

Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

**“Estudio de los metabolitos secundarios del hongo *Escovopsis* sp.  
A.det.08col aislado de una colonia de hormigas *Apterostigma  
dentigerum*”**

Trabajo de Grado como requisito para optar por el título de:

Licenciado en Química

Tania Denice Pérez Vásquez

EC-22-12747

Asesor: Dr. Humberto Ortega

Co-asesor: Dr. Hermógenes Fernández-Marín

Panamá 2022

---

**Dr. Humberto Ortega**

**Asesor**

**Departamento de Química Orgánica**

---

**Dr. Hermógenes Fernández-Marín**

**Co-asesor**

**Investigador en el centro de  
Biodiversidad y Descubrimiento de  
Drogas de INDICASAT-AIP**

## Índice general

Índice de figuras .....	5
Índice de tablas .....	6
Lista de abreviaturas y términos .....	7
Agradecimientos .....	9
Dedicatoria.....	10
Resumen .....	11
Introducción .....	12
1. Marco teórico.....	15
1.1 Simbiosis de las hormigas cultivadoras de hongos .....	16
1.2 El hongo parásito <i>Escovopsis</i> .....	16
1.2.1 Interacciones entre <i>Escovopsis</i> .....	18
1.2.2 Metabolitos secundarios reportados del hongo <i>Escovopsis</i> .....	18
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivos generales.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Metodología .....	23
3.1 Equipos, solventes y materiales utilizados.....	24
3.2 Aislamiento de hongos <i>Escovopsis</i> .....	25
3.3 Cultivo a gran escala del hongo <i>Escovopsis</i> sp. A.det.08.col. ....	26
3.4 Purificación de Compuestos obtenidos del hongo <i>Escovopsis</i> sp. A.det.08.col. ....	26
3.5 Medición de rotación específica de compuestos. ....	28
3.6 Cultivo a pequeña escala de hongos <i>Escovopsis</i> ... ..	29
3.7 Fraccionamiento de Crudos obtenidos de los cultivos a pequeña escala de hongos <i>Escovopsis</i> .....	29
3.8 Análisis por cromatografía líquida acoplada a masas de compuestos y extractos.....	30
3.9 Bioensayo contra hongos <i>Escovopsis</i> .....	31
3.10 Bioensayos antibacterianos .....	31
3.10.1 Preparación del estándar de turbidez.....	31
3.10.2 Preparación del inóculo bacteriano. ....	31

3.10.3 Siembra de la muestra .....	32
4. Resultados y Discusión .....	33
4.1 Elucidación estructural de compuestos aislados de <i>Escovopsis</i> sp. A.det.08.col .....	34
4.1.1 Compuestos TP-38-2 y TP-39-5.....	34
4.1.2 Compuesto TP-44-3.....	37
4.1.3 Compuesto TP-43-2... ..	41
4.2 Comparación del perfil químico de diferentes hongos <i>Escovopsis</i> .....	43
4.3 Bioensayo de fracciones contra <i>Escovopsis</i> .....	49
4.4 Bioensayos antibacterianos .....	51
Conclusiones .....	53
Recomenadaciones.....	54
Bibliografía .....	55
Anexos.....	61

<b>Figura 1. Relación simbiótica cuatripartita de las hormigas <i>Acromyrmex echinator</i> y sus simbioses.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 2. Compuestos producidos por hongos del género <i>Escovopsis weberi</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3. Cultivo a gran escala del hongo <i>Escovopsis</i> sp. A.det.08.col.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 4. Estructura de compuesto Arthropsolide D, TP-38-2, y TP-39-5. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 5. Principales correlaciones vistas en el COSY y HMBC para TP-38-2 y TP-39-5 . ....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 6. Analisis de la configuración relativa de TP-38-2 y TP-39-5 .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 7. Estructura y correlaciones <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY y HMBC de TP-44-3 .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 8. Análisis de la configuración relativa de TP-44 3.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 9. Análogos de los compuestos TP-38-2, TP-39-5 y TP-44-3.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 10. Estructuras de los compuestos gotjawaside, malfimentoside A, TP-43-2 .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 11. Análisis de la configuración relativa de la porción del monosacárido de TP-43-2 .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 12. Hongos <i>Escovopsis</i> estudiados.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 13. Comparación de cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y los compuestos aislados .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 14. Comparación de de cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y los hongos aislados de colonias <i>Apterostigma</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 15. Comparación de cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y los hongos aislados de colonias <i>Acromyrmex</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 16. Comparación de cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y los hongos aislados de otras colonias de hormigas .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 17. Resultados del bioensayo contra hongo <i>Escovopsis</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 18. Ejemplo de resultados de los bioensayos antibacterianos. ....</b>	<b>52</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Hongos <i>Escovopsis</i> Estudiados .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 2. Crudos obtenidos de hongos <i>Escovopsis</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 3. Rendimiento obtenido de cada fracción de extracto de crudos .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 4. Datos RMN Arthroposolide, TP-38-2, TP-39-5 en CDCl<sub>3</sub> .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 5. Datos RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C TP-38-2, TP-39-5 en CD<sub>3</sub>OD .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 8. Datos de bioensayos antibacterianos .....</b>	<b>51</b>

## Lista de abreviaturas y términos

**AcOEt** = Acetato de etilo

**ACN** = Acetonitrilo

**PDA** = Agar de papa y dextrosa

**cm** = Centímetro

**CDCl<sub>3</sub>** = Cloroformo deuterado

**HPLC** = Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**UPLC** = Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución

**δ** = Desplazamiento químico

**DMSO** = Dimetilsulfóxido

**d** = Doblete

**br d** = Doblete ancho

**dd** = Doble doblete

**ddq** = Doble doblete cuarteto

**ddd** = Doble doblete doblete

**MS** = Espectrometría de Masas

**gCOSY** = *Gradient correlation spectroscopy*

**gHSQC** = *Gradient heteronuclear single-quantum correlation*

**gHMBC** = *Gradient heteronuclear multiple-bond correlation*

**gNOESY** = *Gradient Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

**°C** = Grados Celsius

**ESI** = Ionización por electrospray

**MHz** = Megahercio

**MeOH** = Metanol

**CD<sub>3</sub>OD** = Metanol deuterado

**μL** = Microlitro

**mg** = Miligramo

**mm** = Milímetro

**m** = Multiplete

**RMN** = Resonancia Magnética Nuclear

**RMN <sup>13</sup>C** = Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

**RMN <sup>1</sup>H** = Resonancia Magnética Nuclear de Protón

**s** = Singulete

**br s** = Singulete ancho

**UV** = Ultravioleta

## **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 Magister Kathleen Hernández por ayudar a realizar los bioensayos antimicrobianos.

Al Dr. Hermógenes Fernández-Marín por realizar las colectas de las hormigas, aislamiento de los hongos *Escovopsis*, por facilitar algunos solventes orgánicos y diversos insumos de microbiología.

Al Dr. Humberto Ortega por la paciencia, los consejos, por la excelencia que desempeña como investigador y también como profesor.

## **Dedicatoria**

A Dios, mi Señor, que como dice Efesios, siempre nos da más de lo que podemos soñar o pedir; A mi padre, Mynor, mi héroe, el hombre al que Dios le ha dado gracia; A mi madre, Yesenia, que pueda seguir honrando su vida tanto, como ella bendice la mía; A mi hermano Daniel, que siempre escucha, siempre está presente y siempre sabe que decir; A mi abuelo Felipe el hombre de fe; A mi abuelo Ángel, el mejor narrador de historias; A mis abuelas Zenaida y Teresa, las que amo con todo mi corazón; En memoria de mi tía Leticia, mi revolucionaria favorita.

---

## Resumen

---

Los hongos del género *Escovopsis* son parásitos especializados que solo se han encontrado en los ecosistemas de las colonias de hormigas cultivadoras de hongos (Tribu Attini), y han evolucionado junto con estas durante millones de años. Estos hongos son capaces de producir metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos mutualistas de estas hormigas, y además afectan el comportamiento de las hormigas attines. Incluso, algunas especies de *Escovopsis* también pueden exhibir comportamientos antagonistas contra hongos del mismo género de distintas colonias.

En esta investigación se escogieron diecisiete hongos *Escovopsis* que han sido aislados, identificados y estudiados previamente por el laboratorio del Dr. Hermógenes Fernández-Marín de INDICASAT-AIP. Con el fin de comparar sus perfiles químicos, se cultivaron a pequeña escala en medio de cultivo PDA, se obtuvo el extracto crudo con acetato de etilo, se analizaron por UPLC-UV-ESI-MS, y se le realizaron bioensayos contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.

Los hongos *Escovopsis* de colonias *Apterostigma* tiene la capacidad de producir compuestos que inhiben el crecimiento de otros hongos *Escovopsis* y producir compuestos antimicrobianos. Por tal motivo se escogió el hongo ***Escovopsis* sp. A. det. 08 col** para estudiar sus metabolitos secundarios.

Se aislaron 4 compuestos nuevos, una butenolida aromática y tres policétidos, del hongo ***Escovopsis* sp. A. det. 08 col**. Se establecieron las estructuras a través de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear y espectrometría de masas.

Después de analizar el perfil químico de cada hongo se encontraron diferencias notables entre algunas de las cepas aisladas, especialmente entre los hongos aislados de géneros distintos de hormigas Attini, incluyendo *Acromyrmex*, *Atta*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Paratrachymyrmex* y *Mycetomoellerius*.

---

# Introducción

---

## Introducción

---

Las hormigas cultivadoras de hongos (tribu Attini), poseen un ecosistema de diversas interacciones complejas. Dentro de sus colonias han desarrollado una relación mutualista obligada con basidiomicetos (Por ejemplo, *Leucoagaricus gongylophorus*), un hongo que depende de forma exclusiva de las hormigas para su propagación dentro de las colonias. Estos insectos proveen diferentes tipos de sustratos al hongo para que puedan desarrollarse y a cambio este simbionte funciona como principal fuente de alimento para las hormigas. (Moller et al., 2011)

Existe también en estos ecosistemas un grupo de hongos patógenos especializados del género *Escovopsis*, que se nutren casi de manera exclusiva del hongo basidiomycete mutualista (Lepiotaceae), considerándose además como un posible biocontrolador frente a este tipo de hormigas. (Currie y Reynolds, 2004; Travaglini et al., 2018)

Las hormigas Attini poseen algunos mecanismos de defensa contra *Escovopsis*, como la limpieza manual de los jardines y de compuestos antimicrobianos producidos por actinobacterias simbiotes que recubren el exoesqueleto de las hormigas. A pesar de estos sistemas de protección, los hongos *Escovopsis* son capaces de producir compuestos y/o enzimas que degradan las hifas de *L. gongylophorus* (Currie y Reynolds, 2004). Se han reportado que algunos metabolitos secundarios como la melinacidina IV y la shearinina D pueden inhibir el crecimiento de las bacterias mutualistas (género *Pseudonocardia*), la shearinina D puede reducir la defensa del comportamiento de las hormigas obreras, además, la emodina y la cicloartropsona son capaces de inhibir el crecimiento del hongo mutualista *L. gongylophorus*. (Dhodary et al., 2018; Heine et al., 2018)

Además de la interacción antagonista que posee *Escovopsis* con el resto del ecosistema de las hormigas Attini, también muestran relaciones neutrales y antagonistas con cepas de hongos *Escovopsis* de distintas colonias. Por ejemplo, los hongos *Escovopsis* de colonias de hormigas *Apterostigma* tienen la capacidad de producir compuestos que inhiben el crecimiento de hongos *Escovopsis* aislados de otras colonias de hormigas Attini. Las relaciones antagonistas y neutrales están basadas en la compatibilidad que cada cepa posee, reguladas por factores genéticos y mediadas por la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, por lo que podemos tener una idea de qué tan distintos son

estas cepas entre sí, basándonos en su perfil químico. (Malik y Vilgalys, 1999; Christopher et al., 2021)

Tomando en cuenta estos antecedentes, nos planteamos en esta investigación estudiar los metabolitos secundarios producidos por el hongo *Escovopsis* sp. A.det.08col, aislado de una colonia de hormiga *Apterostigma dentigerum*, y comparar su perfil químico contra otras 16 cepas de hongos *Escovopsis* aisladas de colonias de seis géneros distintos de hormigas Attini.

# **Capítulo 1**

## **Marco Teórico**

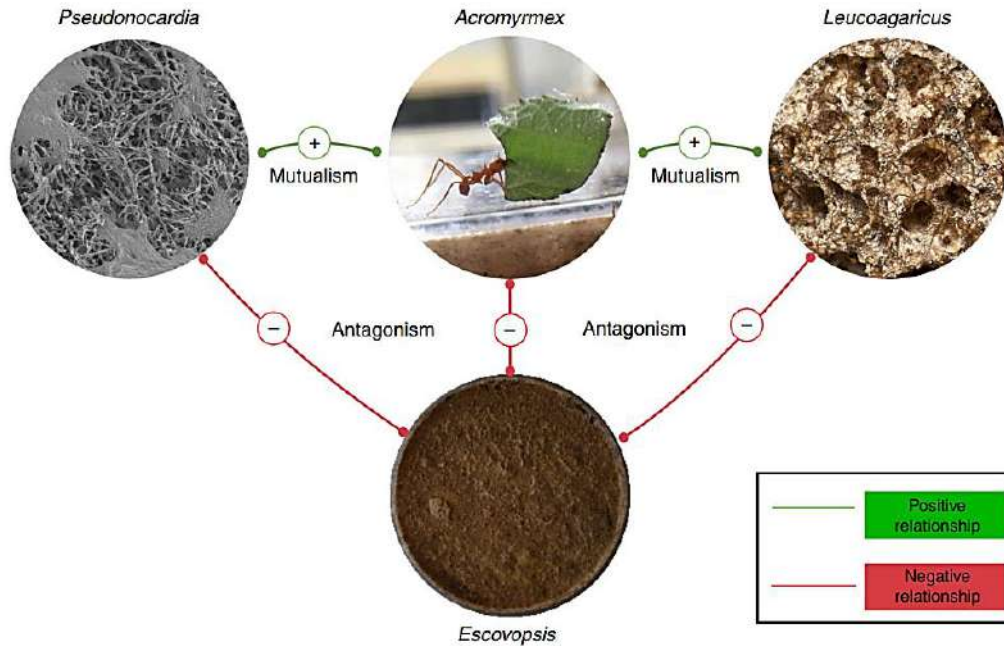
## 1.1 Simbiosis en las colonias de hormigas cultivadoras de hongos

La simbiosis, es una asociación íntima entre especies distintas y es de gran importancia en biología, como ejemplo tenemos a las hormigas de la Tribu Attini. El origen de estas hormigas se encuentra alrededor de 50 millones de años y se han diversificado en más de 250 especies de 16 géneros (Meirelles et al., 2015). Se pueden dividir en cinco sistemas distintos de agricultura: agricultura inferior; agricultura de hongos de coral; agricultura de levaduras; agricultura superior generalizada; y agricultura de cortadoras de hojas (géneros *Atta* y *Acromyrmex*) que han evolucionado más recientemente para convertirse en los herbívoros dominantes de los trópicos del nuevo mundo (Schultz y Brady, 2008). Las hormigas Attini cultivan hongos basidiomicetos del grupo Lepiotaceae como única fuente de alimento de las larvas y principal fuente de alimento para las hormigas adultas. Proveen al hongo simbionte 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. 2006; Haeder et al., 2009). En la **Figura 1** se muestra un ejemplo de la relación simbiótica cuatripartita en una colonia de hormigas Attini del género *Acromyrmex*.

## 1.2 El hongo parásito *Escovopsis*

Los jardines de hongos basidiomicetes cultivados por las hormigas *Attini* están constantemente amenazadas por los hongos parásitos *Escovopsis*, algunos de estos se consideran altamente virulentos para su huésped y aunque las hormigas han desarrollado mecanismos de defensa, si no se controlan, pueden destruir los jardines de las hormigas. (Currie, C. R., Bot, A. & Boomsma, 2003; Fernández-Marin et al., 2015)



**Figura 1.** Relación simbiótica cuatripartita en una colonia de *Acromyrmex echinator*. Las líneas rojas indican interacciones de antagonismo, y las verdes indican interacciones mutualistas (Heine et al., 2018).

Los hongos *Escovopsis* nunca han sido aislados fuera de los ecosistemas de las hormigas cultivadoras de hongos y han coevolucionado con las hormigas Attini, desarrollando un estilo de vida de micoparásito (Dhodary, Schilg, Wirth y Spittle, 2018). Una de las especies más estudiada es *E. weberi*, que primero degrada las hifas de *L. gongylophorus* y luego procede a tener una interacción física con *L. gongylophorus*, lo que supone que el hongo parásito es capaz de producir toxinas y/o enzimas que rompen el micelio del huésped para así alimentarse de él. (Dhodary, Schilg, Wirth y Spittle, 2018)

Inicialmente se clasificaron estos hongos parásitos dentro del género *Escovopsis*, pero gracias a estudios morfológicos y moleculares se han ido resolviendo las incongruencias filogénicas que se dieron en las últimas décadas, se ha logrado clasificar a *Escovopsis* como un clado monofilético, separándolo en tres diferentes géneros. Estos géneros son: *Sympodiorosea*, que de manera general tienden a crecer de manera más lenta y poseen un color rosado,

*Luteomyces* que tienden ser de color amarillo y *Escovopsis* de color marrón. (Montoya et al., 2021)

### **1.2.1 Interacciones entre *Escovopsis***

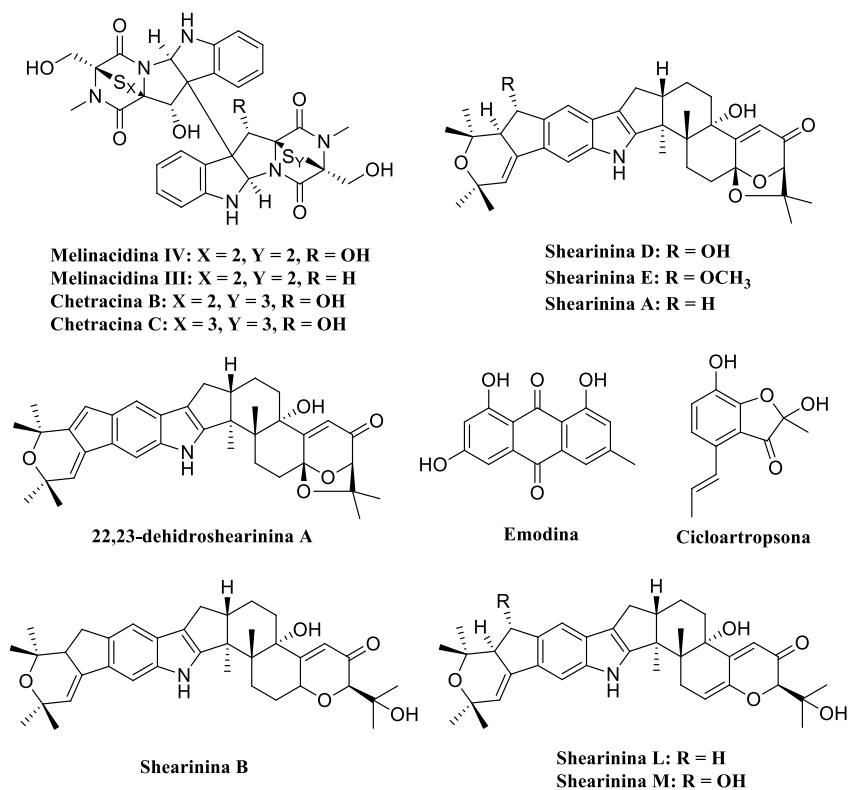
Para los hongos, como para la mayoría de los organismos, es importante el reconocimiento de los posibles antagonistas y mutualistas. Para los hongos la incompatibilidad vegetativa ocurre cuando dos hongos aislados de la misma especie entran en contacto y si las cepas son de diferentes grupos de incompatibilidad se rechazan a través de mecanismos químicos que producen inhibición del crecimiento, o envejecimiento de regiones del micelio. Se ha reportado que existen interacciones intraclonales e interclonales de *Escovopsis* que incluyen tanto interacciones, mutualistas, neutrales, y antagonistas (de inhibición). (Christopher et al., 2021)

Es posible que estas interacciones antagonistas entre distintas cepas de hongos *Escovopsis*, estén mediadas por la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. (Christopher et al., 2021; Boya et al., 2017)

### **1.2.2 Metabolitos secundarios reportados del hongo *Escovopsis***

En la literatura se ha reflejado un mayor interés en la exploración del potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios producidos por las Actinobacterias asociadas a las hormigas cultivadoras de hongos; sin embargo, hay pocos estudios realizados sobre las moléculas producidas por los hongos del género *Escovopsis*. Es considerado un patógeno especializado en las colonias de hormigas Attini, pero ha mostrado ser capaz de producir diversos compuestos antimicrobianos. Entre estos se pueden mencionar a la melinacindina III y IV, la quetracina B y C, la shearinina A, B, D y E, la 22,23-deshidroshearinina A, la cicloartropsona, la emodina y dos nuevos derivados de shearinina, shearinina L y M (**Figura 2**), producidos por *Escovopsis weberi* aislado de colonias de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*. La melinacidina IV y la shearinina D pueden inhibir el crecimiento de la bacteria mutualista *Pseudonocardia*. Además, la shearinina D puede reducir la defensa del comportamiento de las obreras. La emodina y la cicloartropsona mostraron una potente inhibición contra el hongo mutualista de las hormigas, *Leucoagaricus gongylophorous*. La emodina también fue activa contra la bacteria *Streptomyces* sp. (Dhodary et al., 2018; Heine

et al., 2018). Esto podría explicar cómo los jardines de hongos a veces se ven abrumados por *Escovopsis*, y también la muerte de hormigas obreras en la colonia. Este grupo de compuestos se han publicado con diversas actividades biológicas (antimicrobianas, antiparasitarias, citotóxicas, etc.), lo cual aumenta el interés de explorar nuevos compuestos bioactivos producidos por *Escovopsis*, que podrían alinearse con las actividades farmacológicas.



**Figura 2.** Compuestos producidos por hongos del género *Escovopsis weberi* aislados de colonias de hormigas del género *Acromyrmex*. (Heine et al., 2018; Batey, Greco, Hutchings, y Wilkinson, 2020).

Aunque los hongos *Escovopsis* son capaces de segregar metabolitos secundarios como la Shearinina L para inhibir a *L. gongylophorus*. Es posible que las hormigas Attini puedan aprender rápidamente a reconocer los mecanismos del hongo parásito, por lo que pueden iniciar reacciones de defensa. (Heine et al., 2018; Batey, Greco, Hutchings, y Wilkinson, 2020)

Aunque se han reportado diversos compuestos involucrados en estas interacciones, aún se desconocen muchos de los metabolitos secundarios producidos por los hongos *Escovopsis*, por lo que la identificación de nuevos compuestos de un rango más amplio de grupos de *Escovopsis* puede ser muy útil para comprender de mejor forma las interacciones complejas de estos ecosistemas. (Batey, Greco, Hutchings, y Wilkinson, 2020)

## **Capítulo 2**

### **Objetivos**

## 2.1 Objetivo general

- Estudiar los metabolitos secundarios producidos por el hongo *Escovopsis* sp. A.det.08col y comparar su perfil químico con hongos del mismo género aislados de diferentes colonias de hormigas cultivadoras de hongos.

## 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar a gran escala el hongo *Escovopsis* sp. A.det.08col.
- Aislar y purificar algunos compuestos producidos por *Escovopsis* sp. A.det.08col.
- Escoger 16 hongos del género *Escovopsis* encontrados en diferentes colonias de hormigas de la Tribu Attini de Panamá, que han sido aislados, identificados y estudiados previamente.
- Cultivar a pequeña escala los 17 hongos del género *Escovopsis* en medio de cultivo PDA y obtener el extracto orgánico.
- Analizar los extractos orgánicos por UPLC-UV-ESI-MS.
- Comparar el perfil químico de los extractos orgánicos.

# **Capítulo 3**

## **Metodología**

### 3.1 Equipos, solventes y materiales utilizados

Los solventes empleados para la extracción o fraccionamiento por VLC fueron: Acetona, Metanol, Hexano y Acetato de etilo (todos de Grado ACS). Los solventes empleados para el fraccionamiento en el HPLC y para los análisis de LC-UV-Masas fueron: Agua (MilliQ) y metanol (grado HPLC). Los solventes para obtener los datos de Resonancia Magnética Nuclear fueron: cloroformo deuterado y metanol deuterado.

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 el laboratorio 219, 202 y 213 de los edificios gemelos, respectivamente.

Para secar los solventes al vacío se utilizó un Rotavapor R-215 Buchi, y un SpeedVac (SC210A Speedvac® plus) ubicados en el laboratorio 219 y 212 de los edificios gemelos, respectivamente.

Para el fraccionamiento del extracto crudo obtenido a gran escala se utilizó un cartucho de SPE-C<sub>18</sub> (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 el aislamiento de los compuestos se utilizó un HPLC (Waters®, Delta 600) y dos columnas: Synergi C<sub>18</sub> (4µm, 250 x 4.6 mm), y XTerra C<sub>18</sub> (10µm, 250 x 10 mm), ubicados en el laboratorio 208 de los edificios gemelos.

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

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 <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, gHSQC, gHMBC, gCOY 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).

### 3.2 Aislamiento de hongos *Escovopsis*

Para el aislamiento de cada cepa de hongo utilizada se tomaron muestras de los jardines de colonias de hormigas cultivadoras de hongos de algunas provincias de Panamá (**Tabla 1**). Se tomaron pedazos del jardín de hongos con una pinza estéril. Se mantuvieron en contenedores de plástico esterilizados con 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 *Escovopsis*. 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).

**Tabla 1.** Hongos *Escovopsis* Estudiados.

No.	Código de hongos <i>Escovopsis</i>	Colonia de hormiga	Lugar de colecta
1	At.ceph	<i>Atta cephalotes</i>	Copé, Coclé
2	Col.2.29/12	<i>Acromyrmex echinator</i>	Gamboa
3	Ac.33.10-2	<i>Acromyrmex echinator</i>	Gamboa
4	01.Ac.3/02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Cordillera, Chiriquí
5	03.Ac.8/02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Fortuna, Chiriquí
6	03.Ac.19/01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Fortuna, Chiriquí
7	09.Ac.8/02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Cordillera, Chiriquí
8	01.Asp.R3.17/2	<i>Acromyrmex sp</i>	Juan Hombrón, Coclé
9	Ac.2.10-2	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	Gamboa
10	DRA1	<i>Apterostigma auriculatum</i>	Parque Nacional Soberanía, Panamá
11	A.col.40.BCT	<i>Apterostigma collare</i>	Changuinola, Bocas del Toro
12	26/11.A.dent.06.col	<i>Apterostigma dentigerum</i>	Gamboa
13	A.det.08.col	<i>Apterostigma dentigerum</i>	Gamboa
14	A.pil.04	<i>Apterostigma pilosum</i>	Gamboa
15	Cope.CN5	<i>Cyphomyrmex sp</i>	Parque nacional Omar Torrijos Herrera, Cope, Coclé
16	T.zeteki.T2th-155	<i>Mycetomoellerius zeteki</i>	Gamboa
17	T.cornetzi	<i>Paratrachymyrmex cornetzi</i>	Gamboa

### 3.3 Cultivo a gran escala del hongo *Escovopsis* sp. A.det.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 g 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 24 días. (**Figura 3**)



**Figura 3.** Cultivo a gran escala del hongo *Escovopsis* sp. A.det.08.col.

### 3.4 Purificación de Compuestos obtenidos del hongo *Escovopsis* sp. A.det.08.col.

A los cultivos obtenidos a gran escala se les añadió acetato de etilo hasta cubrir todo el material, se dejó hasta el día siguiente para luego filtrar el solvente y secarlo al vacío con un Rotavapor. Esta extracción sólido-líquido se repitió tres veces para obtener el extracto crudo (6.25 g).

