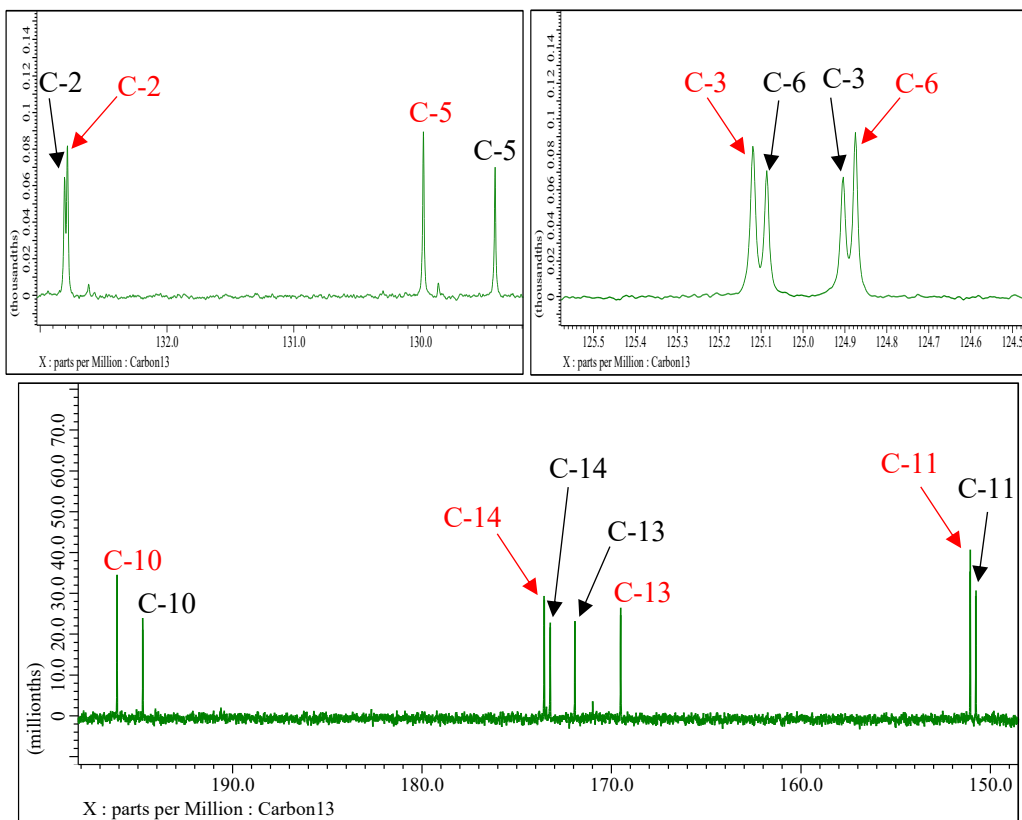
Anexo N. Espectro gNOESY del compuesto Rousoellide en CDCl₃ a 500 MHz.



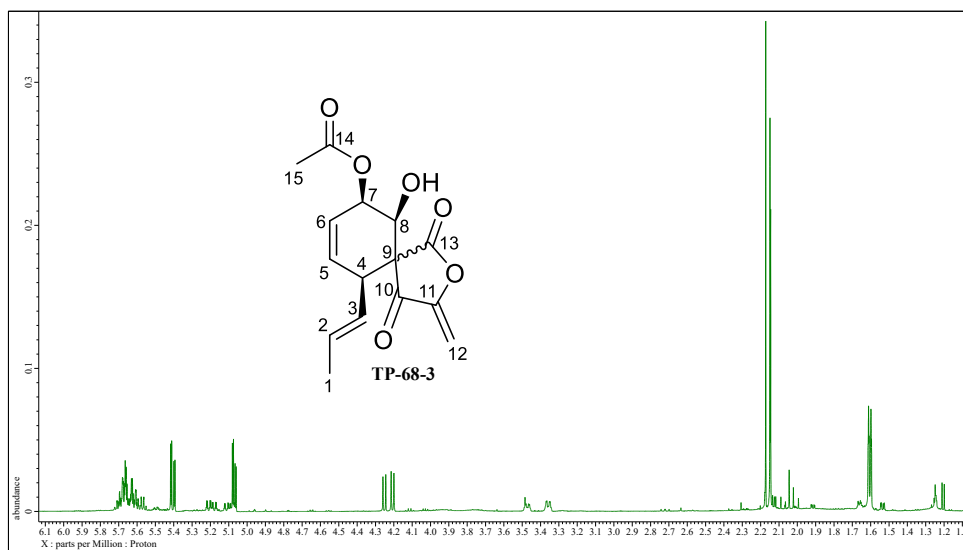
Anexo N. Espectro gNOESY del compuesto Arthropside A en CDCl_3 a 500 MHz.



