



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

biomar
MICROBIAL TECHNOLOGIES

TESIS DOCTORAL (DOCTORADO INDUSTRIAL)

•

Inducción del metabolismo secundario de microorganismos mediante la estrategia OSMAC y la técnica de cocultivo. Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos. Evaluación de su actividad biológica.

PRESENTADA POR:

Víctor Rodríguez Martín-Aragón

DIRIGIDA POR:

Dr. José María Sánchez López

TUTORIZADA POR:

Dr. Joaquín Altarejos Caballero

JAÉN, 19 de octubre de 2023

ISBN

AGRADECIMIENTOS

En el momento de culminar esta etapa, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han sido parte fundamental en mi camino hacia la realización de mi doctorado industrial. Sus apoyos, enseñanzas y compañía han sido vitales para mi desarrollo personal y profesional.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a Biomar, la empresa en la que tengo el honor de trabajar y donde he llevado a cabo mi doctorado industrial. Biomar ha sido un entorno excepcional de innovación y dedicación a la investigación en el ámbito de productos naturales. Es aquí donde he encontrado no solo un lugar de trabajo, sino una comunidad comprometida con el avance científico. Quiero reconocer especialmente al Dr. José María Sánchez López, responsable del Departamento de Química de Productos Naturales en Biomar y director de mi tesis. Chema, tus conocimientos, orientación y apoyo constante han sido fundamentales en mi desarrollo. Tus valiosas contribuciones han enriquecido enormemente mi experiencia y aprendizaje.

Mi gratitud se extiende al Dr. Antonio Fernández Medarde, CEO de Biomar, cuya visión y liderazgo han forjado un entorno propicio para la investigación y la excelencia científica.

A todos y cada uno de mis compañeros en Biomar, y en especial a aquellos del Departamento de Química al que pertenezco, quiero expresar mi agradecimiento por la colaboración y amistad recibidas desde el primer momento.

Agradezco al Dr. Joaquín Altarejos Caballero, mi tutor en la Universidad de Jaén, por su orientación y apoyo constante a pesar de la distancia. Tus valiosas aportaciones y conocimientos han enriquecido mi trabajo y perspectiva.

Agradezco a la Universidad de Jaén, la institución donde comenzó mi viaje académico como estudiante de Química y me ha proporcionado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, así como al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) del Gobierno de España por el apoyo financiero.

A mis amigos en León, la ciudad que me acogió y que ha sido mi hogar durante estos años, les agradezco por su compañía, apoyo y amistad que han hecho que esta etapa sea memorable.

A mis amigos de toda la vida de Andújar, mi ciudad natal, por su constante respaldo y cariño y por estar siempre ahí.

Finalmente, mi más profundo agradecimiento va para mi familia y mi pareja. Vuestro apoyo incondicional, aliento y comprensión han sido la base que me ha permitido afrontar los desafíos con confianza y dedicación.

A cada una de estas personas e instituciones, les extiendo mi reconocimiento y gratitud sincera. Han sido parte fundamental de esta travesía que ahora llega a su conclusión. Este logro es también suyo, y les estaré eternamente agradecido por su contribución a mi crecimiento personal y profesional.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. <i>Productos naturales como fuente de nuevos compuestos bioactivos</i>	8
1.2. <i>Productos naturales de origen microbiano</i>	12
1.3. <i>Descubrimiento de nuevos productos naturales con potencial actividad biológica</i>	18
1.4. <i>Enfrentando los desafíos: Posibles soluciones para la investigación de PNs</i>	22
1.4.1. <i>Desreplicación química de productos naturales</i>	24
1.4.2. <i>Biodiversidad: Riqueza de la naturaleza</i>	27
1.4.3. <i>Ingeniería genética: Metagenómica, minería genómica y expresión heteróloga</i> ..	29
1.4.4. <i>Estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds)</i>	31
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1. <i>Análisis y desreplicación de extractos en el proceso de selección de las cepas microbianas</i>	41
3.2. <i>Aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos por las cepas microbianas seleccionadas a través de la estrategia OSMAC</i>	45
3.2.1. <i>HT-GU-SUES-1371 (Pleotrichocladium opacum)</i>	47
3.2.2. <i>HL-102-24-R04 (Beauveria felina)</i>	69
3.2.3. <i>AA-AR-H-B002 (Streptomyces griseorubiginosus)</i>	87
3.2.4. <i>AA-74-MO2-007 (Streptomyces wuyuanensis)</i>	102
3.2.5. <i>Cocultivos</i>	109
3.3. <i>Actividad biológica en ensayos in vitro de los metabolitos aislados</i>	119
4. CONCLUSIONES	126
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	129
5.1. <i>Microorganismos: Hongos y actinomicetos de origen marino y terrestre</i>	129

5.2. Fermentaciones de los microorganismos seleccionados en diferentes medios y condiciones de cultivo y técnicas de cocultivo.....	133
5.3. Extracción de los compuestos producidos por los microorganismos en los procesos de fermentación.....	140
5.4. Desreplicación química mediante LC-UV-MS de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de los caldos de cultivo	140
5.5. Técnicas de cromatografía para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios	142
5.6. Purificación de productos aislados por HPLC semipreparativo.....	143
5.7. Elucidación estructural de los compuestos puros aislados. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.	143
5.8. Medidas de rotación óptica, ECD y QM-NMR de los compuestos puros	144
5.9. Ensayos de bioactividad de los compuestos aislados.....	146
6. BIBLIOGRAFÍA	156
7. ANEXOS.....	172

LISTA DE ABREVIATURAS

EtOAc	Acetato de Etilo
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BMT	Biomar Microbial Technologies
br d	Doblete ancho
br s	Singlete ancho
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CGBs	Clusters de Genes Biosintéticos
CH₂Cl₂	Diclorometano
CPV	Cromatografía en Placa filtrante a Vacío
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de doblete de dobletes
ddq	Doblete de doblete de cuádrupletes
dm	Doblete de multipletes
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
dt	Doblete de tripletes
dtd	Doblete de triplete de dobletes
ESI	Electrospray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
gCOSY	Gradient Correlation Spectroscopy
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy
gHSQC	Gradient Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC/UV/MS	High Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet/Mass Spectrometry
HRESIMS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Multiplete

MeOH-<i>d</i>₄	Metanol deuterado
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MS	Mass Spectrometry
m/z	Relación masa/carga
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OSMAC	One Strain Many Compounds
PM	Peso Molecular
PN(s)	Producto(s) Natural(es)
q	Cuadruplete
qd	Cuadruplete de dobletes
QM-NMR	Quantum Mechanical - Nuclear Magnetic Resonance
qu	Quintuplete
RMN (1D/2D)	Resonancia Magnética Nuclear (monodimensional/bidimensional)
s	Singlete
sp	Septuplete
sp./spp.	Especie/especies
sx	Sextuplete
t	Triplete
tdd	Triplete de doblete de dobletes
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
t_R	Tiempo de retención
tt	Triplete de tripletes
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
uma	Unidad de masa atómica
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
¹H/¹³C RMN	Espectro de RMN de protón/carbono
δ	Desplazamiento químico

RESUMEN

En los últimos años, ante la necesidad urgente de descubrir nuevos candidatos a fármacos debido a la aparición de nuevas enfermedades y el aumento de enfermedades graves como el cáncer, las patologías neurodegenerativas y la resistencia a antibióticos, ha resurgido el interés en explorar fuentes microbianas en la búsqueda de nuevos productos naturales biológicamente activos, impulsado por el avance de las técnicas de cultivo y biología molecular.

En la búsqueda de estos metabolitos secundarios bioactivos, en el presente estudio se ha investigado una selección de microorganismos (hongos y actinomicetos) fundamentalmente de origen marino, recogidos de distintas regiones geográficas, siguiendo una estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds) para la inducción de metabolitos secundarios crípticos utilizando diferentes medios de cultivo, inductores químicos y técnicas de cocultivo con otros microorganismos. Este enfoque permitió el aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, algunos de ellos previamente descritos en la bibliografía, pero otros muchos con estructuras novedosas, que fueron sometidos a una batería de ensayos biológicos (antimicrobiano, antifúngico, antitumoral, insecticida, etc.) para la caracterización de su bioactividad.

Las estructuras de los nuevos compuestos se elucidaron mediante técnicas de HRESIMS, RMN 1D y 2D, así como por comparación con la literatura, y se aplicaron métodos computacionales QM-NMR (Quantum Mechanical - Nuclear Magnetic Resonance) para determinar sus configuraciones relativas. En algunos casos, las configuraciones absolutas de los compuestos novedosos se asignaron mediante dicroísmo circular electrónico o por comparación de las rotaciones ópticas observadas, con las de productos naturales conocidos relacionados estructuralmente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos naturales como fuente de nuevos compuestos bioactivos

Si bien, en un sentido estricto podríamos englobar como productos naturales (PNs) a cualquier compuesto orgánico producido por organismos vivos, en la práctica, este concepto se asocia principalmente a compuestos químicos de bajo peso molecular, generalmente inferior a 1500 uma, que son sintetizados por organismos biológicos (de origen natural).¹

Dichos compuestos, también denominados metabolitos secundarios, se encuentran sólo en determinados organismos o grupos de organismos y son una expresión de la individualidad de la especie. En muchos casos, la función de estos metabolitos no se conoce todavía. En otros casos, sin embargo, se sabe exactamente cuál es el beneficio que representan para el organismo productor; por ejemplo: toxinas como defensa frente a depredadores, sustancias que atraen o repelen a otros organismos, etc.

Así pues, los compuestos bioactivos son sustancias químicas que desencadenan una respuesta biológica en el organismo, influenciando tanto la actividad celular como los procesos fisiológicos. Esta influencia suele traducirse en efectos beneficiosos para la salud y puede desempeñar un papel fundamental en la protección y la adaptación de los organismos a su entorno.

En los últimos años, se ha producido un renovado interés en el campo de los PNs. Ahora reconocemos plenamente el valor de la quimiodiversidad presente en la naturaleza, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica de utilidad en medicina o en la industria agroalimentaria, entre otros sectores. Además, con el avance de la ecología química, hemos comprendido mejor el papel fundamental que desempeñan los metabolitos secundarios en la regulación de las complejas interacciones entre organismos en un determinado ecosistema. A diferencia del pasado, donde se consideraban simplemente subproductos metabólicos, actualmente prevalece la idea de que la síntesis de tales compuestos confiere ventajas evolutivas a los organismos productores.²

La búsqueda de nuevos PNs bioactivos ha sido de gran interés a lo largo de la historia de la humanidad, ya que muchas sustancias derivadas de fuentes naturales tienen propiedades biológicas que podrían emplearse en el desarrollo de nuevos fármacos, nutracéuticos, alimentos funcionales o en otros sectores como agricultura, cosmética, etc. Desde las antiguas civilizaciones, como la egipcia, la china y la griega, que utilizaban hierbas medicinales para tratar enfermedades y aliviar dolencias, hasta la era moderna en la que los laboratorios farmacéuticos y científicos exploran exhaustivamente la naturaleza en busca de compuestos con potencial médico, esta exploración ha sido una constante en nuestra evolución, lo que ha llevado al descubrimiento de moléculas con propiedades terapéuticas extraordinarias que han revolucionado la medicina y la salud humana. El conocimiento sobre estas sustancias se ha transmitido a lo largo de los siglos y con el avance de la química, en el siglo XIX se comenzaron a aislar los primeros compuestos activos de plantas y otras fuentes naturales, sentando las bases para la farmacología moderna.^{3,4}

En la actualidad, los PNs son considerados un recurso inagotable de moléculas bioactivas en la búsqueda de nuevas cabezas de serie y desempeñan un papel crucial en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos.¹ La investigación se enfoca en la búsqueda de compuestos con mayor eficacia, biodisponibilidad, farmacocinética mejorada, mayor estabilidad y perfiles de efectos secundarios más bajos en comparación con los compuestos ya existentes.

J. Newman y M. Cragg, a través de varias revisiones publicadas en 2007,⁵ 2012,⁶ 2016⁷ y 2020,⁸ han analizado el origen de los nuevos fármacos aprobados en los últimos años, basándose en los datos obtenidos del *Annual Reports of Medicinal Chemistry* (ARMC) de la *Food and Drug Administration* (FDA), del *Drugs News and Perspective* y de la base de datos *Prous* (nombrada en la actualidad como *Thompson-Reuters, Integrity*). Estos estudios muestran la evolución de los PNs en el descubrimiento de nuevos fármacos en los periodos comprendidos entre 1981-2006, 1981-2010, 1981-2014 y 1981-2019, respectivamente. De su último estudio se desprende que más de un 50% de las 1881 nuevas entidades químicas aprobadas como fármacos en el periodo 1981-2019 se corresponden con PNs, entendiendo como tal a los propiamente llamados así, a sus derivados y a los miméticos de los mismos, que son fármacos sintéticos diseñados a

partir del conocimiento adquirido sobre un PN. Este porcentaje sube hasta el 75% si se incluyen los productos “biológicos” aislados de organismos o producidos por biotecnología y las vacunas (Figura 1).

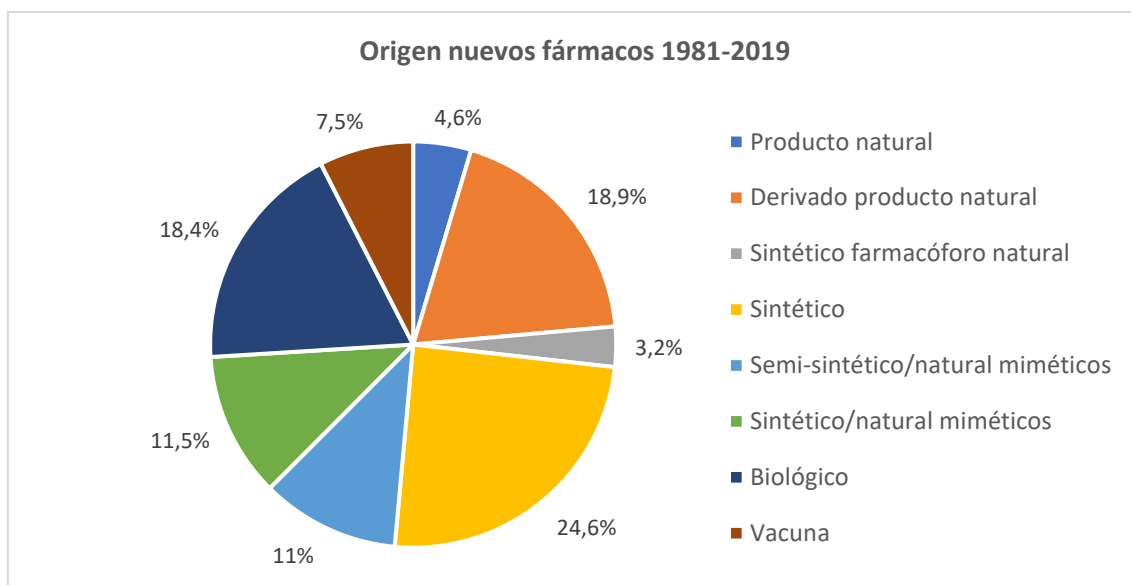


Figura 1. Nuevas entidades químicas entre 1981-2019, clasificadas según su origen.

*Producto natural: fármacos aislados de una fuente natural sin modificación alguna.

*Derivado producto natural: fármacos obtenidos mediante modificación directa de un PN.

*Sintético farmacóforo natural: fármacos obtenidos por síntesis, pero el farmacóforo es de un PN. *Sintético: fármacos obtenidos por síntesis total cuyas estructuras no guardan ninguna relación con la de un PN, a menudo hallados por cribado/modificación de un agente existente.

*Semi-sintético/natural miméticos: fármacos sintéticos diseñados a partir del conocimiento adquirido sobre un PN, con relación directa con el PN.

*Sintético/natural miméticos: fármacos sintéticos diseñados a partir del conocimiento adquirido sobre un PN, sin relación evidente con el PN.

*Biológico: péptidos o proteínas aislados de organismos/líneas celulares o producidos por medios biotecnológicos.

*Vacuna: productos biológicos compuestos por microorganismos inactivados.

Estos estudios, junto a otros de la misma secuencia que les precedieron,^{9, 10} muestran la evolución del peso de los fármacos cuyas estructuras están relacionadas de alguna manera con la de PNs en el mercado farmacéutico mundial, en detrimento de los puramente sintéticos (Figura 2).

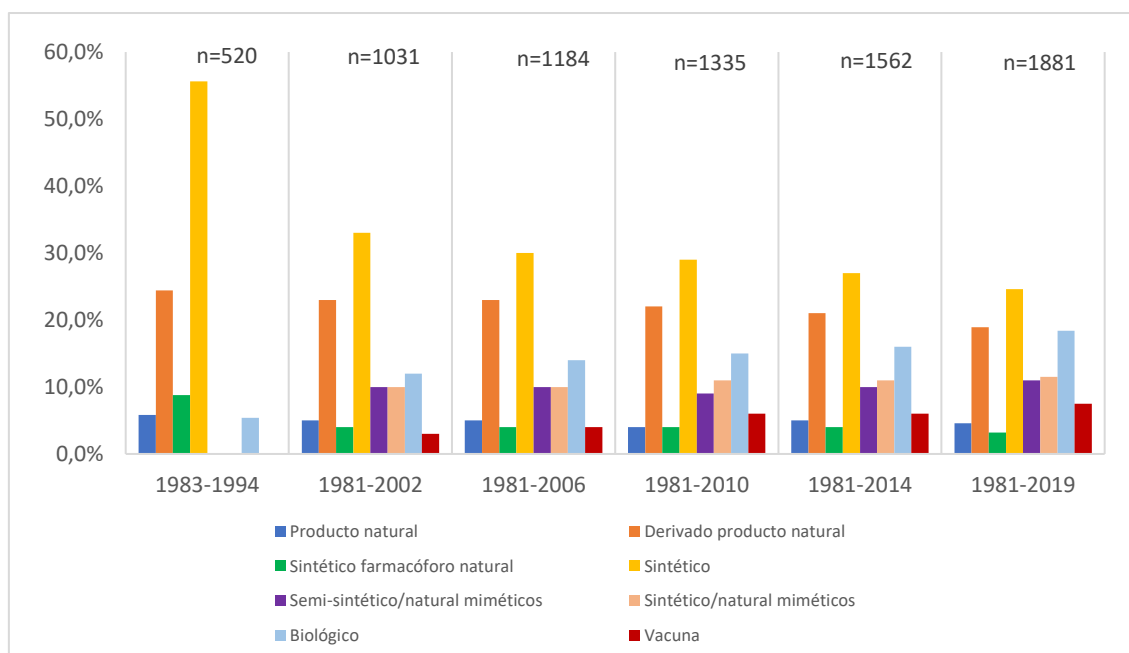


Figura 2. Evolución y tendencia en el origen de los nuevos fármacos a lo largo de los últimos 40 años a nivel mundial según las revisiones de Newman y Cragg.

Además, el éxito de los PNs se basa en que son compuestos que han pasado por un proceso de validación natural a través de la evolución. Han sido biosintetizados, degradados y transformados por sistemas enzimáticos, lo que les confiere una ventaja única en su interacción con las moléculas diana. Por lo tanto, los compuestos sintéticos solo tendrán éxito cuando logren imitar a los PNs.¹¹

Estas razones respaldan la idea de que los PNs desempeñan un papel fundamental en la búsqueda de nuevos fármacos. Lo que hace que sean particularmente valiosos en este contexto es la combinación única de características químicas y biológicas que poseen. Desde una perspectiva química, las estructuras de los PNs se destacan por su equilibrado compromiso entre flexibilidad y rigidez. Esto significa que pueden adaptarse a las formas y tamaños variables de los receptores de membrana, lo que facilita su capacidad para unirse a ellos de manera efectiva. Además, la disposición de grupos funcionales en estas estructuras es altamente favorable para la interacción con los componentes biológicos, lo que aumenta su eficacia. Desde un punto de vista biológico, los PNs a menudo imitan a otras sustancias naturales presentes en el organismo, cuya función es unirse a proteínas y participar en procesos biológicos específicos. Esto les permite actuar como moduladores naturales en el organismo y, por lo tanto, tienen el potencial de generar

menos efectos secundarios no deseados en comparación con los compuestos completamente sintéticos.

1.2. Productos naturales de origen microbiano

Los recursos naturales a partir de los cuales se obtienen los PNs provienen de diversos entornos. Estos recursos pueden ser terrestres, incluyendo plantas superiores, microorganismos, vertebrados e invertebrados, o marinos, tales como algas, esponjas, sedimentos y microorganismos.

Un estudio sobre el origen de los PNs aprobados como NMEs (nuevas entidades moleculares) realizado por la FDA, reveló que casi la mitad (44%) procedían de mamíferos (PNs bioquímicos), mientras que el resto de fuentes estaban dominadas por plantas (25%), bacterias (16%) y hongos (12%).¹² Si nos fijamos más detenidamente en los agentes antibacterianos, destaca el hecho de que el 69% proceden de PNs, de los cuales el 97% han sido aislados a partir de microorganismos. Desde una perspectiva más actual, en los últimos 20 años, el 77% de los antibióticos aprobados por la FDA son PNs, siendo el 100% derivados de microbios.

Los PNs de origen microbiano, también conocidos como metabolitos microbianos, representan una categoría única y valiosa dentro de la amplia variedad de compuestos que se encuentran en la naturaleza. Esto es debido a la naturaleza de los microorganismos productores, tales como bacterias unicelulares, hongos y actinomicetos, los cuales representan una enorme diversidad genética y metabólica. Esta riqueza de diversidad microbiana se traduce en una impresionante variedad de estructuras químicas y, en consecuencia, en una amplia gama de propiedades bioactivas y aplicaciones potenciales. Además, su papel en la coevolución biológica con otros organismos, como patógenos y depredadores, ha impulsado la evolución de compuestos bioactivos con diversas funciones y aplicaciones únicas como parte de su competencia por recursos en su entorno.¹³⁻¹⁸

Un aspecto esencial es el control que se puede ejercer en el ambiente de producción de estos metabolitos. Los metabolitos microbianos se pueden producir en condiciones de

laboratorio o fermentación controlada, lo que permite una producción escalable y reproducible, siendo particularmente relevante en la fabricación de antibióticos y otros productos farmacéuticos.

Un ejemplo emblemático de PNs de origen microbiano es la penicilina, un antibiótico producido por el hongo *Penicillium*.¹⁹ Descubierta por Alexander Fleming en 1928, la penicilina marcó el inicio de la era de los antibióticos y revolucionó la medicina al combatir eficazmente infecciones bacterianas. Otro ejemplo relevante es la estreptomicina, un antibiótico producido por actinomicetos del género *Streptomyces*.²⁰ La estreptomicina se convirtió en un tratamiento crucial contra la tuberculosis en la década de 1940. En un contexto diferente de acción farmacológica, encontramos la bleomicina, un compuesto antitumoral obtenido de cepas de bacterias también del género *Streptomyces*.²¹ La bleomicina ha sido fundamental en el tratamiento de diversos tipos de cáncer y se ha utilizado ampliamente para combatir tumores malignos.

En la actualidad, los PNs microbianos continúan siendo fuentes importantes de nuevos medicamentos y compuestos bioactivos. Por ejemplo, la ciclosporina, producida por el hongo *Tolypocladium inflatum*, se utiliza para suprimir el sistema inmunológico en trasplantes de órganos.²² Además, los metabolitos microbianos tienen aplicaciones en la industria alimentaria, como la nisina, un antibiótico producido por *Lactococcus lactis* que se utiliza como conservante en productos lácteos y cárnicos,²³ así como en agricultura, como la tetranactina, una macrotetrolida con actividad insecticida y antihelmíntica o las validamicinas, que presentan actividad antifúngica frente al hongo *Rhizoctonia solani*, causante de la enfermedad del tizón de la vaina en plantas de arroz.²⁴ Estas últimas son producidas por actinobacterias de los géneros *Actinomyces* y *Streptomyces*, respectivamente.

Por otro lado, la ingeniería genética ha permitido la manipulación y modificación de microorganismos para mejorar la producción de metabolitos específicos. Un ejemplo destacado es la producción de insulina humana recombinante mediante la ingeniería de bacterias, que ha revolucionado el tratamiento de la diabetes.²⁵

No obstante, es importante destacar que, a pesar de los avances significativos en la investigación de PNs microbianos, gran parte de la biodiversidad microbiana y sus

potenciales metabolitos aún no se han explorado completamente. Esto sugiere que existe un vasto territorio inexplorado con el potencial de revelar nuevas moléculas bioactivas con aplicaciones en medicina, agricultura e industria. Los PN de origen microbiano continúan siendo una fuente emocionante y prometedora de innovación científica y desarrollo tecnológico.

En los últimos años, para dar solución a los grandes problemas de salud pública y la aparición, cada vez con mayor frecuencia, de nuevas enfermedades en el mundo moderno (enfermedades emergentes y reemergentes) y patógenos antibiótico-resistentes, las nuevas tendencias en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos se centran en hábitats inexplorados y, por ello, el entorno marino se ha convertido en un recurso principal, debido a la mayor diversidad biológica y variedad metabólica que se produce en los océanos.

El ecosistema marino, que cubre más del 70% de la superficie del planeta, alberga una inmensa diversidad de vida. Además, debido a la extrema profundidad de los océanos (con una profundidad media de más de 3000m), representan más del 99% del hábitat natural de nuestro planeta. De los 35 filos animales identificados taxonómicamente, 34 se encuentran en el ambiente marino, y muchos de ellos son exclusivos del mismo.^{26, 27} Del resto, aproximadamente la mitad son tanto marinos como terrestres (aunque predominantemente marinos) y sólo uno, el filo Onychophora (los gusanos de terciopelo), es exclusivamente terrestre.

Los primeros organismos vivos aparecieron en el mar hace más de 3500 millones de años, y como resultado, estos organismos han sufrido el período evolutivo más largo. Con el tiempo, las duras condiciones marinas favorecieron la producción de una gran variedad de moléculas que tienen estructuras únicas en términos de diversidad química, y también una mayor incidencia de bioactividad significativa en relación con los PN de las formas de vida terrestres.²⁸ Teniendo en cuenta que se ha explorado menos del 5% de las profundidades marinas, y que se trata de un entorno extremo con alta presión, baja temperatura, oscuridad y baja concentración de oxígeno, es probable que aún se descubran muchas nuevas moléculas con actividades biológicas interesantes.²⁷ Los organismos marinos pueden considerarse la fuente más reciente de PN bioactivos en relación con las plantas terrestres y los microorganismos no marinos. Inicialmente, su

explotación dependía del desarrollo de técnicas adecuadas de bioprospección y mejorar los métodos espectrométricos, principalmente de RMN, y de separación. El avance en estos campos ha sido muy grande en los últimos años, lo que ha propiciado que el campo de los PNs marinos esté viviendo un auténtico renacimiento, y según la versión actual de *MarinLit* se han identificado más de 40.000 PNs marinos hasta la fecha.²⁹

Desde 1995, las investigaciones sobre nuevos metabolitos marinos experimentaron un aumento considerable debido a los descubrimientos de nuevos compuestos bioactivos en microorganismos, invertebrados y algas. Si bien los invertebrados marinos han sido la fuente de la mayoría de los PNs marinos bioactivos, siendo Porifera (esponjas) y Cnidaria los filos más prolíficos, el verdadero origen de la mayoría de los PNs marinos parecen ser los microorganismos que conviven con ellos. La mayoría de los invertebrados marinos son sésiles y de cuerpo blando y, por lo tanto, están sujetos a la depredación potencial de los parásitos y la colonización microbiana perjudicial. Como resultado, requieren un complejo arsenal de metabolitos producidos por microorganismos simbióticos (bacterias, hongos, microalgas, cianobacterias, dinoflagelados)³⁰ para facilitar sus defensas naturales. Esta es probablemente la razón por la que casi todos los PNs marinos aprobados como medicamentos, o actualmente en ensayos clínicos, provienen de fuentes biosintéticas bacterianas, resultando ser los actinomicetos marinos importantes contribuyentes.^{31, 32}

Las actinobacterias cuentan con un amplio metabolismo secundario y son responsables de la producción de cerca de dos tercios de todos los antibióticos de origen natural utilizados actualmente en la práctica clínica, además de contribuir a la síntesis de numerosos compuestos con propiedades anticancerígenas, antihelmínticas y antifúngicas. También se están explorando como fuentes potenciales de nuevos compuestos para combatir la resistencia bacteriana a antibióticos conocidos, y pueden resolver problemas medioambientales, sobre todo en la biorremediación de pesticidas, metales tóxicos, residuos radiactivos y bioincrustaciones. En consecuencia, estas bacterias son de gran importancia para la biotecnología, la medicina y la agricultura.