Una parte del crudo (3.0 g) se fraccionó por extracción en fase sólida utilizando un cartucho de SPE-C<sub>18</sub> (45 µm, 10 g/70 Chromabond). Por cada gramo de extracto se realizó el siguiente

gradiente: 100 mL (10% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F1**: 366.3mg); 100 mL (20% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F2**: 511.4 mg); 100 mL (30% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F3**: 365.8 mg); 100 mL (40% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F4**: 381.2 mg); 100 mL (50% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F5**: 113.6 mg); 100 mL (60% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F6**: 34.3 mg); 100 mL (70% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F7**: 25.0 mg); 100 mL (80% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F8**: 20 mg); 100 mL (90% MeOH-H<sub>2</sub>O, **F9**: 171.1 mg); 100 mL (100% MeOH, **F10**: 41.2 mg); y 200 mL (100 % acetona, **F11**: 94.3 mg).

La fracción **F2** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C<sub>18</sub> (10µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), 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 20-24, flujo isocrático de 100% B; min 24-25, gradiente de 100% a 20% B; min 25-28, flujo isocrático de 20% B. Se obtuvieron dos fracciones: **F2.1** (min 17, 10.0 mg) y **F2.2** (min 20, **compuesto TP-38-2**: 30.0 mg).

La fracción **F3** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C<sub>18</sub> (10µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 2.0 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 10% B; min 10-20, gradiente de 10% a 100% B; min 20-23, flujo isocrático de 100% B; min 23-24, gradiente de 100% a 10% B; min 25-26, flujo isocrático de 10% B. Se obtuvieron seis fracciones: **F3.1** (min 16, 7.9 mg), **F3.2** (min 17, 0.9 mg), **F3.3** (min 20, 6.0 mg), **F3.4** (min 21, 20.0 mg), **F3.5** (min 22, **compuesto 39-5**: 5.2 mg), **F3.6** (min 23, 3.2 mg).

La fracción **F4** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C<sub>18</sub> (10µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), 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 20-24, flujo isocrático de 100% B; min 24-25, gradiente de 100% a 20% B; min 25-28, flujo isocrático de 20% B. Se obtuvieron tres fracciones: **F4.1** (min 18, 17.3 mg), **F4.2** (min 20, 1.3 mg), **F4.3** (min 21, 28.3 mg).

La fracción **F4.3** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C<sub>18</sub> (10µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 1.0 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 20% B; min 5-15, gradiente de 20% a 100% B; min 15-25, flujo isocrático de 100% B; min 25-26, gradiente de 100% a 20% B; min 26-31, flujo

isocrático de 20% B. Se obtuvieron tres fracciones: **F4.3.1** (min 14, 13.0 mg), **F4.3.2** (min 21, 0.3 mg), **F4.3.3** (min 22, 0.2 mg).

La fracción **F4.3.1** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (Synergi) C<sub>18</sub> (4µm, 250 x 4.6 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 1.0 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 40% B; min 5-15, gradiente de 40% a 100% B; min 15-25, flujo isocrático de 100% B; min 25-26, gradiente de 100% a 40% B; min 26-31, flujo isocrático de 40%. Se obtuvieron cuatro fracciones: **F4.3.1.1** (min 5, 0.6 mg), **F4.3.1.2** (min 6, 0.8 mg), **F4.3.1.3** (min 8, **compuesto TP-44-3**: 8.0 mg), **F4.3.1.4** (min 23, 0.5 mg).

La fracción **F5** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C<sub>18</sub> (10µm, 250 x 10 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 2.5 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 20-21, gradiente de 100% a 50% B; min 21-23, flujo isocrático de 50% B. Se obtuvieron dos fracciones: **F5.1** (min 8, 34.1 mg), **F5.2** (min 10, 22.7 mg).

La fracción **F5.1** se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (Synergi) C<sub>18</sub> (4µm, 250 x 4.6 mm), con un gradiente de A (40% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 1.0 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 40% B; min 5-15, gradiente de 40% a 100% B; min 15-25, flujo isocrático de 100% B; min 25-26, gradiente de 100% a 40% B; min 26-31, flujo isocrático de 40% B. Se obtuvieron tres fracciones: **F5.1.1** (min 8, 16.5 mg), **F5.1.2** (min 11, **compuesto TP-43-2**: 3.9 mg), **F5.1.3** (min 23, 0.2 mg).

### 3.5 Medición de rotación específica de compuestos

Las rotaciones específicas de los cuatro compuestos fueron determinadas en metanol a las siguientes concentraciones: TP-38-2 (0.353 g/mL), TP-39-5 (0.060 g/mL), TP-43-2 (0.0467 g/mL), y TP-44-3 (0.100 g/mL).

### 3.6 Cultivo a pequeña escala de hongos *Escovopsis*.

Los 17 hongos de la **Tabla 1** se inocularon en 15 platos Petri (100 x 20 mm, con 25 mL de PDA) y se incubaron a 26 °C en oscuridad por un periodo de 2 a 3 semanas dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada hongo. En el día de la cosecha, los cultivos se cortaron en cubos pequeños, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 1 L y se les añadió acetato de etilo hasta cubrir todo el material, se dejó hasta el día siguiente para luego filtrar el solvente y secarlo al vacío con un Rotavapor. Esta extracción sólido-líquido se repitió tres veces para obtener el extracto crudo (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Crudos obtenidos de hongos *Escovopsis*.

No.	Código de <i>Escovopsis</i>	Tiempo de crecimiento en la incubadora a 26 °C	Extracto crudo (mg)
1	At.ceph	2 semanas	150.3
2	Col.2.29/12	2 semanas	109.1
3	Ac.33.10-2	2 semanas	57.3
4	01.Ac.3/02	2 semanas	95.1
5	03.Ac.8/02	2 semanas	71.4
6	03.Ac.19/01	2 semanas	59.4
7	09.Ac.8/02	2 semanas	46.6
8	01.AspR3.17/2	2 semanas	73.9
9	Ac.2.10-2	2 semanas	54.8
10	DRA1	3 semanas	266.7
11	A.col.40.BCT	3 semanas	248.8
12	26/11.A.dent.06.col	3 semanas	260.0
13	A.det.08.col	2 semanas	347.3
14	Apil.04	3 semanas	108.7
15	Cope.CN5	3 semanas	128.3
16	T.zeteki.T2th-155	2 semanas	127.0
17	T.cornetzi	2 semanas	95.0

### 3.7 Fraccionamiento de Crudos obtenidos de los cultivos a pequeña escala

Para los crudos con un peso mayor a 100 mg, se realizó un fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (VLC) con una columna de vidrio (10 cm de altura, 4 cm de diámetro) y 10 g de Sílica gel (200-400 mesh), con el siguiente gradiente: 100 mL (100% Hexano); 100 mL (Hexano-AcOEt 1:1); 100 mL (100% AcOEt); 100 mL (AcOEt-MeOH 1:1); y 100 mL

(100% MeOH). Mientras que, para los crudos con un peso menor a 100 mg, se realizó un fraccionamiento con el siguiente gradiente: 100 mL (100% Hexano); (100% AcOEt); 100 mL (100% MeOH).

Este fraccionamiento se realizó para remover los lípidos y componentes polares procedentes del medio de cultivo. Las fracciones obtenidas con 100% AcOEt contienen los compuestos de mayor interés para realizar el estudio comparativo de los perfiles químicos por cromatografía líquida acoplada a masas (**Tabla 3**). De esta manera se obtiene un cromatograma más limpio y fácil de analizar.

**Tabla 3.** Rendimiento obtenido de cada fracción de los extractos crudos

No.	Crudo	Fracciones				
		100% Hexano	Hexano-AcOEt (1:1)	100% AcOEt	AcOEt-MeOH (1:1)	100% MeOH
1	At.ceph: 150.3 mg	1.6mg	23.5 mg	9.2 mg	68.3mg	27.8 mg
2	Col.2.29/12: 109.1 mg	2.6mg	16.6 mg	11.6 mg	27.7 mg	19.5 mg
3	Ac.33.10-2: 57.3 mg	0.7 mg	---	14.8 mg	---	23.1 mg
4	01.Ac.3/02: 95.1 mg	2.3 mg	---	21.6 mg	---	45.2 mg
5	03.Ac.8/02: 71.4 mg	1.3 mg	---	9.5 mg	---	49.3 mg
6	03.Ac.19/01: 59.4 mg	1.0 mg	---	16 mg	---	35.5 mg
7	09.Ac.8/02: 46.6 mg	0.8 mg	---	8.2 mg	---	17.4 mg
8	01.AspR3.17/2: 73.9 mg	2.5 mg	---	6.0 mg	---	47.2 mg
9	Ac.2.10-2: 54.8 mg	0.9 mg	---	15.0 mg	---	24.8 mg
10	DRA1: 266.7 mg	2.6 mg	24.8 mg	75.1 mg	34.8 mg	19.7 mg
11	A.col.40.BCT: 248.8 mg	6.3 mg	24.0 mg	124.1 mg	68.1 mg	24.3 mg
12	26/11.A.dent.06.col: 260.0 mg	0.9 mg	19.1 mg	115.9 mg	60.5 mg	21.9 mg
13	A.det.08.col: 347.3 mg	0.9 mg	19.1 mg	127.0 mg	146.3 mg	33.8 mg
14	Apil.04: 108.7 mg	1.2 mg	39.3 mg	10.6 mg	30.4 mg	10.4 mg
15	Cope.CN5: 128.3 mg	3.2 mg	60.7 mg	38.8 mg	16.6 mg	17.2 mg
16	T.zeteki.T2th-155: 127 mg	2.3 mg	---	25.4 mg	---	35.5 mg
17	T.cornetzi: 95.0 mg	0.8 mg	---	10.8 mg	---	75.8 mg

### 3.8 Análisis por cromatografía líquida acoplada a masas.

Los datos de Cromatografía Líquida-UV-Masas fueron obtenidos por un UPLC-MS (Waters®). Se inyectaron 5 µL del compuesto (0.5 mg/mL) o fracción/extracto (1 mg/mL) en una columna Shim-pack GISS (C18, 1.9 µm, 100 x 2.1 mm), y se utilizó un gradiente de A (H<sub>2</sub>O con 0.1% de ácido acético) a B (100% MeOH) a un flujo de 0.2 mL/min: min 0-5, un flujo isocrático de 20% B; min 5-20, un gradiente de 20% a 100% B; min 20-25, flujo

isocrático de 100% B; min 25-26, un gradiente de 100% a 20% B; y min 26-30, flujo isocrático de 20% B.

### **3.9 Bioensayo contra hongos *Escovopsis*.**

En un tubo falcon de 50 mL se preparó una solución de esporas del hongo (2 a 3 g en 30 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.

Las fracciones o compuestos (0.1 mg) se colocaron directamente sobre el medio sólido con una micropipeta. Para el control positivo se utilizó Nistatina. 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.

### **3.10 Bioensayos antibacterianos**

Las fracciones o compuestos también se probaron contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, utilizando la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por la técnica Kirby Bauer (difusión en agar).

#### **3.10.1 Preparación del estándar de turbidez:**

Para preparar el estándar de turbidez se agregó 0.5 mL de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.175 %) a 99.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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).

#### **3.10.2 Preparación del inóculo bacteriano:**

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  $1-2 \times 10^8$  (Hudzicki, 2009).

### **3.10.3 Siembra de la muestra:**

Se esparció 100  $\mu\text{L}$  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).

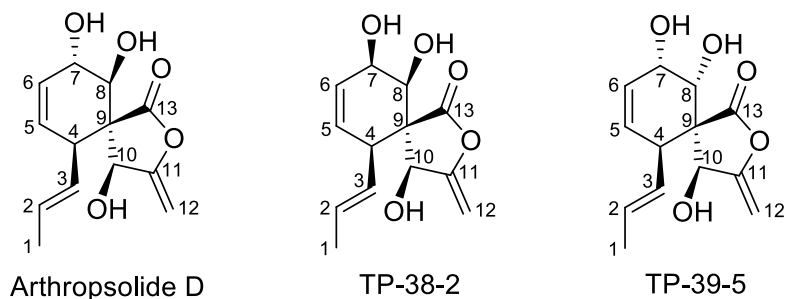
Las fracciones o compuestos (20  $\mu\text{g}$ ) se colocan directamente sobre el agar con una micropipeta. La ciprofloxacina se utilizó como control positivo. Los platos Petri se incubaron a 37 °C durante la noche y luego se observó visualmente en busca de zonas de inhibición (Adnani et al., 2015).

# **Capítulo 4**

## **Resultados y Discusión**

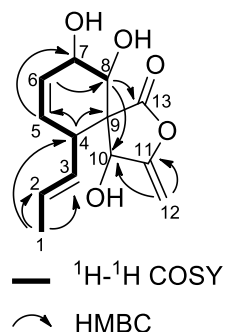
## 4.1 Elucidación estructural de compuestos aislados del hongo *Escovopsis* sp. A.det.08.col

### 4.1.1 Compuestos TP-38-2 y TP-39-5



**Figura 4.** Estructura de compuesto Arthrospolide D, TP-38-2, y TP-39-5.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **TP-38-2** (un sólido aceitoso sin color) en cloroformo deuterado mostró trece carbonos [ $\delta_{\text{C}}$  18.01 (C-1), 131.25 (C-2), 126.99 (C-3), 39.61 (C-4), 129.57 (C-5), 127.73 (C-6), 70.19 (C-7), 72.27 (C-8), 58.31 (C-9), 68.70 (C-10), 157.33 (C-11), 88.55 (C-12), y 174.52 (C-13)] (**Anexo A**). Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC mostraron la presencia de un grupo metilo [ $\delta_{\text{H}}$  1.58 (H-1)]; tres protones oximetinos [ $\delta_{\text{H}}$  4.81 (H-7), 3.68 (H-8), y 5.21 (H-10)]; dos hidrógenos vinílicos [ $\delta_{\text{H}}$  4.72 (H-12a) y 4.63 (H-12b)]; un grupo metino [ $\delta_{\text{H}}$  3.61 (H-4)]; y cuatro hidrógenos de alqueno [ $\delta_{\text{H}}$  5.61 (H-2), 5.26 (H-3), 5.45 (H-5), y 5.66 (H-6)] (**Anexo B y C**). Para determinar la estructura plana se utilizaron las correlaciones observadas en el gHMBC y gCOSY (**Figura 5 y Anexo D y E**). El espectro de masa mostró la presencia de una molécula cationizada  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 275.176$  (**Anexo F**), correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$ , lo cual confirma la estructura base del **TP-38-2**.



**Figura 5.** Principales correlaciones vistas en el COSY y HMBC para TP-38-2 y TP-39-5.

Los datos de RMN del compuesto **TP-38-2** son muy parecidos a los del **Arthrospolide D**, un policétido aislado por primera vez del hongo *Arthrospis truncata* (Ayer, Craw y Neary, 1991). Existen pequeñas diferencias entre sus desplazamientos de carbono e hidrógeno, y en las constantes de acoplamiento de algunas señales, lo que sugiere que puede haber diferencia en la configuración de alguno de sus centros quirales (**Tabla 4**).

Los datos de RMN en cloroformo deuterado y de Masas del compuesto **TP-39-5** (un sólido aceitoso sin color) (**Tabla 4 y Anexo G, H y I**) sugieren que tiene la misma estructura base que el **TP-38-2** y el **Arthrospolide D**. Las diferencias en los desplazamientos químicos de los carbonos e hidrógenos sugieren que se trata de otro estereoisómero.

**Tabla 4.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto Arthrospolide D en  $\text{CDCl}_3$  comparados con los del compuesto TP-38-2 y TP-39-5 en  $\text{CDCl}_3$  a 500 ( $^1\text{H}$ ) y 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz

No.	Tipo	Arthrospolide D		TP-38-2		TP-39-5	
		$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J, Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J, Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J, Hz)
1	CH <sub>3</sub>	17.81	1.60, dd (1.5, 6.5)	18.01	1.58, dd (1.3, 6.4)	17.98	1.65, d (6.3)
2	CH	131.07	5.63, dq (7.0, 15.0)	131.25	5.61, dq (6.4, 15.1)	129.69	5.50, dq (6.5, 14.9)
3	CH	127.20	5.28, ddq (1.8, 8.5, 15.5)	126.99	5.26, ddq (1.3, 8.4, 15.1)	127.52	5.24, m
4	CH	39.40	3.60, br d (8.5)	39.61	3.61, m	40.79	3.28, dd (4.2, 8.9)
5	CH	129.78	5.69, br d (9.5)	129.57	5.45, br d (10.0)	133.32	5.76, dd (4.2, 10.0)
6	CH	127.28	5.49, br dd (1.5, 10.0)	127.73	5.66, br d (10.0)	123.64	5.81, dd (5.0, 10.0)
7	CH	69.70	4.80, br s	70.19	4.81, m	65.70	4.38, m
8	CH	72.22	3.69, br s	72.27	3.68, br d (7.8)	65.75	4.40, m
9	C	57.72	---	58.31	---	56.37	---
10	CH	69.14	5.19, br ddd (2.0, 2.0, 6.5)	68.70	5.21, br s	68.84	5.27, br s
11	C	157.02	---	157.33	---	155.53	---
12	CH <sub>2</sub>	88.67	4.75, dd (2.2, 2.2) 4.65, dd (2.2, 2.2)	88.55	4.72, br s 4.63, br s	90.28	4.92, br s 4.75, br s
13	C	174.49	---	174.52	---	173.60	---

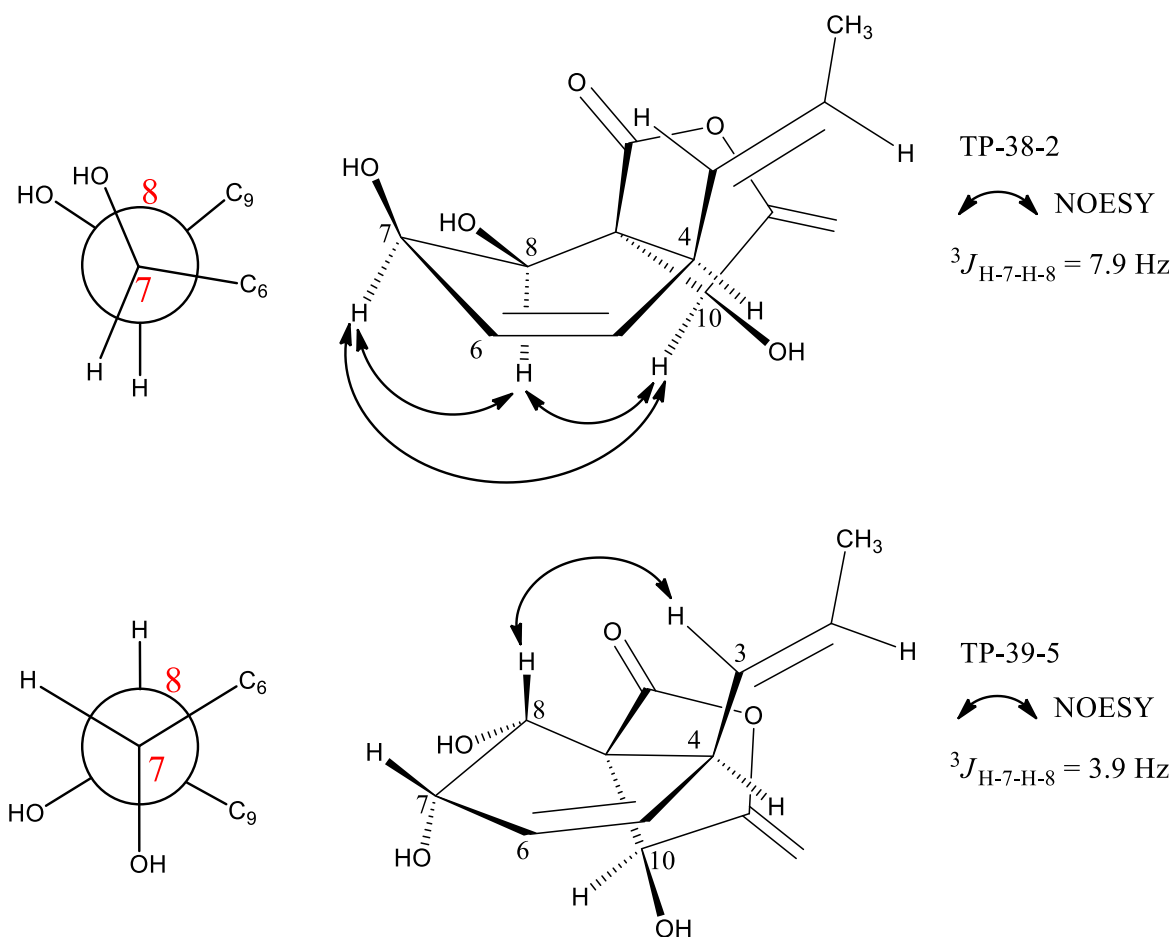
Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **TP-38-2** y **TP-39-5** también fueron obtenidos en metanol deuterado para observar las diferencias y analizar con más

detenimiento algunas señales (**Tabla 5** y **Anexo J-P**). En el caso del compuesto **TP-39-5** se pudo observar con más claridad los desdoblamientos de las señales de los hidrógenos en el espectro RMN  $^1\text{H}$ , lo que facilitó el análisis de su configuración relativa.

**Tabla 5:** Datos espectroscópicos de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto TP-38-2 y TP-39-5 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 ( $^1\text{H}$ ) y 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz

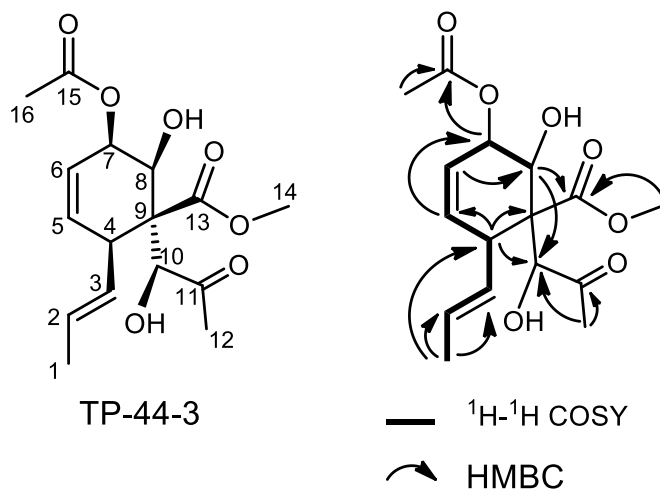
Número	Tipo	TP-38-2		TP-39-5	
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)
1	$\text{CH}_3$	18.17	1.58, ddd (0.6, 1.5, 6.4)	17.96	1.63, dd (1.5, 6.3)
2	CH	131.01	5.60, ddq (1.0, 6.4, 15.3)	129.26	5.48, dq (6.3, 15.0)
3	CH	129.10	5.31, ddq (1.5, 8.0, 15.3)	130.13	5.29, ddq (1.5, 9.3, 15.0)
4	CH	40.51	3.54, m	41.81	3.22, dd (4.4, 9.3)
5	CH	129.12	5.40, dt (2.1, 10.3)	132.53	5.61, dd (4.4, 10.0)
6	CH	130.20	5.64, dt (2.5, 10.3)	126.55	5.78, ddd (1.6, 5.0, 10.0)
7	CH	71.39	4.71, m	66.66	4.23, dd (3.9, 5.0)
8	CH	73.92	3.56, d (7.9)	67.01	4.21, d (3.9)
9	C	59.38	---	57.29	---
10	CH	69.54	5.30, t (2.6)	70.16	5.25, t (2.3)
11	C	160.53	---	158.20	---
12	$\text{CH}_2$	87.06	4.62, t (2.6) 4.51, t (2.6)	89.03	4.81, t (2.3) 4.63, t (2.3)
13	C	174.16	---	174.24	---

La configuración relativa de los compuestos **TP-38-2** y **TP-29-5** se determinó por gNOESY y por las constantes de acoplamiento. El compuesto **Arthrospolide D** posee una relación *anti* entre H-7 y H-8 (Ayer, Craw y Neary, 1991). Para el compuesto **TP-38-2** se observó una correlación en el NOESY entre el H-7 y el H-8 (**Anexo Q**), y una constante de acoplamiento  $^3J_{\text{H-7,H-8}} = 7.9$  Hz, lo que sugiere que debe existir un ángulo menor a  $60^\circ$  entre estos hidrógenos y una configuración *sin*. Por otro lado, el compuesto **TP-39-5**, presenta una constante de acoplamiento  $^3J_{\text{H-7,H-8}} = 3.9$  Hz, esto sugiere que el ángulo entre el H-7 y H-8 debe ser próximo a los  $60^\circ$ , pero el NOESY (**Anexo R**) indica que el H-8 deben estar en el mismo plano que H-3, por tanto H-7 y H-8 deben tener una configuración invertida con respecto a H-7 y H-8 de **TP-38-2** (**Figura 6**). Además, la rotación específica para el compuesto **TP-39-5** fue de  $[\alpha]_D^{25} = +8.5$  (0.06, *MeOH*), y para el compuesto **TP-38-2** fue de  $[\alpha]_D^{25} = -3.68$  (0.35, *MeOH*), los cuales son muy distintos a la de Arthrospolide D,  $[\alpha]_D^{25} = -239$  (c 1.09, *MeOH*). El compuesto **TP-38-2** y **TP-39-5** no aparecen en la base de datos de Scifinder lo cual sugiere que pueden ser dos nuevos productos naturales



**Figura 6.** Análisis de la configuración relativa de los compuestos TP-38-2 Y TP-39-5

#### 4.1.2 Compuesto TP-44-3

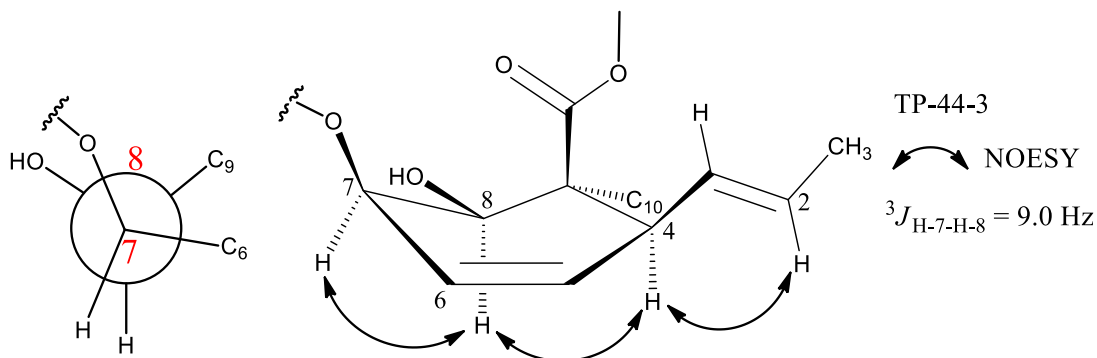


**Figura 7.** Estructura y principales correlaciones  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  y HMBC del compuesto TP-44-3.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **TP-44-3** (un sólido aceitoso sin color) en metanol deuterado mostró dieciséis carbonos [ $\delta_{\text{C}}$  17.70 (C-1), 130.32 (C-2), 132.54 (C-3), 44.24 (C-4), 135.57 (C-5), 124.19 (C-6), 75.44 (C-7), 73.19 (C-8), 61.49 (C-9), 76.96 (C-10), 214.85 (C11), 28.42 (C-12), 172.89 (C-13), 52.15 (C14), 172.77 (C-15), 21.70 (C-16)] (**Tabla 6 y Anexo S**). Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC mostraron la presencia de cuatro grupos metilo [ $\delta_{\text{H}}$  1.58 (H-1), 2.17 (H-12), 3.73 (H-14), 2.08 (H-16)]; tres protones oximetinos [ $\delta_{\text{H}}$  5.22 (H-7), 4.09 (H-8), 5.76 (H-10)]; cuatro hidrógenos de alqueno [ $\delta_{\text{H}}$  5.48 (H-2), 5.56 (H-3), 5.50 (H-5), 5.37 (H-6)] y un grupo metino [ $\delta_{\text{H}}$  3.35 (H-4)] (**Anexo T y U**). Además, los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y gHSQC mostraron dos carbonilos de éster [172.89 (C-13) y 172.77 (C-15)]; y un carbonilo de cetona [214.85 (C-11)]. La estructura plana del compuesto **TP-44-3** se determinó a través de las correlaciones observadas en el espectro de gHMBC y gCOSY (**Figura 7 y Anexo V y W**). Este compuesto es de la misma familia que **TP-38-2** y **TP-39-5**. El espectro de masas mostró la presencia de una molécula cationizada  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 349.59$  (**Anexo X**), correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{Na}$ , lo cual confirma la estructura base de **TP-44-3**.