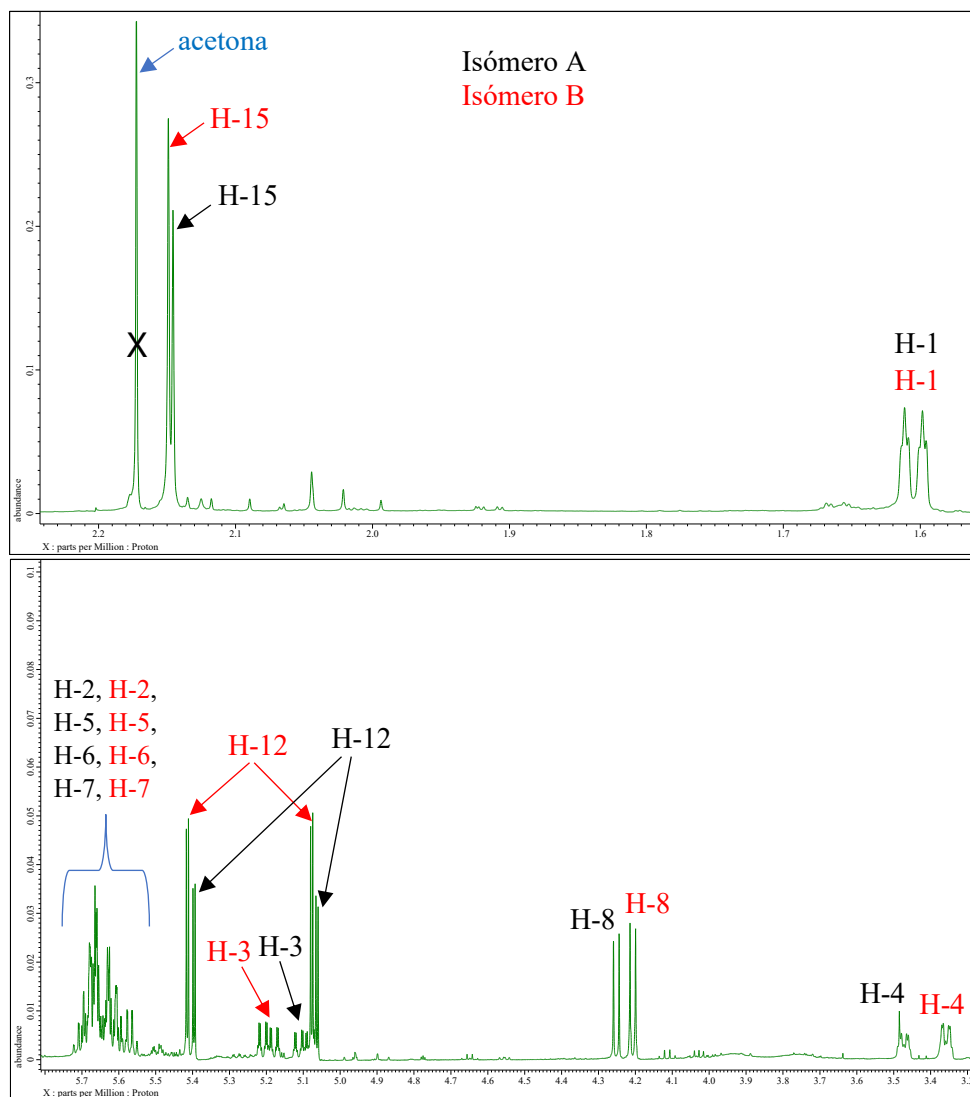
Anexo O. Espectro RMN ^{13}C del compuesto TP-68-3 en CDCl_3 a 125 MHz



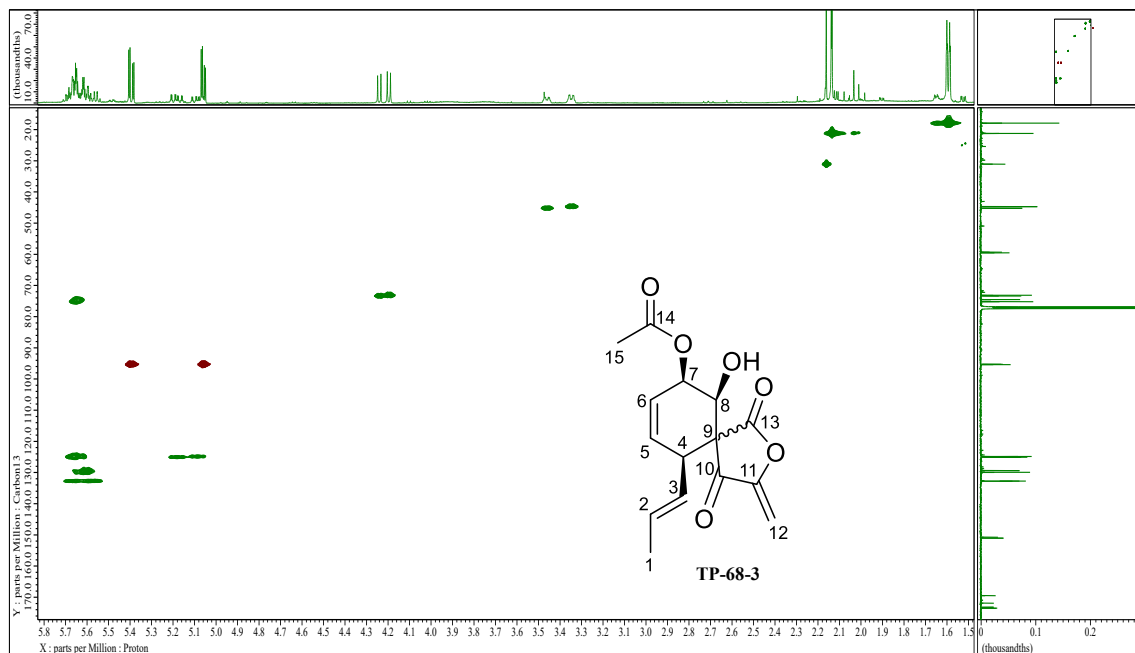
Anexo O (Cont). Espectro RMN ¹³C del compuesto TP-68-3 en CDCl₃ a 125 MHz.