Además de su uso en aplicaciones médicas y medioambientales, los actinomicetos marinos están siendo evaluados actualmente para diversas aplicaciones industriales (Fig. 3).³³ Algunos de estos usos incluyen: su utilidad como probióticos en acuicultura, su

capacidad para la producción de biocombustibles y la producción de metabolitos secundarios para su uso en el desarrollo de plásticos, detergentes y otros productos. Los actinomicetos marinos son cada vez más influyentes en estos diferentes campos y tienen el potencial de revolucionar la medicina, la restauración medioambiental y la industria.

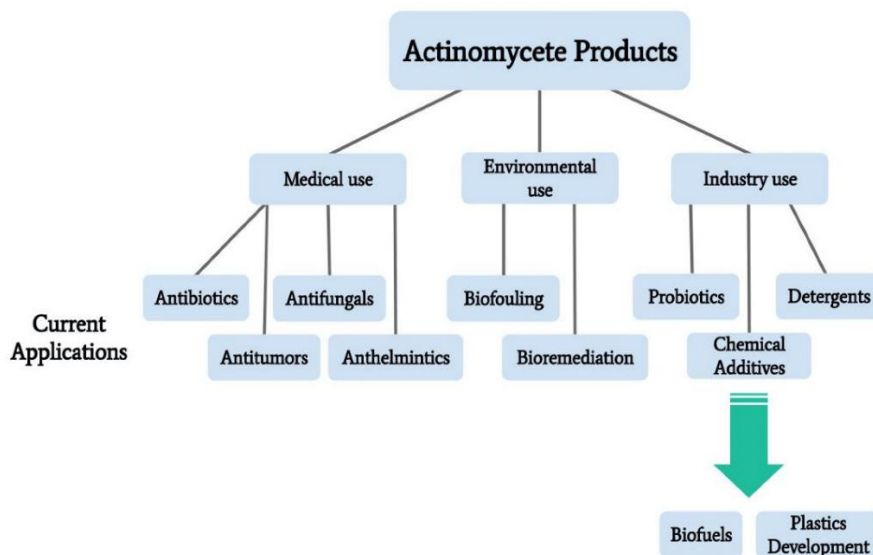


Figura 3. Principales aplicaciones de los actinomicetos marinos en el panorama actual.

Dentro de este filo bacteriano, las especies del género *Streptomyces* son responsables de la producción de la mayoría de los metabolitos secundarios descubiertos con actividad antibiótica, antitumoral o inmunosupresora, tratándose de los principales productores de metabolitos secundarios de gran relevancia médica e industrial.³⁴ Estas especies están ampliamente distribuidas en la naturaleza y, aunque la mayoría de las especies conocidas son de origen terrestre y se han aislado de suelos a lo largo de las últimas décadas (desde la década de 1950), en los últimos años están adquiriendo un papel más relevante los actinomicetos marinos autóctonos que se encuentran en los océanos y están ampliamente distribuidos en diferentes organismos marinos (animales y plantas), además del agua de mar y sedimentos.

Por otro lado, al igual que las actinobacterias, de las cuales las del género *Streptomyces* resultan ser las más prolíficas, los hongos marinos también representan un enorme potencial en la búsqueda de nuevos PN. A pesar del hecho de que muchos hongos son

cosmopolitas y viven tanto en el mar como en otros suelos y hábitats de agua dulce, en varios casos se ha obtenido evidencia de que, bajo las condiciones marinas, es decir, en presencia de sales, los hongos producen un perfil de metabolitos diferente en comparación con aquellos que se encuentran bajo condiciones de agua dulce.

Además de estos aislados marinos cosmopolitas, existe un grupo de hongos marinos que comprende una serie de géneros que hasta ahora se encuentran exclusivamente en hábitats marinos. Estudios basados en técnicas dependientes de cultivo y enfoques moleculares, demostraron que los macroorganismos marinos, como esponjas, algas y corales son una fuente rica en hongos productores de metabolitos secundarios con gran potencial biológico y farmacéutico.³⁵⁻⁴¹

Hasta ahora, más del 42% de los compuestos bioactivos conocidos de origen microbiano se han descrito como producidos por hongos filamentosos (sobre todo de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*) y muchas de estas moléculas se han utilizado ampliamente como antibióticos y antifúngicos, entre otras aplicaciones.⁴² Además, se han utilizado en diversos procesos industriales de fermentación como la producción de vitaminas, enzimas, pigmentos, glicolípidos, lípidos, alcoholes polihídricos y polisacáridos, ubicándose en el foco de interés de los seres humanos debido a su capacidad para sintetizar un enorme número de metabolitos con una amplia diversidad de estructuras químicas y bioactividades de gran interés.⁴³

A pesar de la capacidad de producir una amplia diversidad de compuestos, la mayoría de géneros de hongos filamentosos aún están poco explorados y son fuentes potenciales de nuevas moléculas con aplicaciones no solo en salud humana, sino también en agricultura y otros sectores industriales.

El presente proyecto se centra en el aislamiento y elucidación estructural de nuevos metabolitos a partir de una selección de actinomicetos y hongos, fundamentalmente de origen marino, procedentes de la colección de microorganismos de Biomar Microbial Technologies (BMT), aislados de muestras marinas (y también terrestres) obtenidas en diferentes expediciones por todo el mundo, siguiendo criterios de diversidad geográfica y taxonómica. Estos microorganismos, como ya hemos visto, constituyen una fuente poderosa e inagotable de moléculas bioactivas procedentes de su metabolismo

secundario, que incluyen antibióticos y sustancias con actividad antiviral, antitumoral, inmunológica y herbicida.⁴⁴

1.3. Descubrimiento de nuevos productos naturales con potencial actividad biológica

Como se ha mencionado anteriormente, y veremos más en detalle en el siguiente capítulo, en los últimos años, el descubrimiento de nuevos PNs bioactivos ha experimentado un resurgimiento notable. Sin embargo, a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, previamente a este resurgimiento, la investigación sobre PNs sufrió un decaimiento en la industria farmacéutica, dado que enfrentó una serie de desafíos que llevaron a algunas multinacionales farmacéuticas a reconsiderar sus programas de investigación en este campo.^{1, 5, 45-52} Entre las diversas razones que llevaron al abandono de los programas de PNs se encuentran las siguientes:

- **Costes elevados:** El proceso de aislamiento, purificación y caracterización estructural de PNs era lento y laborioso. Implica la recolección y procesamiento de grandes cantidades de material biológico, que a menudo es insuficiente para la obtención de cantidades significativas de un compuesto específico. Además, se requieren técnicas de extracción y purificación sofisticadas y costosas, como la cromatografía. Por otro lado, la producción a gran escala puede ser costosa y difícil de escalar. La variabilidad en la producción, la necesidad de mantener condiciones específicas de cultivo y la falta de control sobre los rendimientos, pueden aumentar los costes de producción y hacer que la inversión sea poco rentable.
- **Estructuras químicas complejas:** La complejidad estructural de muchos PNs bioactivos, con numerosos centros quirales, anillos ciclados y sustituyentes oxigenados ralentiza el proceso de identificación y contribuye a los problemas de suministro y fabricación. La síntesis y modificación de estas estructuras químicas puede ser desafiante, lo que dificulta su producción y optimización a través de métodos químicos, por lo que su identificación no garantiza su disponibilidad para su desarrollo como fármaco.

- **Propiedad Intelectual y Patentes:** La protección de la propiedad intelectual puede ser complicada en el caso de PNs, ya que muchos de ellos son conocidos en la medicina tradicional o se encuentran en la naturaleza. Esto dificulta la obtención de patentes sólidas, impidiendo que los descubrimientos realizados en este campo por organismos públicos de investigación sean desarrollados por las industrias farmacéuticas.
- **Regulación y Aprobación:** La regulación y aprobación de PNs a menudo es compleja y puede variar según las regiones geográficas, lo que puede ser un obstáculo para su desarrollo y comercialización. En algunas regiones, se requiere un acceso legal y regulado a recursos genéticos, como plantas o microorganismos, para la investigación y desarrollo de PNs. El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) y sus protocolos, como el Protocolo de Nagoya, proporcionan un marco internacional para abordar cuestiones de acceso a recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios derivados de su utilización.
- **High Throughput Screening (HTS):** El surgimiento de enfoques de cribado de alto rendimiento (High Throughput Screening) revolucionó la forma en que se buscaban compuestos bioactivos. Ahora, las compañías farmacéuticas podían probar miles de compuestos en busca de actividad biológica en un período de tiempo relativamente corto, lo que les permitía identificar candidatos prometedores de manera más eficiente que a través de la búsqueda en PNs.
- **Química Combinatoria:** El desarrollo de la química combinatoria a principios de los años 90 permitió a las compañías farmacéuticas sintetizar miles de moléculas diferentes en paralelo utilizando técnicas automatizadas. Esto, junto a la aparición de los mencionados cribados de alto rendimiento (HTS) aceleró significativamente el proceso de búsqueda de compuestos con actividades biológicas específicas. La síntesis de moléculas *de novo*, y no derivadas de fuentes naturales, se convirtió en un enfoque preferido debido a su rapidez,

control y menor coste, además de resolver los problemas relacionados con la propiedad intelectual.

- **Reaislamiento de productos naturales:** La búsqueda de nuevos PNs a menudo lleva al reaislamiento de compuestos ya conocidos. La naturaleza es rica en diversidad, pero algunas sustancias bioactivas pueden ser comunes en múltiples organismos o fuentes naturales. El redescubrimiento de compuestos ya conocidos puede llevar a la percepción de que la investigación de PNs no está generando suficiente innovación.
- **Dificultad de Abastecimiento:** Garantizar un suministro sostenible de materias primas naturales puede resultar complicado. La sobreexplotación de recursos naturales y la degradación del medio ambiente pueden afectar el abastecimiento de estas fuentes naturales. Esto plantea preocupaciones relacionadas con la sostenibilidad y disponibilidad constante de materias primas.
- **Microorganismos No Cultivables:** Algunos microorganismos que producen compuestos bioactivos no pueden crecer y reproducirse en las condiciones de cultivo tradicionales utilizadas en el laboratorio. Algunas de las razones por las que estos microorganismos no pueden ser cultivados en laboratorio incluyen requisitos nutricionales específicos difícilmente replicables o la dependencia de asociaciones simbióticas. Esto limita la capacidad de producir estos metabolitos a gran escala y estudiar su biosíntesis y potencial terapéutico.
- **Clusters Genéticos Biosintéticos (CGBs) silenciados:** En muchos casos, los microorganismos albergan clusters genéticos biosintéticos (CGBs) que codifican la síntesis de PNs. Sin embargo, estos CGBs a menudo están silenciados o inactivados, no expresándose o expresándose en niveles muy bajos en condiciones de laboratorio, lo que dificulta la identificación y producción de los compuestos deseados.

En resumen, los desafíos en la investigación de PNs relacionados con costes, complejidad estructural, competencia con métodos de búsqueda más rápidos,

reaislamiento de compuestos, sostenibilidad de fuentes naturales, dificultad de cultivo de microorganismos y silenciamiento de CGBs, llevaron a algunas multinacionales farmacéuticas a reconsiderar sus inversiones en este campo y a orientarse hacia otros enfoques de investigación percibidos como más rentables y predecibles. Sin embargo, esta transición contribuyó al declive en la productividad de la industria farmacéutica, reflejado en una disminución significativa en el número de nuevas entidades químicas (NCEs) aprobadas como fármacos en la última década del siglo XX y primera del siglo XXI (Figura 4).

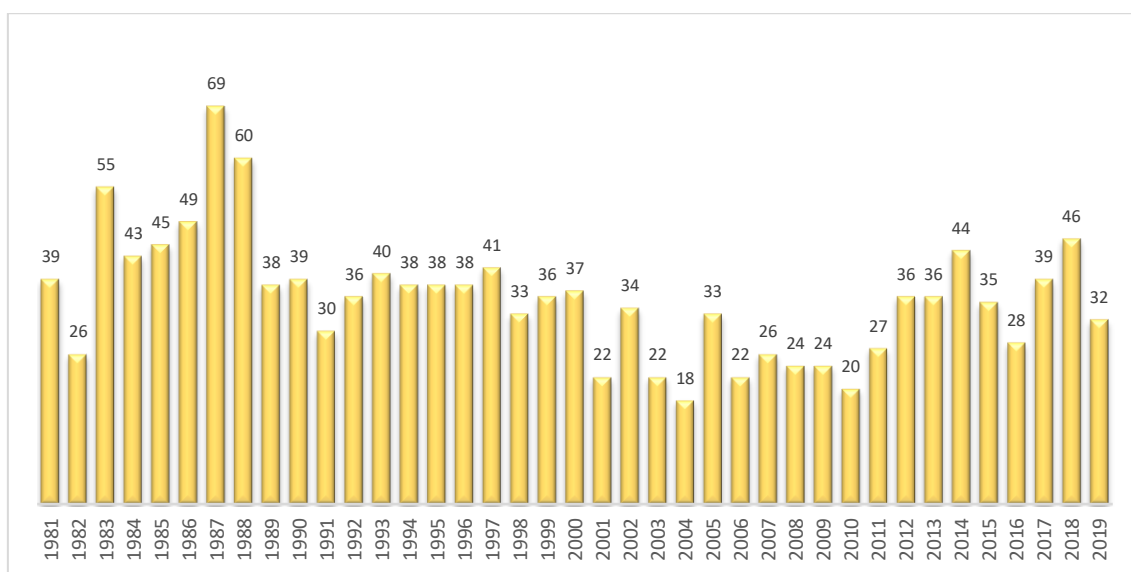


Figura 4. Número de nuevas entidades químicas aprobadas como fármacos en el periodo 01/1981 hasta 09/2019.⁸

Esta situación volvió a plantear el interrogante acerca de la forma y el lugar donde se deberían rastrear nuevas estructuras químicas con las propiedades biológicas buscadas. Un artículo divulgado en el año 2003 en la revista *Chemical & Engineering News* sugirió que una de las posibles causas de este declive podría haber sido la disminución del interés en los PNs en los programas de descubrimiento de nuevos fármacos, a medida que la industria farmacéutica se centraba cada vez más en las nuevas tecnologías, en particular en la química combinatoria.⁵³ Esta técnica generó grandes expectativas en la búsqueda de nuevos fármacos, originando la síntesis de millones de compuestos muy similares entre sí. Sin embargo, estos esfuerzos no produjeron los resultados deseados

y algunas de las colecciones de compuestos resultantes no produjeron ninguna molécula activa. Hacia finales de la década de los 90, quedó claro que la estrategia de desarrollar moléculas sintéticas *de novo* como candidatas a fármacos no estaba cumpliendo con las expectativas, reconociendo que la relevancia biológica, el diseño y la diversidad de las colecciones eran factores mucho más críticos.

Este requisito representa una de las propiedades más valiosas de los PNs en la búsqueda de nuevos fármacos, ya que representan puntos de partida biológicamente sólidos y viables para la creación de librerías de alta calidad, por lo que estos compuestos, a pesar de los desafíos inherentes a su investigación, continúan siendo invaluable y, en ocasiones, insustituibles.

1.4. Enfrentando los desafíos: Posibles soluciones para la investigación de PNs

La búsqueda de soluciones a los desafíos en la investigación de PNs se convirtió en una prioridad, impulsada por las expectativas no cumplidas de las estrategias de I+D acometidas por la industria farmacéutica a finales del siglo XX y la comprensión cada vez mayor de la relevancia innegable de los PNs, debido a sus propiedades únicas y su mayor afinidad biológica en comparación con los compuestos puramente sintéticos. Además, la creciente demanda de terapias innovadoras y las nuevas tendencias, como el acceso expandido a la biodiversidad a través de la exploración de ecosistemas marinos y los avances tecnológicos en técnicas de separación y determinación estructural, suscitaron un renovado interés por los PNs como fuente de diversidad química.

La colaboración multidisciplinaria entre químicos, biólogos, biotecnólogos y bioinformáticos, entre otros, se convirtió en un pilar fundamental para abordar los desafíos de manera más eficiente. A medida que avanzaban las técnicas analíticas, la biotecnología y la genómica, se ofrecían herramientas más poderosas para la identificación y producción de PNs.

A continuación, se explorarán en mayor profundidad algunas de las soluciones clave que se han desarrollado para abordar los desafíos en la investigación de PNs. Cada una de

estas estrategias innovadoras (figuras 5 y 6) ofrece un enfoque único y efectivo para superar estos obstáculos y aprovechar al máximo el potencial de los PN.

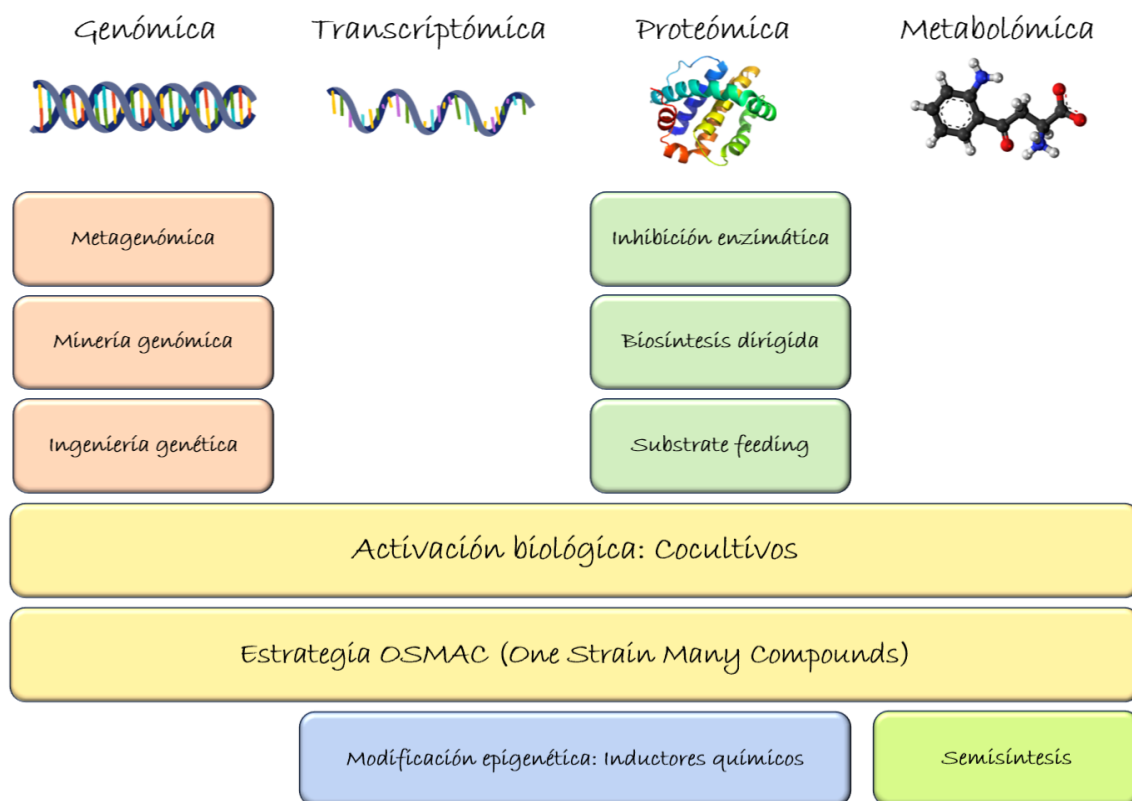


Figura 5. Métodos para acceder a la quimiodiversidad a partir de microorganismos.

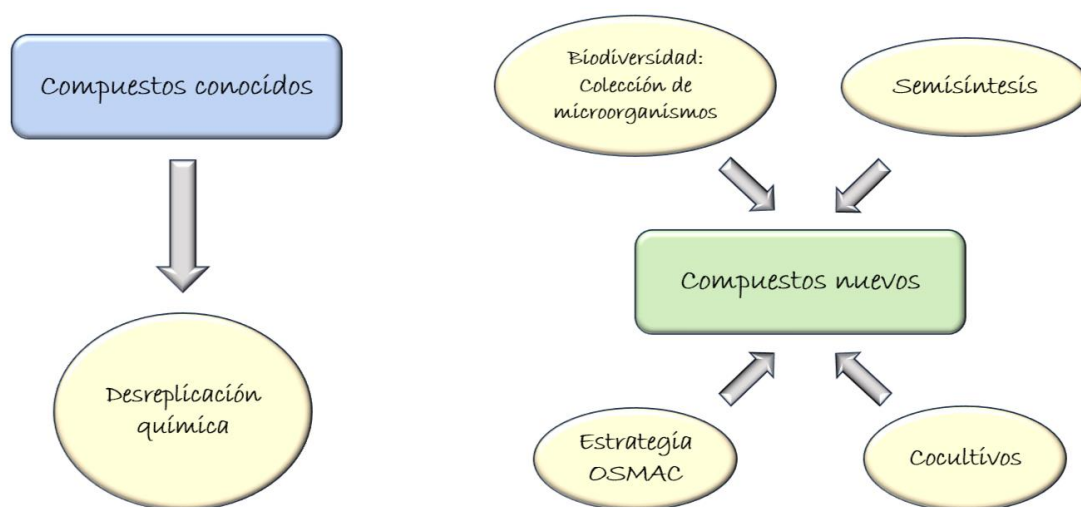


Figura 6. Métodos para evitar el reaslamiento de metabolitos conocidos y acceder a nuevas entidades químicas.

1.4.1. Desreplicación química de productos naturales

La dificultad del proceso de descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas a partir de recursos naturales reside en la gran cantidad de PNs conocidos y la complejidad química de las muestras (extractos y fracciones), que frecuentemente contienen una gran cantidad de compuestos que abarcan una amplia gama de concentraciones.⁵⁴ En la actualidad se han descrito más de 400.000 PNs de bajo peso molecular, según una revisión sobre la información contenida en más de 120 bases de datos de PNs diferentes.⁵⁵ Aunque su número podría ser casi ilimitado debido a la capacidad de las enzimas involucradas en su síntesis, en realidad su ocurrencia es ciertamente restringida.⁵⁶

El desarrollo de metodologías automatizadas de extracción, fraccionamiento y desreplicación, ha mejorado la calidad y rapidez del análisis de los extractos microbianos y, afortunadamente, durante la última década, los avances tecnológicos en instrumentación analítica, junto con el desarrollo de bases de datos adecuadas, han permitido avanzar de manera eficiente en cualquier programa de descubrimiento de fármacos basado en PNs.

Para este fin, ha sido fundamental el desarrollo de estrategias eficientes de desreplicación para establecer que un compuesto dado se ha aislado e identificado previamente y evitar así la pérdida de dinero, tiempo y motivación que causaría el trabajo de reaislamiento del mismo, permitiendo centrarse en estructuras químicas novedosas desde la fase inicial del proceso de descubrimiento.

Es decir, la desreplicación significa reconocer aquellos extractos activos que contienen sustancias ya conocidas en la etapa inicial del proceso de cribado. En otras palabras, es el proceso de analizar las muestras activas (extractos, fracciones, etc.) identificadas en el cribado biológico preliminar, utilizando una combinación de separación analítica y métodos espectroscópicos, para identificar metabolitos bioactivos conocidos y eliminar el trabajo de aislamiento innecesario de los mismos.

No obstante, recordando que hasta la fecha se han identificado más de 400.000 metabolitos secundarios de origen natural, entre los cuales más de 40.000 son de origen marino, es obvio que aún pueden salir a la luz nuevas actividades biológicas de

metabolitos conocidos. Algunos de estos metabolitos conocidos sólo se han determinado estructuralmente, pero nunca se han evaluado biológicamente, y entre los que ya han sido sometidos a uno o incluso más bioensayos específicos, es seguro que una amplia mayoría no ha revelado aún todo su potencial biológico, simplemente porque sigue siendo imposible probar cada compuesto en cada diana biológica conocida en un tiempo razonable. Para ello, la desreplicación también puede ser de gran ayuda, permitiendo acceder de manera rápida a toda la información disponible relacionada con el compuesto identificado (bioactividades, fuentes alternativas, aplicaciones, etc.).⁵⁷

En la actualidad, la desreplicación de PNs generalmente se logra mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o UHPLC) acoplada con espectroscopía UV/Vis y espectrometría de masas (MS).⁵⁸ La mejor opción para la separación es la cromatografía en fase reversa, que se adapta a la polaridad de la mayoría de metabolitos secundarios similares a fármacos.

También se han descrito técnicas más sofisticadas aplicando MS/MS, aprovechando la información adicional de los patrones de fragmentación, permitiendo así el reconocimiento de las subestructuras.

Por último, y no menos importante, el acoplamiento HPLC-RMN se discute como una técnica alternativa, y su utilidad ha mejorado considerablemente por la disponibilidad de HPLC-SPE-RMN, que combina el potencial de la separación de la cromatografía líquida (HPLC), la técnica de extracción en fase sólida (SPE) para la concentración de metabolitos y la información estructural que proporciona la RMN. Pero debido a que esta técnica requiere un equipo bastante costoso, no disponible en la mayoría de los laboratorios, y a que los tiempos de análisis son muy superiores a los requeridos mediante LC-MS, aún no se ha convertido en una metodología de rutina.

Cabe destacar que la espectroscopía de RMN proporciona información estructural mucho más valiosa en un compuesto que las de MS o UV. Rigurosamente hablando, la técnica LC-UV-MS no necesariamente confirma inequívocamente la identidad de compuestos conocidos, debido a la posibilidad de que existan isómeros estructurales, regioisómeros o estereoisómeros. Los tiempos de retención de las bases de datos

internas pueden disminuir este problema, pero indudablemente la respuesta definitiva viene dada por la espectroscopía de RMN.

Además, el uso de bases de datos apropiadas juega un papel importante en la desreplicación de PNs. La base de datos ideal debe contener tanta información sobre un compuesto como sea posible y debe poder buscarse por subestructura, identidad/similitud estructural e identidad/similitud espectroscópica. Los campos de consulta deseables incluyen el nombre trivial, el peso molecular, la masa exacta (o la masa monoisotópica), la fórmula molecular, la identificación taxonómica del organismo productor, la actividad biológica del compuesto y la absorción máxima en UV. Aquellas que contienen espectros reales de RMN o desplazamientos químicos (ya sean experimentales o calculados) son las preferidas. Como alternativa, el concepto de ^1H -SF, desarrollado por los profesores John Blunt y Murray Munro, ha demostrado ser muy eficaz para discriminar entre estructuras candidatas alternativas en el proceso de desreplicación. Este enfoque busca características estructurales que puedan determinarse fácilmente a partir de la inspección del espectro de ^1H RMN de un compuesto.