**Tabla 6.** Datos espectroscópicos de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto TP-44-3 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 ( $^1\text{H}$ ) y 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz

Número	Tipo	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)
1	$\text{CH}_3$	17.70	1.58, dd (1.2, 7.3)
2	CH	130.32	5.48, m
3	CH	132.54	5.56, ddq (1.2, 9.5, 15.2)
4	CH	44.24	3.35, m
5	CH	135.57	5.50, m
6	CH	124.19	5.37, ddd (0.7, 2.3, 10.2)
7	CH	75.44	5.22, m
8	CH	73.19	4.09, d (9.0)
9	C	61.49	---
10	CH	76.96	4.76, s
11	C	214.85	---
12	$\text{CH}_3$	28.42	2.17, s
13	C	172.89	---
14	$\text{CH}_3$	52.15	3.73, s
15	C	172.77	---
16	$\text{CH}_3$	21.70	2.08, s



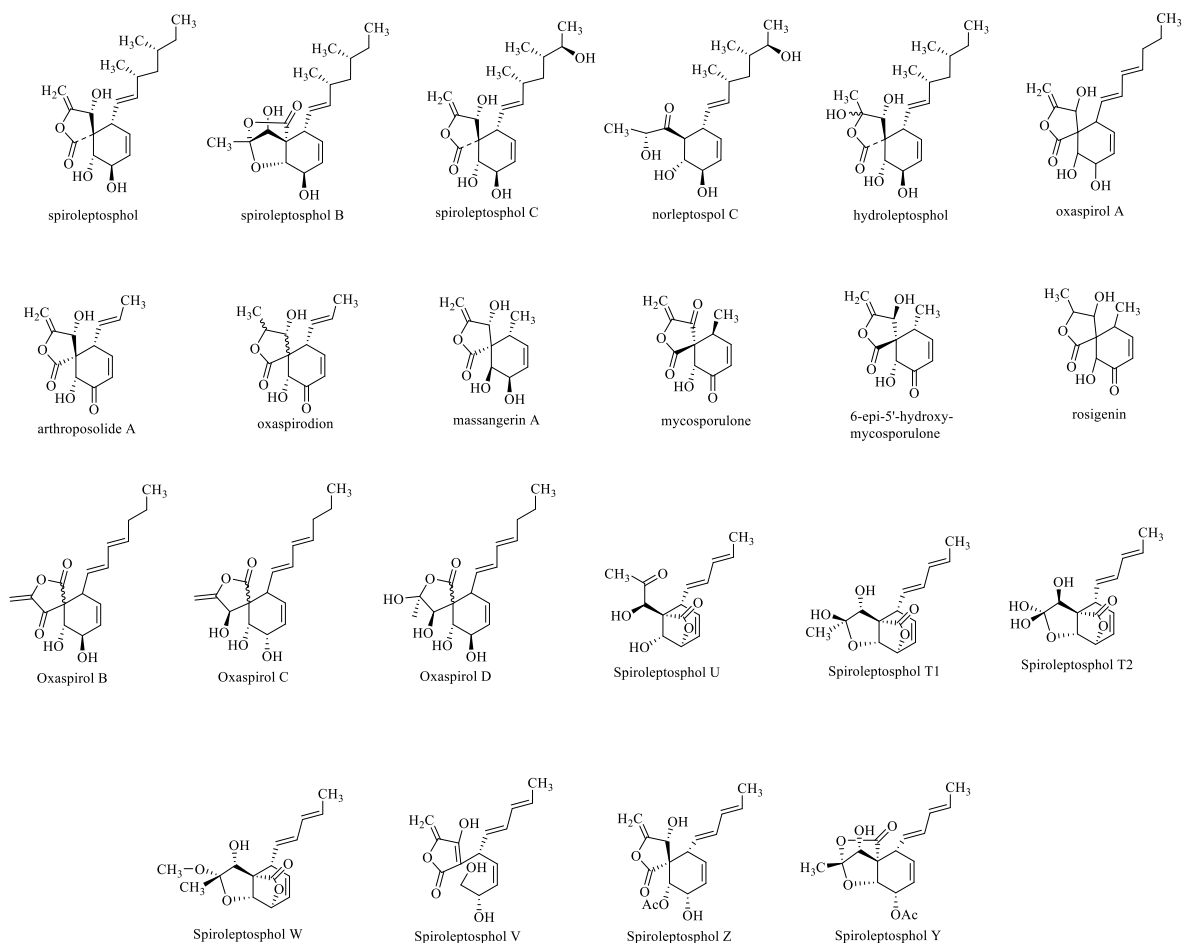
**Figura 8.** Análisis de la configuración relativa de TP-44-3.

En el espectro gNOESY (**Anexo Y**) se observaron correlaciones entre H-7/H-8, H-8/H-4 y H-4/H-2, indicando que están en el mismo plano. La constante de acoplamiento  $^3J_{H-7,H-8} = 9.0 \text{ Hz}$ , sugiere que el ángulo entre H-7 y H-8 es menor a  $60^\circ$  (**Figura 8**). El compuesto **TP-44-3** posee una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = -201.30 (0.05, MeOH)$ . Este compuesto no aparece en la base de datos de Scifinder lo cual sugiere que es un nuevo producto natural.

Los compuestos **TP-38-2**, **TP-39-5** y **TP-44-3**, forman parte de la familia de los policétidos. Los cuales son metabolitos secundarios que pueden variar mucho en su estructura y también en sus funciones. Los policétidos exhiben una amplia gama de bioactividades, tales como antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, inmunosupresora, entre otras. Este grupo de metabolitos secundarios son producidos por bacterias, hongos, plantas, animales, protistas y moluscos. Estos organismos podrían usar los policétidos que producen como compuestos protectores (Moore et al., 2001; Widyastuti, et al., 2012; Rizdian, Mozef y Wink, 2019).

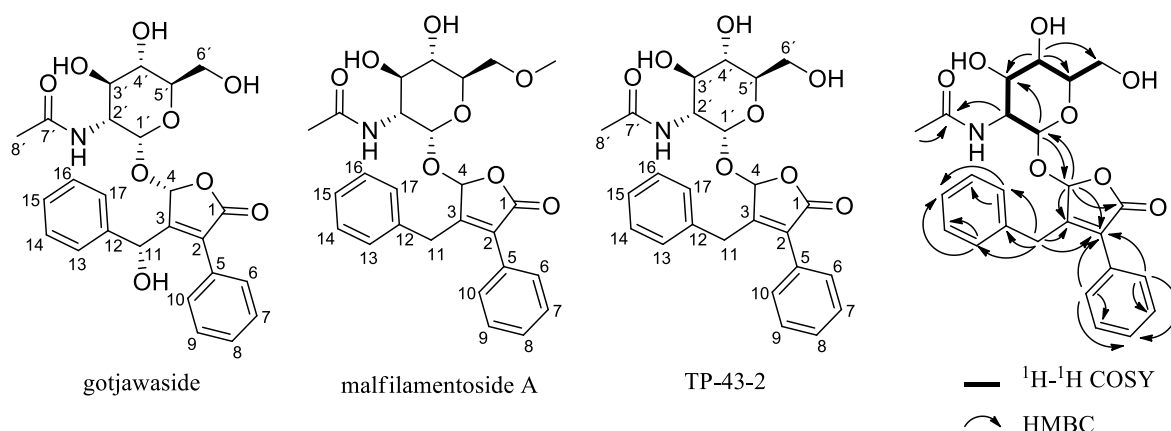
Hay un grupo de policétidos que tienen una estructura parecida a los compuestos **TP-38-2**, **TP-39-5** y **TP-44-3** (**Figura 9**). Los compuestos spiroleptosphol, spiroleptosphol B, spiroleptosphol C, norleptospol C y hydroleptosphol fueron aislados anteriormente del hongo *Leptosphaeria doliolum*, y el compuesto spiroleptosphol B fue reportado con actividad citotóxica (Hashimoto et al., 2008). El compuesto Oxaspirol A se aisló por primera vez de la levadura *Rhodotorula glutinis* y posee actividad antimicrobiana (Jun Doi et al., 1985). El

compuesto arthropsole A, se aisló por primera vez del hongo *Arthropsois truncata* (Ayer, Craw y Neary, 1991) y se ha reportado con acción antidiarreica (Akrimajirachoot et al., 2020). El compuesto oxapirodion fue aislado del ascomiceto *Chaetomium subspirale* (Rether et al., 2004). El compuesto massangerin A fue aislado del hongo de origen marino *Massarina sp* (Abdel-Wahab et al., 2007). El compuesto mycosporulone fue aislado del hongo *Mycosphaerella rosigena* y fue reportado con actividad antimicrobiana y antitumoral (Guiraud et al., 1999; Albinati et al., 2019). 6-epi-5'-hydroxy-mycoporulone fue aislado del hongo *Microsphaeropsis sp* (Akiko et al., 2010). El compuesto rosigenin, fue aislado como un metabolito de *Mycosphaerella rosigena* (Albinati et al., 1979). Los compuestos oxaspirol B, C y D fueron aislados del hongo *Lecythophora sp* (Wijeratne et al., 2016). Los compuestos spiroleptosfol U, T1, T2, W, V, Z y Y fueron aislados del hongo *Fusarium avenaceum* (Westphal et al., 2019).



**Figura 9.** Análogos de los compuestos TP-38-2, TP-39-5 y TP-44-3

### 4.1.3 Compuesto TP-43-2



**Figura 10.** Estructuras de los compuestos gotjawaside, malfilmentoside A, TP-43-2 y principales correlaciones  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY y HMBC del compuesto TP-43-2.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **TP-43-2** (un sólido blanco) mostró 25 carbonos [ $\delta_{\text{C}}$  171.99 (C-1), 131.03 (C-2), 159.22 (C-3), 102.32 (C-4), 130.36 (C-5), 130.22 (C-6), 130.19 (C-7), 130.33 (C-8), 130.19 (C-9), 130.22 (C-10), 33.45 (C11), 137.58 (C-12), 129.71 (C-13), 129.85 (C-14) 128.37 (C-15), 128.09 (C-16), 128.71 (C-17), 100.09 (C-1'), 55.23 (C-2'), 72.02 (C-3'), 71.57 (C-4'), 74.86 (C-5'), 61.85 (C-6'), 173.64 (C-7'), 22.77 (C-8')] (**Anexo Z**). Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC mostraron un grupo metilo [ $\delta_{\text{H}}$  3.88 (H-8)]; un metino de acetal [ $\delta_{\text{H}}$  5.81 (H-4)]; un grupo de hidrógenos de monosacárido [5.0 (H-1'), 3.95 (H-2'), 3.70 (H-3'), 3.51 (H-4'), 3.80-3.85 (H-5'), 3.75-3.86 (H-6'), 2.06 (H-8')]; y un grupo de señales de hidrógenos aromáticos [ $\delta_{\text{H}}$  7.33 (H-6/10), 7.44-7.50 (H-7/9), 7.44 (H-8) 7.16 (H-13/17), 7.52 (H-14/16), 7.28 (H-15)] (**Anexo AA** y **BB**). Los datos de RMN  $^{13}\text{C}$ , indican la presencia de un carbonilo de éster (C-1); un carbono de amida (C-7'). El espectro gHMBC, y gCOSY mostraron correlaciones entre H-4 y C-1, C-2, y C-3, que sugieren la presencia de un anillo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturado; las correlaciones entre el H-11 al C-3 y C-12 y entre el H-6 y H-10 al C-2 sugieren la presencia de dos anillos de benceno unidos al anillo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturado; y la correlación entre H-4 y C-1' muestra la unión del anillo de la lactona y el monosacárido (**Anexo CC** y **DD**). El espectro de masas mostró la presencia de una molécula cationizada  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 492.166$  (**Anexo EE**), correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{Na}$ , lo cual confirma la estructura base de **TP-43-2**. Este compuesto no aparece en la base de datos de Scifinder lo cual sugiere que es un nuevo producto natural.

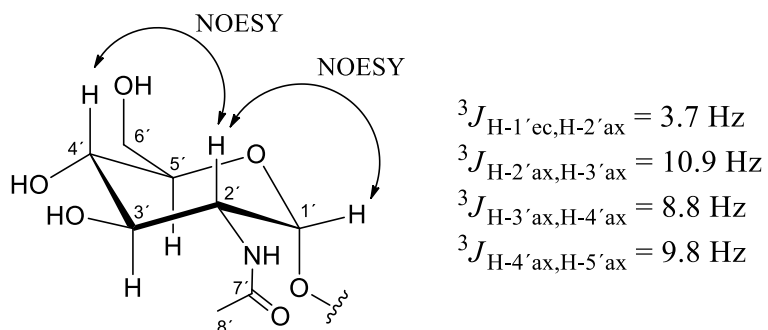
Existen dos compuestos similares a **TP-43-2**. Uno de ellos es **gotjawside**, aislado por primera vez del ascomiceto *Auxarthron sp.* KCB15F070, derivado de suelo volcánico (Won Kim et al., 2019), Este posee una rotación específica de  $[\alpha]_D^{23} = +17$  (*c* 0.5, *MeOH*). Presenta desplazamientos químicos similares a **TP-43-2** (**Tabla 7**), y la única diferencia es que tiene un grupo hidroxilo en C-11 (**Figura 10**). Otro compuesto que también se observa en la **tabla 7** con desplazamientos químicos similares es el **malfilamentoside A**, que se ha reportado como aislado del hongo *Malbranchea filamentosa* (Wakana et al., 2008) y la diferencia principal es un grupo metoxilo en el C-6'. Malfilamentoside A posee una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = +206.4$  (*c* 1.0, *MeOH*) y el compuesto **TP-43-2** posee una rotación específica de  $[\alpha]_D^{20} = +148.3$  (*c* 0.05, *MeOH*).

**Tabla 7.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de TP-43-2 en CD<sub>3</sub>OD a 500 (<sup>1</sup>H) y 125 (<sup>13</sup>C) MHz comparados con los de gotjawside en CD<sub>3</sub>OD a 800 (<sup>1</sup>H) y 200 (<sup>13</sup>C) MHz y malfilamentoside A en CDCl<sub>3</sub> a 500 (<sup>1</sup>H) y 125 (<sup>13</sup>C) MHz.

No.	Tipo	TP-43-2		Tipo	gotjawside		Tipo	malfilamentoside A	
		δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J, Hz)		δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J, Hz)		δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J, Hz)
1	C	171.99	---	C	172.0	---	C	169.9	---
2	C	131.03	---	C	131.4	---	C	136.0	---
3	C	159.22	---	C	160.4	---	C	155.7	---
4	CH	102.32	5.81, s	CH	103.4	6.31, s	CH	100.8	5.76, s
5	C	130.36	---	C	130.5	---	C	128.6	---
6/10	CH	130.22	7.33, m	CH	130.3	7.35, ov1*	CH	129.3	7.34, m
7/9	CH	130.19	7.44-7.50, m	CH	129.5	7.35, ov1*	CH	128.8	7.52, m
8	CH	130.33	7.44-7.50, m	CH	130.4	7.34, ov1*	CH	129.5	7.44, m
11	CH <sub>2</sub>	33.45	3.88, d (15.5) 4.15, d (15.5)	CH	71.1	5.95, s	CH <sub>2</sub>	32.6	3.82, d (15.6) 4.05, d (15.6)
12	C	137.58	---	C	142.7	---	C	131.1	---
13/17	CH	129.71	7.16, d (7.1)	CH	128.8	7.46, d (7.5)	CH	128.5	7.14, m
14/16	CH	129.85	7.52, m	CH	130.1	7.41, t (7.7)	CH	128.9	7.44, m
15	CH	128.37	7.26, m	CH	129.6	7.34, ov1*	CH	127.5	7.28, m
1'	CH	100.09	5.0, d (3.7)	CH	101.7	5.23, d (3.5)	CH	98.4	5.03, d (3.4)
2'	CH	55.23	3.95, dd (3.7, 10.9)	CH	55.3	3.91, dd (3.5, 10.6)	CH	53.3	4.08, m
3'	CH	72.09	3.70, dd (8.8, 10.9)	CH	73.2	3.38, dd (9.0, 10.5)	CH	72.5	3.64, br d (9.8)
4'	CH	71.57	3.51, dd (8.8, 9.8)	CH	71.6	3.49, t (9.3)	CH	71.7	3.64, br d (9.8)
5'	CH	74.86	3.80-3.85, m	CH	75.3	3.77, m	CH	71.2	3.98, m
6'	CH <sub>2</sub>	61.85	3.75-3.86, m	CH <sub>2</sub>	62.1	3.85, m 3.79, m	CH <sub>2</sub>	71.8	3.65, dd (10.7, 3.4) 3.75, dd (10.7, 4.3)
7'	C	173.64	---	C	173.7	---	C	171.5	---
8'	CH <sub>3</sub>	22.77	2.06, s	CH <sub>3</sub>	23.0	1.74, s	CH <sub>3</sub>	23.2	1.93, s
---	---	---	---	---	---	---	6'-O-Me	59.5	3.41, s

\*Señales sobrepuestas con otras.

Los datos obtenidos en el espectro de gNOESY (**Anexo FF**) y las constantes de acoplamiento de los hidrógenos de **TP-43-2**, indican que debe tener una  $\alpha$ -D-glucosamina (**Figura 11**), igual a los compuestos gotjawaside y Malfilamentoside A.

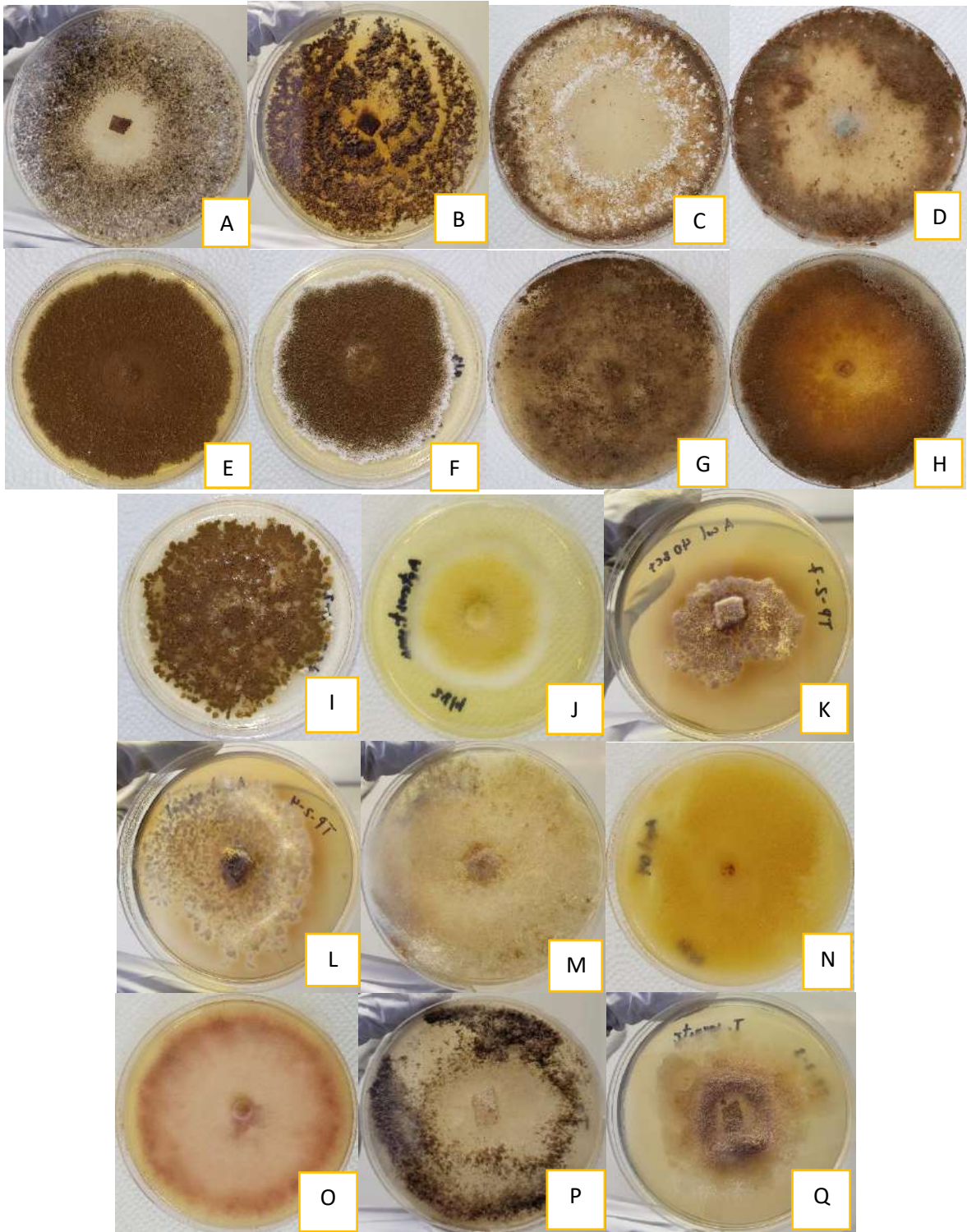


**Figura 11.** Análisis de la configuración relativa de la porción del monosacárido de **TP-43-2**.

#### 4.2 Comparación del perfil químico de los hongos *Escovopsis* estudiados.

En total se cultivaron 17 hongos para este estudio (**Figura 12**). Para comparar el perfil químico de cada cepa se analizaron los cromatogramas de las fracciones obtenidas con acetato de etilo (**Tabla 3**) y los cromatogramas de los compuestos aislados del hongo *Escovopsis* sp. A.det.08.col. a 254 nm.

El compuesto **TP-38-2** se pudo observar fácilmente en el cromatograma del extracto de *Escovopsis* sp. A.det.08.col., pero el resto de los compuestos aislados no se logran observar tan fácilmente por su baja concentración (**Figura 13**).