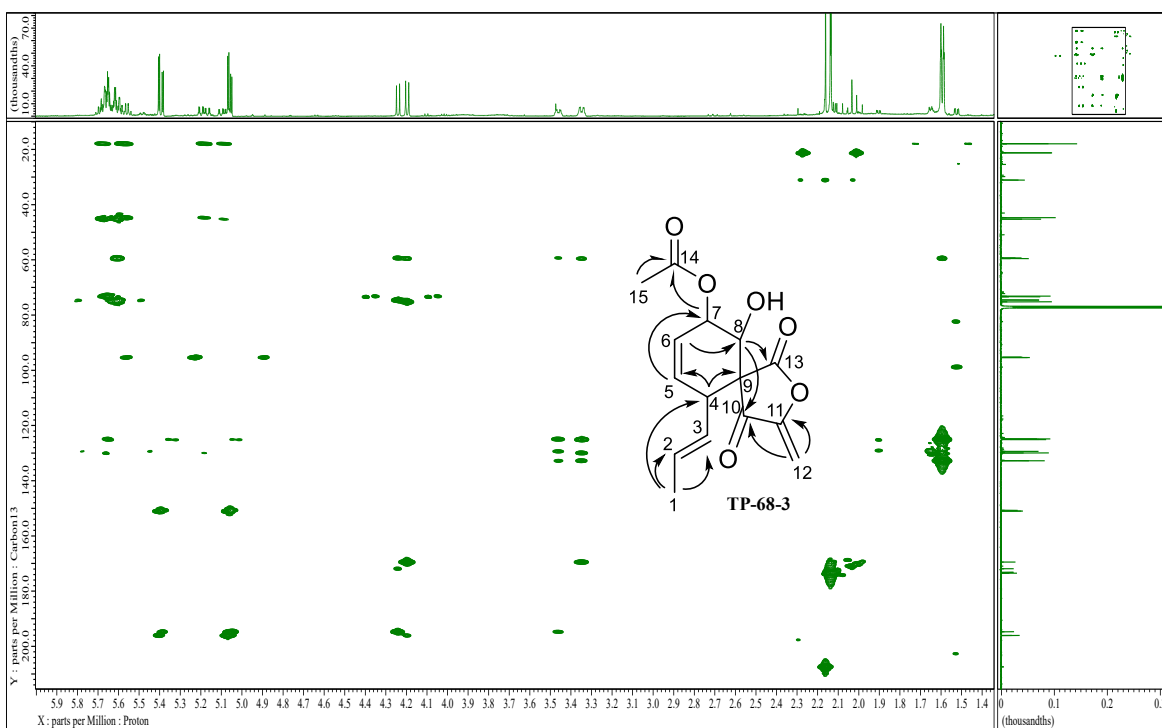
Anexo P. Espectro de RMN ¹H del compuesto TP-68-3 en CDCl₃ a 500 MHz.



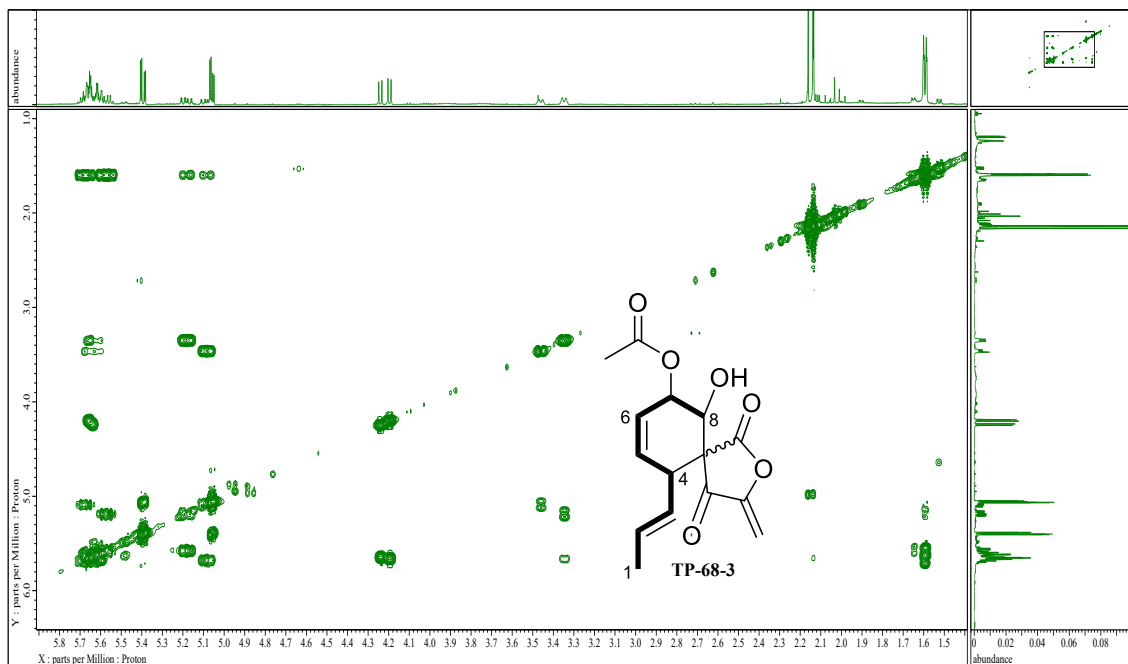
Anexo P (Cont.). Espectro de RMN ¹H del compuesto TP-68-3 en CDCl₃ a 500 MHz.