Teniendo en consideración todo lo mencionado, se pueden proponer varios enfoques diferentes para la desreplicación de PNs, todos ellos implicados en la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas de origen natural, pero cada uno siguiendo un flujo de trabajo particular basado en diferentes materiales de partida, diferentes procedimientos analíticos y/o de separación y diferentes enfoques de elucidación estructural.⁵⁷ El primero permite la rápida identificación de los principales compuestos, sea cual sea su clase química, a partir de un único extracto natural (1). Con frecuencia, esta primera estrategia también se combina directamente con ensayos biológicos para acelerar los procedimientos de fraccionamiento guiados por bioactividad (2). En otros casos, la desreplicación está totalmente integrada en estudios metabolómicos no dirigidos para la elaboración de perfiles químicos de colecciones de extractos naturales (3) o para la identificación dirigida de compuestos predeterminados (deseados o no deseados) en extractos naturales (4). Por último, para la identificación taxonómica de cepas microbianas se utiliza cada vez más una categoría distinta de desreplicación basada principalmente en análisis de secuencias genéticas (5). En la siguiente figura se

muestra el flujo de trabajo seguido para cada una de las estrategias de desreplicación mencionadas:

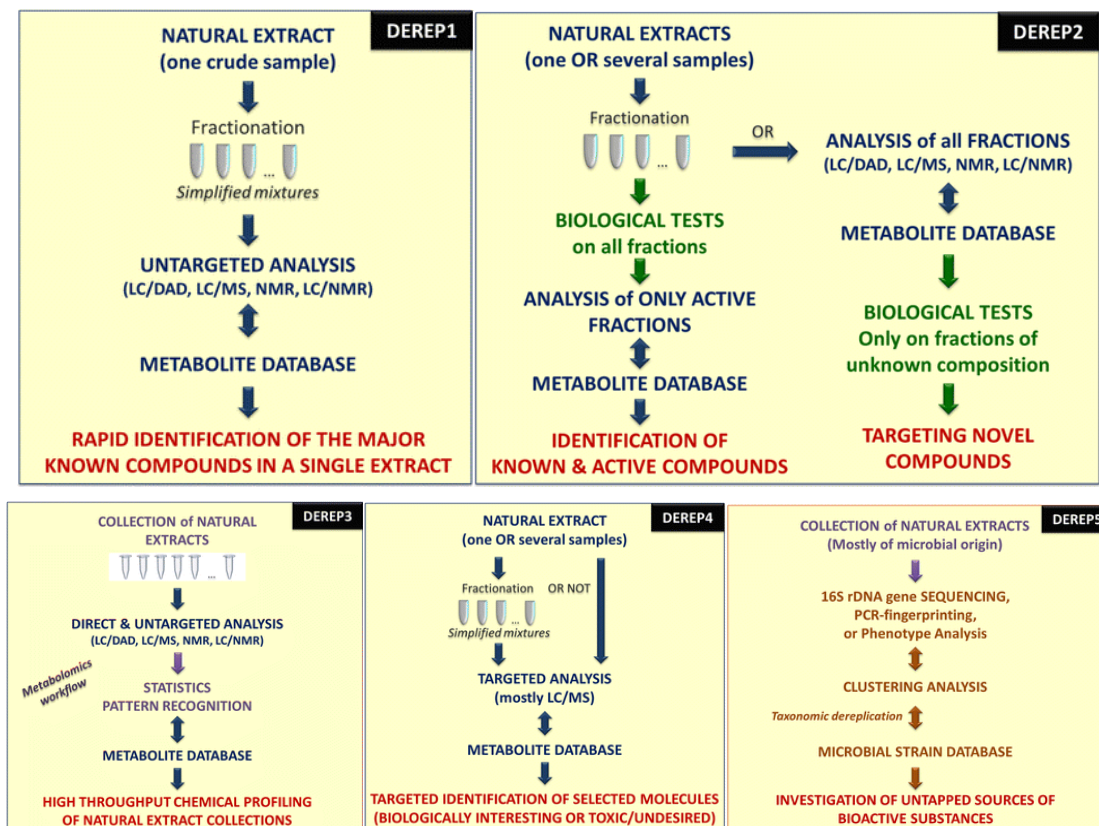


Figura 7. Diferentes estrategias de desreplicación de productos naturales en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas.⁵⁷

En la presente tesis, dicha tarea se realizó siguiendo los procedimientos adoptados en BMT, que implican el uso de las técnicas LC-UV-MS y RMN para la desreplicación de PN, seguido de la caracterización de la actividad biológica de los compuestos aislados.

1.4.2. Biodiversidad: Riqueza de la naturaleza

A lo largo de las últimas décadas, la exploración y explotación de la biodiversidad ha cobrado una importancia creciente debido a su potencial en el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas. Esta diversidad abarca una amplia gama de microorganismos, invertebrados, plantas superiores y otros seres vivos que han evolucionado para sobrevivir en diversos entornos. Cada uno de estos organismos

puede producir compuestos químicos bioactivos únicos como parte de sus mecanismos de defensa, reproducción o supervivencia. Esto se debe a la producción de PNs mediante reacciones enzimáticas, catalizadas por proteínas programadas por secuencias de ADN que difieren enormemente entre los organismos de origen. Además, las muestras geográficamente diversas tienden a ser también químicamente diversas, por lo que el examen de organismos iguales o similares procedentes de distintos lugares ha sido un enfoque productivo para el descubrimiento de nuevas entidades químicas.⁵⁹

Uno de los avances más significativos en este campo ha sido la exploración de los ecosistemas marinos. Como se ha mencionado anteriormente, los océanos albergan una gran diversidad de organismos y ambientes que han sido relativamente inexplorados hasta hace poco. La búsqueda en aguas profundas, arrecifes de coral, hábitats de aguas frías y otros lugares con condiciones ambientales más extremas, ha llevado al descubrimiento de una enorme diversidad microbiana y química asociada a estos ecosistemas,^{38-41, 60-65} por lo que la biodiversidad marina, especialmente la microbiana, se ha convertido en un área de gran interés para la productividad y el éxito de la investigación en PNs.

A este respecto, uno de los principales activos de BMT, institución en la que se ha llevado a cabo la realización de la presente tesis doctoral, en colaboración con la Universidad de Jaén, son sus colecciones de microorganismos, extractos y compuestos puros. Su colección de microorganismos, con más de 80.000 cepas de hongos (42%), actinomicetos (51%), cianobacterias y microalgas (7%), fundamentalmente de origen marino, se ha ido gestando con los años y más de 230 bioprospecciones por todo el mundo (figura 8), incluyendo ambientes extremos como salinas y fumarolas. Esto ha dado como resultado una colección con gran biodiversidad, que se ha traducido en una colección de más de 70.000 extractos (80% origen marino) y más de 1.300 compuestos puros (20% estructuras novedosas).

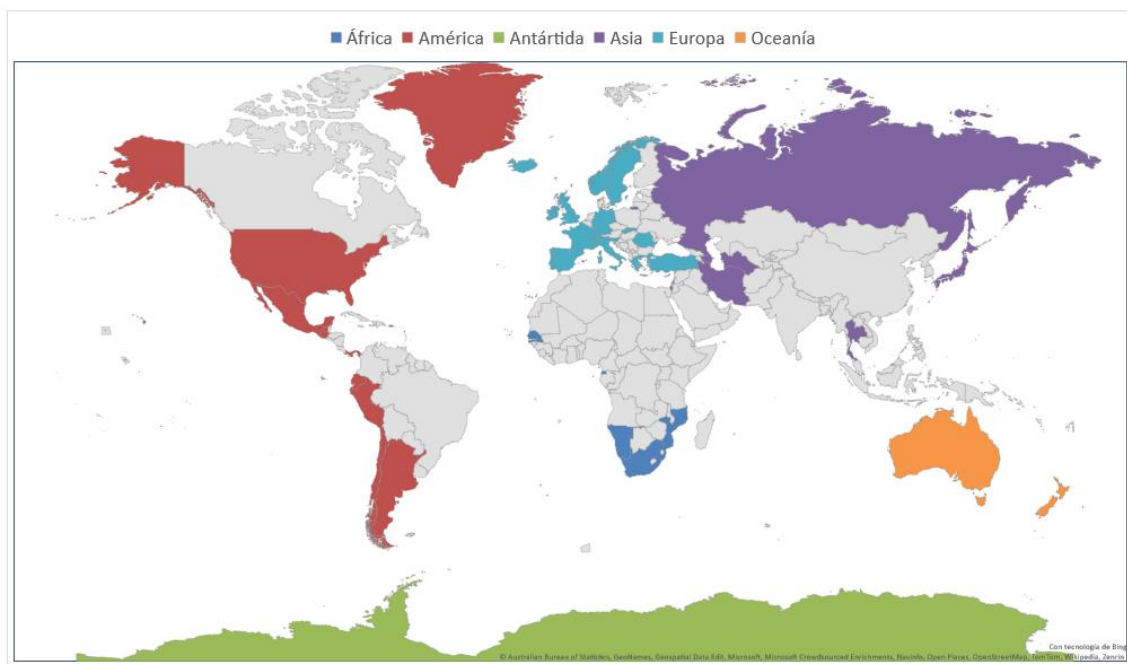


Figura 8. Diversidad geográfica de la colección de microorganismos de BMT, con cepas procedentes de 47 países diferentes. En el mapa no se muestran las bioprospecciones realizadas en aguas internacionales (Océano Atlántico, Mar Mediterráneo y Mar Rojo).

Cabe destacar que muchos microorganismos son difíciles de cultivar en el laboratorio, lo que ha llevado a la subutilización de este vasto recurso microbiano. Para ello, la aplicación de técnicas avanzadas de biología molecular y genómica ha sido de gran utilidad para identificar y expresar genes de interés presentes en estos microorganismos.

1.4.3. Ingeniería genética: Metagenómica, minería genómica y expresión heteróloga

Los compuestos de origen microbiano, casi con total seguridad dominarán el campo de los PN's marinos en los próximos años debido a la diversidad de los metabolitos microbianos, la relativa facilidad de su recolección, la posibilidad de la fermentación para asegurar el suministro y las tecnologías avanzadas para la extracción de su material genómico y su manipulación en sistemas heterólogos. De hecho, se ha revelado que las cepas de actinomicetos marinos, tanto de vida libre como las asociadas a invertebrados marinos, presentan una alta capacidad para la producción de nuevas moléculas con

actividad biológica, con características estructurales únicas cuando se comparan con los aislamientos de actinomicetos terrestres, lo que puede deberse a la presencia de agua marina, hecho que se ha demostrado que potencia la producción de algunos compuestos antimicrobianos.^{33, 52, 66}

Los datos genómicos a menudo ponen de manifiesto una incoherencia entre el número de grupos de genes identificados mediante enfoques bioinformáticos como potencialmente productores de metabolitos secundarios, y el número real de metabolitos secundarios químicamente caracterizados producidos por un microorganismo determinado. El futuro de este campo depende de la aplicación de técnicas y tecnologías avanzadas emergentes para resolver dos problemas principales: microorganismos que no pueden cultivarse con las técnicas de fermentación actuales y la activación de grupos/clusters de genes biosintéticos (CGBs) microbianos “silenciados” (no expresados o expresados en concentraciones muy bajas) bajo condiciones de laboratorio estándar. Algunos ejemplos de estas técnicas serían la metagenómica, que permite la extracción de ADN total de muestras ambientales para su análisis, la minería genómica, que permite la comparación bioinformática de múltiples secuencias con el propósito de identificar genes que codifiquen enzimas relacionadas con la síntesis de PNs de interés, halladas en un genoma específico o en una serie de genomas secuenciados, o el desarrollo de sistemas de expresión homólogos para la sobreexpresión de un determinado gen en el microorganismo del que procede, o heterólogos, que implican la transferencia de una ruta genética responsable de la biosíntesis de un determinado metabolito, desde un microorganismo a un hospedador diferente.

Todas estas estrategias que dependen de manipulaciones genéticas han dado como resultado avances inestimables en este campo. Sin embargo, estos métodos requieren un grado relativamente alto de conocimiento de la biología de los organismos productores. Además, hay muchos ejemplos de microorganismos "dotados", desde el punto de vista de la producción de PNs, especialmente del medio marino, que no son fáciles de manipular genéticamente, lo que limita la mayoría de las técnicas de ingeniería genética antes mencionadas a los grupos filogenéticos más conocidos y estudiados.

Por tanto, la alteración global de la fisiología microbiana mediante la modificación de las condiciones de crecimiento, sin manipular genéticamente el organismo productor, puede ser más útil para cambiar el perfil de metabolitos secundarios de una cepa. Esta técnica ha sido utilizada históricamente en microbiología industrial para mejorar los procesos biotecnológicos mediante prácticas de optimización fermentativas y deriva de la premisa de que cada cepa microbiana tiene el potencial para producir múltiples compuestos, pero sólo un número restringido de ellos se producen bajo condiciones de crecimiento específicas.

1.4.4. Estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds)

Desde el descubrimiento de la penicilina, se ha reconocido que las condiciones de cultivo tienen un impacto evidente en la producción de metabolitos secundarios derivados de microorganismos. Por lo tanto, una misma cepa cultivada en distintas condiciones, es posible que genere compuestos distintos o con rendimientos diferentes.

La posibilidad de activar diferentes rutas biosintéticas a partir de la alteración sistemática de parámetros sencillos de cultivo es una estrategia de diversificación de PNs conocida como OSMAC (One Strain Many Compounds)⁶⁷⁻⁷³ (Figura 9). Esta capacidad de generar un gran número de compuestos químicos de forma rápida y eficiente incrementa las posibilidades de aislar moléculas con estructuras y bioactividades novedosas. Algunos de los parámetros susceptibles de alteración para la activación de CGBs silenciados serían la composición del medio de cultivo, parámetros fisicoquímicos como la temperatura, aireación, pH, etc., la adición de determinadas moléculas que actúan como inductores químicos o la técnica de cocultivo con otros microorganismos.

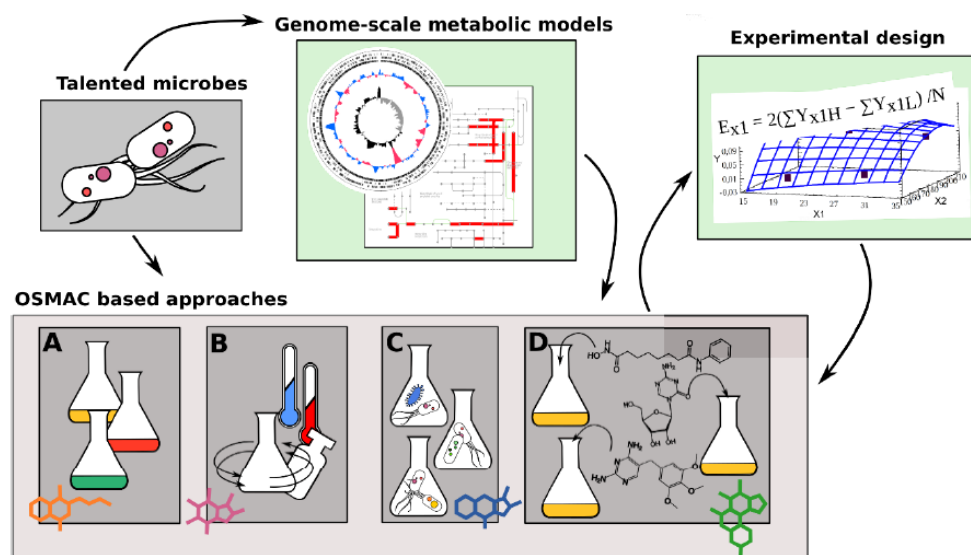


Figura 9. Descripción general de la estrategia "One Strain Many Compounds" (OSMAC) para provocar la producción de metabolitos secundarios "silenciados" mediante la alteración de parámetros de cultivo: A) "Composición del medio (nutrientes)"; B) "Parámetros fisicoquímicos"; C) "Cocultivo"; D) "Inductores químicos".⁶⁷

Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo tiene un gran impacto no sólo sobre el crecimiento microbiano sino también en el metabolismo. La relación C/N, la salinidad y los iones metálicos, pueden regular el grado y el patrón de expresión de genes de metabolitos secundarios microbianos y dar lugar a la producción de diversos PN. A este respecto, los efectos de las concentraciones de nutrientes son complejos y varían notablemente entre los diferentes microorganismos.^{67, 70}

La selección del medio de fermentación depende principalmente de las fuentes de carbono y de nitrógeno, así como de su concentración. Se sabe que hay diferencias entre las fuentes de carbono óptimas para el crecimiento celular y aquellas que incentivan el metabolismo secundario.^{74, 75} Por ejemplo, se conoce que la glucosa es excelente para la producción de biomasa en la mayoría de los casos, pero reduce la producción de determinados metabolitos secundarios. Por otra parte, las fuentes de nitrógeno son necesarias para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos esenciales para los metabolitos secundarios. Existen algunas rutas biosintéticas que se ven negativamente afectadas por algunas fuentes de nitrógeno que estimulan un crecimiento rápido, como

pueden ser las sales de amonio. En resumen, las fuentes de carbono y nitrógeno, ya sean orgánicas o inorgánicas, complejas o simples, tienen importantes efectos sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios en microbios marinos y, a veces, es la relación específica carbono/nitrógeno o incluso los efectos sinérgicos de las fuentes específicas de carbono y nitrógeno lo que determina la optimización de la producción.

Por otro lado, nutrientes como el fósforo, azufre, oligoelementos (como algunos halógenos) o trazas de diferentes metales (Mg, Zn, Ni o algunas tierras raras), pueden tener una influencia importante en la producción de nuevos metabolitos secundarios.

Además, la producción de metabolitos secundarios no solo varía con la composición de los medios de cultivo, sino que también se ha demostrado una producción diferencial cuando la fermentación del microorganismo se lleva a cabo en medios sólidos en comparación con medios líquidos.

Parámetros fisicoquímicos

Parámetros como la temperatura, aireación, salinidad o pH intervienen directamente en el crecimiento celular y en la biosíntesis de metabolitos secundarios. La diversidad química de los metabolitos secundarios microbianos está directamente influenciada por la actividad enzimática microbiana, que es susceptible a la temperatura de cultivo, por lo que, por lo general, cuanto mayor sea la temperatura, más rápida será la tasa de desactivación de la enzima. En muchos casos, la temperatura óptima para el crecimiento es mayor que la temperatura óptima para la producción de metabolitos.

En cuanto a la oxigenación, se han descrito casos en los que el aumento o la deficiencia de aireación del cultivo puede activar el metabolismo secundario, dependiendo de los requerimientos de oxígeno de las enzimas implicadas en la ruta biosintética de un determinado metabolito. La aireación del cultivo a menudo se controla regulando la velocidad de agitación. Cada vez hay más pruebas de que las condiciones del cultivo pueden afectar directamente al proceso metabólico de los microorganismos: medio sólido o líquido, en agitación o estático. En comparación con el cultivo sólido y estático, los líquidos y en agitación no sólo garantizan el contacto pleno de los microorganismos

y los nutrientes, sino que también afectan a sus reacciones bioquímicas al cambiar el suministro de oxígeno y activar grupos de genes funcionales.

Por otro lado, la salinidad es otro factor importante dentro del proceso bioquímico del sistema de cultivo. El agua de mar en sí misma es una mezcla de 96.5% de agua y 3.5% de otros materiales, incluidas sales, gases disueltos, sustancias orgánicas y partículas no disueltas, siendo el 87% de las sales disueltas NaCl. La salinidad del océano es de aproximadamente 3-3.5%, pudiendo aumentar en microambientes hipersalinos, como piscinas de salmuera o disminuir en los manglares. Además, por lo general, los ambientes marinos tienen una naturaleza ligeramente alcalina. Por lo tanto, es razonable suponer que la expresión de metabolitos microbianos asociados con el mar ha evolucionado para adaptarse mejor a estas condiciones de salinidad y pH.

Cocultivo con otros microorganismos

Sin duda, una de las técnicas más prometedoras que se emplean para estimular la producción de metabolitos secundarios y la activación de CGBs “silenciados” es el cocultivo de diferentes microorganismos.^{42, 67, 76-79} Mientras que los procesos de cribado tradicionales implican el cultivo de una única cepa microbiana (cultivo axénico), la introducción de la técnica de cocultivo presenta nuevas oportunidades para la activación de rutas biosintéticas crípticas.

La producción de metabolitos en entornos naturales se ve influenciada por la coexistencia de otros microorganismos y las interacciones entre ellos son la base de muchos procesos ecológicos, como la producción de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas y, entre estas interacciones, la competencia entre especies juega un papel crucial en la biosíntesis de metabolitos. Cuando las moléculas señalizadoras del sistema de *Quorum sensing* (ej.: *N-acilhomoserinlactonas*) de una especie o género interactúan con otras, pueden regular la activación o inhibición de algunos procesos celulares. Por ejemplo, se ha propuesto que el aumento en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana puede ser resultado de la competencia por recursos y espacio, lo que lleva al microorganismo productor a inhibir

a posibles competidores. Por ello, esta técnica ha demostrado ser una herramienta eficaz para simular las condiciones fisiológicas que se producen en el entorno natural y pueden tener un enorme potencial para el descubrimiento de nuevas moléculas.

Por lo general, se emplea el cocultivo de diferentes cepas bacterianas y/o fúngicas, pero recientemente, se ha demostrado que la adición de bacteriófagos también puede tener un efecto en la producción de metabolitos secundarios.⁶⁷

En un estudio llevado a cabo por R. Serrano *et al.*,⁴² se analizó el uso de cocultivos fúngicos con *B. cinerea* para activar rutas crípticas en cepas de hongos aisladas de diversos entornos de plantas, demostrando ser una estrategia exitosa para inducir la producción de nuevos antifúngicos con actividad biológica frente a patógenos humanos y vegetales. La interacción entre dichas cepas fúngicas resultó en cambios drásticos en los perfiles de metabolitos secundarios detectados en los cromatogramas de los extractos orgánicos, en comparación con los obtenidos mediante el cultivo axénico de cada hongo (Figura 10).

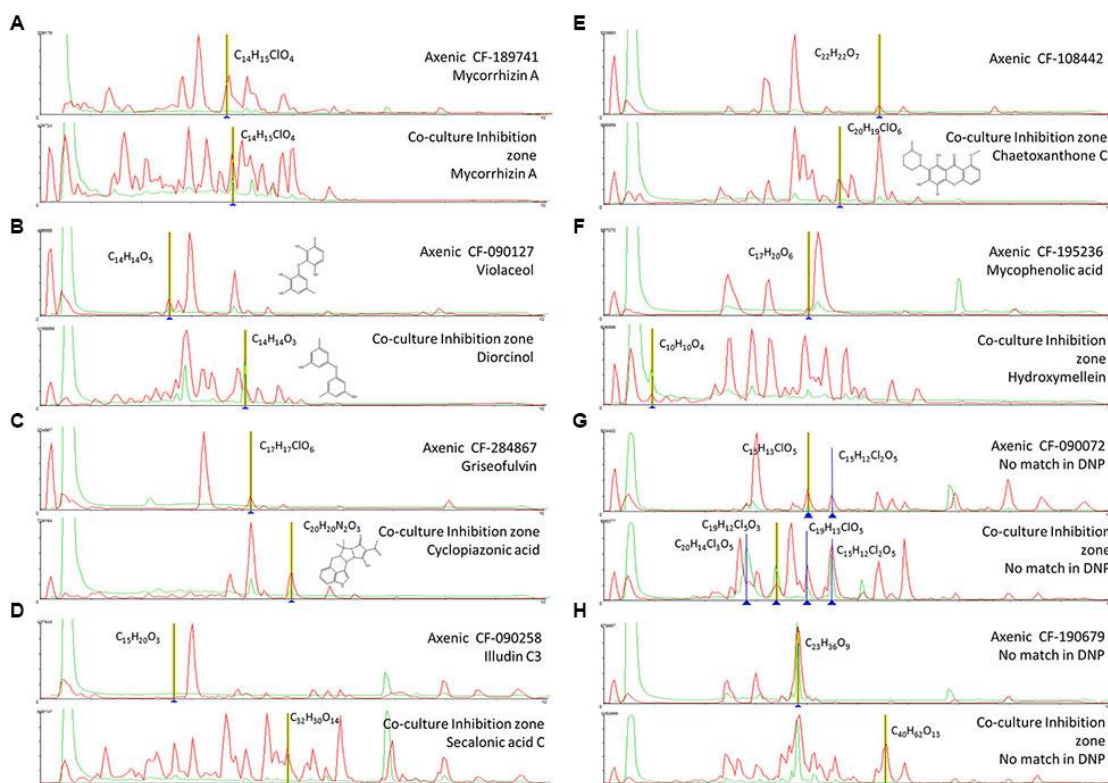


Figura 10. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cada cepa de hongos axénicos y su cocultivo con *B. cinerea*.

Otros estudios sobre este tema revelaron la producción de nuevos compuestos bioactivos, o el aumento de la producción de compuestos conocidos, mediante el cocultivo de diferentes cepas de hongos y/o bacterias.^{80, 81} Algunos ejemplos de este tipo son la producción del antibiótico Pestalona mediante el cocultivo del hongo marino *Pestalotia sp.* con una α -proteobacteria marina,⁸² y de Nafuredin B, un potente citotóxico frente a un panel de líneas celulares tumorales humanas, procedente del cocultivo entre los hongos marinos *Talaromyces aculeatus* y *Penicillium variabile*,⁸³ mientras que el cocultivo de *Myxococcus Xanthus* y *Streptomyces coelicolor* resultó en el aumento de 20 veces en la producción de Actinorhodina por *S. coelicolor*.⁸⁴

Estos son solo algunos ejemplos de los resultados obtenidos en investigaciones recientes sobre la técnica de cocultivo, que demuestran la viabilidad de esta estrategia para aumentar la diversidad química de los metabolitos producidos.

Inductores químicos

Como se ha mencionado anteriormente, muchas de las interacciones microbianas que provocan la producción de metabolitos secundarios bioactivos están sustentadas por mecanismos complejos de ecología química que dependen de moléculas difusibles denominadas “autoinductores” (sistema *quorum sensing*). Estas moléculas de señalización bacteriana son sustancias de bajo peso molecular que se excretan y se acumulan en el ambiente extracelular desencadenando la expresión genética al alcanzar una concentración crítica en el medio. Ejemplos conocidos de estas moléculas que regulan la producción de metabolitos secundarios incluyen el autoinductor Factor A y la γ -butirolactona, que han demostrado tener un amplio impacto en la producción de compuestos bioactivos en actinomicetos.^{67, 85}

Aunque en general los autoinductores son producidos por la misma población bacteriana que sufre la regulación de la producción de metabolitos secundarios, existen ejemplos tanto en bacterias marinas como terrestres en los que la respuesta del sistema *quorum sensing*, y por tanto la producción de metabolitos secundarios, se ve alterada por moléculas similares a los autoinductores producidas por otras cepas bacterianas.