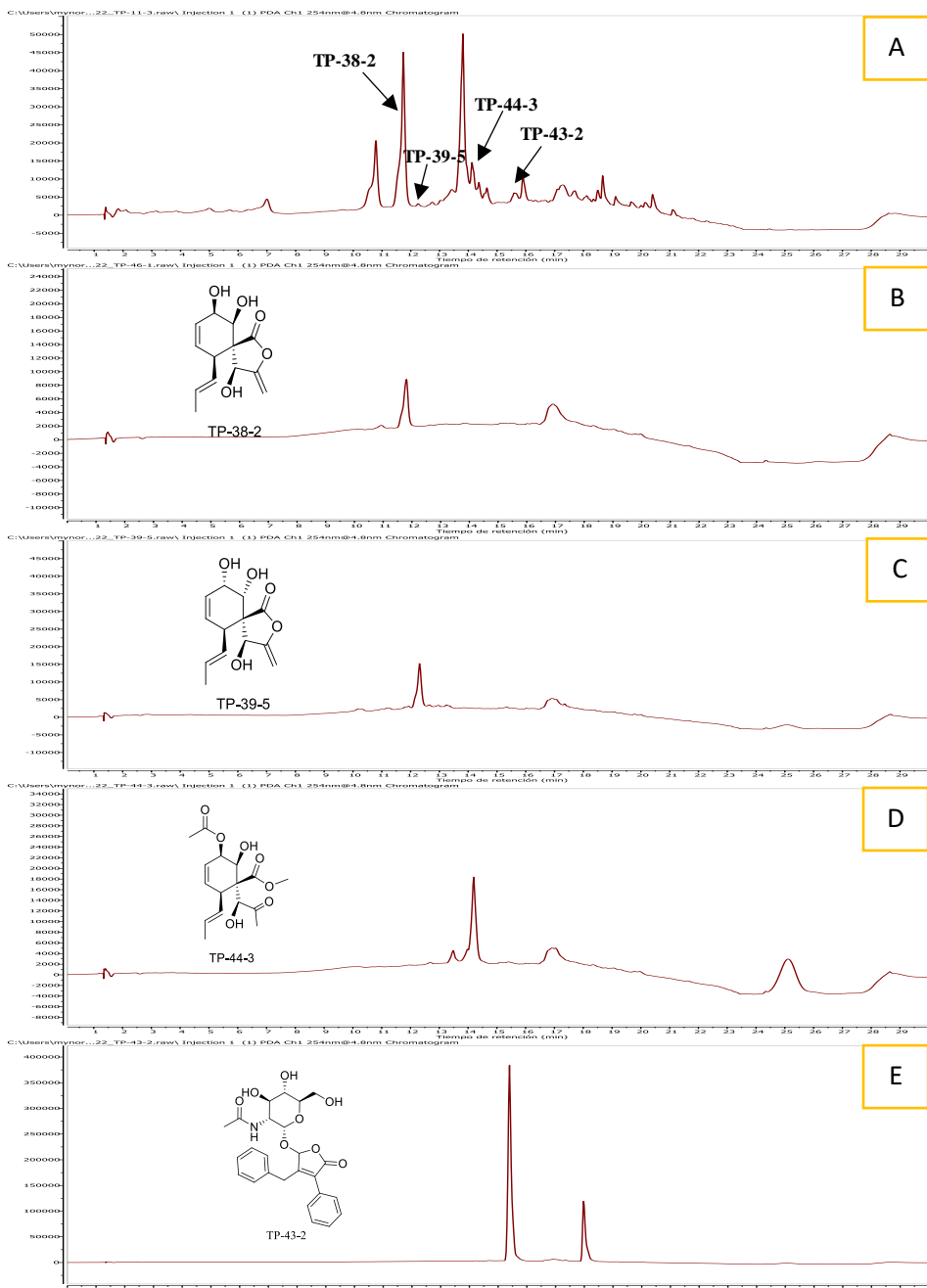


**Figura 12.** Hongos *Escovopsis* Estudiados: A) *At.ceph*; B) *Col.2.29/12* C) *Ac.33.10-2* D) *01.Ac.3/02* E) *03.Ac.8/02* F) *03.Ac.19/01* G) *09.Ac.8/02* H) *01.AspR3.17/2* I) *Ac.2.10-2* J) *DRA1* K) *A.col.40.BCT* L) *26/11.A.dent.06.col* M) *A.det.08.col* N) *Apil.04* O) *COPE.CN5* P) *T.zeteki.T2th-155* Q) *T.cornetzi*

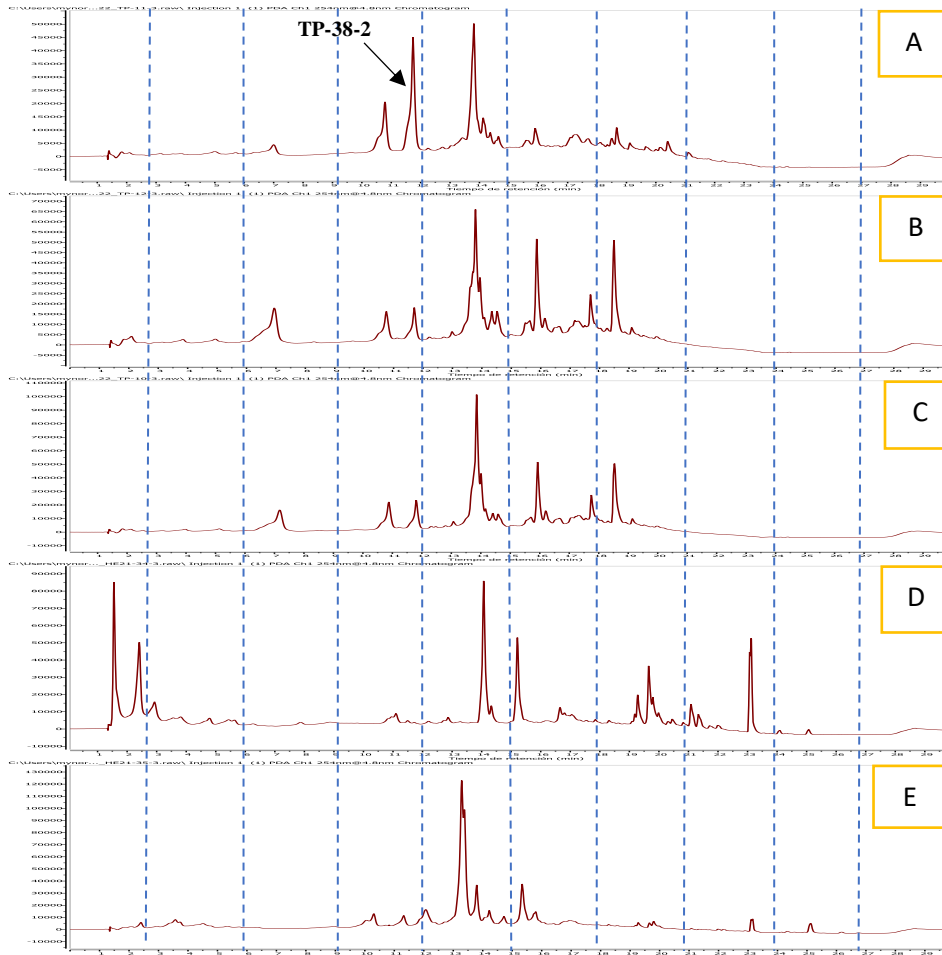
Los extractos de hongos aislados de colonias de *Apterostigma*, muestran un perfil químico variado, aunque existe una sección en los cromatogramas donde se encuentran la mayor parte de los picos, se hallan diferencias entre la intensidad de los picos y entre tiempos de retención. Es posible que los hongos de A.col.40.BCT y 26/11.A.dent.06.col, también produzcan el compuesto **TP-38-2**, aunque por la intensidad de los picos presentes en los cromatogramas, tal vez no lo produzcan en tanta abundancia. Sin embargo, no se encontraron coincidencias con tiempo de retención del compuesto **TP-39-5** y el compuesto **TP-44-3**. De forma general, el hongo A.det.08.col tiene un perfil químico parecido a A.col.40.BCT de *Apterostigma collare* y 26/11.A.dent.06.col. de *Apterostigma dentigerum* (**Figura 14**).

Por otro lado, el perfil químico de los extractos de los hongos aislados de *Acromyrmex*, son muy similares, lo que puede indicar que se producen los mismos compuestos en este grupo de hongos. Sin embargo, el hongo A.det.08.col muestra diferencia en su perfil químico y es probable que los hongos aislados de colonias *Acromyrmex* no produzcan los compuestos aislados del hongo A.det.08.col (**Figura 15**).

Los cromatogramas de los extractos de los hongos aislados de *Cyphomyrmex sp*, *Paratrachymyrmex cornetzi*, *Mycetomoellerius zeteki*, *Atta cephalotes* a comparación con el extracto del hongo A.det.08.col, muestran un perfil químico diferente y es probable que ninguno de los compuestos aislados de A.det.08.col, se encuentren en este grupo de hongos, a excepción de *Escovopsis sp. T.cornetzi* de *Paratrachymyrmex cornetzi*, que posee un pico con un tiempo de retención muy similar al compuesto **TP-38-2**, por lo que es probable que el compuesto esté presente en este hongo (**Figura 16**).



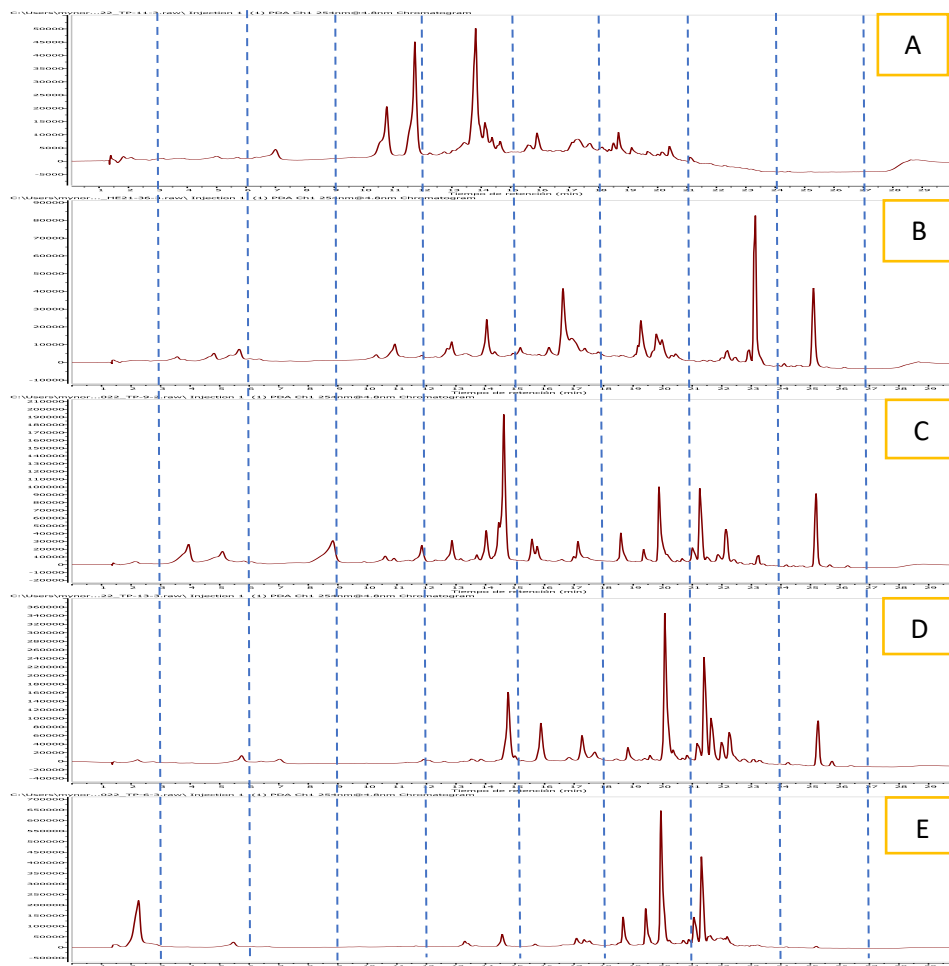
**Figura 13.** Comparación de cromatogramas UPLC-PDA del hongo *A. det. 08. col* y los compuestos aislados de *A. det. 08. col*: (A) hongo *A. det. 08. col* de *Apterostigma dentigerum*; (B) Compuesto TP-38-2; (C) Compuesto TP-39-5; (D) Compuesto TP-44-3; (E) Compuesto TP-43-2.



**Figura 14.** Comparación de Cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y los hongos de las colonias de hormigas *Apterostigma* a 254 nm. (A) A.det.08.col de *Apterostigma dentigerum*; (B) a col.40.BCT de *Apterostigma collare*; (C) 26/11.A.dent.06 col de *Apterostigma dentigerum*; (D) Apil.04 de *Apterostigma pilosum*; (E) DRA1 de *Apterostigma auriculatum*.



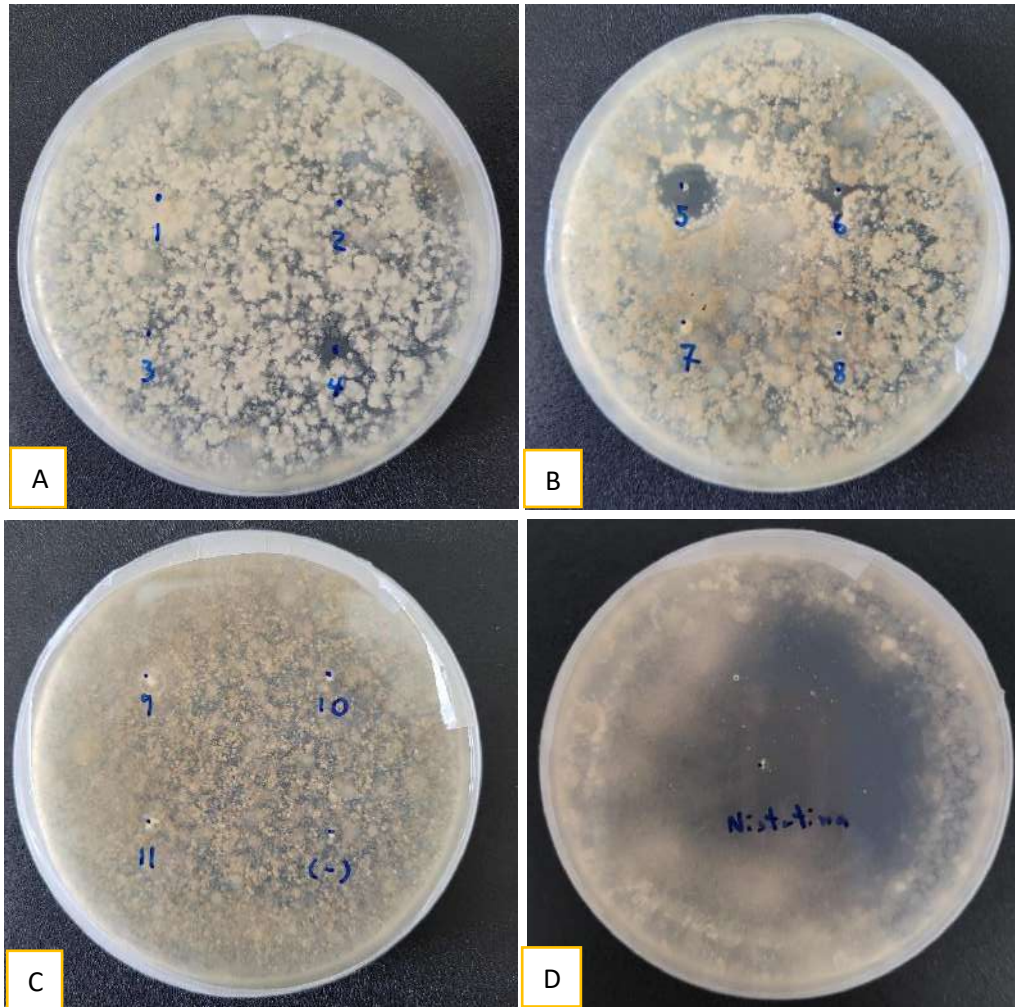
**Figura 15.** Comparación de cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y hongos de colonias *Acromyrmex* a 254 nm: (A) A.det.08.col de *Apterostigma dentigerum*; (B) Col.2.29/12 de *Acromyrmex echinator*; (C) Ac.33.10-2 de *Acromyrmex echinator*; (D) 01.Ac.3/02 de *Acromyrmex coronatus*; (E) 03.Ac.8/02 de *Acromyrmex coronatus*; (F) 03.Ac.19/01 de *Acromyrmex coronatus*; (G) 01.AspR3.17/2 de *Acromyrmex* sp; (H) Ac.2.10-2 de *Acromyrmex octospinosus*; (I) 09.Ac.8/02 de *Acromyrmex coronatus*.



**Figura 16.** Comparación de Cromatogramas UPLC-PDA del hongo A.det.08.col y otros hongos *Escovopsis* aislados de colonias de hormigas a 254 nm: (A) A.det.08.col de *Apterostigma dentigerum*; (B) Cope.CN5 de *Cyphomyrmex* sp; (C) T.cornetzi de *Paratrachymyrmex cornetzi*; (D) T.zeteki:T2th-Iss de *Mycetomoellerius zeteki*; (E) At.ceph de *Atta cephalotes*.

#### 4.3 Bioensayo de fracciones y compuestos contra *Escovopsis*.

Se realizó un bioensayo de las fracciones y compuestos obtenidos del hongo *Escovopsis* A.det.08.col contra el hongo *Escovopsis* 03.Ac.19/01. Se observó un halo de inhibición para fracciones F4, F5, F6 (**Figura 17**). Sin embargo, se observó un halo de inhibición mayor con la fracción F5, por lo que es probable que los compuestos antifúngicos se encuentren en mayor concentración en esta fracción. Ninguno de los cuatro compuestos aislados de *Escovopsis* sp. A.det.08.col presentó actividad antifúngica, por lo que el compuesto bioactivo aún queda pendiente por ser aislado.



**Figura 17.** Resultados de bioensayo de las fracciones obtenidas por extracción en fase sólida del crudo del hongo *A.det.08.col* contra un hongo *Escovopsis* de una colonia de *Acromyrmex*: A) Fracciones: F1 (1); F2 (2); F3 (3); F4 (4). B) Fracciones: F5 (5); F6 (6); F7 (7); F8 (8). C) Fracciones: F9 (9); F10 (10); F11 (11); Control negativo (-). D) Control positivo (Nistatina).

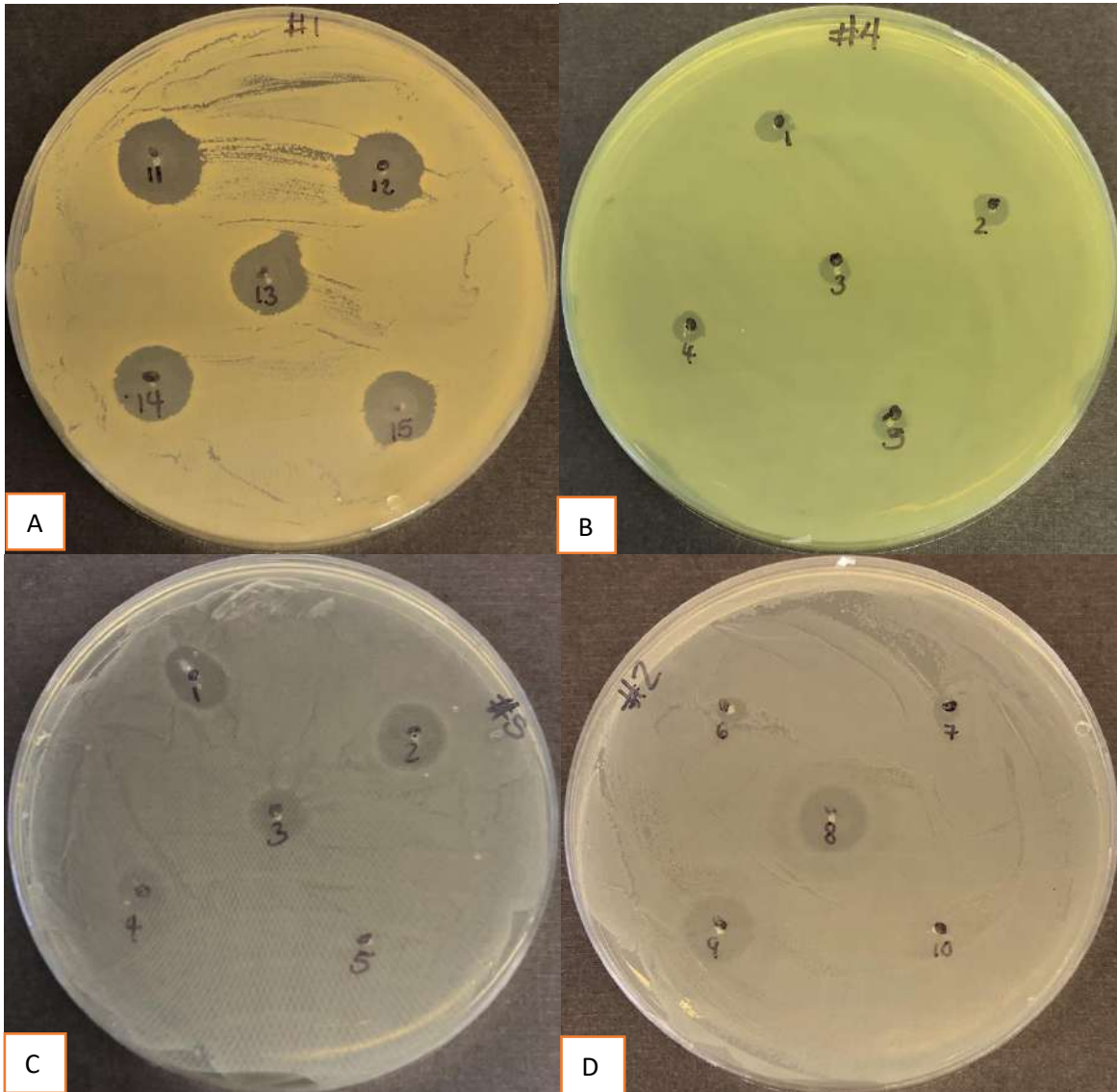
#### 4.4 Bioensayos antibacterianos.

Casi todos los hongos *Escovopsis* estudiados producen compuestos que pueden inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Tabla No.8). Este resultado era de esperarse ya que se han reportado diversos compuestos antimicrobianos del hongo *Escovopsis*. En la figura 18 se observa algunos de los resultados positivos en los bioensayos antibacterianos. El hongo *Escovopsis* sp A.det.08.col mostró ser activo contra estas bacterias a excepción de *Enterococcus faecalis*, que mostró un halo de inhibición parcial. Sin embargo, aún se desconocen los compuestos responsables de esta actividad antibacteriana, ya que ninguno de los cuatro compuestos aislados del hongo *Escovopsis* sp. A.det.08.col mostró actividad antibacteriana.

**Tabla 8.** Datos de bioensayos antibacterianos de los extractos de los hongos *Escovopsis*

No.	Código del hongo <i>Escovopsis</i>	Colonia de hormiga donde se aisló el hongo	Actividad antibacteriana*			
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
1	26/11.A.dent.06.col	<i>Apterostigma dentigerum</i>	+	+	+/-	+
2	A.det.08.col	<i>Apterostigma dentigerum</i>	+	+/-	+	+
3	A.col.40.BCT	<i>Apterostigma collare</i>	+	-	+	+
4	A.pil.04	<i>Apterostigma pilosum</i>	+	+	+	+
5	DRA1	<i>Apterostigma auriculatum</i>	-	-	-	+
6	Col.2.29/12	<i>Acromyrmex echinator</i>	+	+	+	+
7	Ac.2.10-2	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	+	+	+	+
8	01.Asp.R3.17/2	<i>Acromyrmex sp</i>	+	+	-	+
9	03.Ac.19/01	<i>Acromyrmex coronatus</i>	+	+	+	+
10	03.Ac.8/02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	+	+	-	+
11	01.Ac.3/02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	+	+	+	+
12	Ac.33.10-2	<i>Acromyrmex echinator</i>	+	+	+	+
13	09.Ac.8/02	<i>Acromyrmex coronatus</i>	+	+	+	+
14	At.ceph	<i>Atta cephalotes</i>	+	+	+	+
15	T.cornetzi	<i>Paratrachymyrmex cornetzi</i>	+	+	+	+
16	T.zeteki T2th-155	<i>Mycetomoellerius zeteki</i>	+	+	+	+
17	Cope CN5	<i>Cyphomyrmex sp</i>	+	+	+	+

\*Presencia de halo de inhibición (+); Ausencia de halo de inhibición (-); Presencia de halo inhibición parcial (+/-).



**Figura 18.** Ejemplo de resultados de los bioensayos antibacterianos contra: A) *Staphylococcus aureus*; B) *Pseudomonas aeruginosa*; C) *Enterococcus faecalis*; D) *Escherichia coli*

---

## Conclusiones

---

Se identificaron cuatro nuevos productos naturales, una butenolida aromática (TP-43-2) y tres policétidos (TP-38-2, TP-39-5, TP-44-3), del hongo *Escovopsis* A.det.08.col, aislado de una colonia de *Apterostigma dentigerum* colectada en Gamboa, Provincia de Colón, Panamá. Ninguno de los compuestos aislados posee actividad antifúngica o antibacteriana, algunas de las fracciones obtenidas del hongo A.det.08.col poseen tanto actividad antifúngica contra otros hongos *Escovopsis*, como también actividad antibacteriana, los cuales quedan pendiente por identificar.

Se encontraron notables diferencias en los perfiles químicos de los hongos *Escovopsis* según el género de las colonias de hormigas de las que fueron aislados (*Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Paratrachymyrmex*, *Mycetomoellerius*, *Atta* y *Acromyrmex*). Los hongos *Escovopsis* de las colonias de *Apterostigma* tienden a producir compuestos muy diferentes al resto y esto puede explicar por qué pueden inhibir el crecimiento de otros hongos *Escovopsis*.

---

## Recomendaciones

---

- Aislar los compuestos con actividad antifúngica y antibacteriana.
- Realizar Espectrometría de masas en alta resolución de los cuatro compuestos aislados.
- Determinar la configuración absoluta de los nuevos compuestos.

---

## Bibliografía

---

- Abdel-Wahab, M. A., Asolkar, R. N., Inderbitzin, P., & Fenical, W. (2007). Secondary metabolite chemistry of the marine-derived fungus *Massarina* sp., strain CNT-016. *Phytochemistry*, *68*(8), 1212–1218.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.020>
- 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>
- Akrimajirachoote, N., Satitsri, S., Sommart, U., Rukachaisirikul, V., & Muanprasat, C. (2020). Inhibition of CFTR-mediated intestinal chloride secretion by a fungus-derived arthropsole A: Mechanism of action and anti-diarrheal efficacy. *European Journal of Pharmacology*, *885*(173393), 173393.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173393>
- Albinati, A., Brückner, S., Camarda, L., & Gianluca, N. (1980). Rosigenin, an unusual metabolite from *mycosphaerella rosigena*. *Tetrahedron*, *36*(1), 117–121.  
[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)85033-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)85033-2)
- Ayer, W. A., & Craw, P. A. (2010). ChemInform abstract: Biosynthesis and biogenetic interrelationships of metabolites of the fungus *Arthropsis truncata*. *ChemInform*, *24*(5), no. <https://doi.org/10.1002/chin.199305289>
- Batey, S. F. D., 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.08.001>
- 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>

Christopher, Y., Aguilar, C., Gálvez, D., Wcislo, W. T., Gerardo, N. M., & Fernández-Marín, H. (2021). Interactions among Escovopsis, antagonistic microfungi associated with the fungus-growing ant symbiosis. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(12), 1007. <https://doi.org/10.3390/jof7121007>

Coyle, M. B. (2005). *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. American Society for Microbiology.