Anexo Q. Espectro gHSQC del compuesto TP-68-3 en CDCl_3 a 500 MHz.

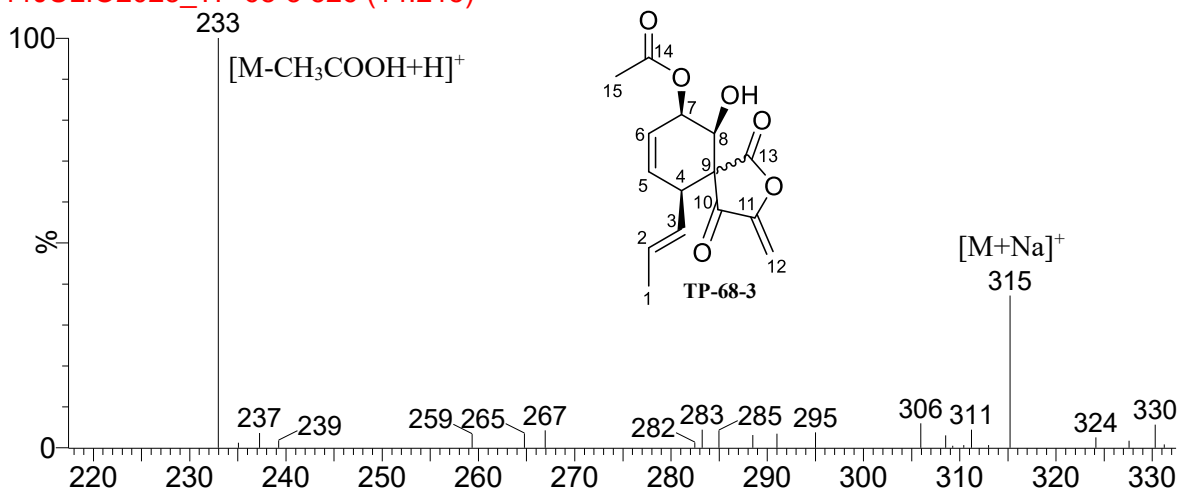


Anexo R. Espectro gHMBC del compuesto TP-68-3 en CDCl_3 a 500 MHz.

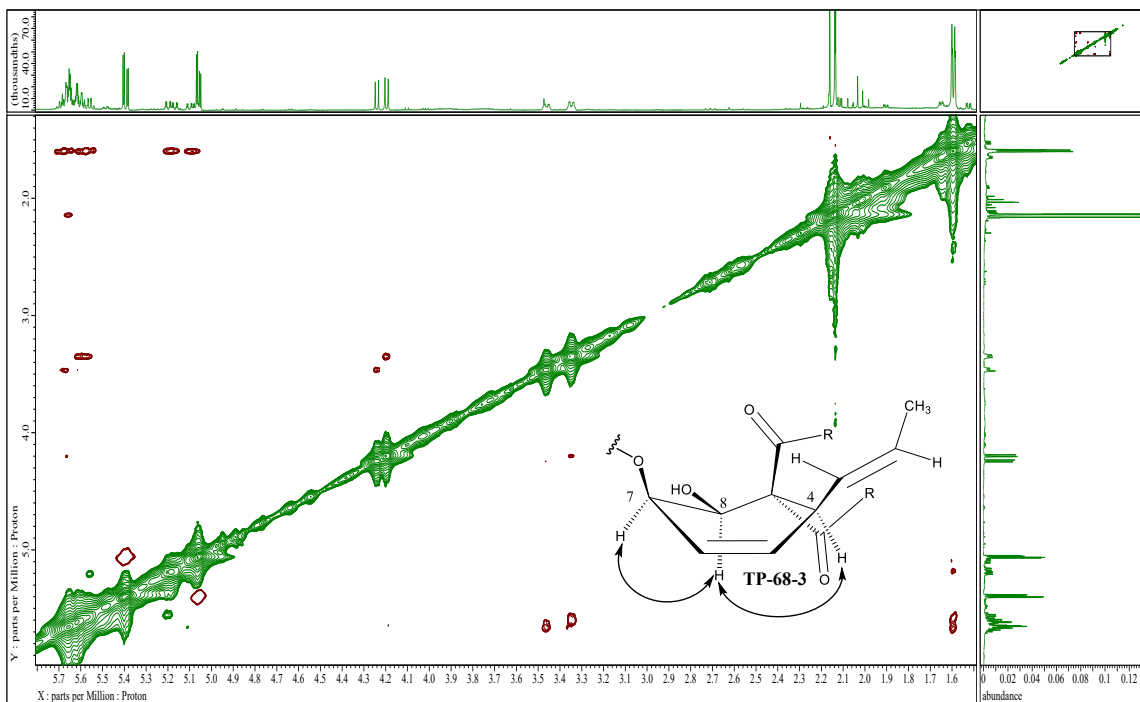


Anexo S. Espectro gCOSY del compuesto TP-68-3 en CDCl_3 a 500 MHz.