La *N*-acetilglucosamina (NAcGlc) se considera uno de los inductores químicos que actúa como molécula de señalización e induce un aumento significativo de la producción de metabolitos secundarios en hongos y bacterias.⁸⁶ Este aminoazúcar se encuentra presente en las paredes celulares de hongos y bacterias, y durante el crecimiento celular, una cantidad significativa de NAcGlc se libera al medio, induciendo la señalización celular. En un estudio sobre la producción de antibióticos en *Streptomyces sp.*,⁸⁷ se reveló que en condiciones nutricionales deficientes, la suplementación con NAcGlc acelera la producción de antibióticos, actuando esta molécula como señalizadora del estrés por nutrientes. Por el contrario, en medios ricos en nutrientes, las concentraciones más altas de NAcGlc bloquean el desarrollo y la producción de este tipo de compuestos, induciendo así una respuesta típica del crecimiento vegetativo.

Otros dos grandes grupos de inductores químicos son los antibióticos y los modificadores epigenéticos. La adición a los medios de cultivo de determinadas moléculas, como es el caso de las cytochalasinas o determinados antibióticos a concentraciones subletales, se sabe que pueden desencadenar la producción de un perfil metabólico diferente, al aparecer nuevos metabolitos o aumentar el rendimiento de los que ya se producían. Por otro lado, los modificadores epigenéticos son sustancias químicas capaces de cambiar las características microbianas mediante la alteración de su estado epigenético, como los inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT) y de la histona deacetilasa (HDAC). La adición de estos modificadores suele suprimir la actividad de las enzimas relacionadas en la ruta biosintética y promueve el progreso de otras rutas metabólicas. La 5-azacitidina es el inhibidor de DNMT más utilizado para activar los genes silenciados por la DNMT, que inhibe la transcripción génica por metilación de determinadas zonas del ADN,⁷² mientras que el ácido suberohidroxámico (SBHA), el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA, también llamado vorinostat) y la nicotinamida son las sustancias químicas inhibidoras de HDAC más utilizadas para impedir la desacetilación de las histonas y facilitar la transcripción y expresión de los genes silenciados en microorganismos. Existen algunos estudios recientes en los que la adición al medio de cultivo de estos modificadores epigenéticos ha resultado en la producción de nuevos metabolitos secundarios bioactivos.⁸⁸⁻⁹⁴

Todos estos cambios en los parámetros de los procesos de cultivo ofrecen un amplio arsenal de estrategias con la finalidad de alterar la maquinaria celular del organismo productor en respuesta a diversas condiciones de crecimiento. La principal ventaja de estos enfoques es que no requieren un conocimiento previo del tipo de clusters genéticos biosintéticos y/o procesos reguladores que rigen su expresión. Además, estas estrategias pueden aplicarse a microorganismos que son menos susceptibles a la manipulación genética, y representan herramientas ideales que pueden emplearse en particular para desbloquear microorganismos marinos genéticamente refractarios.

Si bien es cierto que dichos enfoques pueden llevar mucho tiempo y ser desafiantes desde un punto de vista práctico, ya que la cantidad de cambios potenciales en los parámetros de cultivo puede ser enorme, y a pesar de los numerosos estudios dirigidos a provocar la activación de CGBs "silenciosos" mediante la estrategia OSMAC, aún queda mucho por descubrir, especialmente en el caso de los microorganismos marinos.

Los pasos iniciales en la identificación de las condiciones de cultivo adecuadas para usar en los procesos de ampliación de escala posteriores no requieren necesariamente grandes volúmenes. Por lo tanto, la miniaturización es, sin duda, la estrategia más prometedora para lograr mayores rendimientos.⁶⁷ Para ello, las plataformas microfluídicas pueden ser los mejores dispositivos para ayudar a racionalizar las fases iniciales de prueba. La posibilidad de cultivar microorganismos directamente en diferentes medios en el chip microfluídico, combinada con la posibilidad de realizar microextracción e inyección en MS en el mismo dispositivo, hace que estas herramientas sean muy atractivas. En general, nos encontramos ante un momento emocionante para el descubrimiento de PNs, y una integración más completa de enfoques microbiológicos básicos, métodos computacionales e innovaciones tecnológicas, ayudará a descubrir gran parte del potencial indudable de los microorganismos marinos.

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de cada uno de estos factores en la capacidad de los microorganismos seleccionados para producir nuevos metabolitos secundarios, haciendo hincapié en la composición de los medios de cultivo, la adición de inductores químicos, así como en las interacciones microbianas mediante la técnica de cocultivo.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Biomar Microbial Technologies (BMT) tiene una larga trayectoria en proyectos de descubrimiento de nuevos productos naturales de origen microbiano, fundamentalmente a partir de microorganismos de origen marino, contando con una colección propia de PNs que incluye más de 1.300 compuestos, algunos de las cuáles se han llevado a desarrollo preclínico en algunos proyectos internos y otros han sido licenciados a empresas del sector.

En el ámbito de salud humana, cabe destacar las licencias de varios compuestos patentados a la farmacéutica PharmaMar S.A., enfocados al tratamiento del cáncer. Aunque estos compuestos se abandonaron por distintas causas durante el desarrollo preclínico, estas licencias validaron el potencial de la colección de BMT para el descubrimiento de fármacos. Además, BMT ha presentado la solicitud de dos nuevas patentes, una de un compuesto neuroprotector para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (EP3708162A1),⁹⁵ y otra de un compuesto antitumoral, para el tratamiento del glioblastoma (PCT/EP2023/077547),⁹⁶ que es el tipo de tumor cerebral con peor pronóstico.

En los últimos años, BMT ha dedicado una gran parte de su capacidad investigadora a la búsqueda de nuevos PNs con potencial para su uso en el campo de la agricultura. En este campo, consiguió licenciar a la empresa Marrone Biosolutions un herbicida para cultivos de arroz (US8476195B2),⁹⁷ y además ha participado en el descubrimiento de una serie de compuestos con diferentes actividades pesticidas, en proyectos de colaboración con algunas compañías relevantes en el sector, como la multinacional Sumitomo, Valent BioSciences o la española Symborg, recientemente adquirida por el gigante Corteva.

La tasa de descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios microbianos es cada vez menor y la posibilidad de redescubrimiento de compuestos conocidos hoy en día es mayor que antes. Por lo tanto, la aplicación de nuevas metodologías para aumentar la diversidad química obtenida a partir de microorganismos es un campo de estudio con mucho interés en los últimos años. A este efecto, la estrategia OSMAC llevada a cabo en el presente trabajo se erige como una potente herramienta.

Algunos de los objetivos específicos propuestos al inicio de la presente investigación fueron los siguientes:

1. Selección de las cepas microbianas a estudiar (hongos y actinomicetos fundamentalmente de origen marino), atendiendo a criterios de diversidad geográfica y taxonómica, y de producción de metabolitos secundarios, y desarrollo de una eficiente estrategia de desreplicación (identificación de compuestos conocidos) que permita la rápida evaluación de la novedad química de los extractos con los que se va a trabajar.
2. Fermentación de las cepas finalmente seleccionadas siguiendo una estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds), que favorezca la producción de diferentes metabolitos secundarios mediante la alteración sistemática de parámetros sencillos de cultivo, junto con la puesta a punto de técnicas de cocultivo.
3. Desarrollo de los mejores métodos para la extracción, aislamiento y purificación de los compuestos producidos por los microorganismos durante los procesos de fermentación.
4. Estudios de elucidación estructural de los compuestos aislados, mediante técnicas espectroscópicas y de espectrometría (RMN, MS, UV, etc.)
5. Screening de los compuestos aislados en los diferentes ensayos biológicos (in vitro) puestos a punto en BMT.
6. Estudios preclínicos o pruebas de campo de los posibles candidatos seleccionados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y desreplicación de extractos en el proceso de selección de las cepas microbianas

A partir de la colección de microorganismos de BMT se seleccionaron una serie de hongos y actinomicetos, fundamentalmente de origen marino (solo uno de ellos fue de origen terrestre), procedentes de muestras recogidas en áreas geográficas que pudieran ser de especial relevancia, a los que se aplicaron criterios taxonómicos tratando de buscar cepas de géneros o especies menos estudiados hasta el momento o más interesantes desde el punto de vista de producción de posibles nuevas estructuras.

Las cepas de hongos se identificaron siguiendo dos criterios, el criterio morfológico, y el criterio molecular, por comparación de secuencias genómicas con las bases de datos públicas. Siguiendo el criterio morfológico, se tienen en cuenta características propias de cada cepa en cultivo sobre medio sólido en placa con agar, en medio estándar de crecimiento y esporulación. En estas condiciones se evalúan características macroscópicas como el tipo de crecimiento de la colonia, textura del micelio, esporulación, difusión de pigmentos, exudados, etc. En caso de presentar esporulación se realizan preparaciones microscópicas que permiten asignar las características de los cuerpos fructíferos, tipo de esporulación y características de las esporas. Con todos estos datos se puede llegar a género y en algunos casos a especie, siguiendo las claves dicotómicas de la taxonomía clásica.

La taxonomía obtenida con criterios morfológicos debe ser corroborada por análisis moleculares y viceversa. Esta metodología permite obtener la secuencia de un fragmento de ADN con valor taxonómico para el rango taxonómico que se desee analizar, y compararla con las bases de datos públicas. Para obtener esta secuencia es necesario proceder a la extracción del material genético del hongo y a la amplificación, mediante la técnica de PCR, del fragmento de ADN más apropiado. En el caso de los hongos, la región *a priori* más adecuada es ITS1-5.8S-ITS2 de ADN ribosomal, que en general presenta variabilidad suficiente para determinar taxonomía a nivel de género y especie.

En el caso de los actinomicetos, para todos ellos se dispone de información del perfil de ácidos grasos, mediante análisis por GC-MS, así como información morfológica y fisiológica adicional. Para las cepas seleccionadas, se llevó a cabo la identificación taxonómica mediante la secuenciación de un fragmento del gen ADNr 16s, y comparación de la secuencia obtenida con las bases de datos públicas.

Esta información, recogida en la sección de materiales y métodos, refleja claramente la biodiversidad existente entre los microorganismos escogidos, encontrándose hongos y actinomicetos con una amplia diversidad taxonómica, procedentes de distintas regiones geográficas.

Una vez identificadas, las cepas microbianas escogidas (hongos y actinomicetos) fueron sometidas a un proceso de selección para determinar aquellas que pudieran resultar más interesantes desde el punto de vista de producción de metabolitos secundarios. Para ello, se generó la correspondiente colección de extractos a partir de los microorganismos cultivados en pequeño volumen (40 ml), en los medios y condiciones estándar de fermentación y estos fueron sometidos a un exhaustivo proceso de desreplicación química por LC-UV-MS, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. En este proceso se comparó el tiempo de retención, el espectro de UV, y el espectro de masas de cada uno de los compuestos del extracto, con esos mismos parámetros de todos los metabolitos incluidos en la colección de compuestos puros de BMT.

Código cepa	Taxonomía	Compuestos desreplicados
MI-75-A20-043	<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, ciclo(4-OH-Pro-Leu)
MI-61-TEA-010	<i>Gordonia terrae</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, ciclotirosilpropil, ciclo(L-4-OH-Pro-L-Phe), ciclo(4-OH-Pro-Leu), ácidos grasos y acilglucéridos
BL-65-HOL2-018	<i>Dermatophilus sp.</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, ciclotirosilpropil, ciclo(L-4-OH-Pro-L-Phe), ciclo(4-OH-Pro-Leu), triptófano, ácidos grasos y acilglucéridos
AA-78-CN2-009	<i>Salinicoccus roseus</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, genistin, ácido pirrol-3-carboxílico
BL-59-SINU-006	<i>Bacillus pumilus</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, triptófano, streptazolina, loloatines, malayamicina A, N-acetiltryptamina, ciclo(Phe-Pro), ciclo(4-OH-Pro-Leu), ciclo(Pro-Val)
AA-73-COF-018	<i>Leifsonia poae</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, ciclo(4-OH-Pro-Leu), malayamicina A
AA-78-CR6-010	<i>Streptomyces sp.</i>	Ácido benzoico, daidzeína, genisteína, ciclo(4-OH-Pro-Leu), malayamicina A, adenosina, ciclo(Phe-Pro), indol-3-carbaldehído
AA-AR-H-B002	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	Compuestos mayoritarios sin identificar
AA-74-MO2-007	<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	Compuestos mayoritarios sin identificar
HL-84-MIS4-AD04	<i>Echinocatena arthrinioides.</i>	Sulochrin, metil asterrate, 7-cloroemodin
HL-84-TRO-AD01	<i>Ascomycete sp.</i>	Ácido papiracílico, decumbenona A, ácido benzoico
HL-94-F20-Q01	<i>Galactomyces sp.</i>	Terpendol C, ácido benzoico, ácidos grasos y acilglucéridos
HL-94-F41-AA01	<i>Penicillium raistrickii</i>	Ácido penicílico, ácido dihidropenicílico, ácido benzoico y ácido shikímico metil éster
HL-94-F10-P02	<i>Thielavia sp.</i>	Ácido benzoico, ácido penicílico, diisooctilftalato
HL-118-04-Q01	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ácido micofenólico, 5,7-dihidroxi-3-(1-hidroxietil)ftalida, ácido benzoico, xantoepocina, asperfenamato
HL-118-08-P100	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	Terpendol C, ácido benzoico, ácidos grasos y acilglucéridos
HT-GU-SUES-1371	<i>Pleotrichocladium opacum</i>	Compuestos mayoritarios sin identificar
HL-102-24-R04	<i>Beauveria felina</i>	Compuestos mayoritarios sin identificar

Tabla 1. Compuestos desreplicados producidos por los microorganismos seleccionados en condiciones estándar de fermentación.

Con la información que se muestra en la tabla 1, se seleccionaron aquellos microorganismos para los que se obtuvieron extractos con perfiles de HPLC que sugerían la presencia de posibles nuevas estructuras, al no haber una clara correspondencia en el proceso de desreplicación química con ninguno de los metabolitos secundarios incluidos en la colección de BMT.

Los microorganismos seleccionados fueron los actinomicetos *Streptomyces griseorubiginosus* (código cepa **AA-AR-H-B002**), descrito en bibliografía como productor de cinerubines y melaninas (polímeros de compuestos fenólicos) del tipo eumelaninas con actividad antioxidante,^{98, 99} y *Streptomyces wuyuanensis* (código cepa **AA-74-MO2-007**), que aparece en bibliografía como productor de metabolitos secundarios con una potente actividad antibacteriana frente a *B. subtilis*, *M. luteus* y *S. aureus*,¹⁰⁰ así como enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs) y sideróforos con actividad antifúngica.^{101, 102}

Por otro lado, se seleccionaron los hongos *Pleotrichocladium opacum* (código cepa **HT-GU-SUES-1371**), perteneciente al género *Trichocladium*, el cual está descrito en bibliografía como productor de varios metabolitos secundarios bioactivos que incluyen inhibidores de serino proteasas de la vía de la coagulación, asterriquinonas CT1, CT3 y CT4, humicolona, una tetralona fenólica citotóxica, inhibidores de diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) humana, amidepsinas A – K,⁷⁶ además de una amplia familia de policétidos, como massarilactonas, massarigeninas y trichocladinoles; y *Beauveria felina* (código cepa **HL-102-24-R04**) productor de una familia de ciclodepsipéptidos, en concreto destruxinas e isariinas con diversas actividades biológicas, como citotóxicas, fitotóxicas, antimicrobianas, antivirales, antihelmínticas, insecticidas, antimaláricas, antitumorales e inhibidoras de enzimas.¹⁰³⁻¹¹²

3.2. Aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos por las cepas microbianas seleccionadas a través de la estrategia OSMAC

En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias para el descubrimiento de nuevos productos naturales crípticos. Una de las más versátiles ha sido la estrategia OSMAC, basada en la manipulación controlada y sistemática de las diferentes condiciones de cultivo microbiano. Siguiendo esta estrategia, las cuatro cepas microbianas seleccionadas (2 hongos y 2 actinomicetos) fueron fermentadas en primer lugar en un medio y condiciones estándar de producción de metabolitos secundarios, y posteriormente, se realizó una prueba de medios para seleccionar aquellos en los cuales se apreciaba una alteración notable en el perfil metabolómico, respecto al obtenido en las condiciones estándar de fermentación, incluyendo medios líquidos y sólidos, la adición de inductores químicos y la técnica de cocultivo con otros microorganismos.

A continuación, se detalla el aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos por estas cepas microbianas en las distintas condiciones de cultivo probadas siguiendo la estrategia OSMAC (figuras 11 y 12).

Los espectros de RMN (1D y 2D), espectros de masas de alta resolución y de absorción UV de los compuestos con estructuras novedosas, están incluidos en los anexos, clasificados por microorganismo productor, en el orden en que aparecen en el texto.

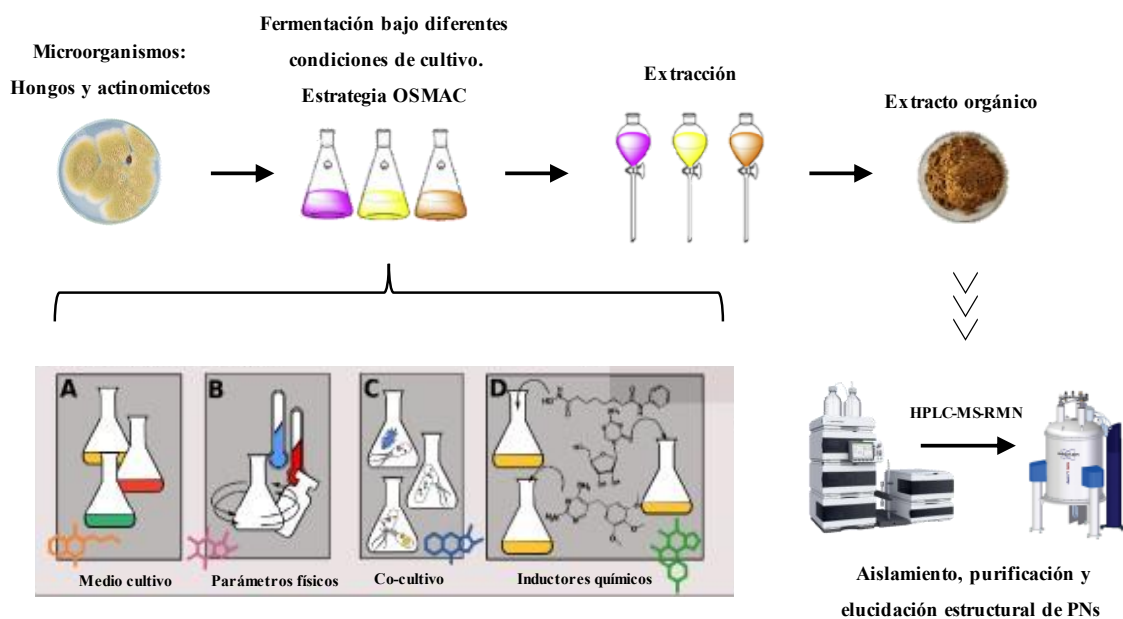


Figura 11. Estrategia OSMAC seguida para la activación de clusters genéticos silenciados y la producción de diferentes metabolitos secundarios.

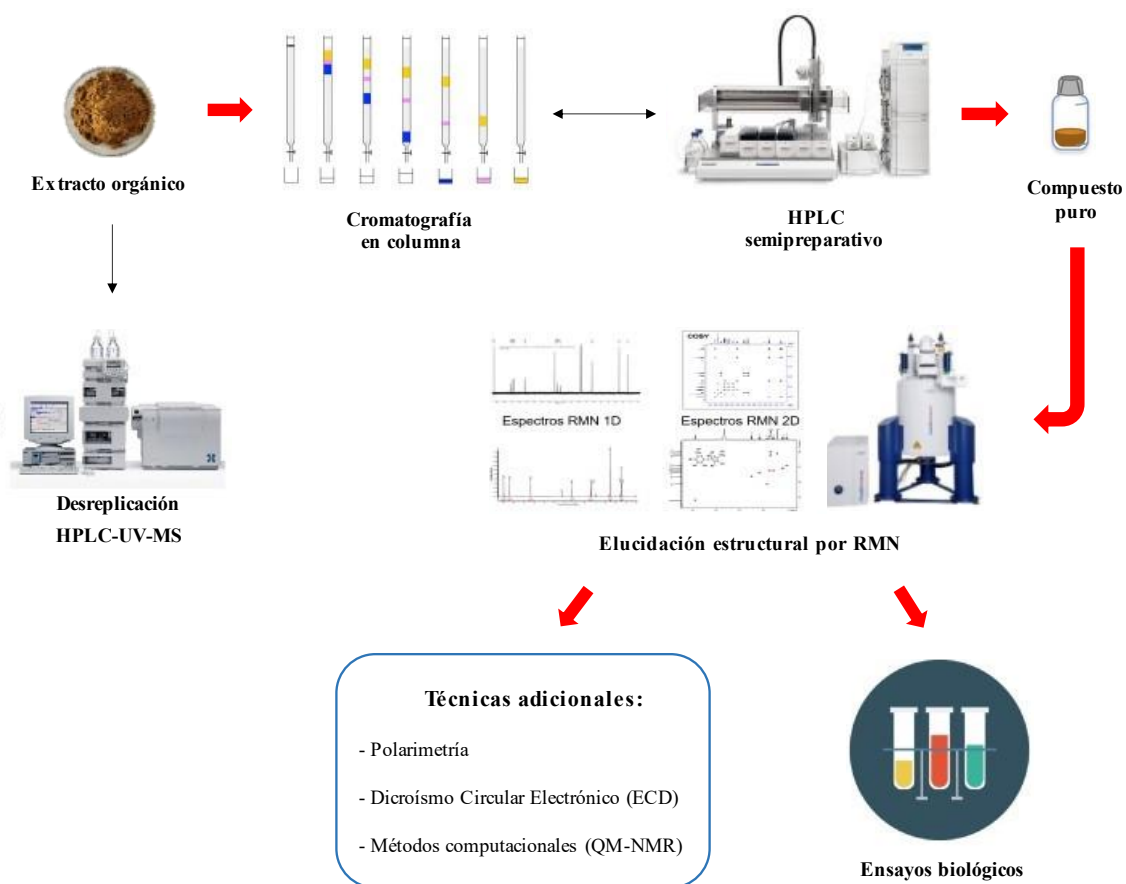


Figura 12. Descripción del proceso completo de aislamiento, purificación, elucidación estructural y ensayos biológicos de los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos seleccionados.

3.2.1. HT-GU-SUES-1371 (*Pleotrichocladium opacum*)

A partir del hongo *P. opacum*, aislado de una muestra de suelo recogida en España, cultivado en medio JSA (condiciones estándar de fermentación), se aislaron e identificaron nueve PNs (**1-9**) (figura 13), entre los que se incluían dos compuestos nuevos (**8 y 9**).

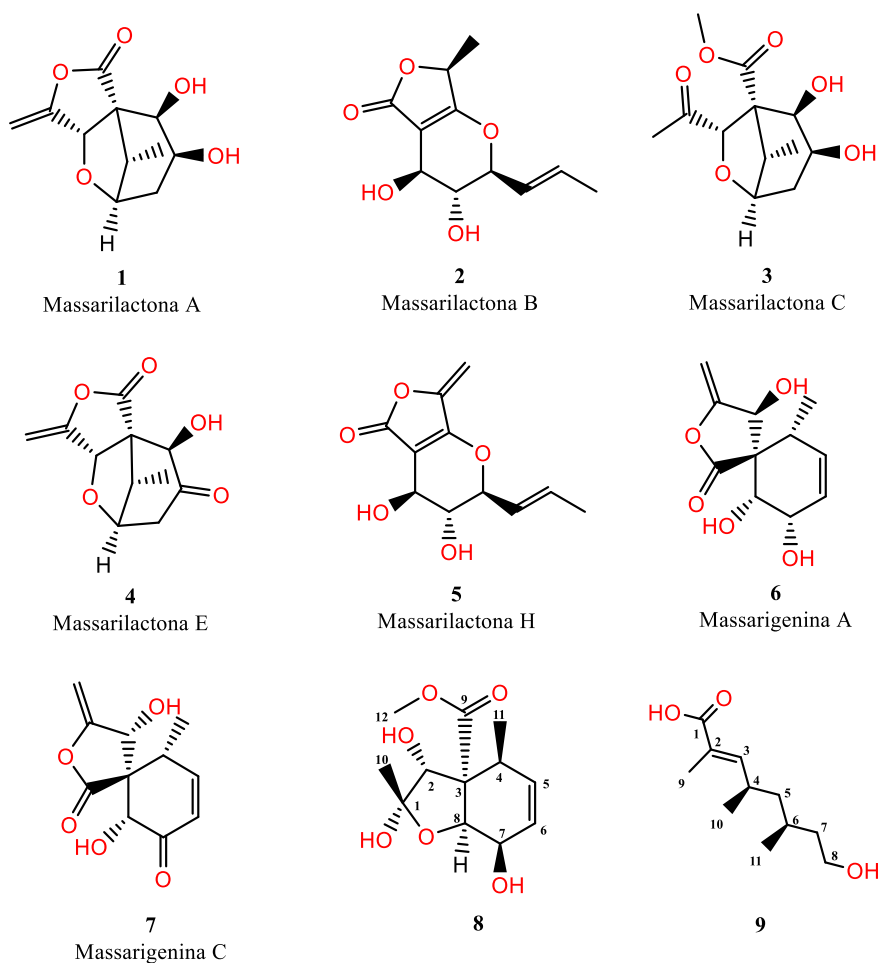


Figura 13. Metabolitos secundarios aislados de *P. opacum* cultivado en condiciones estándar (medio JSA).

El extracto orgánico (11.25 g) de esta fermentación se fraccionó mediante CPV (cromatografía en placa filtrante a vacío) utilizando un gradiente de hexano/EtOAc/MeOH obteniendo 12 fracciones (¹F1-¹F12), de las cuales ¹F6, ¹F7, ¹F8-9 y ¹F11 contenían compuestos sin desreplicación química frente a la colección de compuestos puros de BMT, tras su análisis por HPLC/UV/MS, por lo que se procedió al aislamiento y purificación de estas moléculas. La fracción ¹F11 fue sometida a

cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/acetona como fase móvil para obtener los compuestos **1** (126 mg) y **3** (94.8 mg). Para el aislamiento de los metabolitos secundarios detectados en la fracción ¹F7 se siguió un procedimiento similar, seguido de un paso de purificación en HPLC semipreparativo utilizando un gradiente de MeOH/H₂O como sistema de elución para obtener los compuestos **4** (36 mg) y **5** (8.5 mg). Por último, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la fracción ¹F7, a partir de la fracción ¹F8-9 se aislaron los compuestos **2** (6.1 mg), **7** (11.7 mg) y **9** (13.7 mg), y a partir de la fracción ¹F6 se obtuvieron los compuestos **6** (87.2 mg) y **8** (28 mg).

Los compuestos **1-7** se identificaron como massarilactonas A-C (**1-3**),^{113, 114} E-H (**4-5**),¹¹⁵⁻¹¹⁷ y massarigeninas A (**6**) y C (**7**),¹¹⁸ por comparación de sus espectros HRESIMS y RMN 1D y 2D con los descritos en la bibliografía.

El compuesto **8** se aisló como un sólido incoloro, cuya fórmula molecular se determinó como C₁₂H₁₈O₆ (cuatro grados de insaturación) a partir de los datos de HRESIMS y RMN. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN (Tabla 2) sugirieron la presencia de dos grupos metilo (uno de ellos formando un resto de CH₃CH-), un grupo metoxilo, un carbonilo de éster (δ_C 177.0), tres protones oximetinos, dos carbonos cuaternarios sp³, uno de ellos hemiacetalico (δ_C 56.8, 102.0, respectivamente), una olefina 1,2-disustituida y tres protones intercambiables (δ_H 2.49, 4.03 y 4.20). Los dos grados de insaturación restantes indicaban que este compuesto presentaba una estructura bicíclica.