Dhodary, B., Schilg, M., Wirth, R., & Spitteller, D. (2018). Secondary metabolites from Escovopsis weberi and their role in attacking the garden fungus of leaf-cutting ants. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 24(17), 4445–4452. <https://doi.org/10.1002/chem.201706071>

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. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867065>

Fukami, A., Taniguchi, Y., Nakamura, T., Rho, M.-C., Kawaguchi, K., Hayashi, M., Komiyama, K., & Omura, S. (2010). ChemInform Abstract: New Members of the Macrospheles from Microsphaeropsis sp. FO-5050. Part 4. *ChemInform*, 30(42), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.199942270>

Genilloud, O. (2019). Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.012>

Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., & Buarque De Gusmao, N. (1999). Antimicrobial and antitumor activities of mycosporulone. *Journal of Natural Products*, 62(9), 1222–1224. <https://doi.org/10.1021/np9805084>

Heine, D., Holmes, N. A., Worsley, S. F., Santos, A. C. A., Innocent, T. M., Scherlach, K., Patrick, E. H., Yu, D. W., Murrell, J. C., Vieria, P. C., Boomsma, J. J., Hertweck, C.,

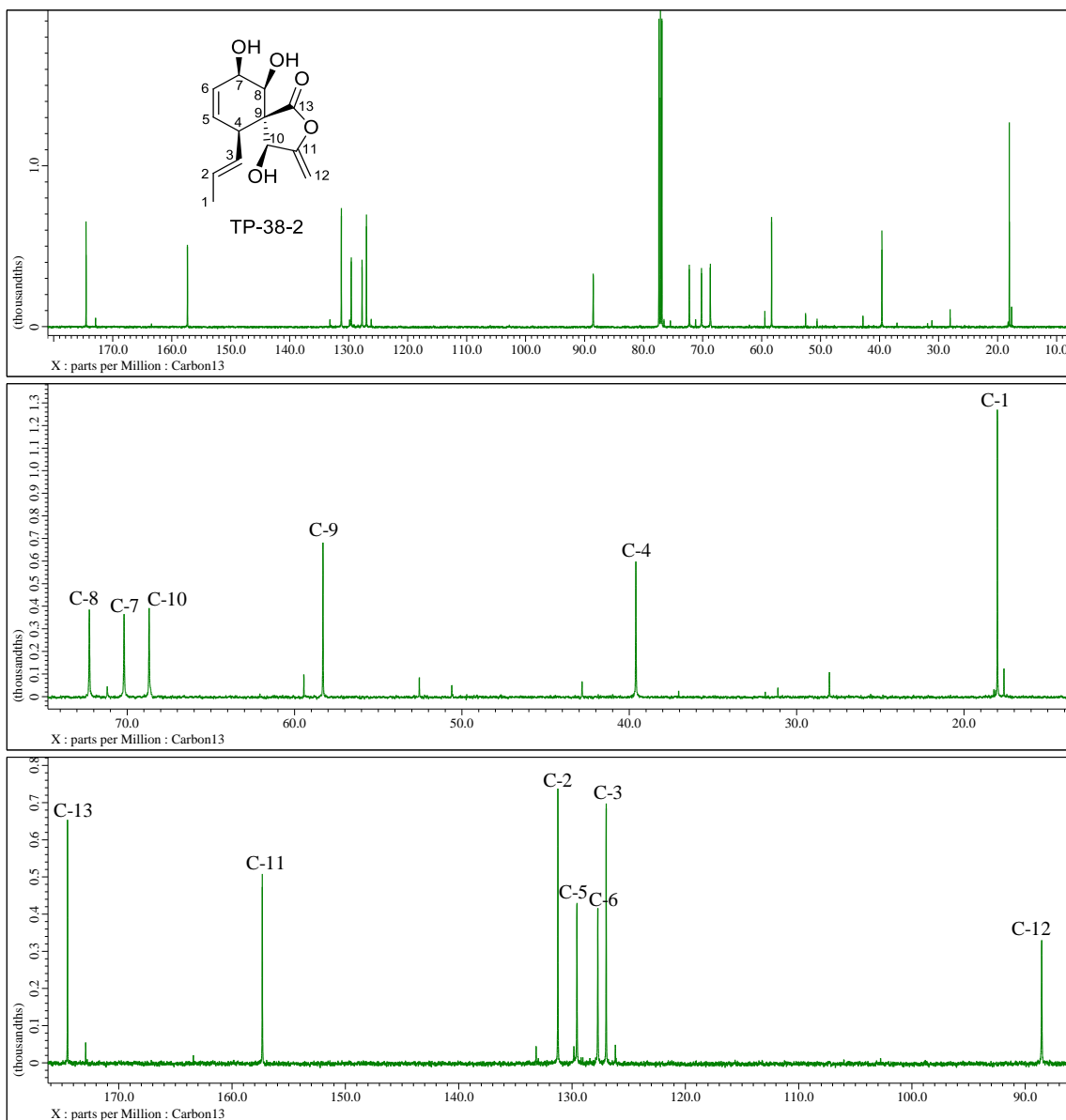
- Hutchings, M. I., & Wilkinson, B. (2018). Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1>
- Hutchings, M. I., & Wilkinson, B. (2018). Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1>
- Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. En *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 1253–1273). ASM Press.
- Kim, J. W., Son, S., Kim, G. S., Otaka, J., Miura, Y., Muranaka, A., Uchiyama, M., Lee, J.-S., Jang, M., Ko, S.-K., Takahashi, S., Osada, H., Jang, J.-H., & Ahn, J. S. (2019). Aromatic butenolides produced by a soil ascomycete *Auxarthron* sp. KCB15F070 derived from a volcanic island. *Tetrahedron Letters*, 60(45), 151227. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151227>
- 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, R., Jr, 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. <https://doi.org/10.1186/s43008-021-00078-8>

- Murakami, T., Tsushima, T., Takada, N., Tanaka, K., Nihei, K.-I., Miura, T., & Hashimoto, M. (2009). Four analogues of spiroleptoshol isolated from *Leptosphaeria doliolum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(2), 492–495.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.004>
- Oh, D.-C., Poulsen, M., Currie, C. R., & Clardy, J. (2009). Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nature Chemical Biology*, *5*(6), 391–393.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.159>
- Oh, H., Swenson, D. C., Gloer, J. B., & Shearer, C. A. (2003). New bioactive rosigenin analogues and aromatic polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*. *Journal of Natural Products*, *66*(1), 73–79.  
<https://doi.org/10.1021/np020342d>
- Rether, J., Erkel, G., Anke, T., & Sterner, O. (2004). Inhibition of inducible TNF- $\alpha$  expression by oxaspirodion, a novel spiro-compound from the ascomycete *Chaetomium subspirale*. *Biol. Chem*, *385*, 829–834.
- Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Arthington-Skaggs, B., Brown, S. D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M. A., Espinel-Ingroff, A., Knapp, C. C., Ostrosky-Zeichner, L., Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Walsh, T. J. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. *Clin. Lab. Stand. Inst.*
- Rodrigues, A., Cable, R. N., Mueller, U. G., Bacci, M., Jr, & Pagnocca, F. C. (2009). Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, *96*(3), 331–342.  
<https://doi.org/10.1007/s10482-009-9350-7>
- Schnermann, M. J., Romero, F. A., Hwang, I., Nakamaru-Ogiso, E., Yagi, T., & Boger, D. L. (2006). Total synthesis of piericidin A1 and B1 and key analogues. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(36), 11799–11807.  
<https://doi.org/10.1021/ja0632862>

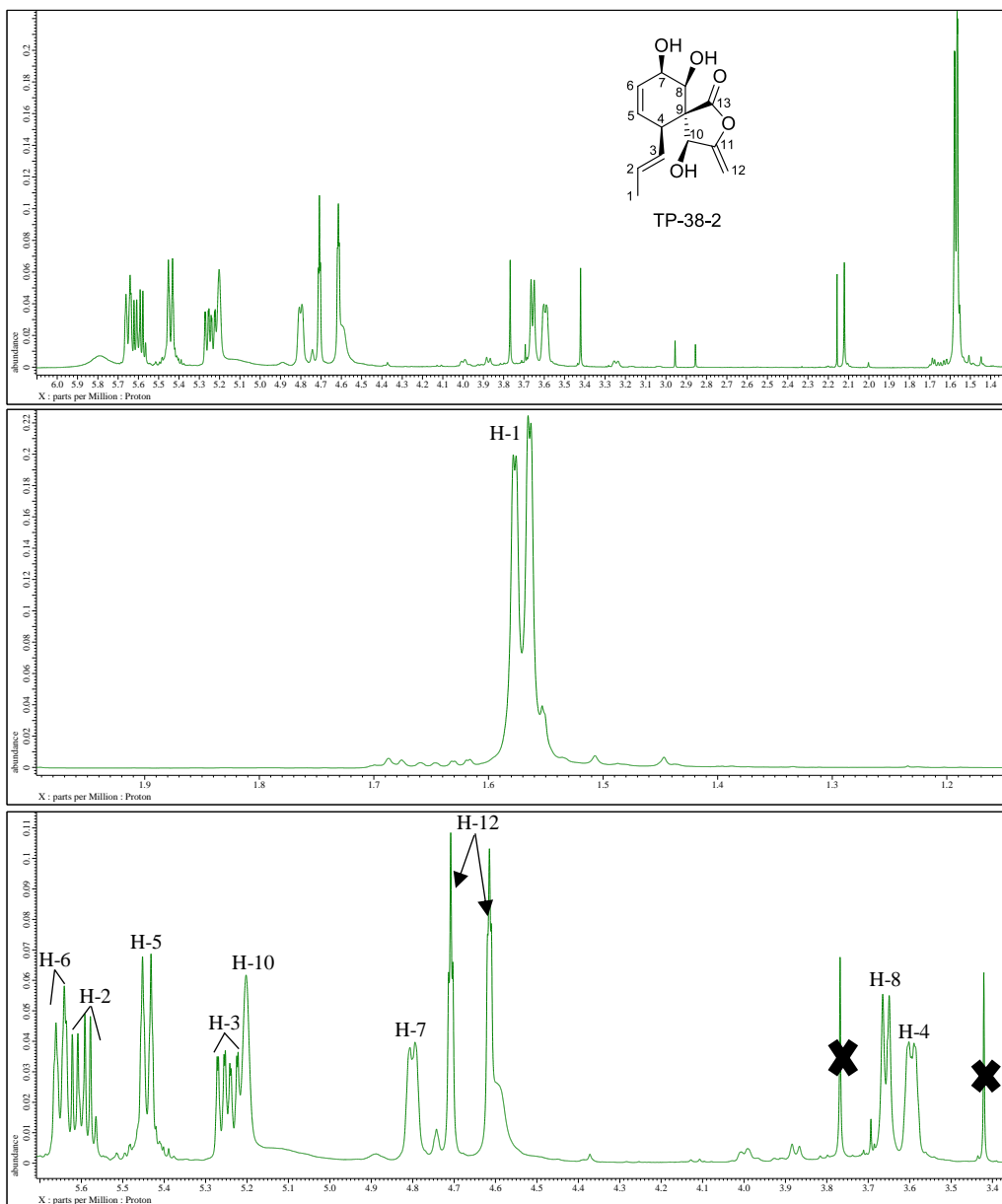
- Schoenian, I., Spiteller, M., Ghaste, M., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2011). Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leafcutting ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 1955–1960.
- Schultz, T. R., & Brady, S. G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(14), 5435–5440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711024105>
- Sit, C. S., Ruzzini, A. C., Van Arnem, E. B., Ramadhar, T. R., Currie, C. R., & Clardy, J. (2015). Variable genetic architectures produce virtually identical molecules in bacterial symbionts of fungus-growing ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(43), 13150–13154. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515348112>
- Westphal, K. R., Werner, M. I. H., Nielsen, K. A. H., Sørensen, J. L., Andrushchenko, V., Winde, J., Hertz, M., Jensen, M. A., Mortensen, M. L., Bouř, P., Sondergaard, T. E., & Wimmer, R. (2019). Characterization of Eight Novel Spiroleptosphols from *Fusarium avenaceum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(19), 3498. <https://doi.org/10.3390/molecules24193498>
- Wijeratne, E. M. K., Gunaherath, G. M. K. B., Chapla, V. M., Tillotson, J., de la Cruz, F., Kang, M., 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00986>
- Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Low, M. D., Sheehan, D. J., Tenover, F. C., Turnidge, J. D., & Weinstein, M. P. (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically : approved standard*.

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 Huaxue*, 42(4), 1229.  
<https://doi.org/10.6023/cjoc202110038>

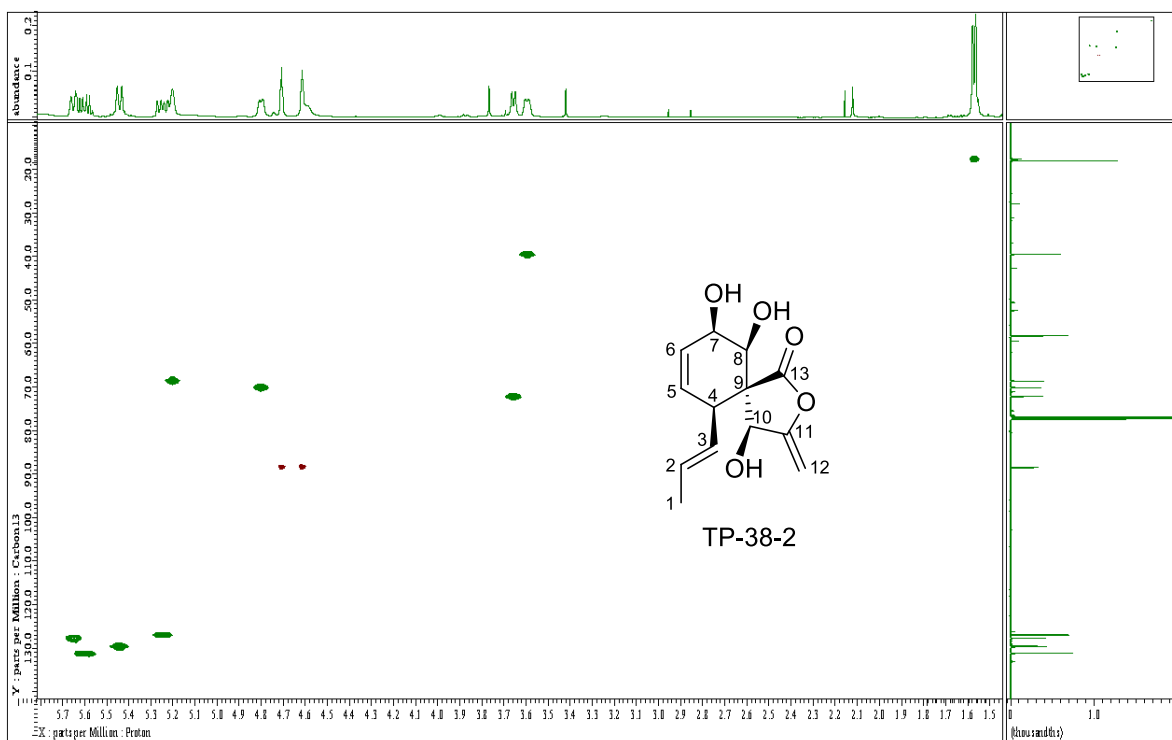
## Anexos



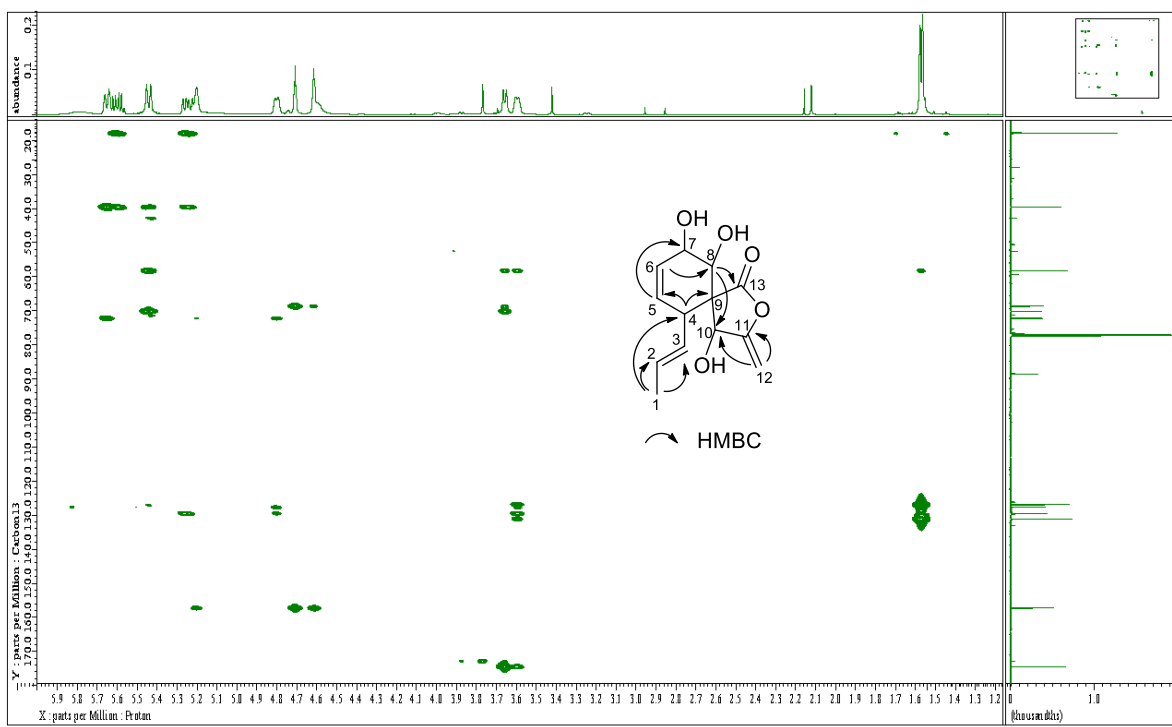
Anexo A. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto TP-38-2 en  $\text{CDCl}_3$  a 125 MHz



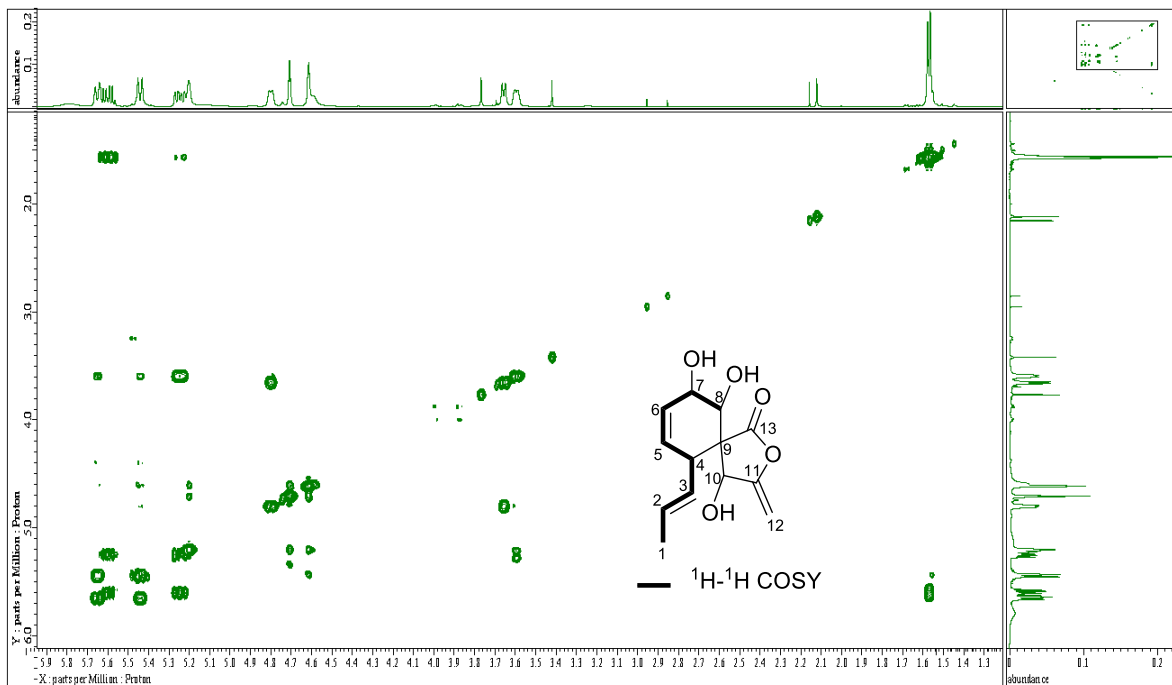
Anexo B. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de TP-38-2 en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz.



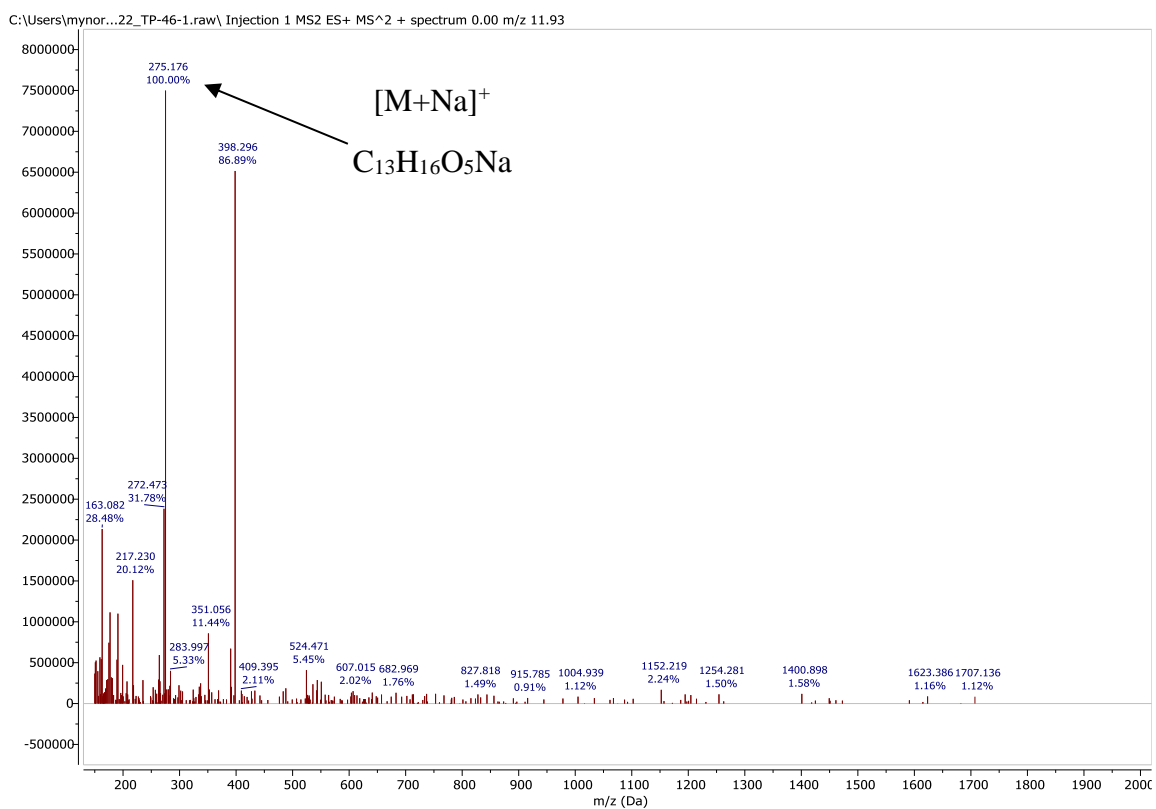
Anexo C. gHSQC de TP-38-2 en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz.



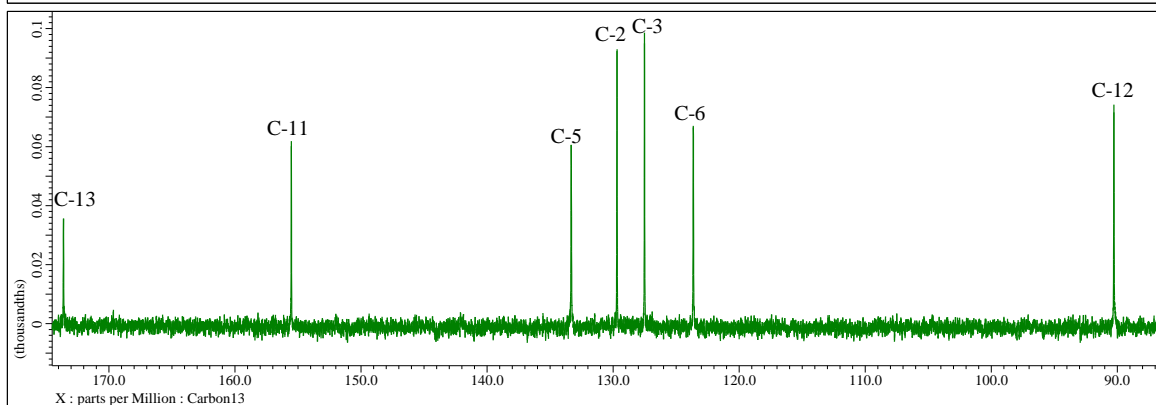
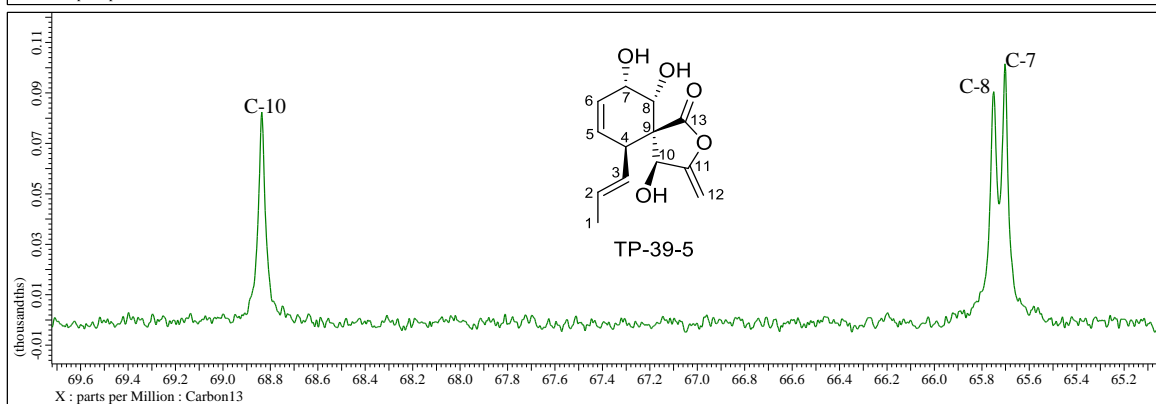
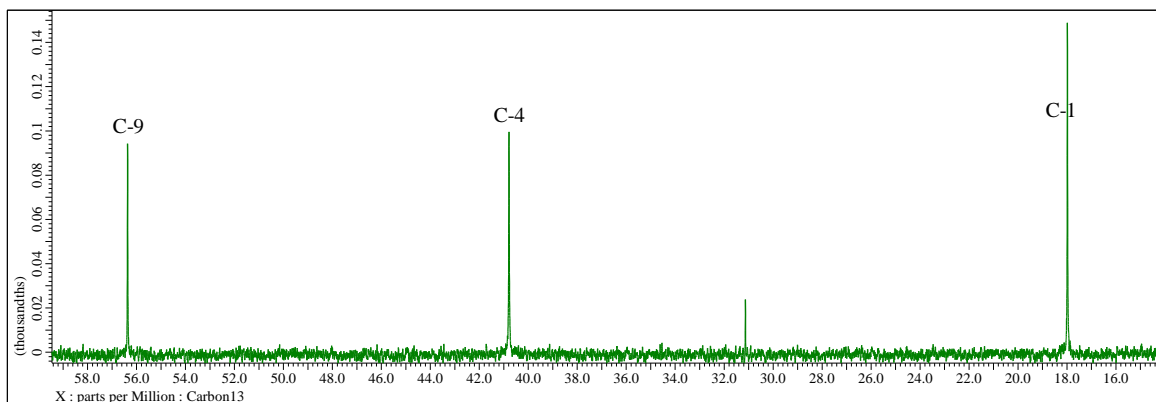
Anexo D. gHMBC de TP-38-2 en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz.



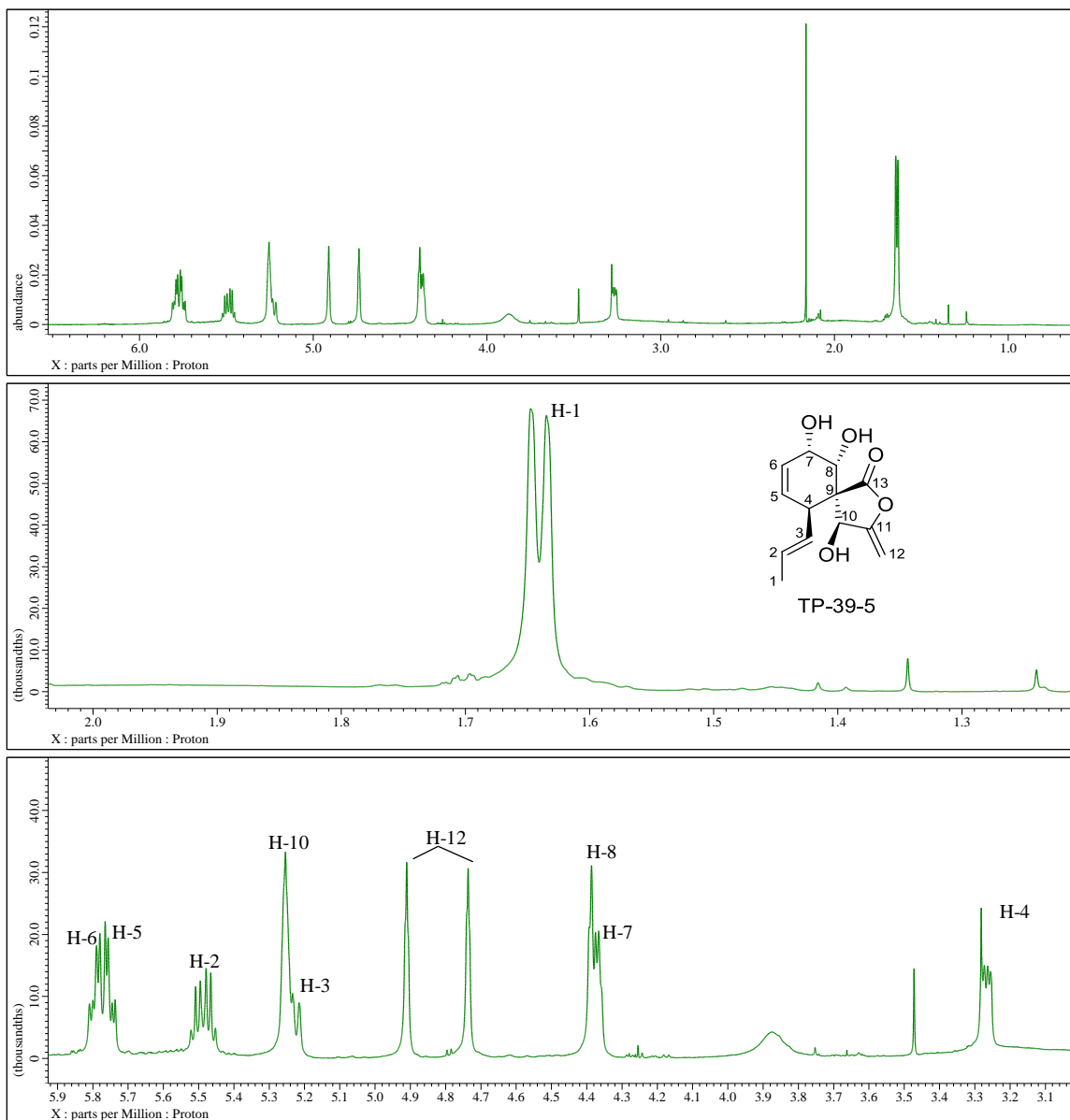
Anexo E. gCOSY de TP-38-2 en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz.