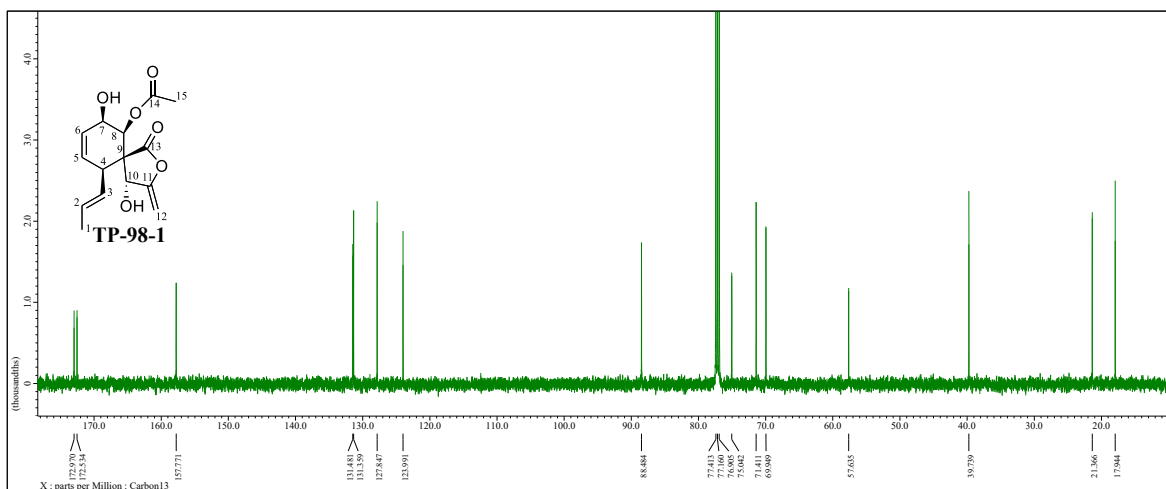
11JULIO2023_TP-68-3 526 (14.215)



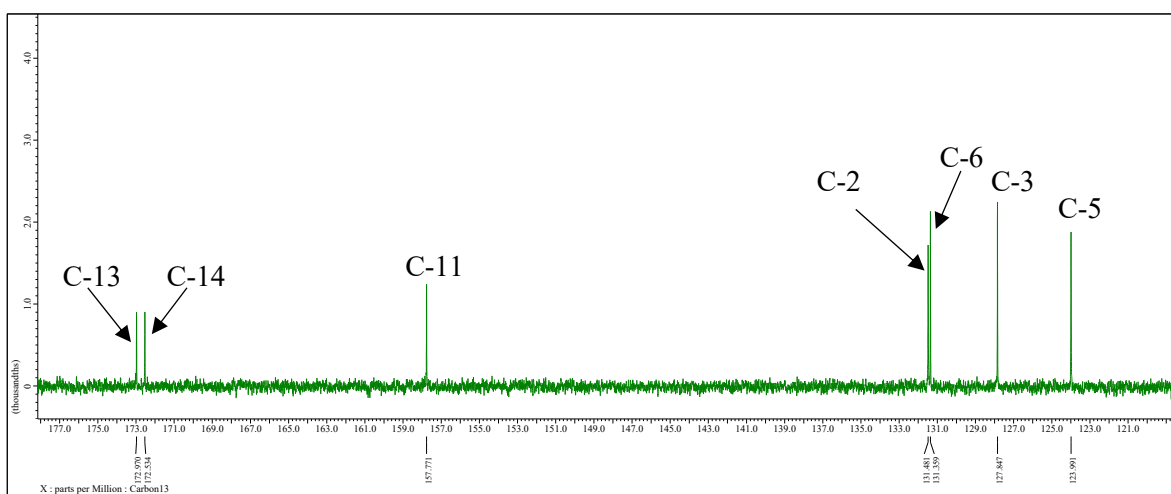
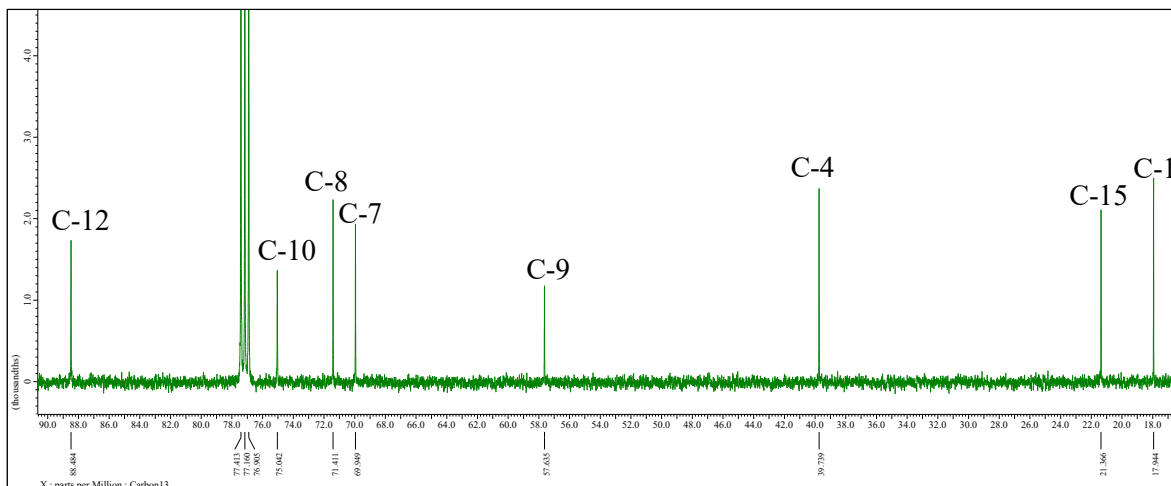
Anexo T. Espectro de masas del compuesto TP-68-3.