El análisis del espectro gCOSY (CORrelation SpectroscopY) permitió asignar dos sistemas de espín aislados correspondientes a C4-C8/C11/7-OH y C2-2-OH, que junto con las correlaciones observadas en el espectro gHMBC de H-8 con C-4, y de H-11 y H-5 con el carbono cuaternario C-3, establecieron un anillo de ciclohexeno pentasustituido. Además, las correlaciones de H-2 y H-8 con el carbonilo del éster C-9, de H₃-10 con C-2 y el carbono hemiacetalico C-1, y de H-2 con C-4, junto con la fórmula molecular del compuesto, y los desplazamientos químicos de H-8 y C-8, sugerían que el carbono C-1 debía estar unido mediante un puente de éter a C-8, estableciendo un anillo de tetrahidrofurano.

Una vez determinada la estructura plana, se llevó a cabo la determinación de la estereoquímica de la molécula. Esta tarea suele abordarse utilizando información espacial obtenida a partir del experimento NOESY, sin embargo, es relativamente común en la química de PNs que la escasa cantidad de muestra impida obtener datos claros de dicho experimento debido a su baja sensibilidad. Como alternativa, el uso de cálculos de mecánica cuántica para desentrañar la información codificada en los desplazamientos químicos de RMN, también conocidos como métodos QM-NMR, es actualmente una de las estrategias más populares para este fin y se ha utilizado con éxito en la elucidación de la estructura de compuestos muy complejos,¹¹⁹⁻¹²¹ ya que se está convirtiendo en un enfoque más rápido y, en algunos casos, incluso más fiable que el enfoque de síntesis total.^{122, 123} Existen varios métodos para esta tarea, sin embargo, los que se basan en el teorema de Bayes, como la probabilidad DP4 original o los métodos DP4+ y J-DP4 más elaborados, destacan sobre el resto.¹²⁴⁻¹²⁷ Todos ellos comparan los desplazamientos químicos calculados frente a los datos experimentales de RMN, obteniendo la probabilidad de que un candidato concreto sea el correcto.¹²⁸ Teniendo en cuenta la estructura bastante rígida del compuesto **8**, se estudiaron los 32 posibles diastereoisómeros candidatos mediante el método DP4+ para asignar su configuración relativa y comparando los datos experimentales y calculados de ^1H y ^{13}C RMN, se obtuvo la mejor coincidencia para el isómero $1S^*$, $2R^*$, $3S^*$, $4S^*$, $7R^*$, $8S^*$. Este resultado fue compatible con las configuraciones relativas asignadas en la literatura para los compuestos relacionados trichocladinoles A y B,¹²⁹ por lo que la configuración relativa de la molécula quedó claramente definida como se muestra en la figura 13.

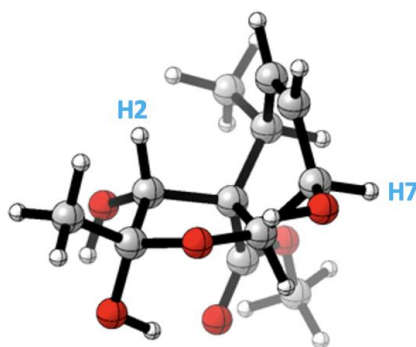
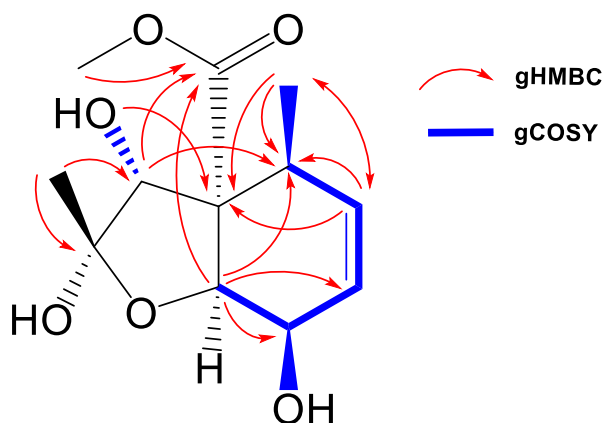


Figura 14. Conformación de mínima energía para el compuesto **8**.

Tabla 2. Datos de RMN del compuesto **8** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		101.9, C		
2	3.57, (d, 10.0)	80.2, CH	2-OH	C-4, 9
3		56.7, C		
4	2.55, m	33.0, CH	5, 6, 11	
5	5.54, (dt, 2.9, 9.6)	131.5, CH	4, 6, 7	C-3, 4, 11
6	5.88, (dm, 9.6)	133.8, CH	4, 5, 7, 8	
7	4.11, m	68.3, CH	5, 6, 8, 7-OH	
8	4.63, (dd, 1.5, 4.3)	83.1, CH	6, 7	C-4, 6, 7, 9
9		176.8, C		
10	1.40, s	23.2, CH ₃		C-1, 2
11	1.25, (d, 7.1)	15.8, CH ₃	4	C-3, 4, 5
12	3.84, s	53.3, CH ₃		C-9
1-OH	4.20, s			
2-OH	4.03, (d, 10.0)		2	C-3
7-OH	2.49, (d, 10.4)		7	

**Figura 15.** Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **8**.

Por otro lado, el compuesto **9** se purificó tal y como se ha descrito anteriormente, obteniendo un aceite incoloro, cuya fórmula molecular se estableció como C₁₁H₂₀O₃ (dos grados de insaturación) a partir de los datos de HRESIMS y RMN. El análisis de los datos de ¹H y ¹³C RMN (Tabla 3) junto con el espectro gHSQC, revelaron la presencia de dos restos CH₃CH-, un grupo metilo singlete, dos grupos metileno multiplete, un metileno oxigenado, un grupo ácido carboxílico y una olefina trisustituida. El grupo carboxilo y la olefina explicaban los 2 grados de insaturación calculados, por lo tanto, el compuesto **9** se trataba de un compuesto acíclico.

El análisis del espectro gCOSY permitió la asignación de un sistema de espín aislado correspondiente a C3-C8/C9/C10/C11, donde H-3 y H₃-9 mostraban una constante de acoplamiento alílica ($J_{3-9}=1,5$ Hz). Estos datos, junto con las correlaciones observadas en el experimento gHMBC de H-3 y H₃-9 con el ácido carboxílico, confirmaron la estructura del compuesto **9** tal y como se muestra en la Fig. 13.

Para definir la configuración relativa de este compuesto se estudiaron los dos posibles diastereoisómeros mediante el método DP4+, obteniendo la mejor coincidencia para el isómero *4R**, *6S** con una probabilidad superior al 99%. Esta propuesta se vio respaldada por las correlaciones NOESY observadas entre H4-H9 y H4-H11 (Fig. 16).

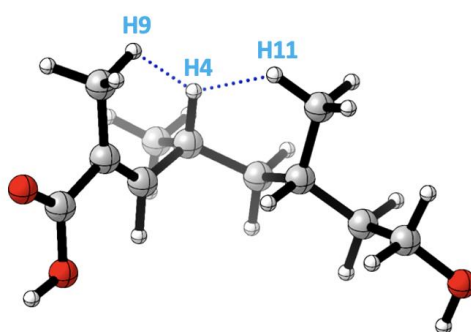


Figura 16. Conformación de mínima energía para el compuesto **9**. Las líneas discontinuas representan correlaciones NOESY.

Tabla 3. Datos de RMN del compuesto **9** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ_H , ppm (J en Hz)	δ_C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		172.9, C		
2		125.9, C		
3	6.63, (dd, 1.5, 10.3)	150.6, CH	4, 9	C-1, 2, 4, 5, 9, 10
4	2.65, m	31.2, CH	3, 5b, 10	C-2, 3, 5, 10
5a	1.19, m	44.6, CH ₂	5b, 6	C-3, 4, 6, 7, 10, 11
5b	1.35*		4, 5a, 6	C-3, 4, 6, 7, 10, 11
6	1.48*	27.8, CH	5a, 7a, 11	C-5, 8
7a	1.36*	40.5, CH ₂	6, 7b, 8	C-5, 6, 8, 11
7b	1.53*		6, 7a, 8	C-5, 6, 8, 11
8	3.67, m	61.1, CH ₂	7a, 7b	C-6, 7
9	1.85, (d, 1.5)	12.4, CH ₃	3	C-1, 2, 3
10	1.00, (d, 6.6)	20.6, CH ₃	4	C-3, 4, 5
11	0.87, (d, 6.4)	19.6, CH ₃	6	C-5, 6, 7

* Señales solapadas

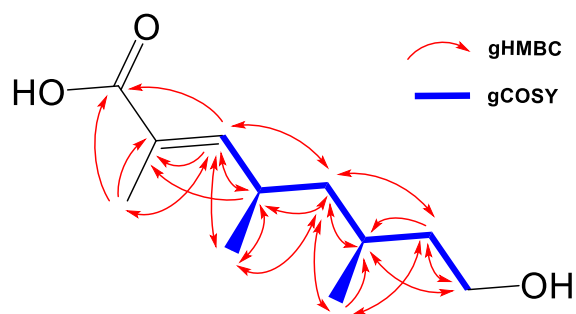


Figura 17. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **9**.

A continuación, se cultivó el hongo *P. opacum* en medio sólido de arroz, obteniéndose tres metabolitos secundarios adicionales (**10-12**), además de la mayoría de los compuestos aislados en la fermentación en condiciones estándar descritos anteriormente.

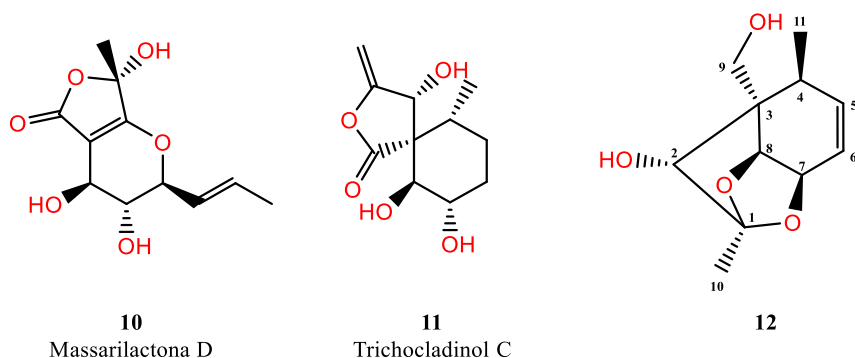


Figura 18. Metabolitos secundarios aislados de *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz.

A partir del extracto orgánico (40.1 g) se obtuvieron un total de doce fracciones (R^1F1 - R^1F12) mediante CPV, concentrándose los metabolitos secundarios de interés en la fracción R^1F8 -9, que se fraccionó mediante cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de CH_2Cl_2 /acetona para obtener 10 subfracciones (R^2F1 - R^2F10). El compuesto **10** (35.2 mg) se purificó mediante cromatografía líquida de fase reversa utilizando un gradiente de acetona/ H_2O a partir de la subfracción R^2F8 -10, mientras que los compuestos **11** (14.5 mg) y **12** (39.4 mg) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento a partir de las subfracciones R^2F7 y R^2F6 , respectivamente.

Los compuestos **10** y **11** se identificaron como massarilactona D¹¹⁴ y trichocladinol C,¹²⁹ respectivamente, por comparación con los datos descritos en la bibliografía, mientras que el compuesto **12** resultó ser un nuevo PN.

Este compuesto se obtuvo en forma de cristales incoloros y su fórmula molecular, C₁₁H₁₆O₄ (cuatro grados de insaturación), se determinó mediante HRESIMS y RMN. Los espectros de RMN 1D y 2D eran muy similares a los del compuesto **8**, salvo que el éster metílico presente en **8** se sustituía por un metileno oxigenado (δ_H 3.67, 3.76 y δ_C 59.8). Sin embargo, los cuatro grados de insaturación requeridos para esta molécula sugerían una estructura tricíclica. La acetilación del compuesto **12** con anhídrido acético y piridina produjo el derivado diacetilado **13** (figura 19), lo cual coincidía con el hecho de que el espectro ¹H RMN del compuesto **12** sólo mostrara 2 protones intercambiables (2-OH y 9-OH).

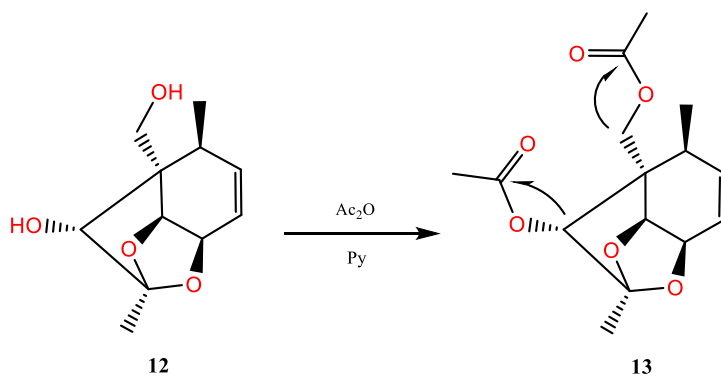


Figura 19. Acetilación de **12** con anhídrido acético y piridina para obtener **13**. Las flechas curvas representan correlaciones gHMBC.

Toda esta información, junto con el peso molecular del compuesto **12**, llevó a la conclusión de que el carbono C-1 debía estar unido mediante un puente éter a C-7, estableciendo un acetal cíclico. Por lo tanto, el compuesto **12** es una molécula tricíclica con anillos fusionados de ciclohexeno, tetrahydrofurano y dioxolano. La estructura de esta molécula se confirmó posteriormente por comparación con los datos descritos en la bibliografía para los trichocladinoles A y B,¹²⁹ que presentan el mismo esqueleto tricíclico.

Aunque este compuesto posee seis estereocentros, su estructura tricíclica sólo permite cuatro isómeros geoméricamente factibles, que fueron estudiados mediante el método DP4+ obteniendo una probabilidad del 98% para el isómero *1R**, *2R**, *3S**, *4S**, *7R**, *8S**. Esta propuesta coincide con la estructura del trichocladinol A y fue respaldada por la observación de correlaciones NOESY entre H2-H11, H4-H8 y H7-H8. Además, el compuesto **12** presenta una rotación óptica ($[\alpha]^{20}_D = +66.8^\circ$) similar en signo y magnitud a la del trichocladinol A ($[\alpha]^{20}_D = +78^\circ$), lo que indica que ambos compuestos comparten la misma configuración absoluta (*1R*, *2R*, *3S*, *4S*, *7R*, *8S*).

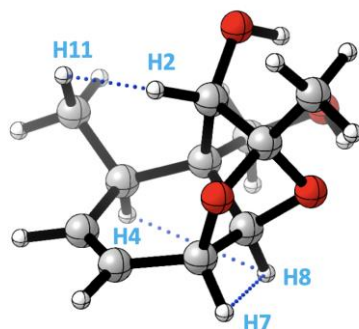


Figura 20. Conformación de mínima energía para el compuesto **12**. Las líneas discontinuas representan correlaciones NOESY.

Tabla 4. Datos de RMN del compuesto **12** en MeOH-*d*₄ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ_H , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ_C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		111.3, C		
2	3.68, s	78.8, CH		C-1, 8, 9
3		54.1, C		
4	2.73, (ddq, 7.4, 2.7, 2.4)	30.9, CH	5, 6, 11	C-2, 3, 5, 6, 9, 11
5	5.73, (dd, 2.4, 10.0)	138.2, CH	4, 6	C-3, 4, 7, 11
6	5.84, (ddd, 2.7, 5.2, 10.0)	124.1, CH	4, 5, 7	C-4, 7, 8
7	4.00, (dd, 5.2, 3.8)	70.5, CH	6, 8	C-3, 5, 8
8	4.40, (d, 3.8)	77.0, CH	7	C-1, 2, 7, 9
9a	3.67, (d, 11.8)	59.8, CH ₂	9b	C-2, 4, 8
9b	3.76, (d, 11.8)		9a	C-2, 4, 8
10	1.43, s	14.6, CH ₃		C-1, 2
11	1.14, (d, 7.4)	16.2, CH ₃	4	C-3, 4, 5
2-OH*	4.94, (d, 6.0)		2	C-1, 2, 3
9-OH*	4.52, (t, 5.3)		9a, 9b	C-3, 9

* Datos extraídos de mediciones en DMSO-*d*₆.

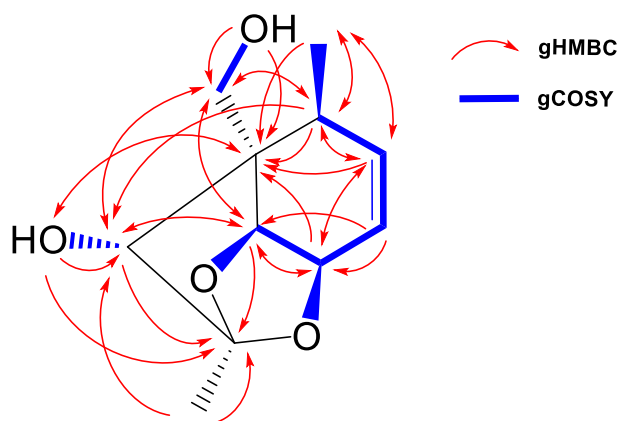


Figura 21. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **12**.

Siguiendo la estrategia OSMAC, se llevó a cabo una nueva fermentación de *P. opacum* en medio sólido, pero cambiando el arroz por trigo, lo que permitió el aislamiento de dos metabolitos secundarios adicionales (**14-15**) no observados en anteriores condiciones de cultivo.

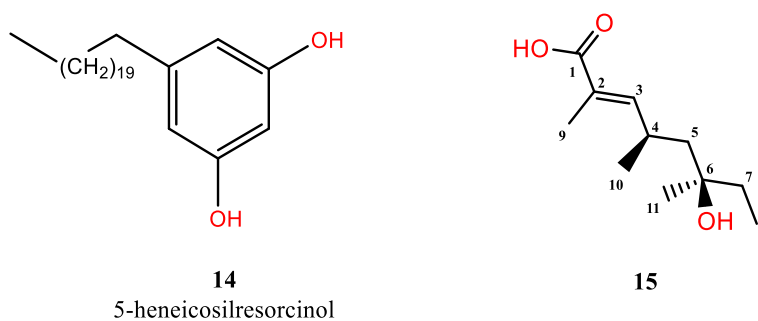


Figura 22. Metabolitos secundarios aislados de *P. opacum* en medio de cultivo sólido de trigo.

A partir del extracto orgánico del cultivo en trigo (21.4 g) se obtuvieron doce fracciones ($^{W1}F1$ - $^{W1}F12$) tras una CPV. El compuesto **14** (65.9 mg) se aisló de la fracción $^{W1}F4$ -5 tras purificación por cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de hexano/éter. Por otro lado, la fracción $^{W1}F6$ se fraccionó por cromatografía líquida de fase normal usando un gradiente de CH_2Cl_2 /acetona como fase móvil, seguido de un paso de purificación por HPLC semipreparativa con un gradiente de MeOH/ H_2O como sistema de elución, para obtener el compuesto **15** (6.4 mg).

El compuesto **14** resultó ser un derivado de resorcinol, 5-heneicosilresorcinol,¹³⁰ identificado por comparación con los datos publicados en bibliografía, mientras que el

compuesto **15** se trataba de un nuevo ácido graso no descrito previamente en la bibliografía.

El compuesto **15** se aisló como un aceite amarillento con fórmula molecular $C_{11}H_{20}O_3$ (dos grados de insaturación) determinada a partir de los datos de HRESIMS y RMN. Los datos de RMN del compuesto **15** (Tabla 5) eran muy similares a los del compuesto **9**, y el hecho de que ambos compuestos tuvieran la misma fórmula molecular reveló que se trataban de isómeros de posición.

La comparación de los datos de 1H y ^{13}C RMN entre estos dos compuestos reveló la presencia de un grupo metilo singlete unido a un carbono cuaternario oxigenado (δ_C 73.1) y un grupo metilo triplete adicional (CH_3-CH_2) en el compuesto **15**, en lugar del metileno oxigenado presente en **9**. Las correlaciones gHMBC de H_2-5 , H_2-7 , H_3-8 y H_3-11 con el carbono cuaternario oxigenado sugirieron su localización en C-6, estableciendo la estructura del compuesto **15** como se muestra en la Fig. 22.

La asignación de la estereoquímica de este tipo de moléculas (**9** y **15**) no es trivial, ya que su estructura acíclica permite una gran flexibilidad conformacional. Por ello, los resultados obtenidos tras el cálculo de la probabilidad DP4+ para los dos diastereoisómeros posibles no resultaron contundentes en este caso, obteniendo la mejor coincidencia para el isómero $4R^*$, $6R^*$ con una probabilidad >82%. Teniendo esto en cuenta, se asignó tentativamente la configuración relativa de este compuesto como $4R^*$, $6R^*$, configuración que parece respaldada por las correlaciones NOESY observadas entre H_4-H_9 y H_4-H_{11} .

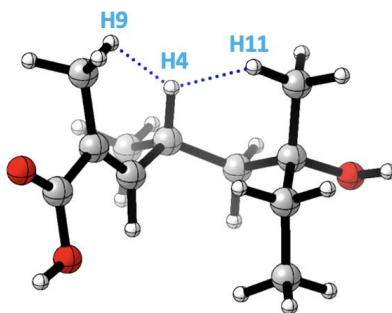
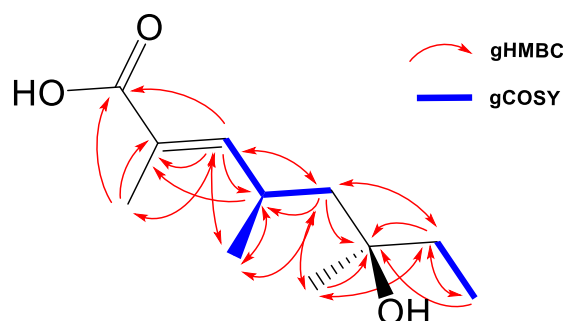


Figura 23. Conformación de mínima energía para el compuesto **15**. Las líneas discontinuas representan correlaciones NOESY.

Tabla 5. Datos de RMN del compuesto **15** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		173.1, C		
2		124.5, C		
3	6.78, (d, 10.2)	151.1, CH	4, 9	C-1, 2, 4, 5, 9, 10
4	2.75, m	29.5, CH	3, 5, 10	C-10
5	1.59, m	48.2, CH ₂	4	C-3, 4, 6, 7, 10, 11
6		73.1, C		
7	1.45, (q, 7.6)	35.1, CH ₂	8	C-5, 6, 8, 11
8	0.88, (t, 7.6)	8.3, CH ₃	7	C-6, 7
9	1.86, s	12.0, CH ₃	3	C-1, 2, 3
10	1.02, (d, 6.9)	21.6, CH ₃	4	C-3, 4, 5
11	1.12, s	26.4, CH ₃		C-5, 6, 7

**Figura 24.** Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **15**.

El siguiente paso en la estrategia OSMAC consistió en el estudio de la adición de inductores químicos al medio de cultivo. Estas moléculas, como se ha mencionado anteriormente, son capaces de desencadenar la alteración del perfil metabolómico del cultivo, al aparecer nuevos metabolitos o modificar el rendimiento de los que ya se producían en condiciones estándar.⁷²

En esta línea se llevaron a cabo nuevas fermentaciones del hongo *P. opacum*, esta vez añadiendo los inductores químicos 5-azacitidina y N-acetil-D-glucosamina, respectivamente, al medio de cultivo sólido en arroz. La adición de 5-azacitidina condujo al aislamiento de cuatro nuevos metabolitos secundarios no descritos previamente en la literatura (**16-19**), mientras que la adición de N-acetil-D-glucosamina, desencadenó la producción de massarilactona G (**20**)¹³¹ y de un diastereoisómero de trichocladinol C (**21**).

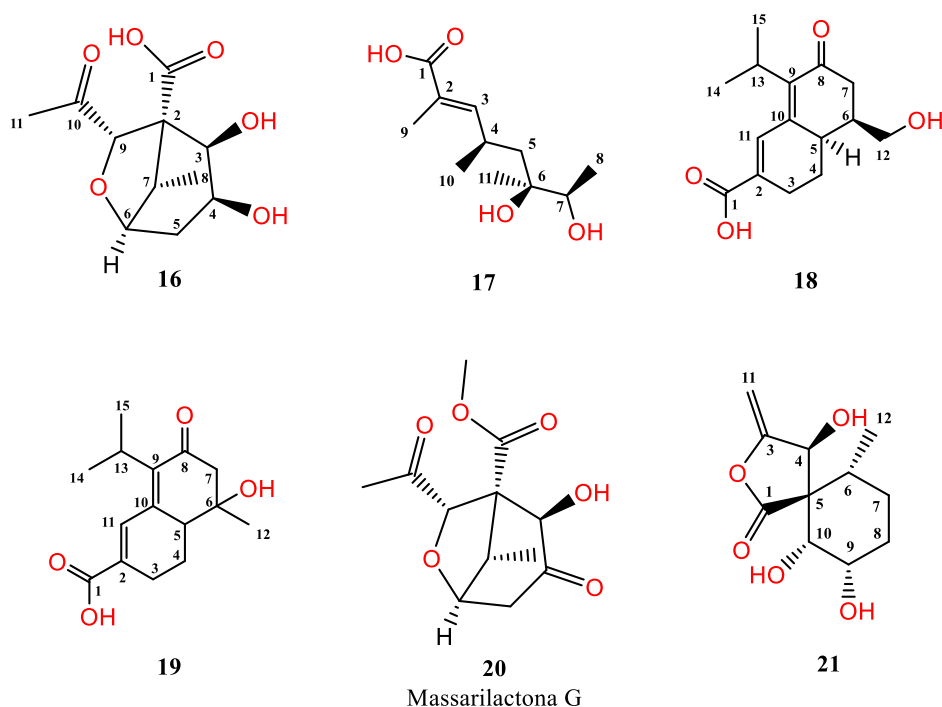


Figura 25. Metabolitos secundarios aislados de un cultivo sólido en arroz del hongo *P. opacum*, con la adición de los inductores químicos 5-azacitidina (**16-19**) y N-acetil-D-glucosamina (**20-21**).

Como en fermentaciones anteriores, a partir del extracto orgánico del cultivo sólido en arroz, con adición de 5-azacitidina, (45.8 g) se obtuvieron doce fracciones (A^1F1 - A^1F12) tras una CPV. A continuación, la fracción A^1F10 , se fraccionó por cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ para obtener 12 subfracciones (A^2F1 - A^2F12). El compuesto **16** (27.1 mg) se aisló de la subfracción A^2F4 tras purificación por cromatografía líquida de fase normal con un gradiente de CH_2Cl_2 /acetona, mientras que el compuesto **17** (1.3 mg) se obtuvo de la subfracción A^2F10 tras purificación por HPLC semipreparativa utilizando un gradiente de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$. La fracción A^1F11 también se fraccionó, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la purificación del compuesto **17**, para obtener los compuestos **18** (4.4 mg) y **19** (2.1 mg).