Anexo F. Espectro de Masas de TP-38-2.

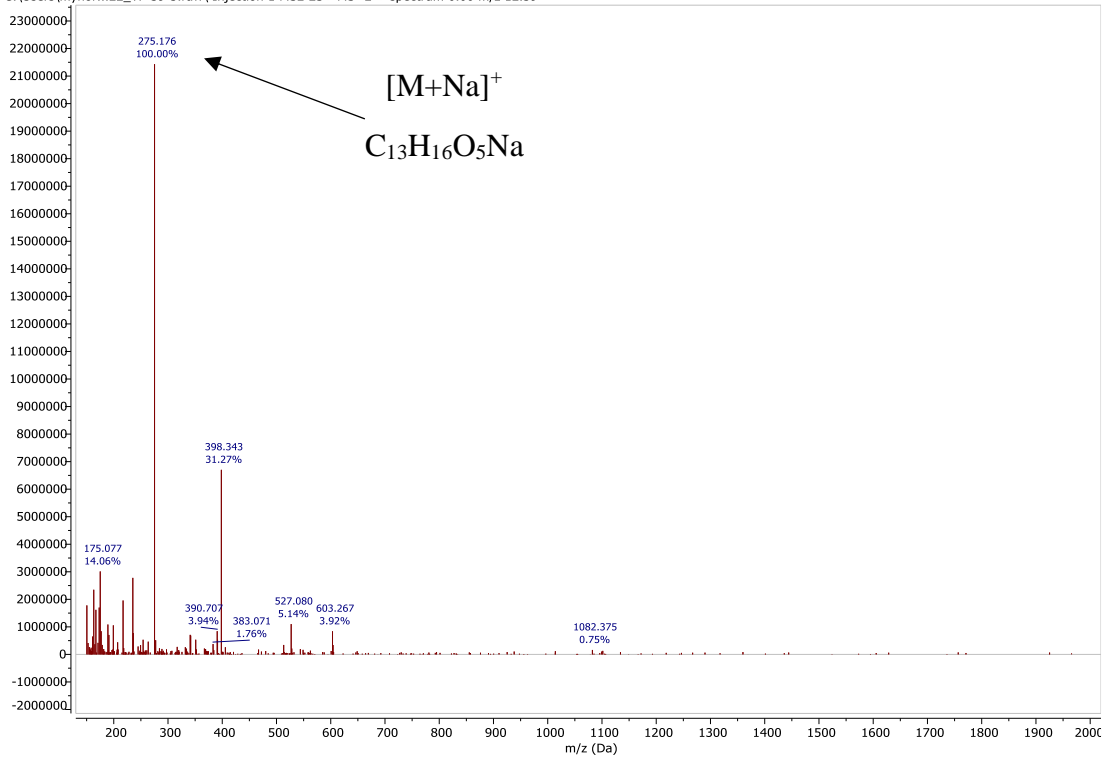


Anexo G. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto TP-39-5 en CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz.

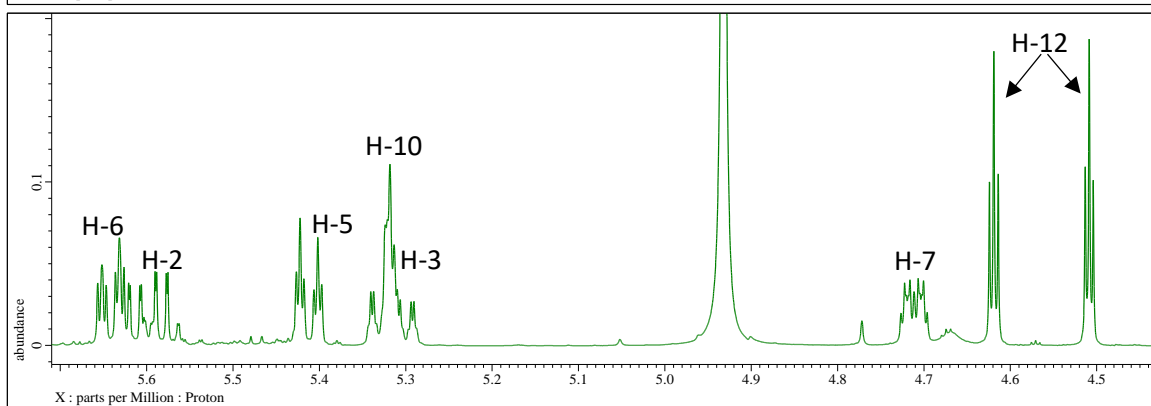
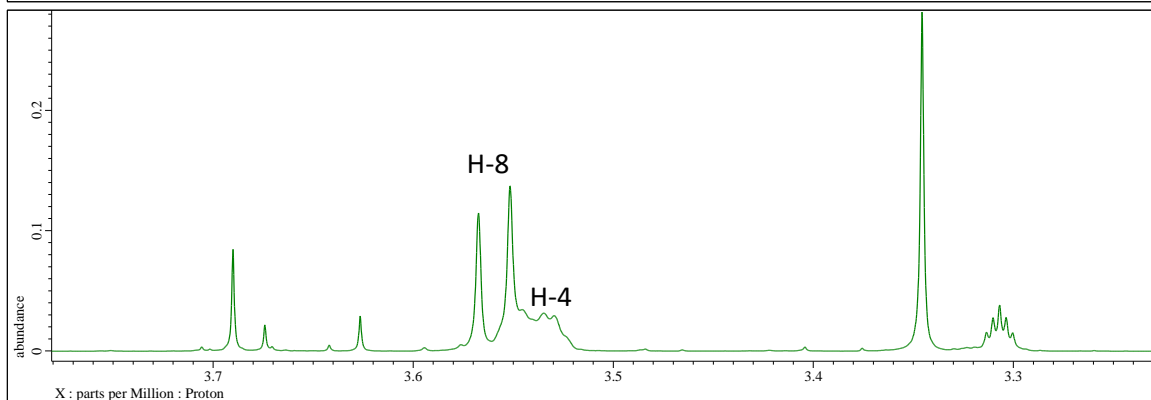
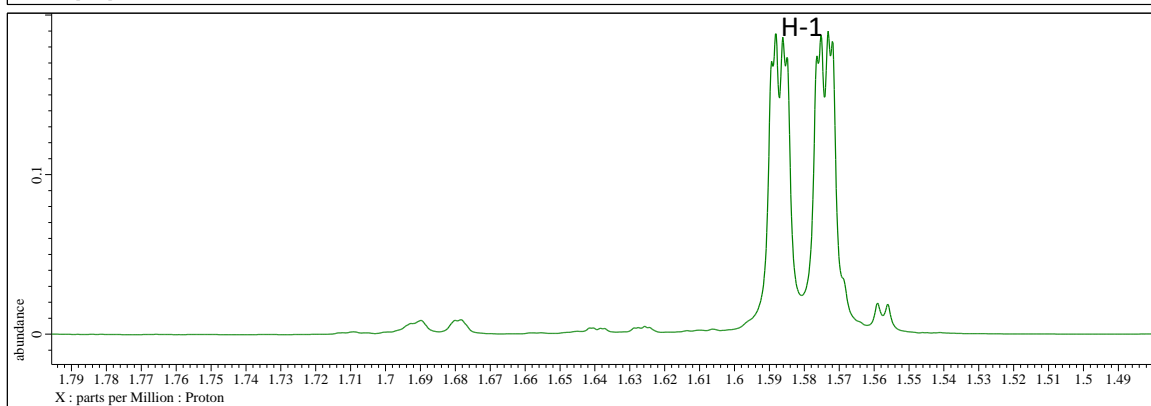
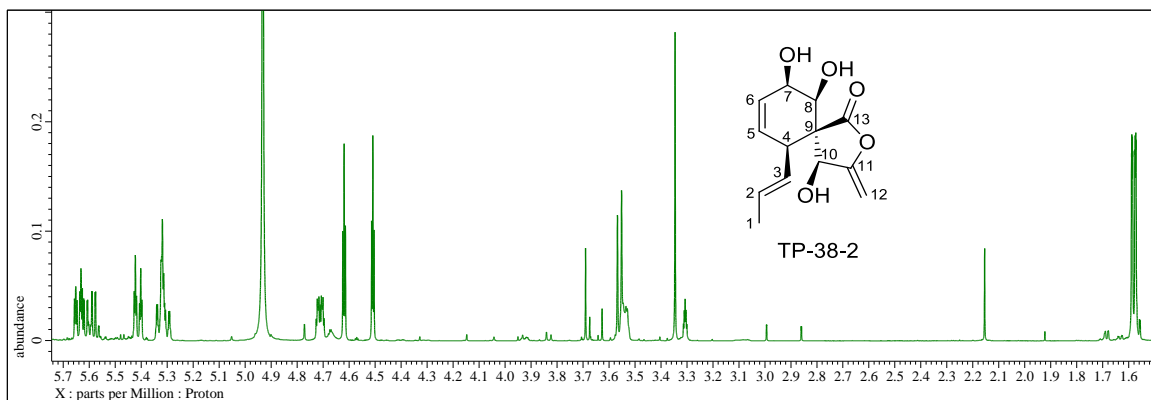


Anexo H. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto TP-39-5 en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz.

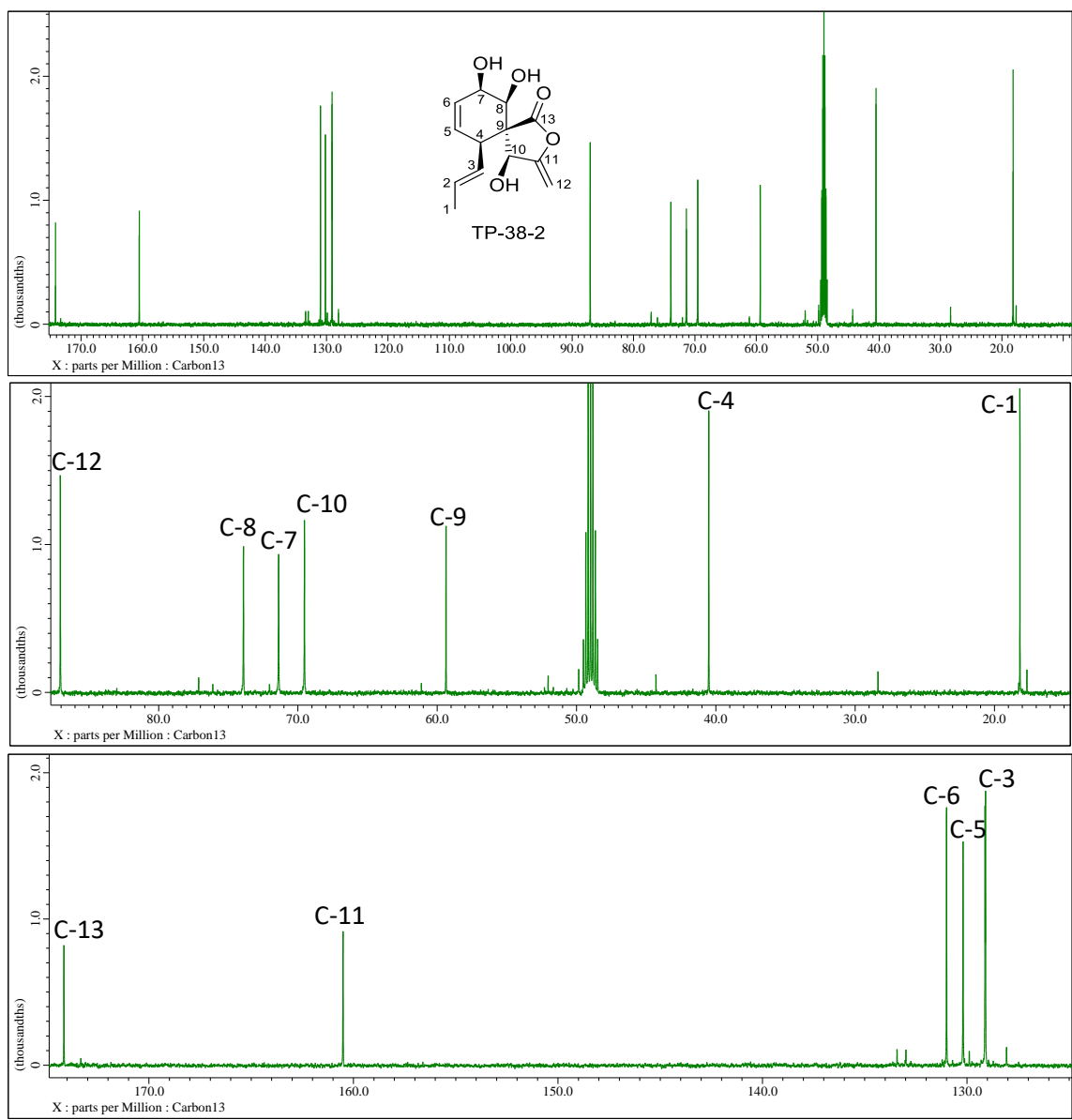
C:\Users\mynor...22\_TP-39-5.raw\ Injection 1 MS2 ES+ MS^2 + spectrum 0.00 m/z 12.39



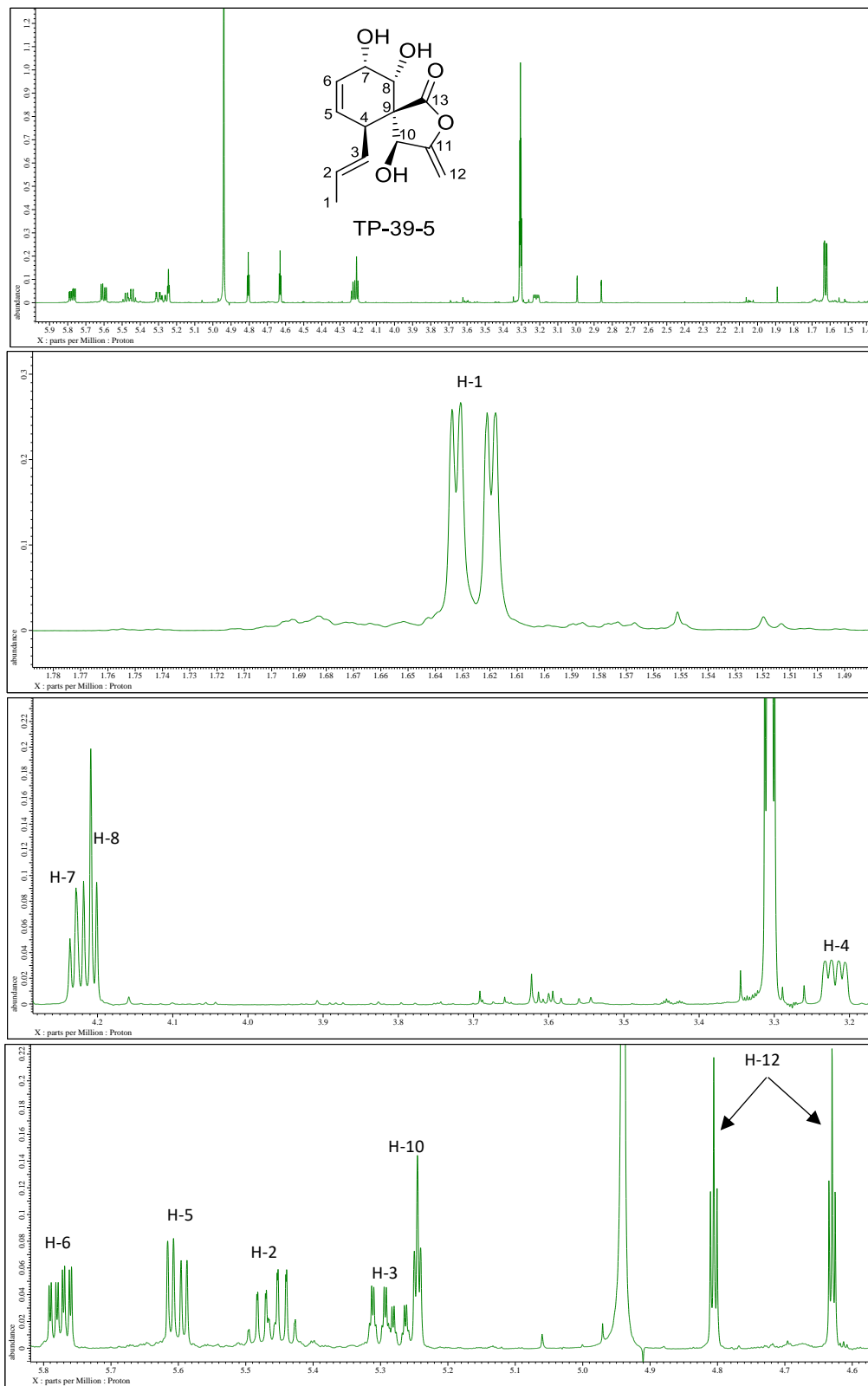
Anexo I. Espectro de Masas de TP-39-5.



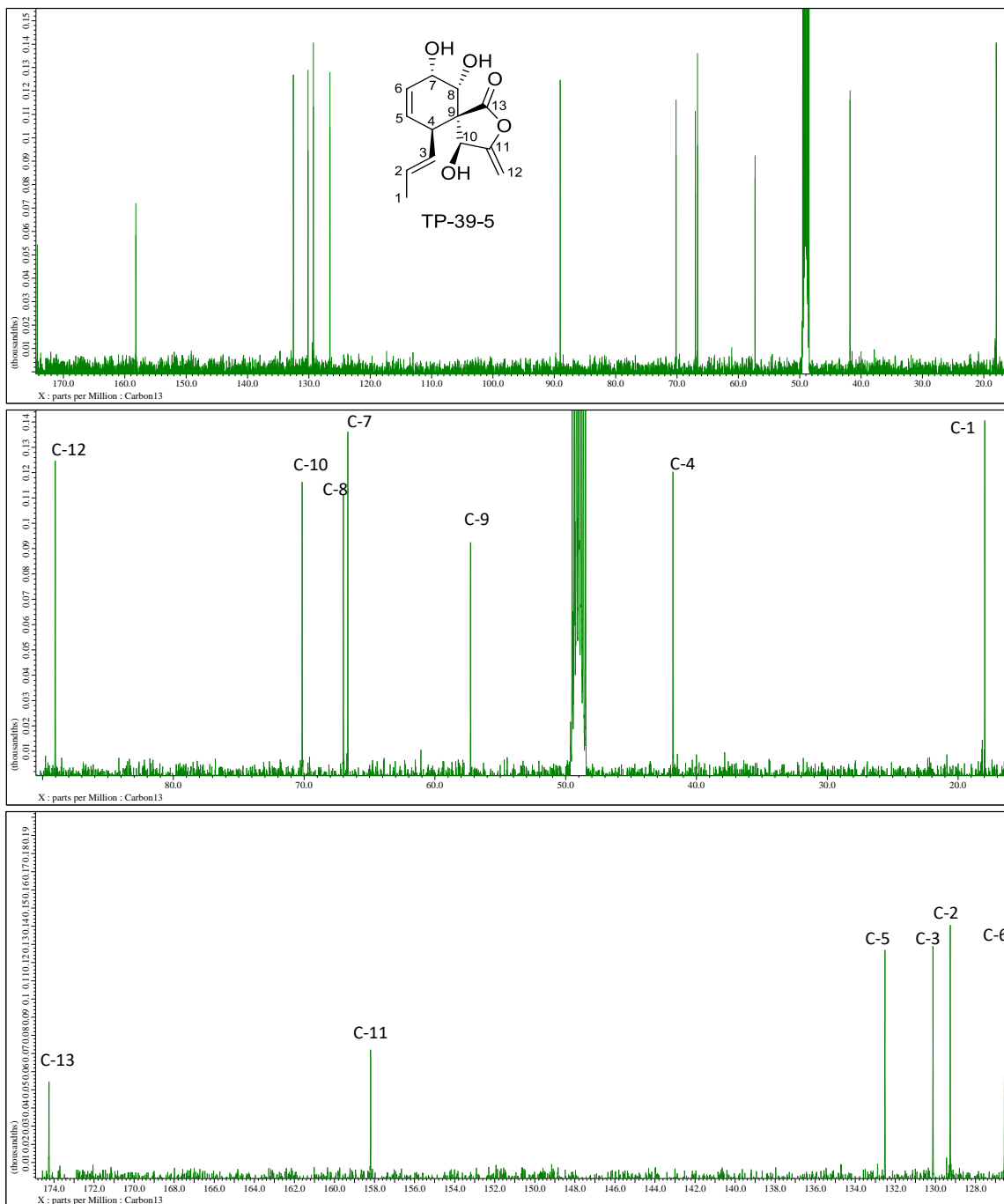
Anexo J. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto TP-38-2 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz.



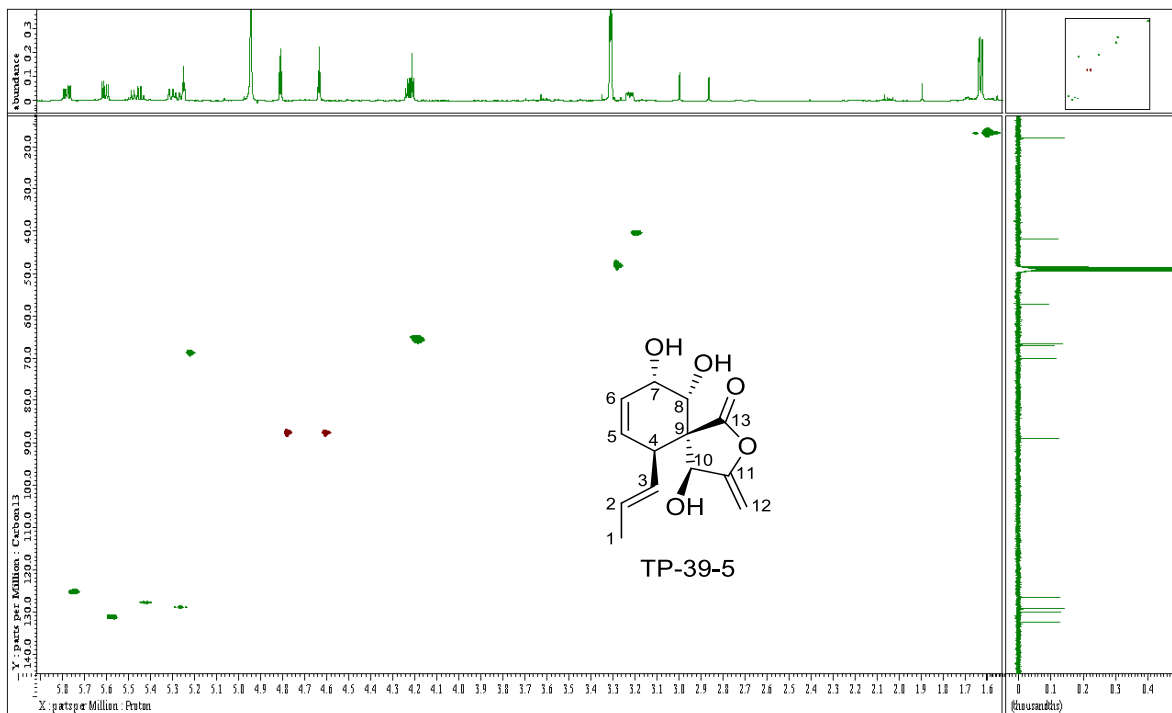
Anexo K. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto TP-38-2 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 125 MHz.



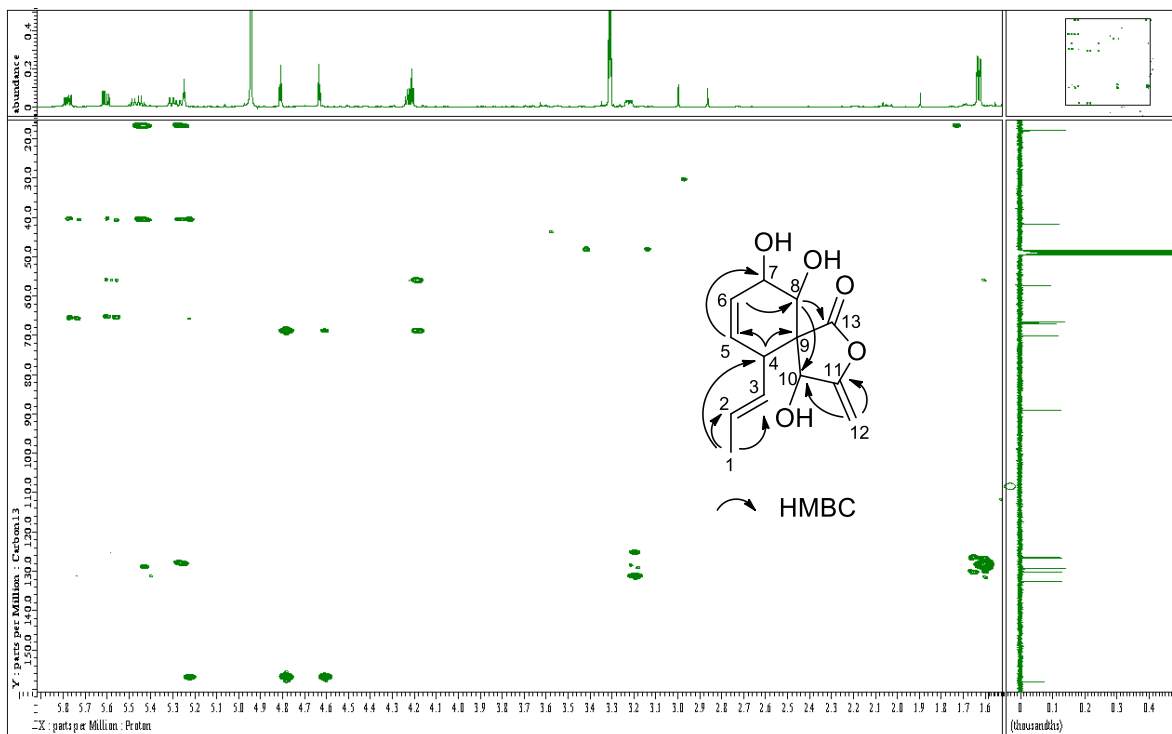
Anexo L. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto TP-39-5 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz.