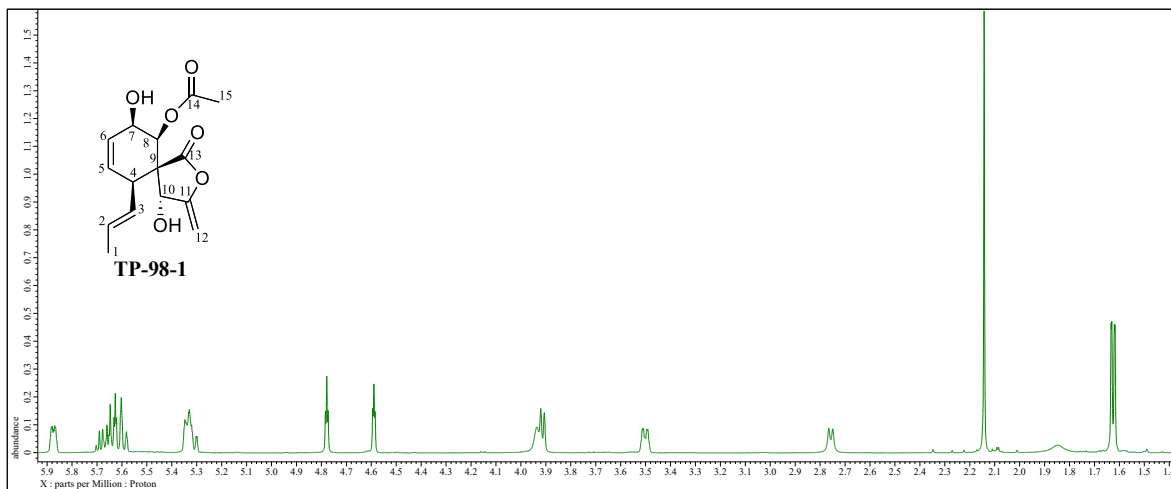
Anexo U. Espectro gNOESY del compuesto TP-68-3 en CDCl_3 a 500 MHz.



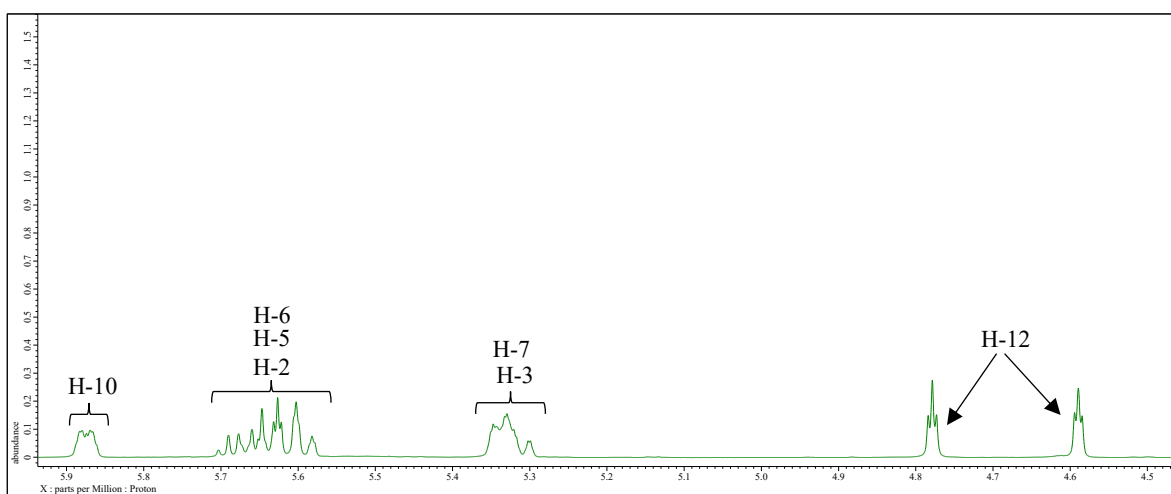
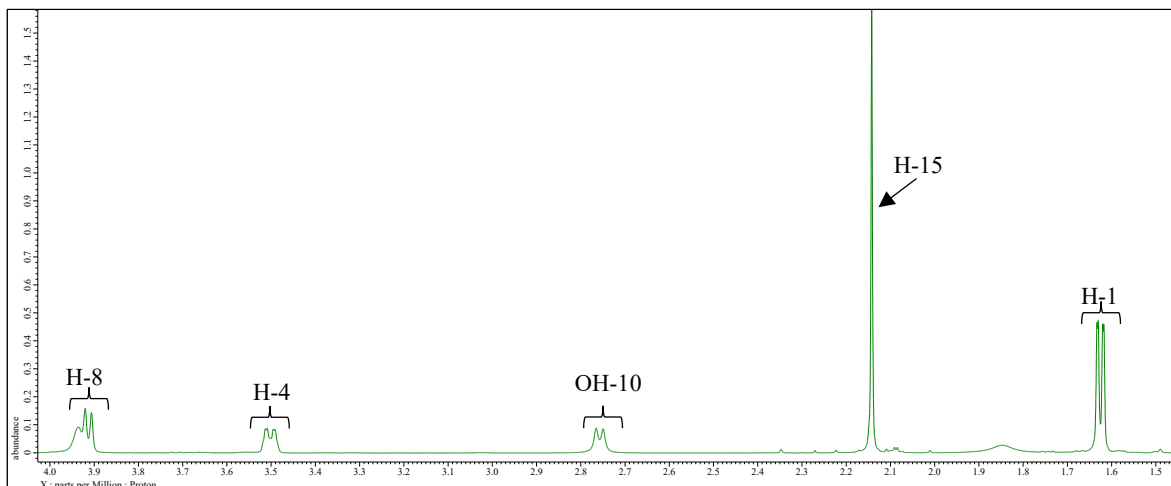
Anexo V. Espectro RMN ^{13}C del compuesto TP-98-1 en CDCl_3 a 500 MHz.