Cuando se lleva a cabo un cultivo sólido en arroz, pero con adición de N-acetil-D-glucosamina, se obtiene un extracto orgánico (67.4g), del que, siguiendo el mismo procedimiento de CPV, se obtienen 12 fracciones. De las fracciones N^1F6 -7, se aíslan los compuestos **20** (9.3 mg) y **21** (49.4 mg). La purificación de estos compuestos se realizó

mediante cromatografía líquida de fase normal con un gradiente de CH₂Cl₂/acetona, seguida de HPLC semipreparativa utilizando un gradiente de MeOH/H₂O.

El compuesto **16** se aisló como un aceite incoloro y el análisis de los resultados obtenidos por HRESIMS y RMN determinaron su fórmula molecular como C₁₁H₁₆O₆ (cuatro grados de insaturación). El estudio inicial del espectro de ¹H RMN de **16**, reveló claras similitudes estructurales con massarilactona C (**3**), aislada de la fermentación en condiciones estándar, pero en lugar del éster metílico (δ_H 3,73, δ_C 52,2) presente en massarilactona C, el compuesto **16** mostraba un grupo ácido carboxílico libre. El análisis de los espectros de RMN 2D confirmaron que el resto de la molécula era idéntico al de massarilactona C.

El análisis computacional mediante el método mix-J-DP4 permitió asignar la configuración relativa de este compuesto como 2*S**, 3*R**, 4*S**, 6*R**, 7*S** y 9*S** con una probabilidad superior al 90%, configuración confirmada por la probabilidad obtenida mediante el método DP4+ (>99%). Las correlaciones NOESY observadas entre 3OH-4OH, H3-H7 y H6-H8 reforzaron la estereoquímica propuesta, la cual coincidía con la de massarilactona C. Además, ambos compuestos presentan valores de rotación del mismo signo y magnitud, (massarilactona C: $[\alpha]^{20}_D = +105.9^\circ$; compuesto 16: $[\alpha]^{20}_D = +104.2^\circ$), sugiriendo la misma configuración absoluta, por lo que la estructura tridimensional del compuesto **16** quedó claramente definida como se muestra en la Fig. 25.

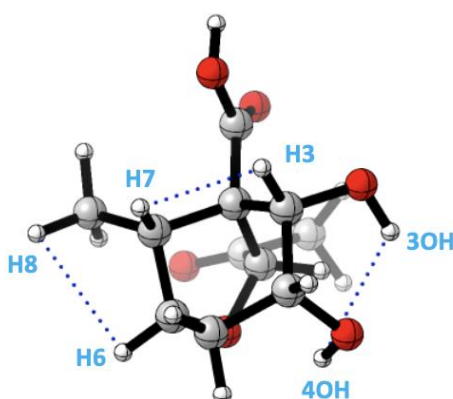
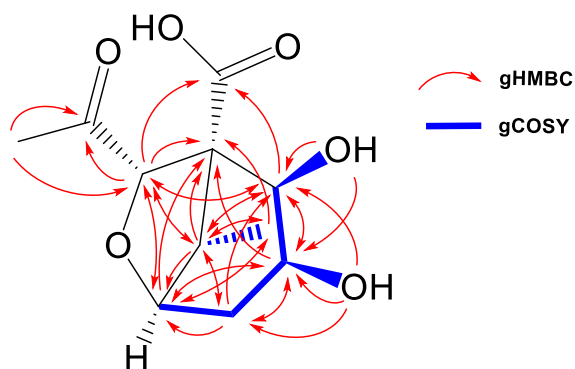


Figura 26. Conformación de mínima energía para el compuesto **16**. Las líneas discontinuas representan correlaciones NOESY.

Tabla 6. Datos de RMN del compuesto **16** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		171.0, C		
2		64.6, C		
3	4.13, (dd, 5.6)	73.7, CH	4, 3-OH	C-1, 4, 7, 9
4	4.19, m	66.5, CH	3, 4-OH, 5a	C-2, 3, 5, 6
5a	1.85, (ddd, 1.3, 5.6, 15.7)	38.3, CH ₂	4, 5b	C-4, 7
5b	2.25, (dd, 15.7, 3.8)		5a, 6	C-3, 4, 6, 7
6	4.23, (dd, 3.8, 1.3)	81.1, CH	5b	C-2, 4, 8, 9
7	1.90, (q, 7.0)	45.8, CH	8	C-2, 3, 5, 6, 8, 9
8	1.06, (d, 7.0)	15.2, CH ₃	7	C-2, 6, 7
9	5.10, s	81.6, CH		C-1, 2, 3, 6, 7, 10
10		206.9, C		
11	2.20, s	28.8, CH ₃		C-9, 10
3-OH	4.04, (d, 5.6)		3	C-3, 4
4-OH	3.10, (d, 3.5)		4	C-3, 4, 5

**Figura 27.** Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **16**.

El compuesto **17** se obtuvo como un aceite incoloro con fórmula molecular C₁₁H₂₀O₄ (dos grados de insaturación) según los datos de HRESIMS y RMN. Los datos de RMN (Tabla 7) eran muy similares a los del compuesto **15**, con la diferencia de la presencia de un nuevo grupo metino (δ_H 3.58, δ_C 74.8) en lugar del metileno en C-7 de **15**, lo que sugería la presencia de un grupo hidroxilo en esta posición. El metilo doblete C-8, junto con el oxígeno adicional presente en la fórmula molecular del compuesto **17**, confirmaron esta propuesta. El análisis detallado de los espectros de RMN 2D del compuesto, confirmó que el resto de la molécula era idéntica a la de **15**.

Para determinar la configuración relativa de este compuesto se estudiaron los cuatro posibles diastereoisómeros utilizando el método DP4+, obteniéndose la mejor

coincidencia entre los datos calculados y los experimentales para el isómero con la configuración $4R^*$, $6S^*$, $7R^*$, con una probabilidad >99%, lo que concuerda con la estereoquímica propuesta anteriormente para los compuestos **9** y **15**, muy relacionados estructuralmente.

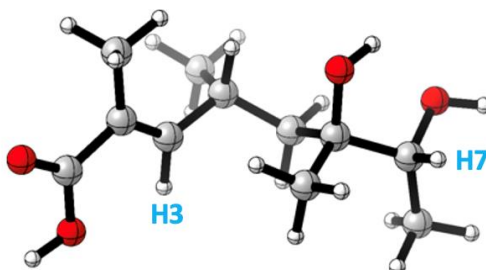


Figura 28. Conformación de mínima energía para el compuesto **17**.

Tabla 7. Datos de RMN del compuesto **17** en CDCl_3 a 400 (^1H) y 100 (^{13}C) MHz

no.	δ_{H} , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ_{C} , ppm	gCOSY	gHMBC
1		172.4, C		
2		124.6, C		
3	6.82, (d, 10.2)	151.3, CH	4, 9	C-1, 4, 9
4	2.81, m	29.4, CH	3, 5, 10	
5a	1.49, (dd, 14.4, 3.3)	42.3, CH_2	4, 5b	C-3, 4, 10
5b	1.76, (dd, 14.4, 10.0)		4, 5a	C-3, 4, 6, 11
6		75.2, C		
7	3.58, (q, 6.3)	74.8, CH	8	C-5, 6, 8, 11
8	1.14, (d, 6.3)	17.4, CH_3	7	C-6, 7
9	1.89, (d, 1.1)	12.2, CH_3	3	C-1, 2, 3
10	1.05, (d, 6.8)	21.6, CH_3	4	C-3, 4, 5
11	1.15, s	23.7, CH_3		C-5, 6, 7

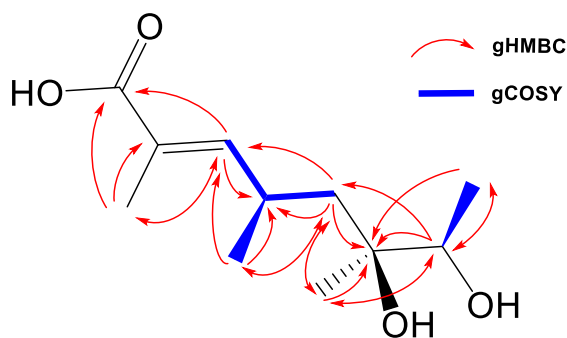


Figura 29. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **17**.

El compuesto **18**, se aisló como un sólido amorfo incoloro con fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$, (seis grados de insaturación). Los espectros 1H y ^{13}C RMN, junto con los experimentos gCOSY y gHSQC, revelaron la presencia de dos grupos metilo doblete y un metino septuplete formando un resto de isopropilo, cuatro grupos metileno, uno de ellos oxigenado, dos grupos metino, una olefina trisustituida, tres carbonos cuaternarios olefínicos (δ_c 137.1, 142.8 y 146.0) y dos grupos carbonilo, una cetona (δ_c 199.9) y un ácido carboxílico (δ_c 169.1). Aún quedaban dos grados de insaturación sin justificar, por lo que la molécula debía ser bicíclica. El experimento gCOSY permitió asignar dos sistemas de espín aislados correspondientes a C3-C7/C12 y C13/C14/C15, y el análisis exhaustivo de todas las correlaciones observadas en gHMBC (Tabla 8) concluyó que la estructura del compuesto **18** consistía en un esqueleto fusionado de ciclohexeno-ciclohexenona. Las correlaciones gHMBC de H-13 con C-8, C-9 y C-10, anclaron el grupo isopropilo a C-9, mientras que las correlaciones de H-11 y H₂-3 con el carbono del ácido carboxílico (δ_c 169.1), situaron este grupo anclado en la posición C-2. Por último, las correlaciones de H₂-12 con C-5, C-6 y C-7, confirmaron la presencia del metileno H₂-12 unido a la posición C-6. El resto de correlaciones gHMBC confirmaron la estructura propuesta para el compuesto **18**.

El análisis computacional mix-J-DP4 para determinar la configuración relativa de este compuesto arrojó el mejor resultado para el isómero con configuración *5R**, *6R**, con una probabilidad superior al 99%.

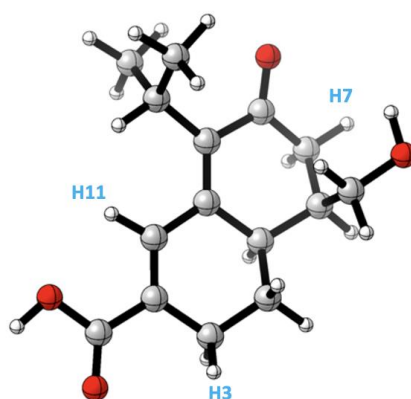


Figura 30. Conformación de mínima energía para el compuesto **18**.

Por su parte, el compuesto **19**, se aisló como un sólido amorfo amarillento y el análisis de los resultados obtenidos por HRESIMS y RMN determinaron su fórmula molecular como C₁₅H₂₀O₄ (seis grados de insaturación). El estudio inicial de los espectros de RMN 1D y 2D de **19**, reveló claras similitudes estructurales con **18** y el hecho de que ambos compuestos tuvieran la misma fórmula molecular reveló que se trataban de isómeros de posición.

La comparación de los datos de ¹H y ¹³C RMN de estos compuestos, reveló la presencia en el compuesto **19** de un nuevo grupo metilo singlete (δ_H 1.05, δ_C 20.4) unido a un carbono cuaternario oxigenado (δ_C 71.5), en lugar del metileno oxigenado presente en el compuesto **18**. Esto sugería el desplazamiento del grupo hidroxilo unido al metileno en **18**, al carbono C-6. Las correlaciones gHMBC de H-5 y H₂-7 con el carbono cuaternario oxigenado y del nuevo metilo H₃-12 con C-5, C-6 y C-7 confirmaron esta suposición, estableciendo la estructura de **19** como se muestra en la Fig. 25.

Tabla 8. Datos de RMN de los compuestos **18** y **19** en CDCl₃ + MeOH-*d*₄ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	Compuesto 18				Compuesto 19			
	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		169.1, C				169.0, C		
2		137.1, C				138.3, C		
3a	2.30, m*	25.5, CH ₂	3b, 4a, 4b	C-1, 2, 5, 11	2.28, m*	25.0, CH ₂	3b, 4a	C-2, 11
3b	2.68, m*		3a, 4a, 4b	C-1, 2, 5, 11	2.70, m		3a, 4a, 4b	C-2, 4, 5, 11
4a	1.60, (qd, 13.0, 4.7)	26.8, CH ₂	3a, 3b, 4b, 5		1.34, (qd, 13.4, 5.3)	21.8, CH ₂	3a, 3b, 4b, 5	C-3, 5, 10
4b	1.85, m		3a, 3b, 4a, 5		2.23, m*		3b, 4a, 5	C-2, 3, 10
5	2.72, m*	38.5, CH	4a, 4b, 6	C-4, 6, 9, 12	2.48, (dd, 13.4, 2.7)	47.3, CH	4a, 4b	C-4, 6, 9, 10
6	2.30, m*	39.8, CH	5, 7a, 7b, 12a, 12b			71.5, C		
7a	2.48, (dd, 16.3, 5.1)	42.2, CH ₂	6, 7b	C-5, 8, 12	2.54, s	55.5, CH ₂		C-5, 6, 8, 9, 12
7b	2.75, m*		6, 7a	C-5, 8, 12				
8		199.9, C				199.1, C		
9		142.8, C				141.8, C		
10		146.0, C				146.6, C		
11	7.72, (d, 2.5)	133.1, CH	3a	C-1, 2, 3, 5, 9, 10	7.70, s	132.6, CH		C-1, 2, 3, 5, 9, 10
12a	3.46, (dd, 4.8, 11.1)	60.0, CH ₂	6, 12b	C-5, 6, 7	1.05, s	20.4, CH ₃		C-5, 6, 7
12b	3.69, (dd, 9.0, 11.1)		6, 12a	C-5, 6, 7				
13	3.17, (sp, 7.1)	26.8, CH	14, 15	C-8, 9, 10, 14, 15	3.17*	26.6, CH	14, 15	C-8, 9, 10, 14, 15
14	1.18, (d, 7.1)	21.3, CH ₃	13	C-9, 13, 14	1.17, (d, 7.1)	21.2, CH ₃	13	C-9, 13, 14
15	1.15, (d, 7.1)	20.9, CH ₃	13	C-9, 13, 15	1.14, (d, 7.1)	20.6, CH ₃	13	C-9, 13, 15

* Señales solapadas

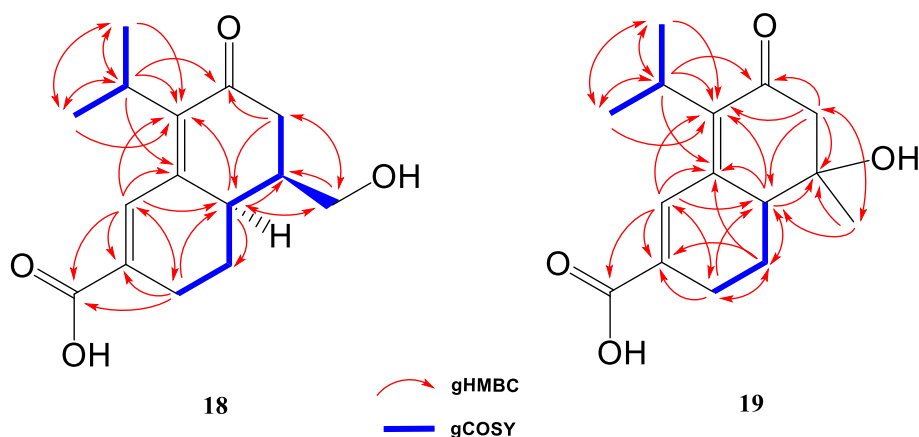


Figura 31. Correlaciones gCOSY y gHMBC de los compuestos **18** y **19**.

El compuesto **21**, producido por el hongo *P. opacum* cuando se añadió el inductor químico N-acetil-D-glucosamina al medio de cultivo sólido en arroz, se aisló como un aceite incoloro con fórmula molecular $C_{11}H_{16}O_5$, determinada a partir de los datos de HRESIMS y RMN. En un primer análisis, este compuesto parecía ser trichocladinol C (**11**) en base a la similitud de sus fórmulas moleculares y las correlaciones observables en los espectros de RMN 2D. Sin embargo, el espectro 1H RMN mostraba diferencias significativas en algunos desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento, lo que parecía sugerir que **21** se trataba de un diastereoisómero de trichocladinol C.

El estudio de esta molécula mediante el método DP4+ para determinar su configuración relativa, reveló una configuración $4S^*$, $5S^*$, $6R^*$, $9S^*$, $10R^*$, con una probabilidad >99%, en contraste con la configuración $4R$, $5R$, $6R$, $9S$, $10S$ de trichocladinol C. Además, las correlaciones NOESY observadas entre H12-H4 y H6-H9-H7b respaldaron la estructura propuesta para este nuevo compuesto.

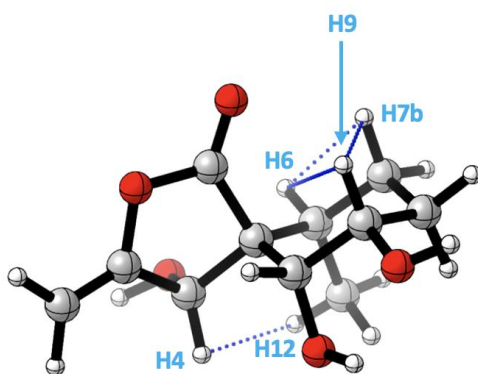


Figura 32. Conformación de mínima energía para el compuesto **21**. Las líneas discontinuas representan correlaciones NOESY.

Tabla 9. Datos de RMN del compuesto **21** en MeOH-*d*₄ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ_H , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ_C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		178.5, C		
3		159.7, C		
4	5.42, (t, 2.5)	69.4, CH	11a, 11b	C-3, 5, 6, 10, 11
5		57.1, C		
6	1.75, (ddq, 4.3, 7.0, 13.7)	40.4, CH	7a, 7b, 12	C-1, 4, 5, 7, 8, 10, 12
7a	1.31, (dtd, 2.3, 4.8, 13.7)	26.0, CH ₂	6, 7b, 8a, 8b	C-5, 6, 8, 9, 12
7b	1.97, (qd, 4.3, 13.7)		6, 7a, 8a, 8b	C-5, 6, 8, 9, 12
8a	1.61, (tdd, 2.4, 4.8, 13.7)	31.7, CH ₂	7a, 7b, 8b, 9	C-6, 7
8b	1.87, (dtd, 2.3, 3.9, 13.7)		7a, 7b, 8a, 9	C-6, 9, 10
9	4.02, (dt, 2.4, 3.9)	71.2, CH	8a, 8b, 10	C-5, 7, 8, 10
10	3.83, (d, 2.4)	72.9, CH	9	C-1, 4, 5, 6, 8, 9
11a	4.57, (t, 2.5)	87.0, CH ₂	4, 11b	C-3, 4
11b	4.70, (t, 2.5)		4, 11a	C-3, 4
12	1.08, (d, 7.0)	17.1, CH ₃	6	C-5, 6, 7

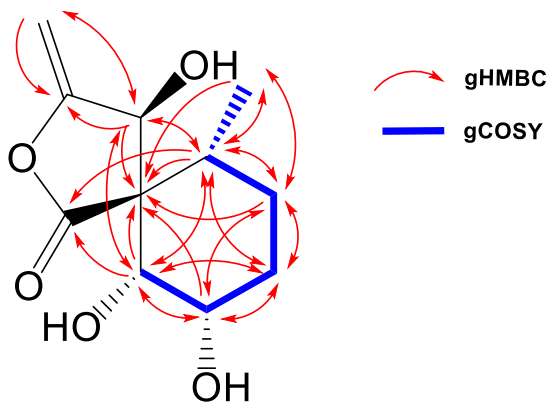


Figura 33. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **21**.

Por último, siguiendo la estrategia OSMAC se realizó un estudio exhaustivo sobre el efecto de las interacciones microbianas en la producción de nuevos metabolitos secundarios. Para ello, se probó el cocultivo a escala reducida del hongo *P. opacum* con distintos microorganismos (hongos y actinomicetos), en diferentes medios de cultivo líquidos y sólidos, seleccionando el cocultivo entre *P. opacum* y el hongo *Echinocatena sp.*, en medio de cultivo PDA sólido, para llevarlo a cabo a mayor escala. Como resultado de este cocultivo, se aislaron cinco metabolitos secundarios adicionales derivados de antraquinona y benzofenona (**22-26**), que no se habían producido en ninguna de las fermentaciones anteriores (Figura 34).

Las antraquinonas constituyen un grupo químico con alto potencial biológico y en numerosos estudios se han relacionado con una potente actividad antibiótica, lo que podría sugerir una posible reacción del hongo productor ante la presencia de un segundo microorganismo en el cocultivo.

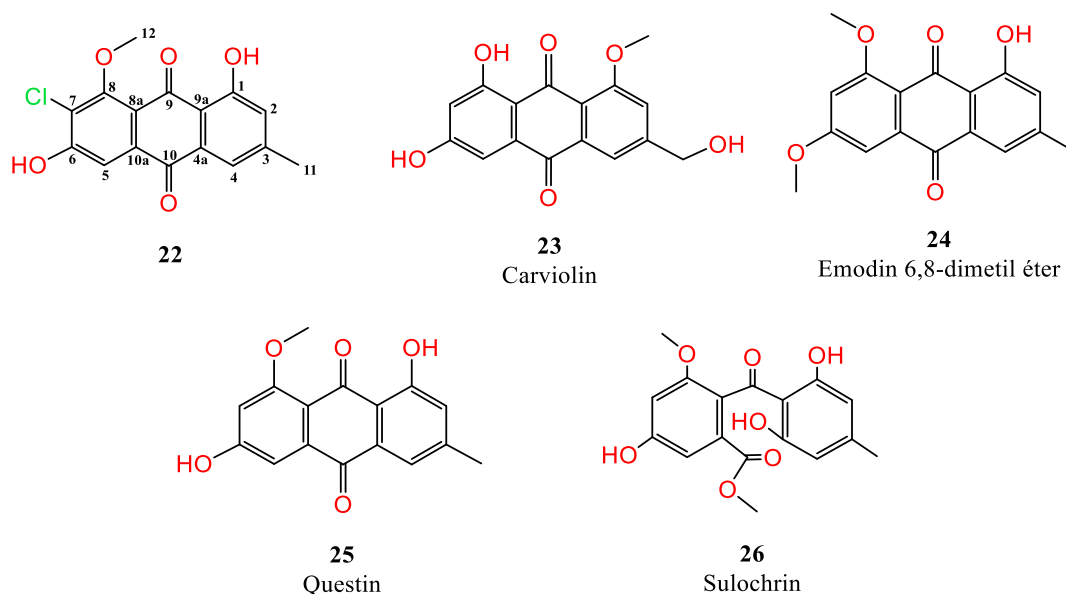


Figura 34. Metabolitos secundarios aislados del cocultivo entre *P. opacum* y *Echinocatena sp.* en medio de cultivo PDA sólido.

El aislamiento de estos compuestos (**22-26**), se llevó a cabo como se describe a continuación. La fracción ^{C1}F5-6, obtenida a partir del extracto orgánico del cocultivo (2.23 g) tras un paso de cromatografía CPV, se fraccionó mediante cromatografía líquida

de fase normal utilizando un gradiente de hexano/EtOAc (C^2F1 - C^2F14) para obtener los compuestos **21** (4.5 mg), **24** (46.4 mg) y **25** (29.3 mg), mientras que las fracciones C^2F13 y C^2F5 se purificaron mediante HPLC semipreparativa usando un gradiente de MeOH/H₂O aislándose los compuestos **22** (3.9 mg) y **23** (7.8 mg), respectivamente.

Los compuestos **23-26** se identificaron como carviolin (**23**),¹³² emodin 6,8-dimetil éter (**24**),¹³³ questin (**25**),¹³⁴ sulochrin (**26**),¹³⁵ tras un exhaustivo análisis espectroscópico y la comparación con los datos publicados en la bibliografía. El compuesto **22** resultó ser una nueva antraquinona natural no descrita anteriormente en la literatura.

El compuesto **22** se aisló como un sólido amorfo amarillo. El análisis del espectro obtenido por HRESIMS reveló la presencia de un ion molecular con una relación m/z 341.0137 ([M+Na]⁺) y un pico isotópico a m/z 343.0108 con una relación 3:1, lo que sugirió la presencia de un átomo de Cl en la molécula, determinando C₁₆H₁₁ClO₅ como fórmula molecular (once grados de insaturación). La comparación de los espectros ¹H y ¹³C RMN de este compuesto con los de questin (**25**) mostró la similitud entre estas dos moléculas, siendo la única diferencia la eliminación del protón aromático H-7, que aparece sustituido en el compuesto **22** por un átomo de cloro. La correlación gHMBC de H-5 con el nuevo carbono cuaternario aromático C-7 (δ_c 122.7), estableció claramente la posición del átomo de cloro, quedando la estructura de **22** claramente definida como se muestra en la figura 34.

Tabla 10. Datos de RMN del compuesto **22** en DMSO-*d*₆ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm	δ _C , ppm	gHMBC
1		161.8, C	
2	7.15, s	124.1, CH	C-1, 4, 9a, 11
3		146.9, C	
4	7.43, s	119.2, CH	C-2, 9a, 10, 11
4a		132.1, C	
5	7.43, s	111.8, CH	C-7, 8a, 10, 10a
6		159.4, C**	
7		122.7, C*	
8		158.8, C	
8a		115.9, C*	
9		185.4, C	
9a		114.6, C	
10		182.1, C	
10a		133.9, C	
11	2.39, s	21.4, CH ₃	C-2, 3, 4
12	3.85, s	60.7, CH ₃	C-8
1-OH	13.2, s		C-1, 2, 9a

* Desplazamientos químicos asignados a través del espectro 2D gHMBC.

** Datos extraídos de mediciones en CDCl₃.

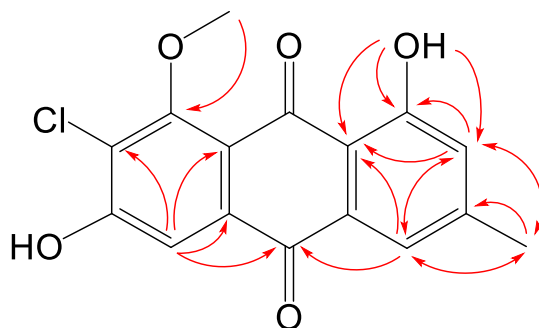


Figura 35. Correlaciones gHMBC del compuesto **22**.

Como conclusión, la fermentación axénica del hongo *Pleotrichocladium opacum* en medio JSA produjo nueve PNs (**1-9**), incluidos dos compuestos nuevos (**8** y **9**). Al cambiar a un medio de cultivo sólido en arroz, se obtuvieron tres compuestos adicionales (**10-12**), siendo el compuesto **12** un nuevo trichocladinol. El cambio de arroz por trigo dio lugar a la producción de dos metabolitos secundarios adicionales (**14** y **15**), siendo el compuesto **15** un nuevo ácido graso de cadena corta. La adición del modificador epigenético 5-azacitidina al medio sólido de arroz provocó la producción de otros cuatro

nuevos PNs (**16-19**), una nueva massarilactona, un nuevo ácido graso de cadena corta y dos nuevos sesquiterpenos, respectivamente, mientras que la adición del inductor químico N-acetil-D-glucosamina al medio sólido de arroz, indujo la producción de dos compuestos adicionales (**20-21**), donde el compuesto **21** resultó ser un diastereoisómero de trichocladinol C, no descrito previamente en la bibliografía. Finalmente, el cocultivo del hongo *Pleotrichocladium opacum* con *Echinocatena sp.* en medio PDA sólido, condujo a la obtención de cinco PNs adicionales (**22-26**), siendo el compuesto **22** un nuevo derivado de antraquinona.