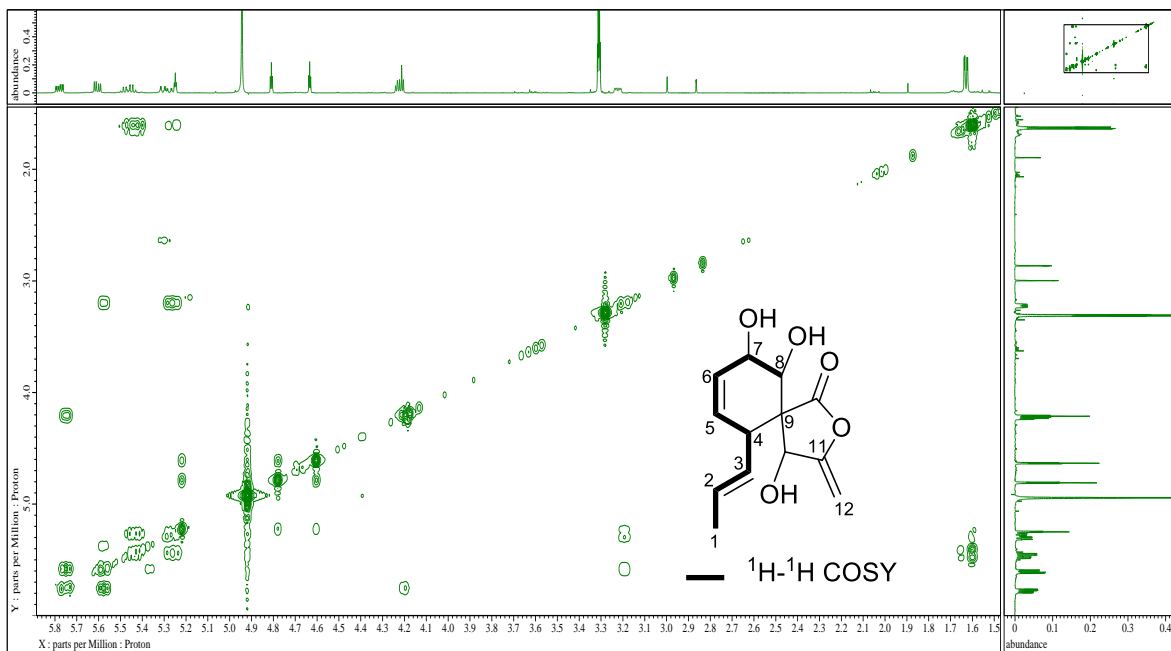
Anexo M. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto TP-39-5 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 125 MHz.



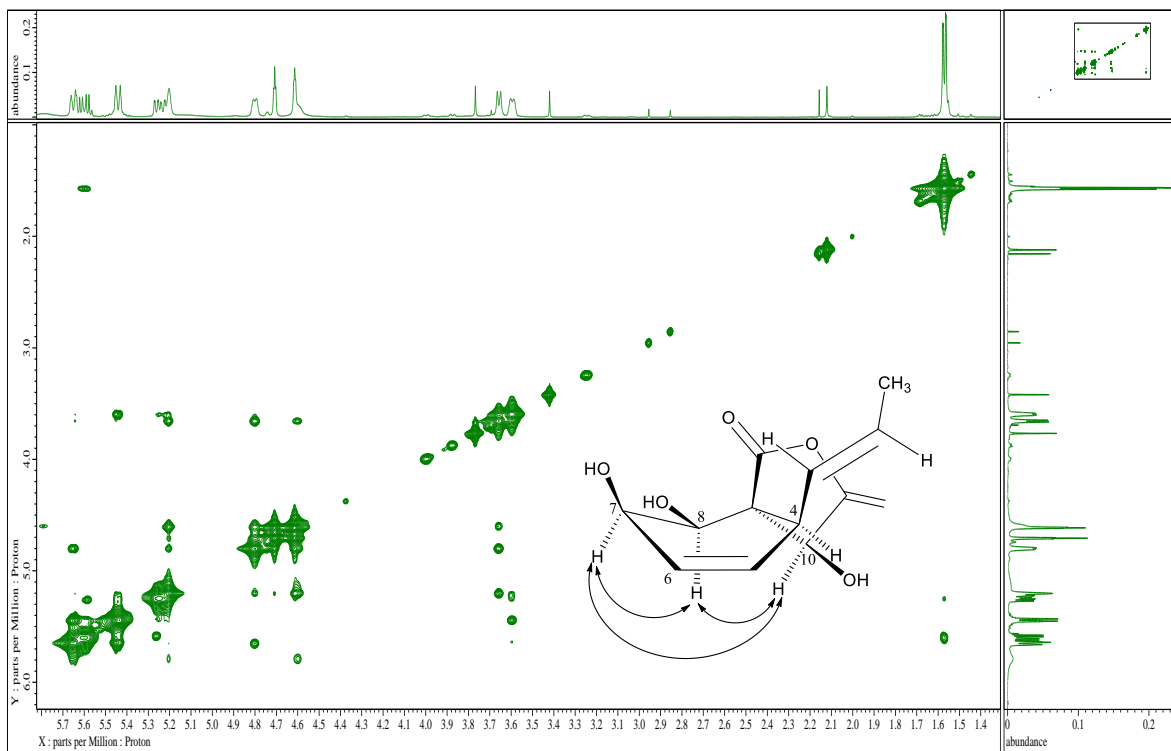
Anexo N. Espectro gHSQC de TP-39-5 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



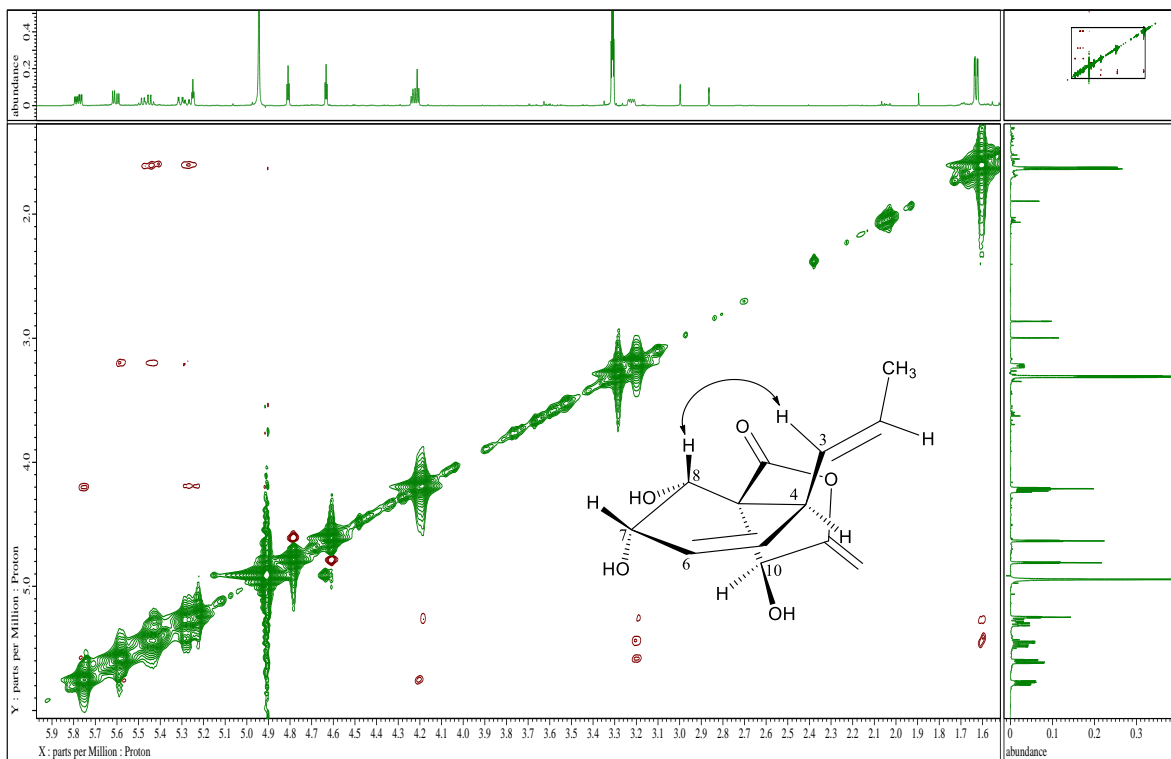
Anexo O. Espectro gHMBC de TP-39-5 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



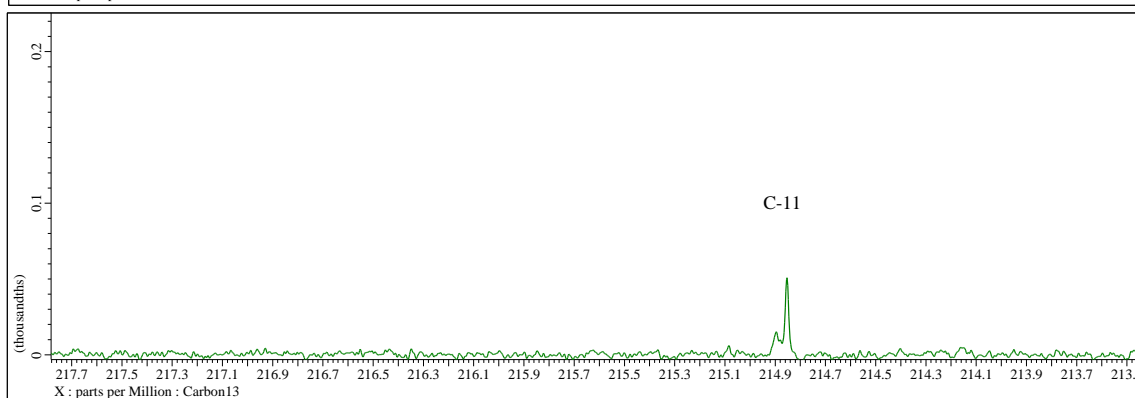
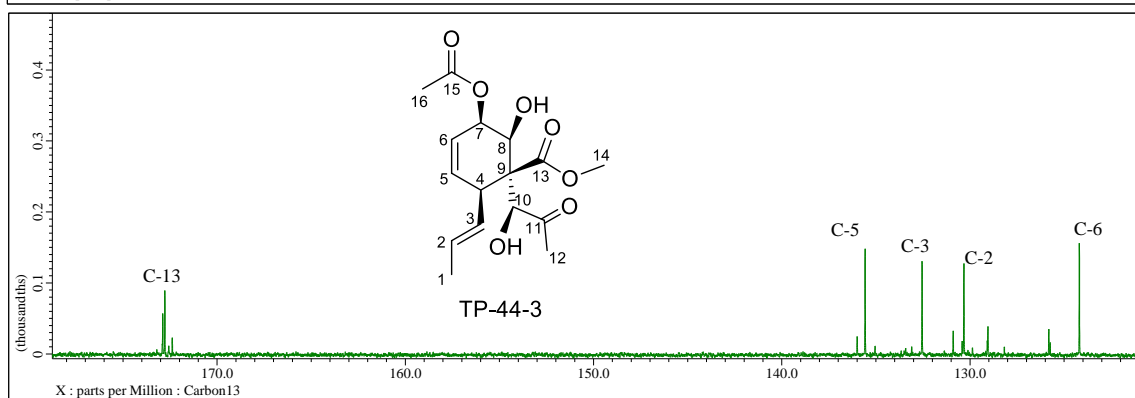
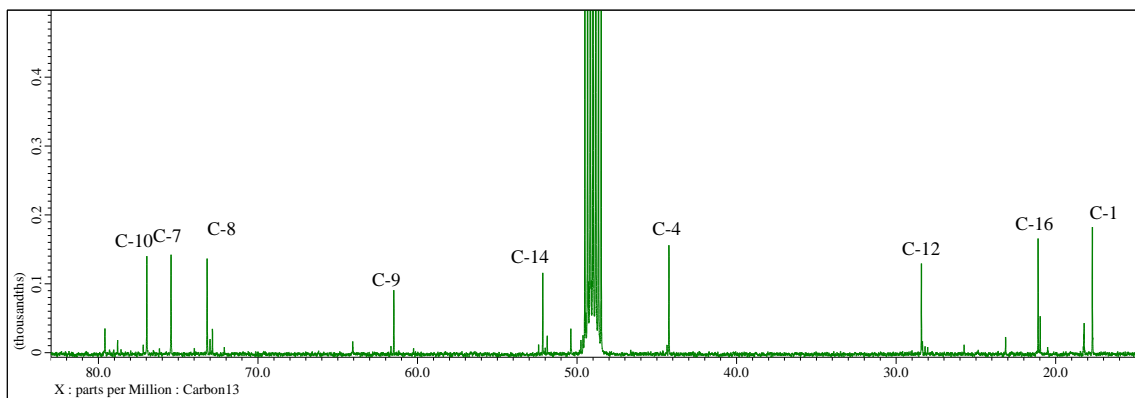
Anexo P. Espectro gCOSY de TP-39-5 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



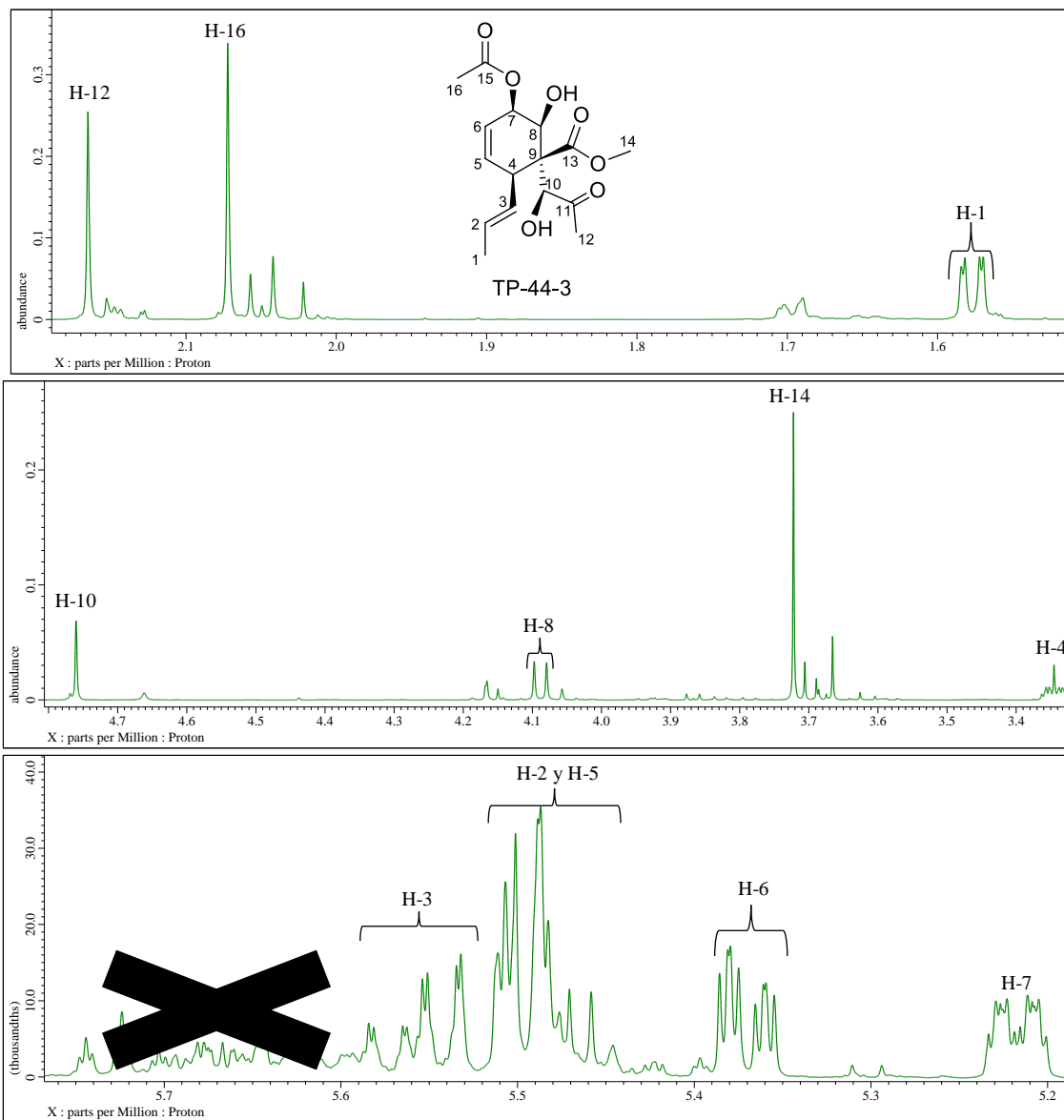
Anexo Q. Espectro gNOESY de TP-38-2 en CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz.



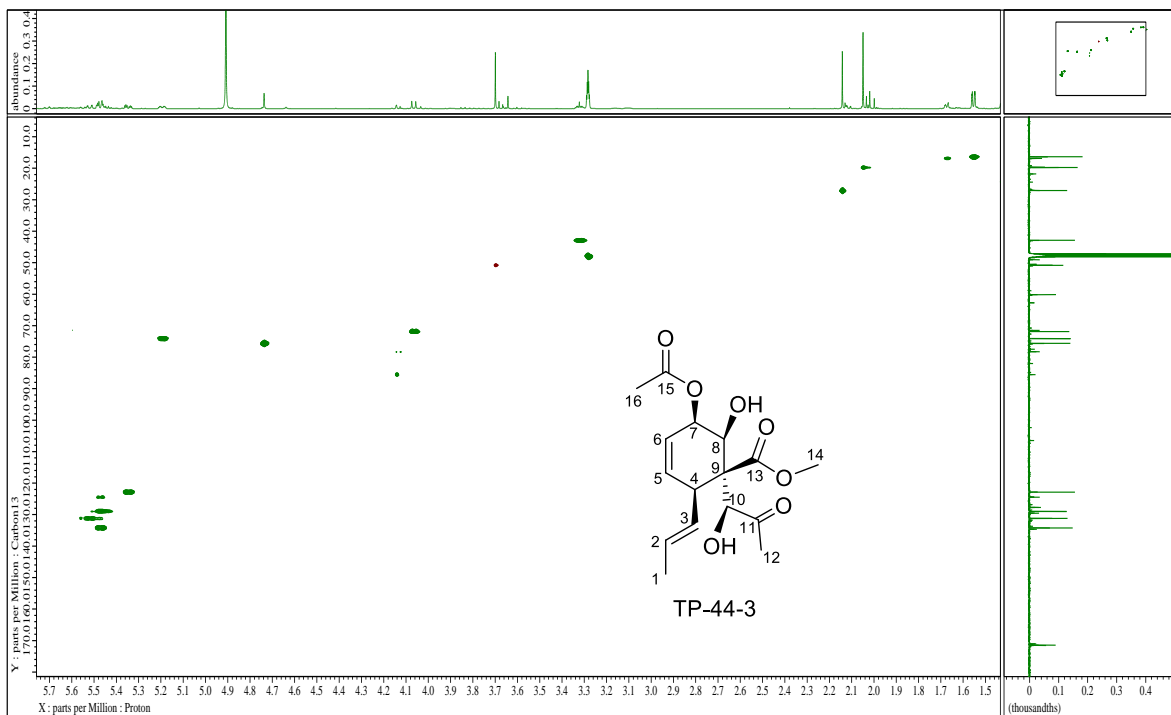
Anexo R. Espectro gNOESY de TP-39-5 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



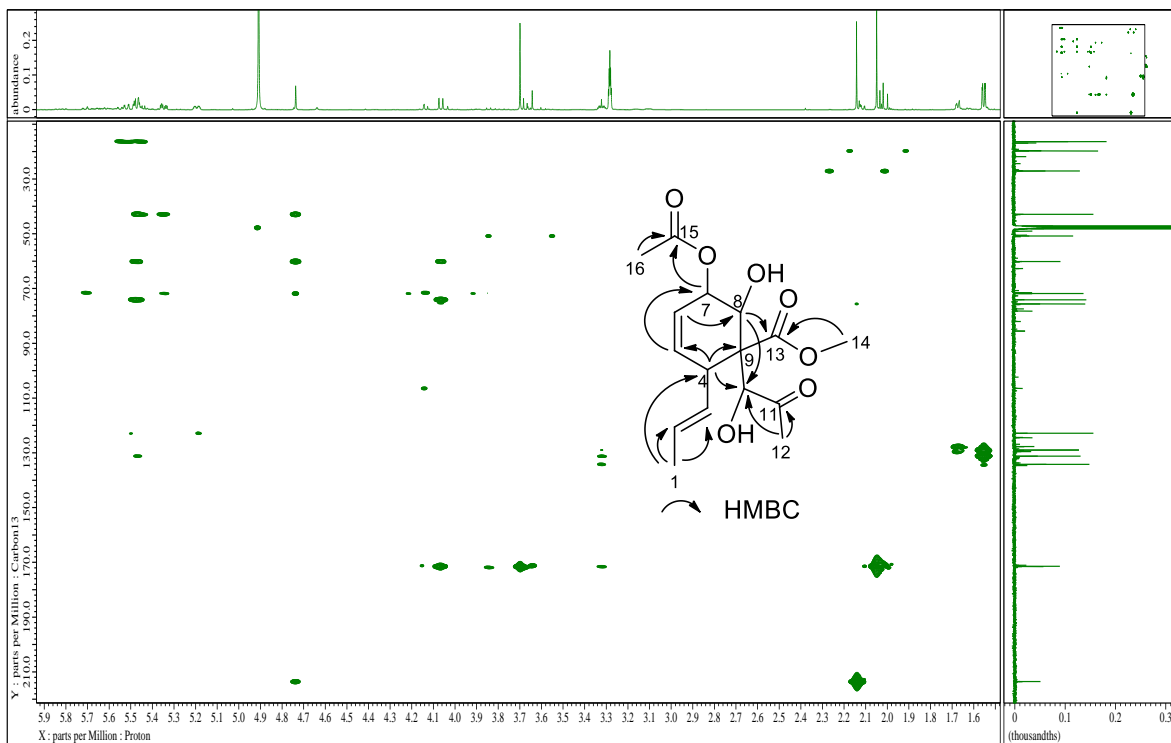
Anexo S. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD a 125 MHz.



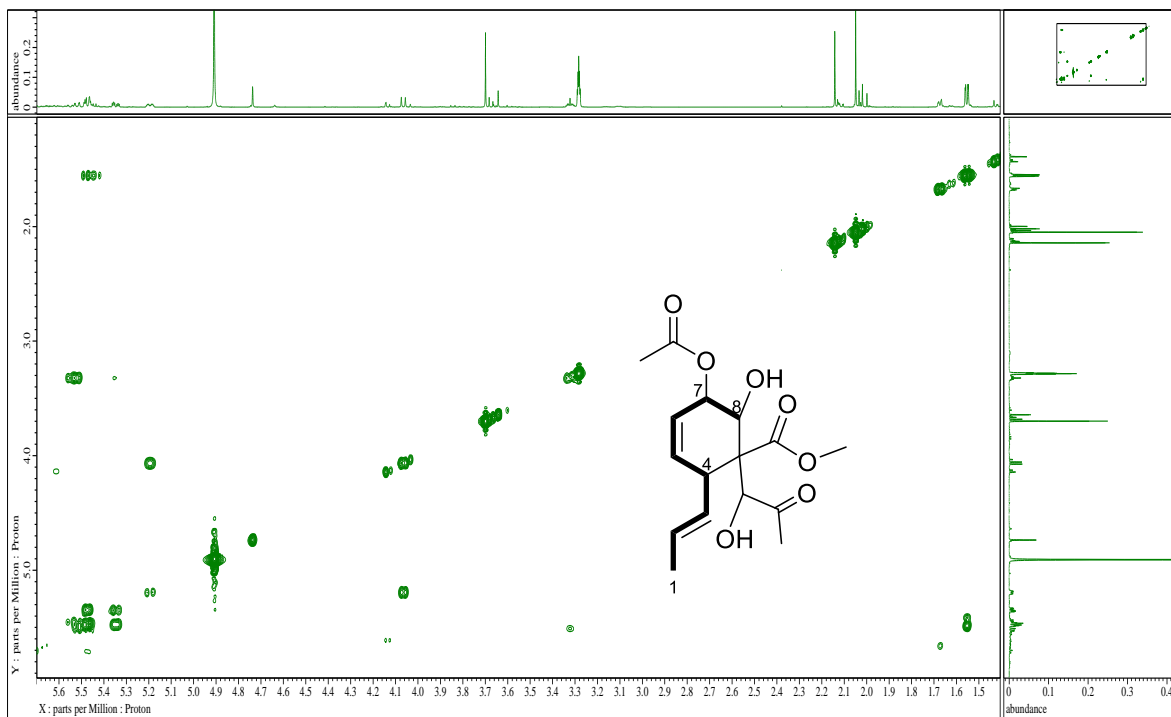
Anexo T. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



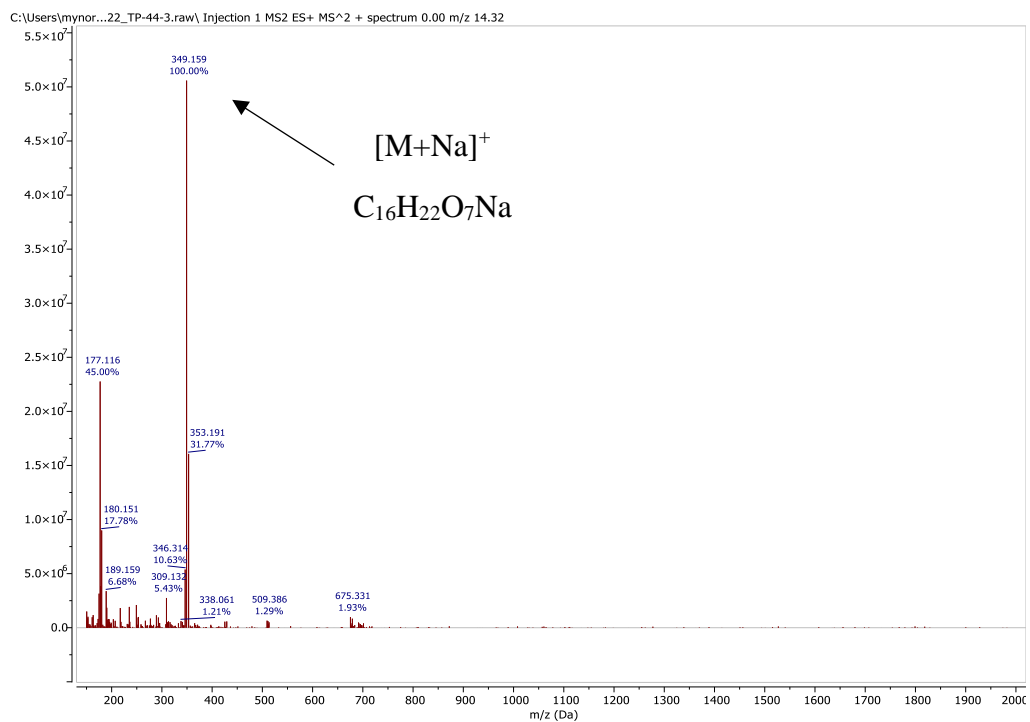
Anexo U. Espectro gHSQC del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz