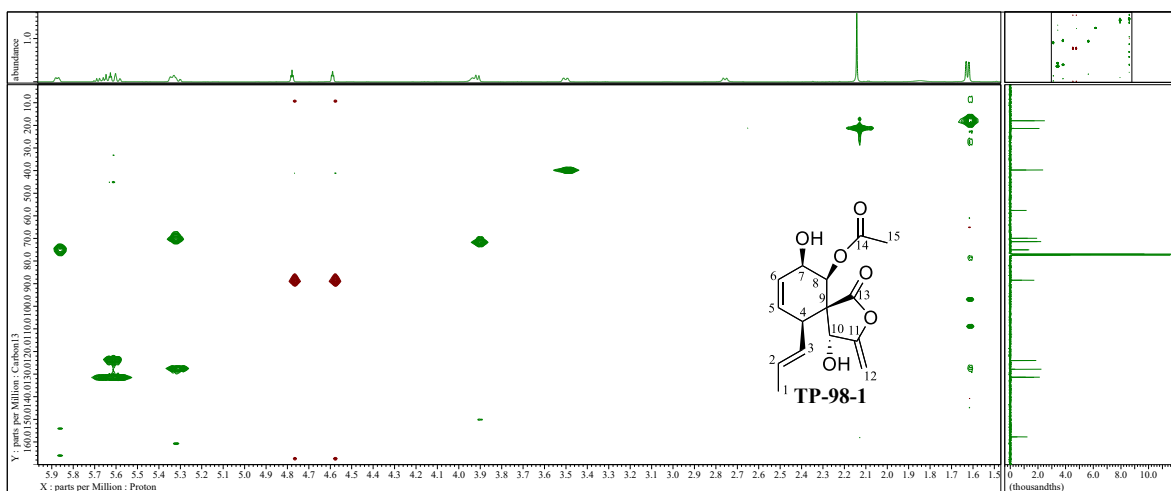
Anexo V.(Cont.). Espectro RMN ¹³C del compuesto TP-98-1 en CDCl₃ a 500 MHz.



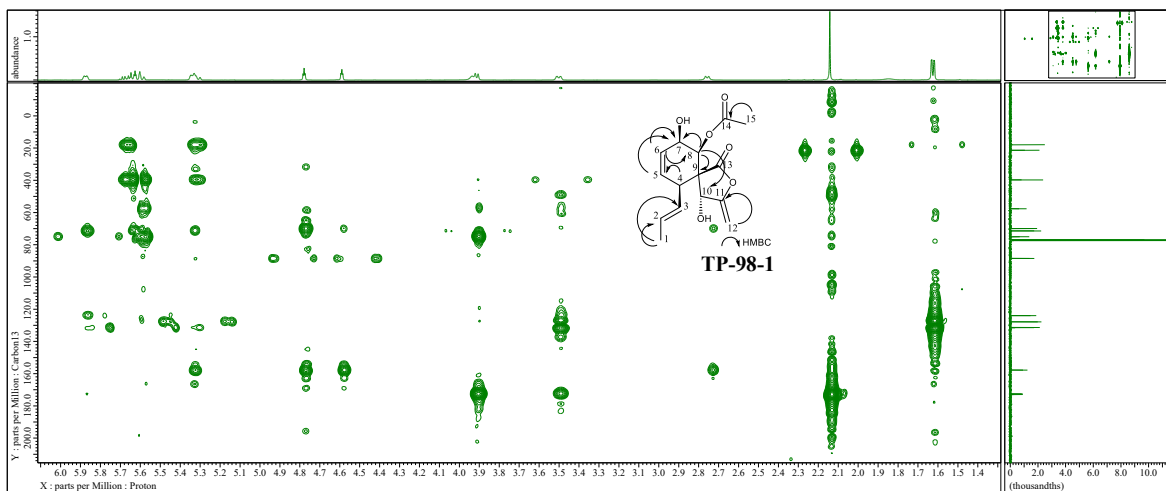
Anexo W. Espectro RMN ¹H del compuesto TP-98-1 en CDCl₃ a 500 MHz



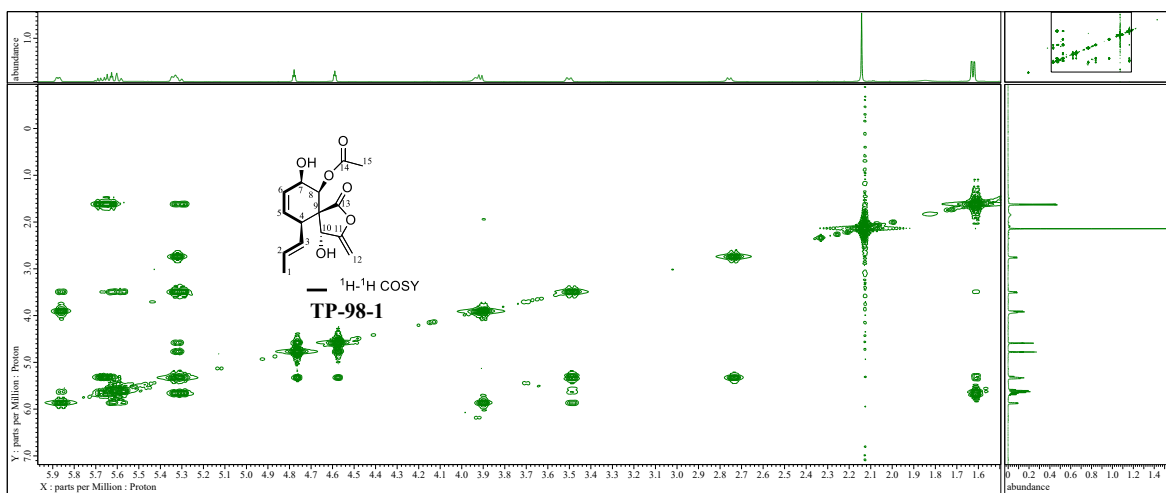
Anexo W. (Cont.). Espectro RMN ^1H del compuesto TP-98-1 en CDCl_3 a 500 MHz