El número de compuestos aislados y el alto porcentaje de estructuras novedosas confirman la estrategia OSMAC como un método sencillo y eficaz para inducir el metabolismo secundario de los microorganismos, activando rutas biosintéticas silenciadas en condiciones estándar, lo que se traduce en la biogénesis de nuevos metabolitos secundarios.

Los buenos resultados obtenidos con el hongo *Pleotrichocladium opacum*, nos animaron a repetir la estrategia con el resto de los microorganismos seleccionados.

3.2.2. HL-102-24-R04 (*Beauveria felina*)

El hongo *B. felina*, aislado de una muestra de sedimento marino recolectada en Euskadi (España), fue inicialmente cultivado en medio MI/2 (condiciones estándar de fermentación) consiguiendo el aislamiento de cuatro PNs (**27-30**) (figura 36), entre los que se incluían dos compuestos nuevos (**29** y **30**).

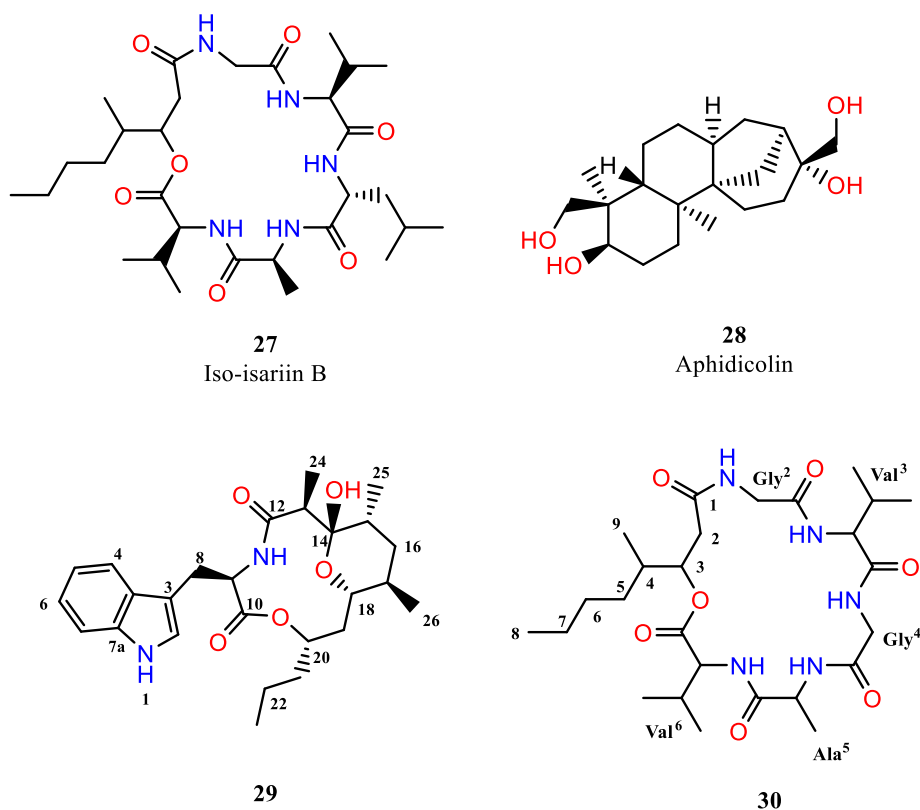


Figura 36. Metabolitos secundarios aislados de *B. felina* en medio de cultivo MI/2 (condiciones estándar de fermentación).

El extracto orgánico de esta fermentación (11.75 g) se fraccionó mediante cromatografía CPV, siguiendo el procedimiento estándar descrito en el apartado de Materiales y métodos, obteniendo 12 fracciones (¹F1-¹F12), de las cuales ¹F4-5 y ¹F9-10 contenían compuestos sin desreplicación química frente a la colección de compuestos puros de BMT. La fracción ¹F9-10 fue sometida a cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH como fase móvil, para obtener los compuestos **27** (732 mg), **28** (64.5 mg) y **30** (12.8 mg). Este último, requirió un paso adicional de cromatografía de fase reversa utilizando un gradiente de MeOH/H₂O. Por último, el compuesto **29** (178 mg) se aisló de la fracción ¹F4-5 mediante cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de hexano/éter.

Los compuestos **27** y **28** se identificaron como iso-isariin B¹⁰⁷ aphidicolin,¹³⁶ respectivamente, por comparación de sus espectros de HRESIMS y RMN con los descritos en la bibliografía.

El compuesto **29** se obtuvo como un sólido amorfo blanco con fórmula molecular $C_{26}H_{36}N_2O_5$ (diez grados de insaturación) según los datos de HRESIMS y RMN.

El análisis de los espectros 1H y ^{13}C RMN (Tabla 11), junto con el espectro gHSQC, reveló la presencia de tres grupos metilo doblete (CH_3CH-) y uno triplete (CH_3CH_2-), cinco metilenos, tres metinos apantallados (unidos a CH_3), tres metinos unidos a heteroátomo, que por sus desplazamientos químicos debían ser dos oxígenos (δ_H 3.63, δ_C 76.0; δ_H 4.79, δ_C 77.1) y un nitrógeno (δ_H 3.75, δ_C 57.6), cinco hidrógenos aromáticos y tres intercambiables, además de seis carbonos cuaternarios, tres aromáticos, dos carbonilos (δ_C 169.5 y 180.0) y uno hemiacetalico (δ_C 100.3).

El análisis del espectro gCOSY permitió asignar cinco sistemas de espín aislados correspondientes a C4-C7, 1NH-C2, C8-C9/11NH, C13/C24 y C15-C23/C25/C26.

Por una parte, los sistemas de espín C4-C7, 1NH-C2 y C8-C9/11NH y las correlaciones de estos hidrógenos en el espectro gHMBC (Tabla 11), permitieron identificar un residuo de triptófano en la molécula, mientras que el sistema de espín C15-C23/C25/C26, junto con las correlaciones de H-18 con C-14 y de 14-OH con C-13, C-14 y C-15 establecieron un anillo de oxano pentasustituido, donde C-14 es un carbono hemiacetalico.

La información recabada hasta ahora daba cuenta de nueve de los diez grados de insaturación requeridos por la fórmula molecular del compuesto **29**, lo que indicaba que el compuesto presentaba una estructura tetracíclica.

Finalmente, las correlaciones en el espectro gHMBC de H-9 y 11NH con C-12, de H-20 con C-10 y de H₃-24 con C-12, C-13 y C-14, permitieron establecer la estructura plana de la molécula, formando un ciclo adicional de 11 miembros (1,8-dioxo-4-azacicoundecano-2,5-diona), como se muestra en la Fig. 36.

El estudio de esta molécula mediante el método *J*-DP4 para determinar su configuración relativa, reveló una configuración *9R**, *13S**, *14S**, *15R**, *17R**, *18S**, *20S**, con una probabilidad >99%. Esta propuesta fue respaldada por la observación de correlaciones NOESY entre H13-H25, H16-H18-H20, H17-H19 y H-18-H26 (Fig. 37).

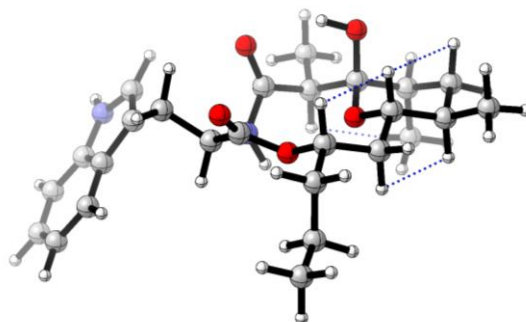


Figura 37. Conformación de mínima energía para el compuesto **29**. Las líneas discontinuas representan correlaciones NOESY.

Tabla 11. Datos de RMN del compuesto **29** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ_H , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ_C , ppm	gCOSY	gHMBC
1 (NH)	8.11, br d		2	C-2, 3, 3a, 7a
2	7.06, br d	123.3, CH	1	C-3, 3a, 7a, 8
3		112.9, C		
3a		127.7, C		
4	7.56, (d, 7.8)	118.9, CH	5	C-3, 3a, 5, 6, 7a
5	7.10, (t, 7.8)	119.4, CH	4, 6	C-3a, 6, 7
6	7.18, (t, 7.8)	122.0, CH	5, 7	C-4, 7a
7	7.35, (d, 7.8)	111.3, CH	6	C-3a, 5
7a		136.2, C		
8	3.50*, (dd, 4.4, 13.9) 3.71*, m	24.8, CH ₂	9	C-2, 3, 3a, 9, 10
9	3.75*, m	57.6, CH	8, 11	C-3, 8, 10, 12
10		169.5, C		
11 (NH)	6.07, (d, 5.7)		9	C-8, 9, 12
12		180.0, C		
13	2.37, (q, 6.9)	45.5, CH	24	C-12, 14, 24
14		100.3, C		
15	1.81*, m	32.1, CH	16, 25	C-14, 16, 25
16	1.32*, m 1.86*, m	35.6, CH ₂	15, 17	C-14, 15, 17, 18, 25, 26
17	1.45, m	29.6, CH	16, 18, 26	C-15, 16
18	3.63, (t, 10.2)	76.0, CH	17, 19	C-14, 16, 19, 20, 26
19	1.57*, m 1.76*, m	36.2, CH ₂	18, 20	C-17, 18, 20, 21
20	4.79, (q, 5.6)	77.1*, CH	19, 21	C-10, 18, 21, 22
21	1.57*, m	38.0, CH ₂	20, 22	C-19, 20, 22, 23
22	1.31*, m	18.3, CH ₂	21, 23	C-20, 21, 23
23	0.9, (t, 7.2)	14.2, CH ₃	22	C-21, 22
24	1.07, (d, 6.9)	10.4, CH ₃	13	C-12, 13, 14
25	0.92, (d, 7.2)	15.2, CH ₃	15	C-14, 15, 16
26	0.78, (d, 6.6)	17.7, CH ₃	17	C-16, 17, 18
14-OH	5.23, s			C-13, 14, 15

* Señales solapadas

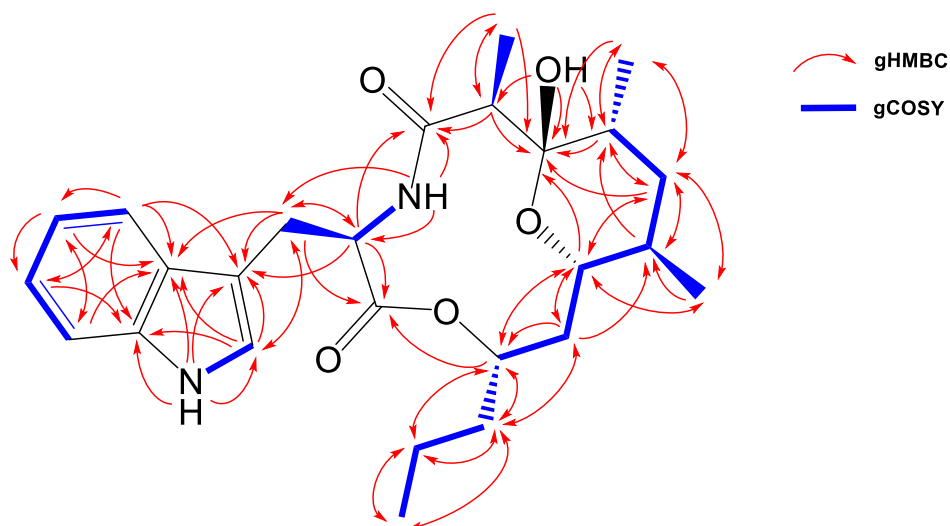


Figura 38. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **29**.

El compuesto **30** se obtuvo como un sólido amorfo blanquecino con fórmula molecular $C_{26}H_{45}N_5O_7$ (siete grados de insaturación) según los datos de HRESIMS y RMN.

La comparación de los datos de 1H y ^{13}C RMN de este compuesto con los de iso-isariin B (**27**) reveló claras similitudes estructurales entre estos dos compuestos, lo que sugería una estructura ciclodepsipeptídica. La observación de cinco protones amida en el espectro de 1H RMN, así como seis grupos carbonilo (δ_c 168.3-172.1) en el espectro de ^{13}C RMN, confirmaron dicha estructura. También se registraron señales adicionales en 1H y ^{13}C RMN que sugerían la presencia de una cadena alquílica idéntica a la de iso-isariin B.

La asignación de las señales de protón y carbono a los residuos de aminoácidos se realizó mediante experimentos gCOSY, gHSQC y gHMBC. Así, los cinco protones de grupos amida que resonaban a δ_H 7.51, 7.77, 7.80, 8.29 y 8.86 ppm presentaron correlaciones gCOSY con sus correspondientes CH o CH_2 en posición α (δ_H 4.0, 4.19, 3.51-4.12, 3.92 y 3.42-3.77 ppm, respectivamente). El resto de las correlaciones gCOSY y gHMBC condujeron a la identificación de las cadenas laterales de los aminoácidos. Así, se identificaron los residuos de aminoácidos glicina (Gly), valina (Val), glicina (Gly), alanina (Ala) y valina (Val).

La determinación de la secuencia peptídica se basó en los datos obtenidos en el experimento gHMBC. Así, los protones NH de Gly², Val³, Gly⁴, Ala⁵ y Val⁶ se

correlacionaron respectivamente con los carbonilos C-1, Gly², Val³, Gly⁴ y Ala⁵, dando lugar a la siguiente secuencia peptídica: Gly²-Val³-Gly⁴-Ala⁵-Val⁶. Adicionalmente, las correlaciones gHMBC de H₂-2 (δ_H 2.22, 2.56) con C-1 (δ_C 169.7), C-3 (δ_C 75.3) y C-4 (δ_C 76.2), así como la correlación gCOSY entre H₂-2 y el oximetino H-3 (δ_H 4.95) establecieron la posición de la cadena alquílica HMA¹ (ácido 3-hidroxi-4-metiloctanoico) adyacente al residuo Gly². Por último, la ausencia de correlación gHMBC entre el carbonilo del residuo Val⁶ y un protón amida sugirió la posición del enlace éster en esta posición, determinando la estructura del compuesto **30** como ciclo[HMA¹-Gly²-Val³-Gly⁴-Ala⁵-Val⁶], tal y como se muestra en la Fig. 36, difiriendo de la estructura de isosariin B en la sustitución del residuo de leucina por uno de glicina.

Tabla 12. Datos de RMN del compuesto **30** en DMSO-*d*₆ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
HMA¹				
1		169.7, C		
2	2.22, (d, 14.3) 2.56, (dd, 10.0, 14.3)	37.3, CH ₂	3	C-1, 3, 4
3	4.95*	75.3, CH	2, 4	
4	1.67, m	36.2, CH	3, 5, 9	
5	1.0* 1.37*	31.1, CH ₂	4	
6	1.12* 1.20*	28.9, CH ₂		
7	1.20*	22.5, CH ₂	8	C-6
8	0.84*	15.0, CH ₃	7	C-6, 7
9	0.82*	14.0, CH ₃	4	C-3, 4, 5
Gly²				
NH ²	7.80*		α ²	C-1
α ²	3.51, (dd, 6.5, 17.1) 4.12 (dd, 6.5, 17.1)	41.9, CH ₂	NH ²	CO ²
CO ²		169.3, C		
Val³				
NH ³	8.29, (d, 7.4)		α ³	α ³ , CO ²
α ³	3.92, (t, 7.4)	59.5, CH	NH ³ , β ³	β ³ , γ ³ , γ ³ , CO ³
β ³	1.89, m	29.2, CH	α ³ , γ ³ , γ ³	α ³ , γ ³ , γ ³ , CO ³
γ ³	0.9*	19.0, CH ₃	β ³	α ³ , β ³ , γ ³
γ ³	0.82*	19.0, CH ₃	β ³	α ³ , β ³ , γ ³
CO ³		172.1, C		
Gly⁴				
NH ⁴	8.86, (t, 6.0)		α ⁴	α ⁴ , CO ³
α ⁴	3.42, (dd, 6.0, 16.5) 3.77, (dd, 6.0, 16.5)	43.0, CH ₂	NH ⁴	CO ³ , CO ⁴
CO ⁴		168.3, C		
Ala⁵				
NH ⁵	7.77, (d, 7.1)		α ⁵	α ⁵ , CO ⁴
α ⁵	4.19, (qu, 7.1)	48.0, CH	NH ⁵ , β ⁵	CO ⁴ , CO ⁵ , β ⁵
β ⁵	1.23, (d, 7.1)	17.5, CH ₃	α ⁵	α ⁵ , CO ⁵
CO ⁵		171.9, C		
Val⁶				
NH ⁶	7.51, (br d, 6.3)		α ⁶	CO ⁵
α ⁶	4.0, (t, 6.3)	58.2, CH	NH ⁶ , β ⁶	β ⁶ , γ ⁶ , γ ⁶ , CO ⁶
β ⁶	2.05, m	29.2, CH	α ⁶ , γ ⁶ , γ ⁶	α ⁶ , γ ⁶ , γ ⁶ , CO ⁶
γ ⁶	0.87*	19.0, CH ₃	β ⁶	α ⁶ , β ⁶ , γ ⁶
γ ⁶	0.87*	17.7, CH ₃	β ⁶	α ⁶ , β ⁶ , γ ⁶
CO ⁶		170.7, C		

* Señales solapadas o mal definidas

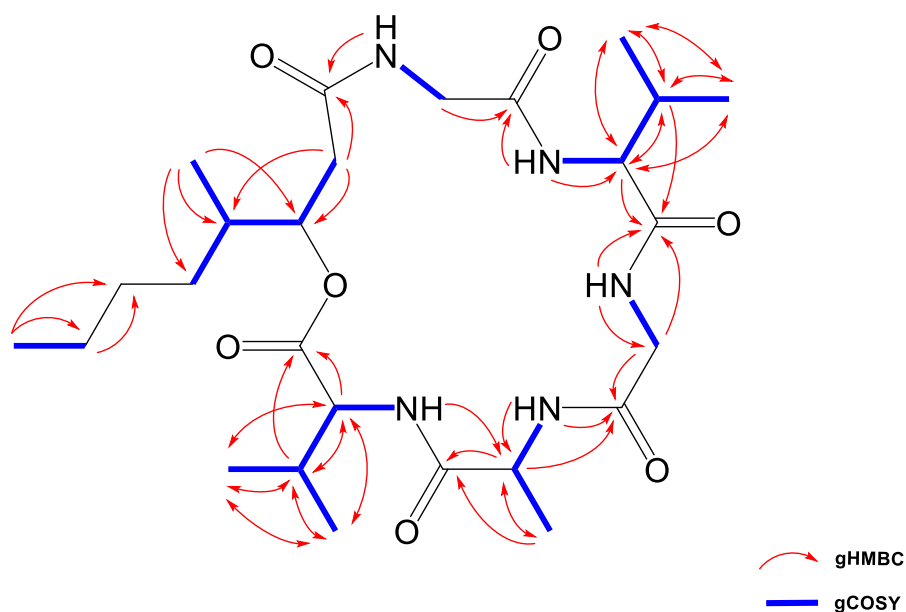


Figura 39. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **30**.

A continuación, se cultivó el hongo *B. felina* en medio HGA, obteniéndose seis metabolitos secundarios adicionales (**31-36**), además de la mayoría de los compuestos aislados en la fermentación en condiciones estándar descritos anteriormente.

A partir del extracto orgánico de este cultivo (6.24 g), se obtuvieron un total de doce fracciones ($^{H1}F1$ - $^{H1}F12$) mediante cromatografía CPV, concentrándose los metabolitos secundarios de interés en la fracción $^{H1}F10$ -11, que se fraccionó mediante cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, para obtener 12 subfracciones ($^{H2}F1$ - $^{H2}F12$). Los compuestos **31** (5.3 mg), **32** (58 mg), **35** (4.5 mg) y **36** (5.9 mg) se purificaron mediante cromatografía líquida de fase reversa utilizando un gradiente de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, a partir de la subfracción $^{H2}F4$, mientras que los compuestos **33** (4.3 mg) y **34** (5.7 mg) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento a partir de la subfracción $^{H2}F7$.

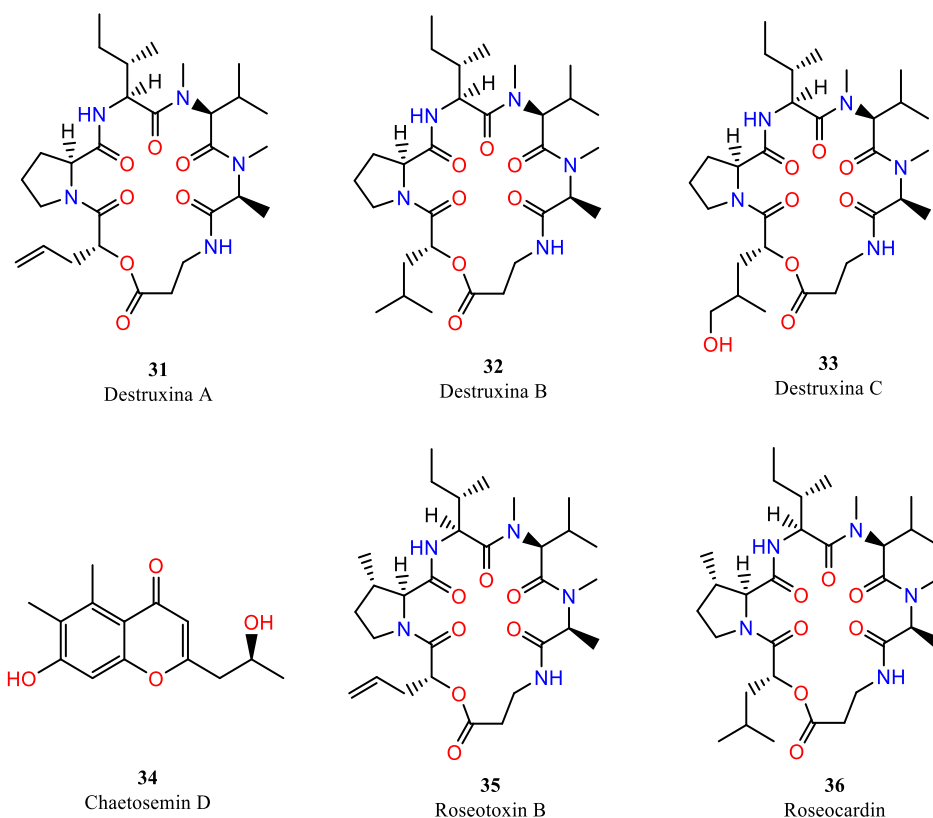


Figura 40. Metabolitos secundarios aislados de *B. felina* en medio de cultivo HGA.

Los compuestos **31-36** se identificaron como destruxinas A-C (**31-33**),¹³⁷ chaetosemin D (**34**),¹³⁸ roseotoxin B (**35**)¹³⁹ y roseocardin (**36**),¹⁴⁰ por comparación de los datos de HRESIMS y RMN con los publicados en bibliografía.

Siguiendo la estrategia OSMAC, se planteó un cultivo sólido de *B. felina* en arroz, que permitió el aislamiento de tres metabolitos secundarios adicionales (**37-39**), no observados en anteriores condiciones de cultivo.

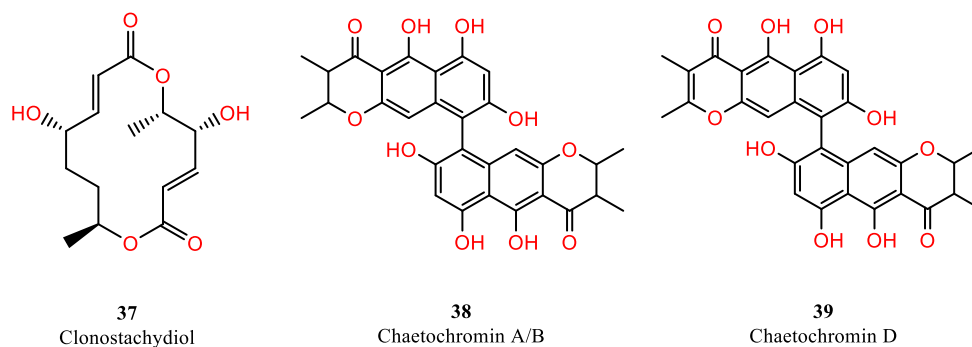


Figura 41. Metabolitos secundarios aislados de *B. felina* en medio de cultivo sólido en arroz.

A partir del extracto orgánico del cultivo en arroz (53.5 g) se obtuvieron doce fracciones (R^1F1 - R^1F12) cromatográficas. El compuesto **37** (17.9 mg) se aisló a partir de la fracción R^1F6 tras un segundo fraccionamiento por cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, seguido de un paso adicional de cromatografía de fase normal con un gradiente de hexano/ EtOAc . Por su parte, los compuestos **38-39** requirieron un paso de purificación adicional mediante HPLC semipreparativa usando un gradiente de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.

Los compuestos **37-39** se identificaron como clonostachydiol (**37**),¹⁴¹ chaetochromin A/B (**38**) y chaetochromin D (**39**)^{142, 143} por comparación de los espectros de HRESIMS y RMN experimentales con los publicados en bibliografía.

Además, se detectó la presencia de varios compuestos adicionales de la familia de chaetochromin y ustilaginoidin, que no llegaron a identificarse debido a la dificultad presentada en el proceso de aislamiento y purificación de estas moléculas, obteniendo en última instancia mezclas de varias de ellas, lo que imposibilitó su determinación estructural mediante RMN. Este tipo de moléculas con actividad antibacteriana y citotóxica han sido descritas en bibliografía producidas por varias especies de hongos como *Penicillium sp.*, *Ustilaginoidea virens*, *Chaetomium gracile*, *Chaetomium microcephalum* o *Fusarium sp.*, entre otras.¹⁴⁴⁻¹⁴⁸

El siguiente paso dentro de la estrategia OSMAC consistió en la adición de inductores químicos a los medios de cultivo. Se llevaron a cabo dos nuevas fermentaciones del hongo *B. felina*, añadiendo 5-azacitidina y N-acetil-D-glucosamina, respectivamente, al medio de cultivo sólido de arroz.

La adición de 5-azacitidina al medio de cultivo desencadenó la producción de cinco metabolitos (**40-44**) no detectados en las condiciones de cultivo previamente estudiadas, de los cuales tres de ellos resultaron ser nuevos PNs (**42-44**), algunos con estructuras completamente distintas a las previamente observadas. Los compuestos **40** y **41** se identificaron como 3-carboxindol¹⁴⁹ y 5,6-dihidro-4-metil-2H-piran-2-ona,¹⁵⁰ respectivamente. Por otro lado, la adición de N-acetil-D-glucosamina a la fermentación del hongo, condujo al aislamiento del análogo de cadena abierta de clonostachydiol (**45**)¹⁵¹, junto con dos ciclodepsipéptidos adicionales, nodupeptide (**46**)¹⁵² e isariin E

(47).¹⁵³ Como siempre, los compuestos conocidos se identificaron por comparación con los datos publicados en bibliografía.