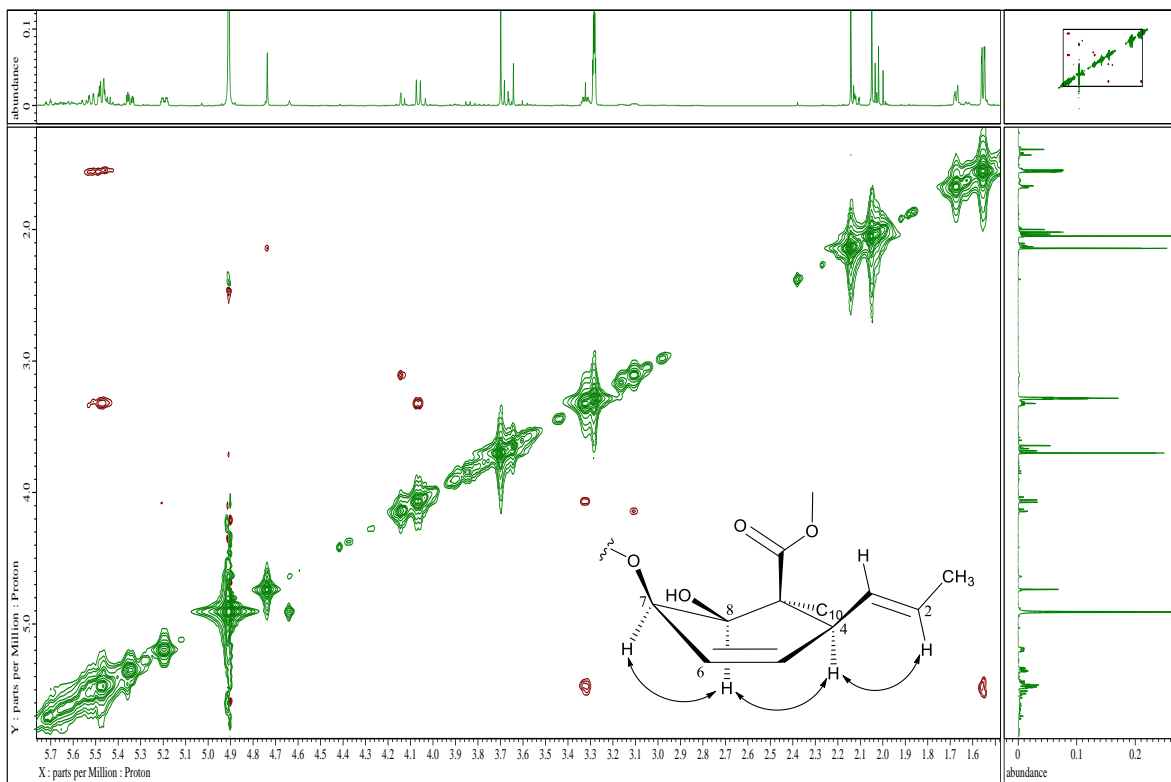
Anexo V. Espectro gHMBC del compuesto TP-44-3 CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



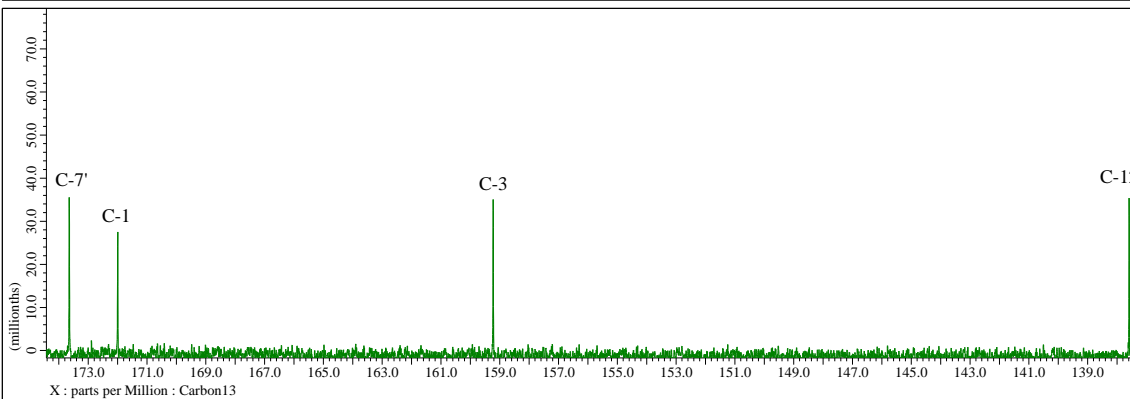
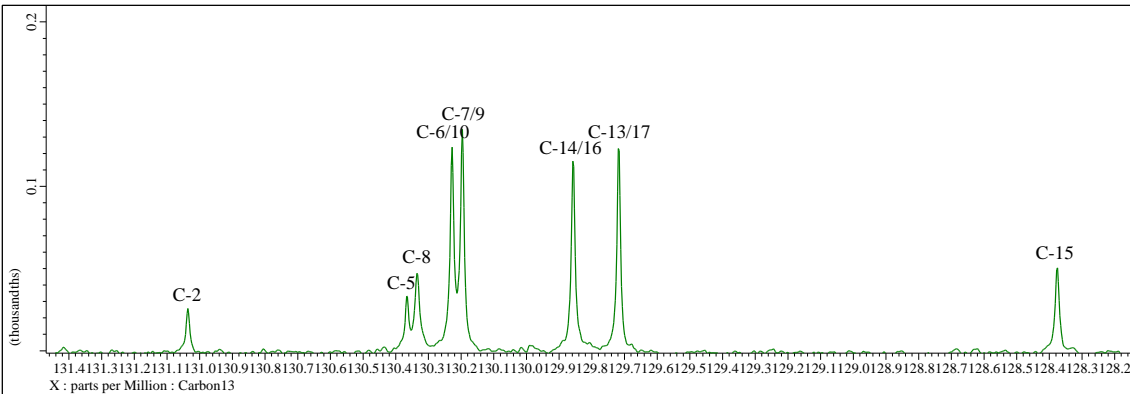
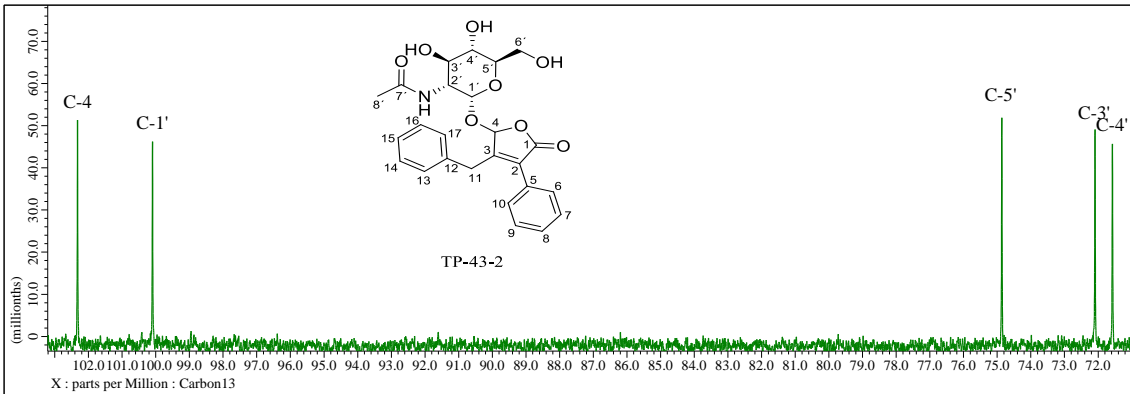
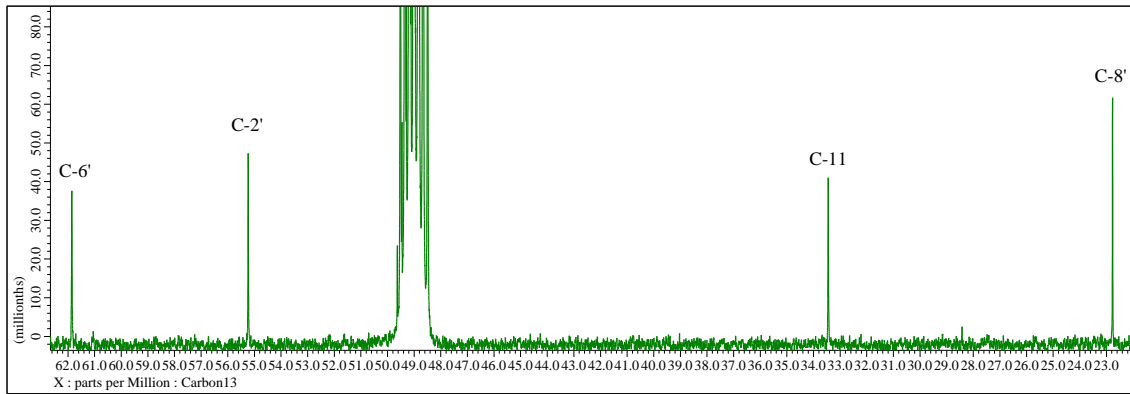
Anexo W. Espectro gCOSY del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



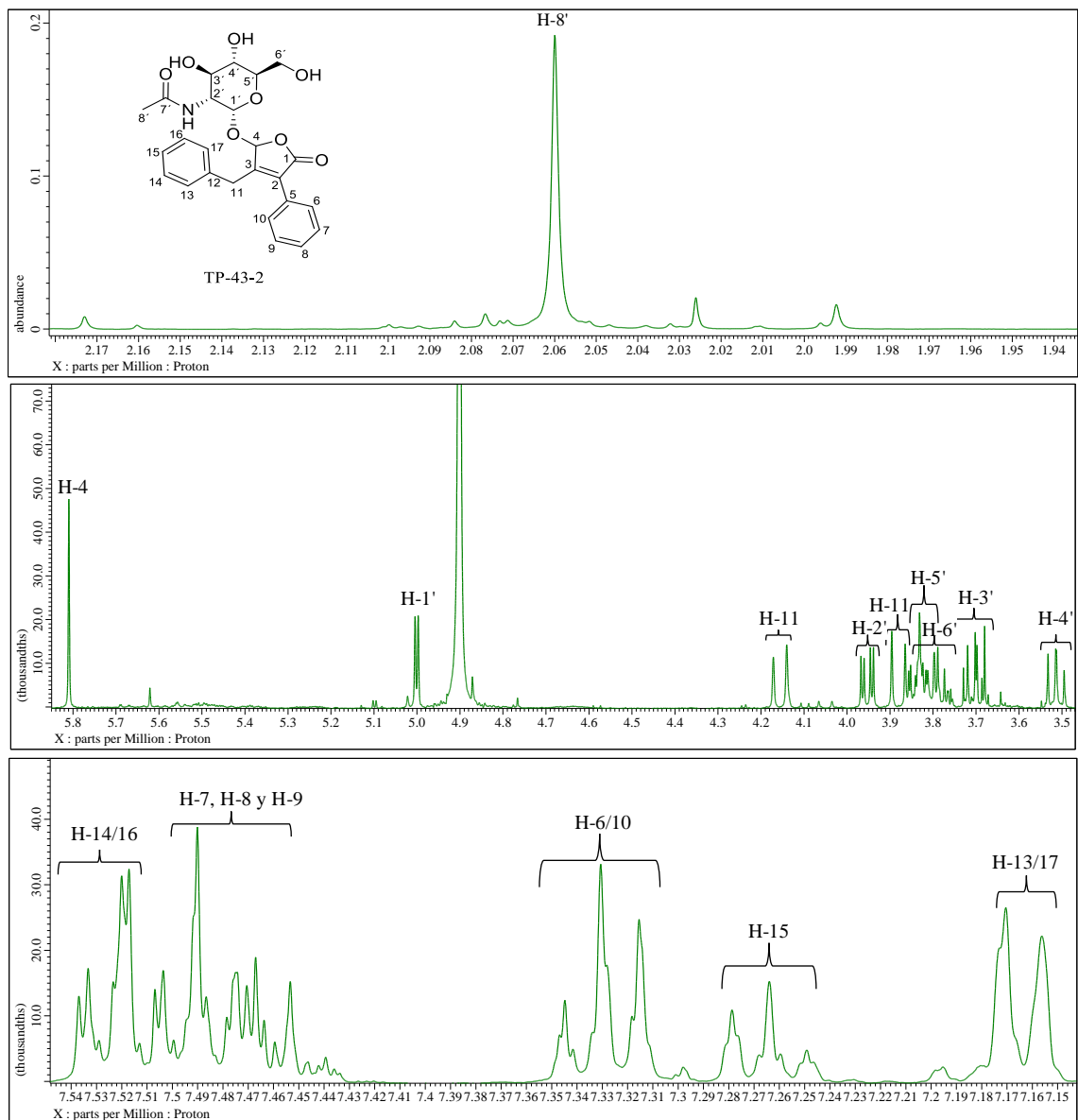
Anexo X. Espectro de Masas del compuesto TP-44-3



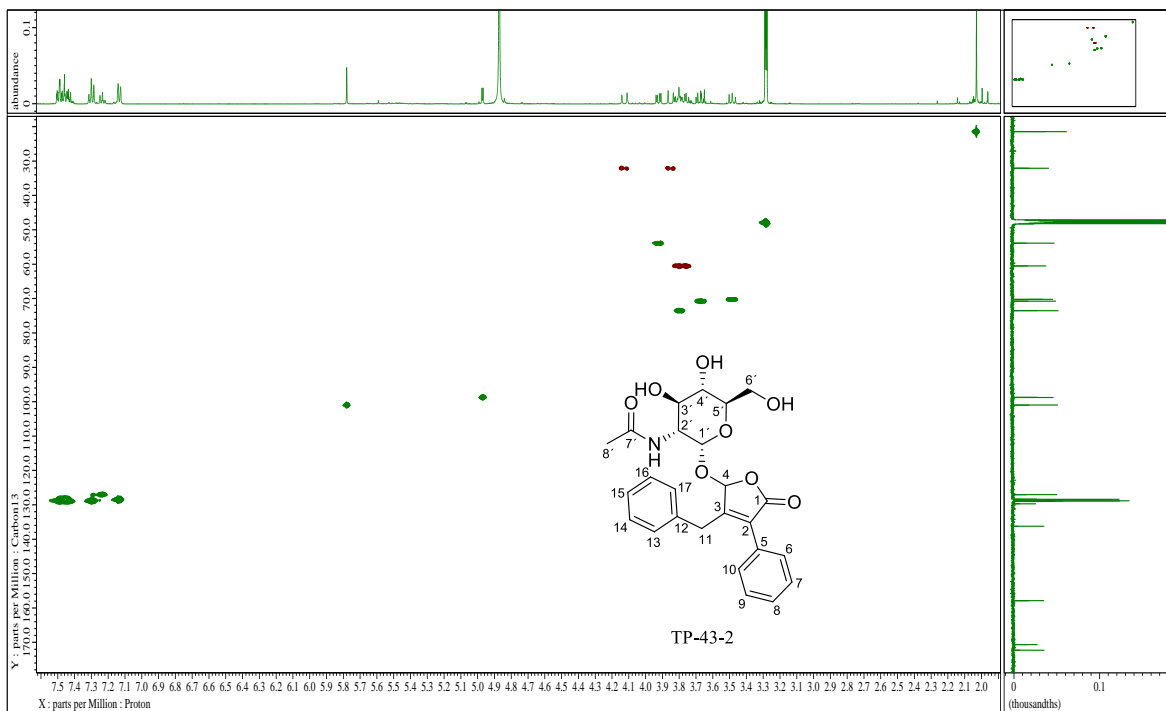
Anexo Y. Espectro gNOESY del compuesto TP-44-3 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



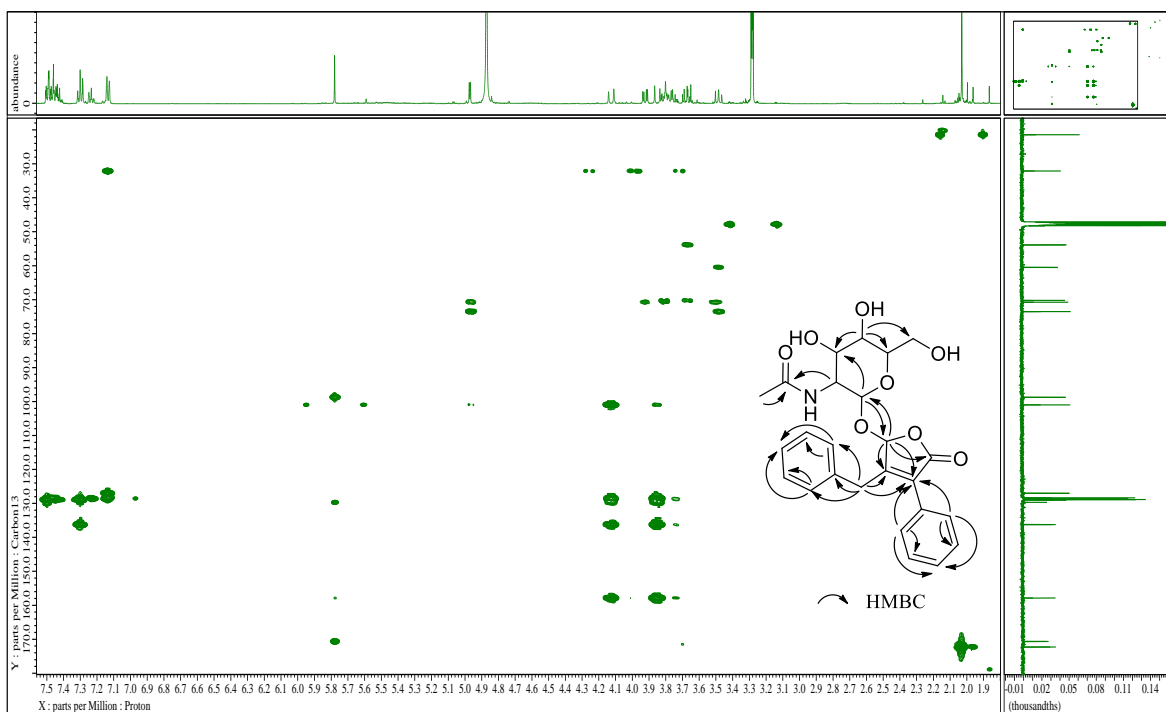
Anexo Z. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto TP-43-2 en CD<sub>3</sub>OD a 125 MHz.



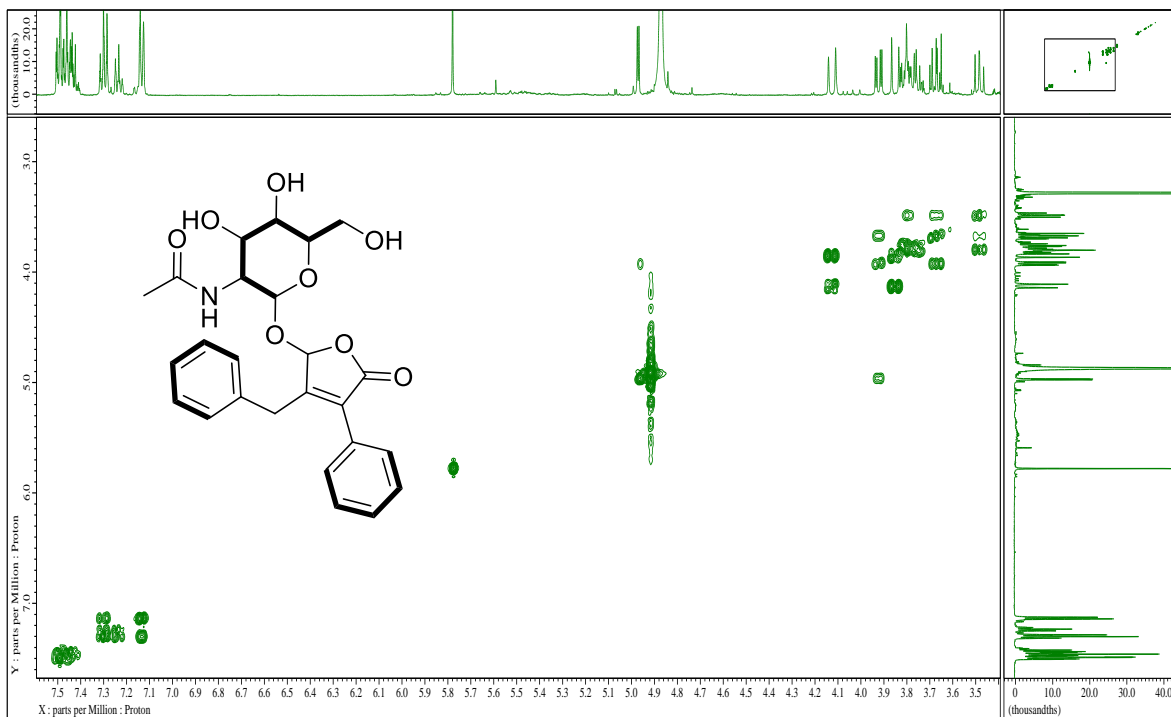
Anexo AA. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto TP-43-2 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz.



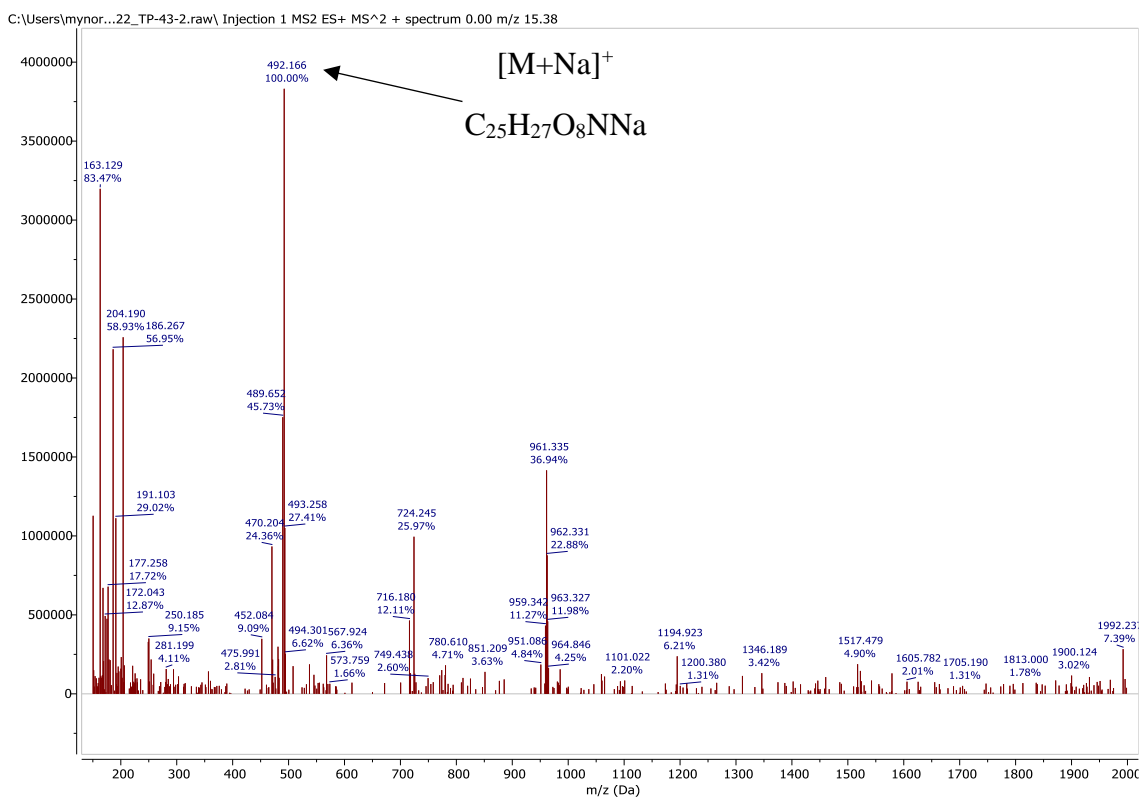
Anexo BB. Espectro gHSQC del compuesto TP-43-2 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



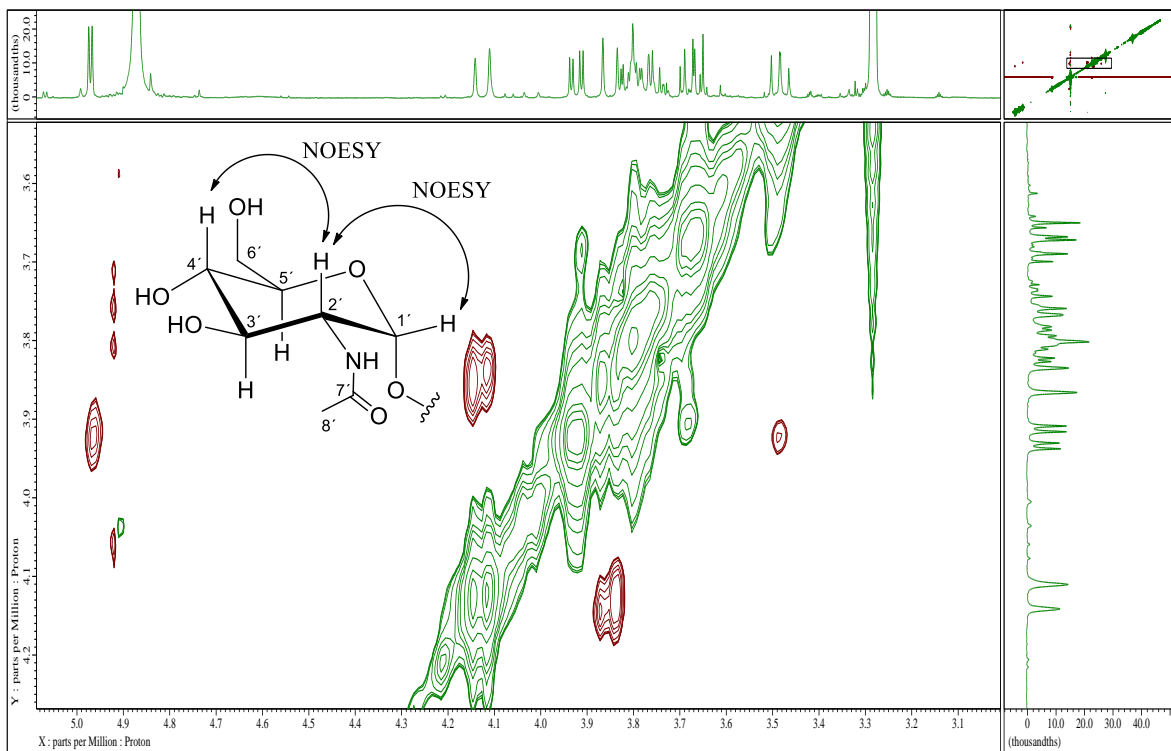
Anexo CC. Espectro gHMBC del compuesto TP-43-2 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



Anexo DD. Espectro gCOSY del compuesto TP-43-2 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.



Anexo EE. Espectro de Masas de TP-43-2.



Anexo FF. Espectro gNOESY del compuesto TP-43-2 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.