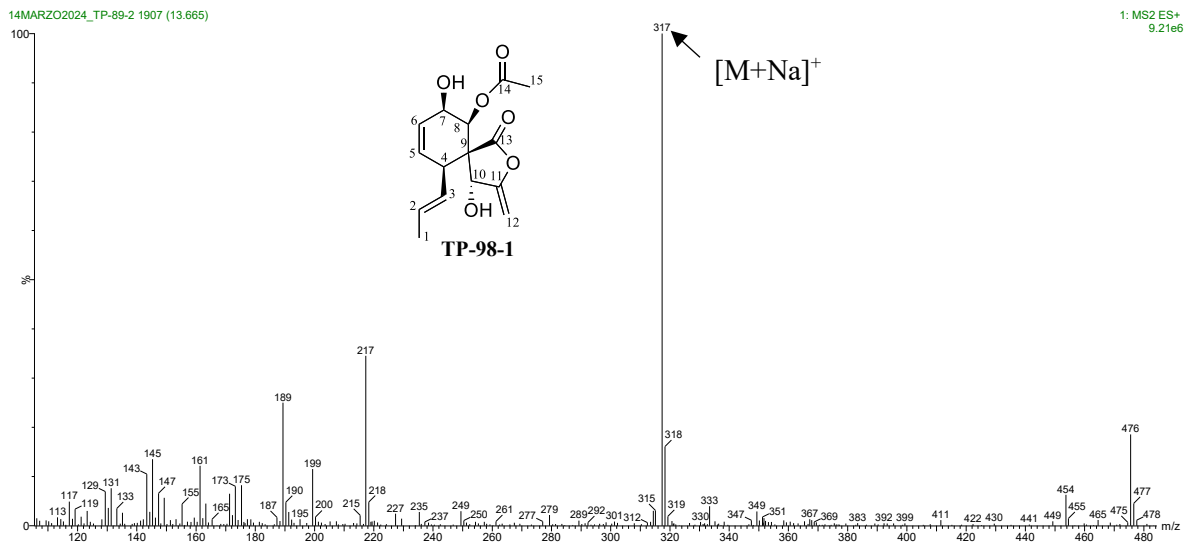
Anexo X. Espectro gHSQC del compuesto TP-98-1 en CDCl_3 a 500 MHz.



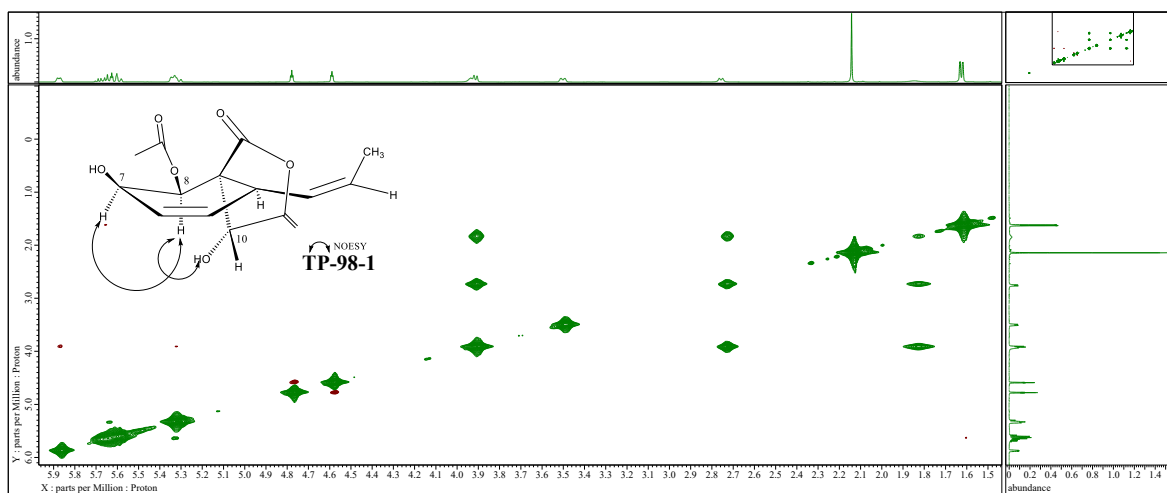
Anexo Y. Espectro gHMBC del compuesto TP-98-1 en CDCl_3 a 500 MHz.



Anexo Z. Espectro gCOSY del compuesto TP-98-1 en CDCl_3 a 500 MHz.



Anexo AA. Espectro de masas del compuesto TP-98-1.



Anexo BB. Espectro gNOESY del compuesto TP-98-1 en CDCl₃ a 500 MHz.