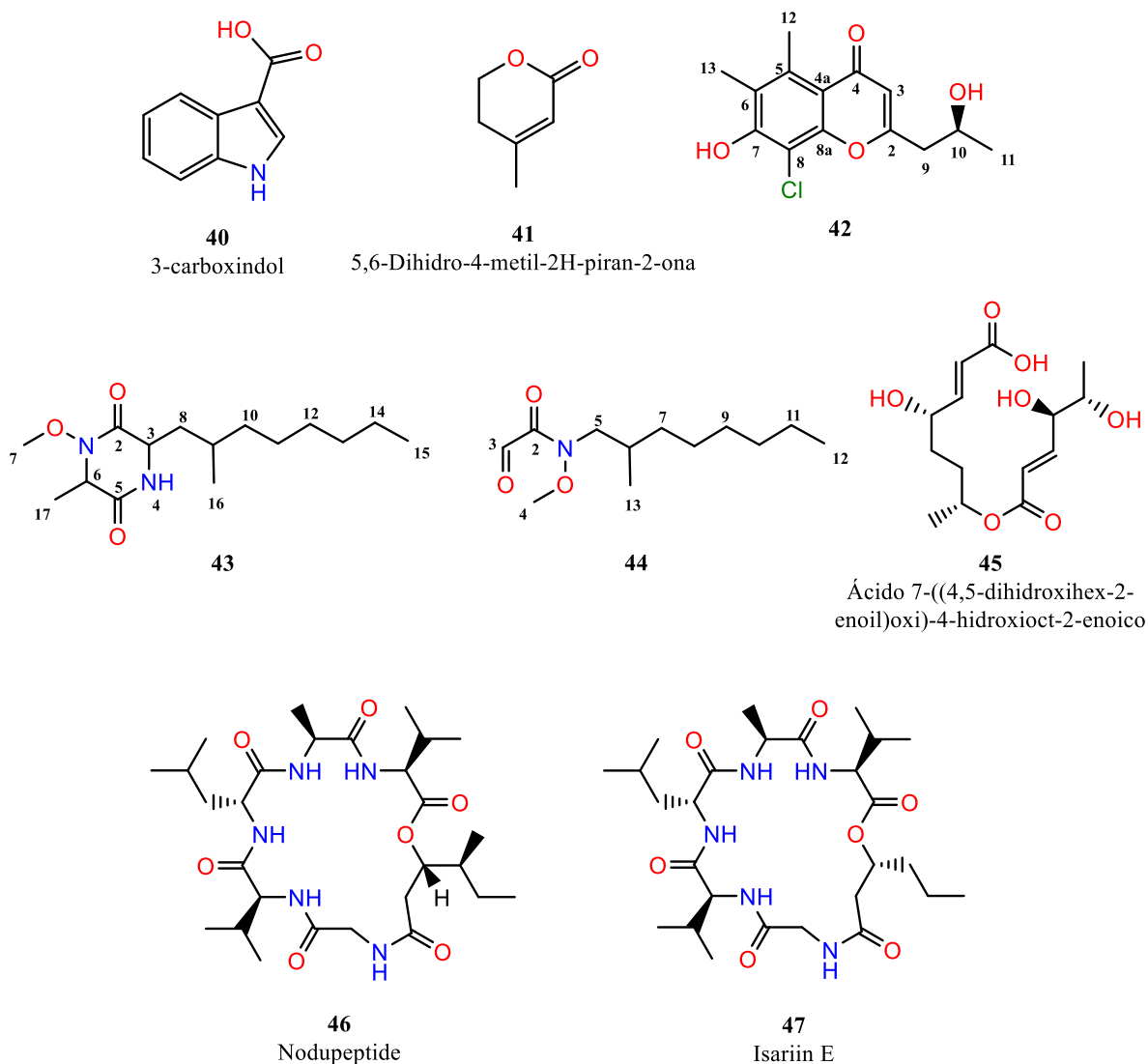


Figura 42. Metabolitos secundarios aislados de *B. felina* en medio de cultivo sólido de arroz con adición de los inductores químicos 5-azacitidina (**40-44**) y N-acetil-D-glucosamina (**45-47**).

El trabajo de aislamiento de estos compuestos comenzó a partir de los extractos orgánicos de los correspondientes cultivos. La fracción ^{A1}F6-7, obtenida por CPV a partir del extracto orgánico (67 g) del cultivo de arroz con adición de 5-azacitidina, se fraccionó por cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/acetona, para obtener 11 subfracciones (^{A2}F1-^{A2}F11). Los compuestos **40** (11.4 mg) y **41** (5.5 mg)

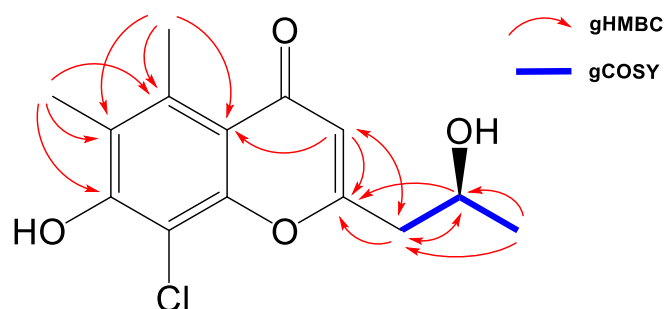
se aislaron de las subfracciones A^2F8 y A^2F4 , respectivamente, tras purificación por cromatografía líquida de fase reversa con un gradiente de MeOH/H₂O. A partir de la fracción A^1F8 de la cromatografía CPV, y siguiendo el mismo procedimiento, se aislaron los compuestos **42** (6.4 mg), **43** (12.6 mg) y **44** (28.6 mg). Por otro lado, los compuestos **45** (45 mg), **46** (23.7 mg) y **47** (15 mg) se aislaron de la fracción N^1F10 , obtenida por CPV a partir del extracto orgánico (104.9 g) del cultivo de arroz con la adición de N-acetil-D-glucosamina. La purificación de estos compuestos se realizó mediante cromatografía líquida de fase normal, con un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH, seguida de HPLC semipreparativa utilizando un gradiente de MeOH/H₂O.

El compuesto **42** se obtuvo como un sólido amorfo verdoso con fórmula molecular C₁₄H₁₅ClO₄ (siete grados de insaturación) según los datos de HRESIMS y RMN. El análisis del espectro obtenido por HRESIMS reveló la presencia de un ion molecular a m/z 283.0732 ([M+H]⁺), junto a un pico isotópico a m/z 285.0709 con una relación 3:1, estableciendo la presencia de un átomo de Cl en la molécula. La comparación de los espectros ¹H y ¹³C RMN de este compuesto con los de chaetosemin D (**34**), mostró la similitud entre estas dos moléculas, siendo la única diferencia la desaparición del hidrógeno aromático H-8 (δ_H 6.60, δ_C 99.7), presente en el espectro ¹H RMN de chaetosemin D, y la aparición de un nuevo carbono cuaternario aromático (δ_C 106.6) en el espectro ¹³C RMN de **42**, sugiriendo la localización del átomo de Cl en esta posición. El análisis de los espectros gCOSY y gHMBC (Tabla 13) confirmó que el resto de la molécula era idéntico al de chaetosemin D. Además, la comparación del valor de rotación óptica del compuesto **42** ($[\alpha]^{20}_D = +14.8^\circ$) con el publicado para chaetosemin D ($[\alpha]^{20}_D = +58.6^\circ$), ambos de mismo signo, permitió asignar la configuración absoluta *S* del único carbono quiral presente en la molécula, quedando la estructura de **42** claramente definida como se muestra en la figura 42.

Tabla 13. Datos de RMN del compuesto **42** en MeOH-*d*₄ + CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (<i>J</i> en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
2		166.0, C		
3	6.09, s	112.9, CH		C-2, 4a, 9
4		181.8, C		
4a		115.9, C		
5		138.5, C		
6		125.4, C		
7		158.6, C		
8		106.6, C		
8a		154.4, C		
9	2.75, m*	44.1, CH ₂	10	C-2, 3, 10
10	4.27, (sx, 6.2)	66.2, CH	9, 11	C-2, 9
11	1.31, (d, 6.2)	23.5, CH ₃	10	C-9, 10
12	2.73, s	17.5, CH ₃		C-4a, 5, 6
13	2.24, s	12.6, CH ₃		C-5, 6, 7

* Señal solapada.

**Figura 43.** Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **42**.

El compuesto **43** se obtuvo en forma de un aceite de color verde, cuya fórmula molecular se determinó como C₁₅H₂₈N₂O₃ (tres grados de insaturación) basándose en los datos obtenidos de HRESIMS y RMN.

La interpretación conjunta de los espectros ¹H, ¹³C RMN (Tabla 14) y gHSQC, permitió identificar dos grupos metilo doblete (CH₃CH-) y uno triplete (CH₃CH₂-), característico de metilo terminal de cadena alquílica. Además, se identificó un grupo metoxilo (δ_H 3.82, δ_C 62.3), cinco metilenos que resonaban al mismo desplazamiento químico (δ_H 1.24) en el espectro ¹H RMN, otro metileno adicional resonando a campo más bajo (δ_H 1.65, 1.78), tres grupos metino, de los cuales dos de ellos presentaban desplazamientos químicos característicos de la unión a átomos de nitrógeno (δ_H 4.0, δ_C 52.9; δ_H 4.29, δ_C

57.7), dos grupos carbonilo tipo éster/amida (δ_C 164.0, 168.3) y un protón intercambiable (δ_H 7.10), atribuido a un NH debido a la presencia únicamente de tres átomos de oxígeno en la molécula, correspondientes a los dos carbonilos y al metoxilo. El grado de insaturación restante indicaba la presencia de un ciclo en la estructura del compuesto **43**.

Por otro lado, el análisis del espectro gCOSY permitió asignar dos sistemas de espín aislados correspondientes a 4NH/C3/C8-C15/C16, estableciendo un residuo de 3-metil-1-nonanamina, y C6/C17.

Las correlaciones clave observadas en el espectro gHMBC de H-3, 4NH, H-6 y H₂-8 con el carbonilo C-2, de H-3, 4NH, H-6 y H₃-17 con el carbonilo C-5 y de 4NH con C-6, evidenciaron la existencia de un anillo de 2,5-dicetopiperazina, ubicando el grupo metoxilo sobre uno de los nitrógenos de la dicetopiperazina. Esta conclusión fue respaldada por la ausencia de correlaciones gHMBC entre el metoxilo H₃-7 y otros átomos de carbono. De esta manera, se estableció claramente la estructura plana de **43**, tal como se presenta en la Fig. 42.

Tabla 14. Datos de RMN del compuesto **43** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ_H , ppm (J en Hz)	δ_C , ppm	gCOSY	gHMBC
2		164.0, C		
3	4.0, (dt, 3.1, 10.3)	52.9, CH	4, 8	C-2, 5, 8
4 (NH)	7.1, br s		3	C-2, 3, 5, 6
5		168.3, C		
6	4.29, (q, 6.9)	57.7, CH	17	C-2, 5
7	3.82, s	62.3, CH ₃		
8	1.65, (ddd, 3.1, 10.3, 13.7) 1.78, (ddd, 3.1, 10.3, 13.7)	42.7, CH ₂	3, 9	C-2, 3, 10
9	1.6*	28.9, CH	8, 10, 16	C-8
10	1.24*	37.5, CH ₂		
11	1.24*	26.8, CH ₂		C-13
12	1.24*	29.4, CH ₂		C-13
13	1.24*	31.8, CH ₂		
14	1.24*	22.6, CH ₂	15	C-13
15	0.86, (t, 6.9)	14.1, CH ₃	14	C-13, 14
16	0.93, (d, 6.5)	18.3, CH ₃	9	C-8, 9, 10
17	1.58, (d, 6.9)	18.0, CH ₃	6	C-5, 6

* Señales solapadas.

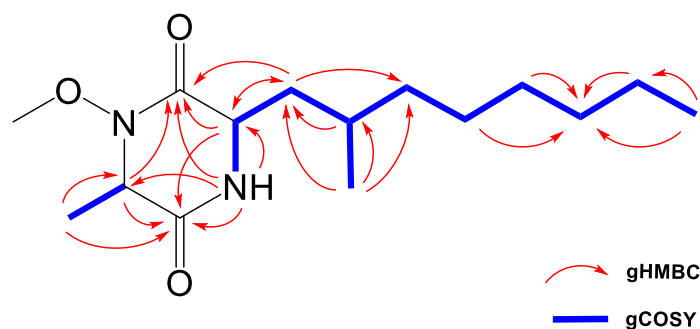


Figura 44. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **43**.

El compuesto **44** se obtuvo como un aceite amarillento con fórmula molecular $C_{12}H_{23}NO_3$ (dos grados de insaturación), como se dedujo de los datos de HRESIMS y RMN.

En este caso, el espectro de 1H RMN de **44** presentaba algunas señales similares a las observadas previamente para **43**, concretamente las correspondientes a la cadena alquílica lineal. Sin embargo, el resto de la molécula presentaba importantes diferencias, como la desaparición de las señales correspondientes a los dos grupos metino y al protón intercambiable NH de la dicetopiperazina y la aparición de una nueva señal de protón característica de aldehído (δ_H 9.41, δ_C 198.9) en el compuesto **44**.

El espectro gCOSY de **44** permitió asignar un único sistema de espín correspondiente a C5-C12/C13, estableciendo la cadena alquílica lineal como 2-metiloctano. Los desplazamientos químicos de H₂-5 (δ_H 2.72, 2.88; δ_C 44.2) sugirieron la unión de este metileno a un átomo de nitrógeno. Teniendo en cuenta la información del peso molecular del compuesto y las señales aún por asignar correspondientes a un grupo metoxilo (δ_H 3.81; δ_C 64.6), un carbonilo tipo amida (δ_C 157.2) y el aldehído, se concluyó que el resto de la molécula debía tratarse de un residuo de N-metoxi-2-oxoacetamida. Esta conclusión fue respaldada por la observación de una única correlación gHMBC del aldehído H-3 con la amida C-2, así como por la ausencia de correlaciones del metoxilo H₃-4. Aunque no se observó correlación gHMBC de H₂-5 con C-2, lo cual habría confirmado inequívocamente la estructura propuesta, la información obtenida por HRESIMS y el análisis descrito de los datos de RMN, no permitía la conformación de una estructura alternativa. Por tanto, la estructura acíclica plana de **44** se estableció como se muestra en la Fig. 42.

Tabla 15. Datos de RMN del compuesto **44** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
2		157.2, C		
3	9.41, s	198.9, CH		C-2
4	3.81, s	64.6, CH ₃		
5	2.72, (dd, 8.2, 17.3) 2.88, (dd, 5.6, 17.3)	44.2, CH ₂	6	C-6, 7, 13
6	2.02, m	28.9, CH	5, 7, 13	C-7
7	1.24*	36.9, CH ₂		C-5, 8, 9
8	1.24*	27.0, CH ₂		C-7, 9, 10
9	1.24*	29.5, CH ₂		C-7, 8, 10
10	1.24*	31.9, CH ₂		C-8, 9
11	1.24*	22.7, CH ₂		C-10
12	0.86, (t, 6.9)	14.2, CH ₃	11	C-10, 11
13	0.89, (d, 6.7)	19.9, CH ₃	6	C-5, 6, 7

* Señales solapadas.

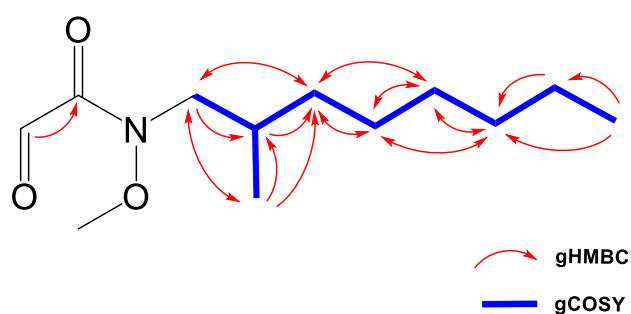


Figura 45. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **44**.

Por último, en el estudio de cocultivo llevado a cabo entre este hongo y otros microorganismos (hongos y bacterias), se seleccionó el cocultivo con el hongo *Penicillium brevicompactum* en medio de cultivo PDA sólido. Como resultado, se aislaron siete metabolitos secundarios adicionales (**48-54**). Lamentablemente, ninguno de ellos resultó tener una estructura novedosa, sin embargo, tal y como ha venido demostrando la estrategia OSMAC a lo largo del estudio, aparecieron moléculas con estructuras muy distintas a las producidas por este hongo en condiciones axénicas.

Para el aislamiento de estos compuestos, el extracto orgánico del cocultivo (1.22 g) se separó en 12 fracciones por CPV. Las fracciones ¹F5, ¹F9-10 y ¹F11 fueron sometidas a distintos pasos de purificación por cromatografía líquida en columna. La fracción ¹F5 se fraccionó mediante cromatografía líquida de fase reversa utilizando un gradiente de

MeOH/H₂O para obtener los compuestos **48** (11.9 mg), **49** (17.5 mg) y **50** (3.1 mg). Por otra parte, la fracción ^{c1}F9-10 se fraccionó mediante cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH, seguido de un paso adicional de purificación mediante cromatografía líquida de fase reversa utilizando un gradiente de MeOH/H₂O, consiguiendo así el aislamiento de los compuestos **51** (3.2 mg), **52** (2.8 mg) y **53** (18.8 mg). Por último, la fracción ^{c1}F11 se purificó de igual modo que la fracción ^{c1}F9-10, obteniendo el compuesto **54** (6.7 mg) puro.

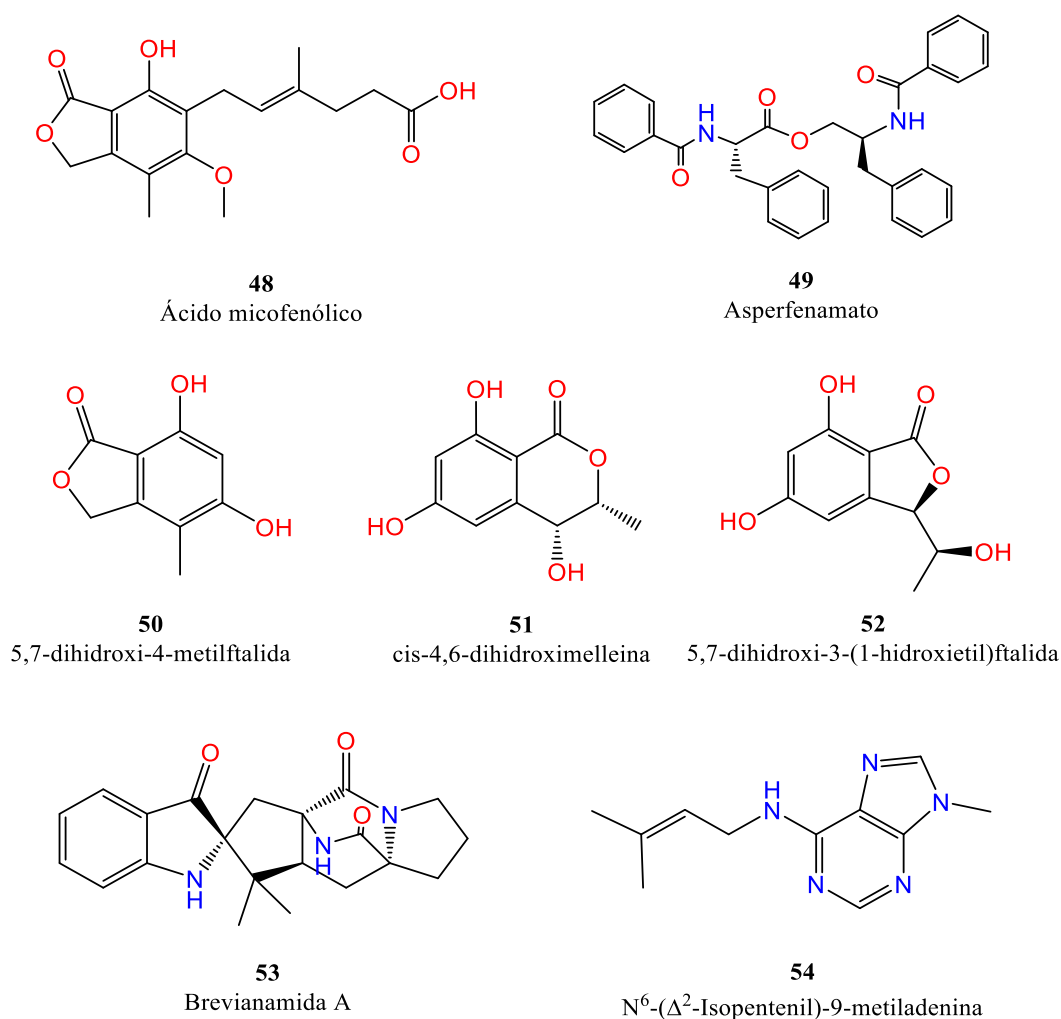


Figura 46. Metabolitos secundarios aislados del cocultivo entre *B. felina* y *Penicillium brevicompactum* en medio de cultivo PDA sólido.

Los compuestos **48-54** se identificaron como ácido micofenólico (**48**),¹⁵⁴ asperfenamato (**49**),¹⁵⁵ 5,7-dihidroxi-4-metilftalida (**50**),¹⁵⁶ cis-4,6-dihidroximelleina (**51**),¹⁵⁶ 5,7-

dihidroxi-3-(1-hidroxietil)ftalida (**52**),¹⁵⁷ brevianamida A (**53**)¹⁵⁸ y N⁶-(Δ^2 -Isopentenil)-9-metiladenina (**54**),¹⁵⁹ por comparación de los espectros de HRESIMS y RMN experimentales con los publicados en bibliografía.

Cabe destacar que, sin un conocimiento amplio de la biología de los microorganismos involucrados en el cocultivo mediante técnicas de ingeniería genética y/o el uso de métodos bioinformáticos, resulta complicado discernir cuál de los dos microorganismos es el responsable de la producción de cada uno de los compuestos identificados. Sin embargo, en este caso, compuestos como las brevianamidas, ácido micofenólico y derivados y asperfenamato están descritos en bibliografía como metabolitos producidos por varias especies de *Penicillium*,^{160, 161} lo que parece indicar que la producción de este tipo de compuestos en el cocultivo entre *Beauveria felina* y *Penicillium brevicompactum*, pudiera deberse a este último hongo. Por su parte, el compuesto N⁶-(Δ^2 -Isopentenil)-9-metiladenina (**54**) pertenece a la familia de las citoquininas, fitohormonas capaces de estimular la división celular, y que han sido descritas tanto a partir de plantas como de microorganismos (hongos y bacterias), generalmente fitopatógenos. La búsqueda de información bibliográfica acerca de este compuesto en la base de datos SciFinder permitió encontrar únicamente una referencia bibliográfica,¹⁵⁹ por lo que resulta difícil apuntar cuál podría ser el microorganismo productor, y cuál el inductor.

En conclusión, la fermentación axénica del hongo *Beauveria felina* en medio MI/2 (condiciones estándar) produjo cuatro PNs (**27-30**), incluidos dos nuevos metabolitos secundarios, un híbrido policétido-péptido (**29**) y un ciclodepsipéptido (**30**). Al cambiar el medio de cultivo a HGA, se obtuvieron seis compuestos adicionales (**31-36**), la mayoría de ellos de la familia de los ciclodepsipéptidos. El cambio del medio de cultivo líquido a sólido en arroz dio lugar a la producción de otros tres metabolitos secundarios (**37-39**), además de varios compuestos adicionales de la familia de chaetochromin y ustilaginoidin, aunque estos últimos no pudieron ser identificados. La adición del modificador epigenético 5-azacitidina al medio sólido de arroz provocó la producción de otros cinco PNs (**40-44**), entre los cuales se encontraban tres nuevos compuestos no descritos previamente en bibliografía, un derivado halogenado de chaetosemin D (**42**), una dicetopiperazina (**43**) y una acilhidroxilamina (**44**), mientras que la adición del inductor químico N-acetil-D-glucosamina al medio sólido de arroz, indujo la producción

de tres compuestos adicionales (**45-47**), el análogo de cadena abierta de clonostachydiol (**45**) y otros dos ciclodepsipéptidos. Finalmente, el cocultivo del hongo *Beauveria felina* con *Penicillium brevicompactum* en medio PDA sólido, condujo a la obtención de siete PNs adicionales (**48-54**).

3.2.3. AA-AR-H-B002 (*Streptomyces griseorubiginosus*)

La actinobacteria *Streptomyces griseorubiginosus*, derivada de un cnidario sin identificar recolectado de un arrecife cercano a Pointe de Bellevue, en la isla de la Reunión (Francia), fue sometida a una estrategia OSMAC, y se cultivó en distintas condiciones de fermentación. En primer lugar, se llevó a cabo la fermentación de *S. griseorubiginosus* en medio FA-1 (condiciones estándar de fermentación) de la que se aislaron e identificaron cinco PNs (**55-59**), todos ellos derivados de antraquinona y antrona.

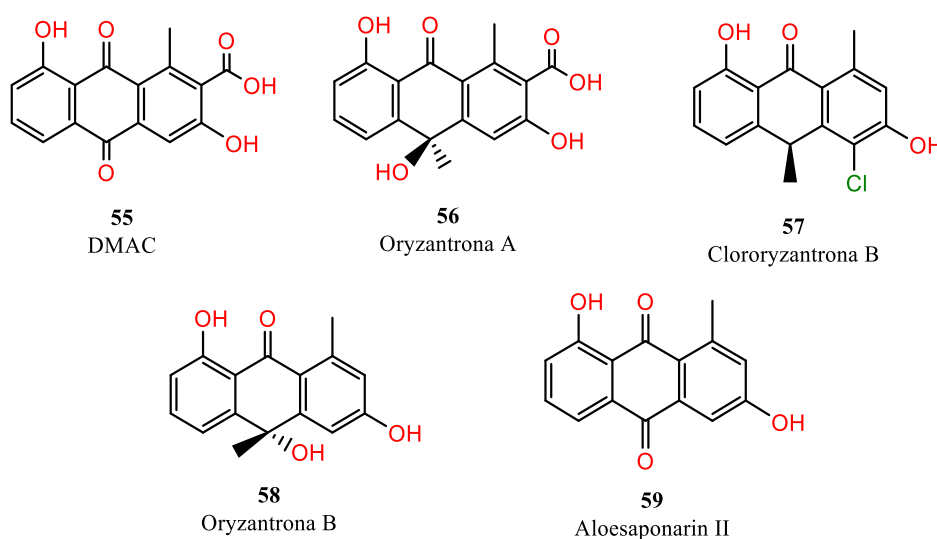


Figura 47. Metabolitos secundarios aislados de *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo FA-1.

El extracto orgánico (3.9 g) de la fermentación estándar se fraccionó mediante CPV con un gradiente de hexano/EtOAc/MeOH para dar 12 fracciones (¹F1-¹F12). Tras un análisis por HPLC-UV-MS, se observó que las fracciones ¹F5, ¹F6-7 y ¹F11-12 contenían metabolitos secundarios sin desreplicación química frente a la colección de compuestos

puros de BMT. La fracción ¹F11-12 fue sometida a cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH para obtener 12 subfracciones (²F1-²F12). Los compuestos **55** (3.7 mg) y **56** (13.2 mg) se purificaron a partir de ²F7-10 y ²F5, respectivamente, mediante cromatografía líquida de fase reversa utilizando un gradiente de MeOH/H₂O. Por otro lado, los compuestos **57** (12.5 mg) y **59** (27.4 mg) se aislaron a partir de la fracción ¹F5 mediante cromatografía líquida de fase normal con un gradiente de hexano/EtOAc, seguida de un paso adicional de cromatografía líquida de fase normal con un gradiente de hexano/éter, mientras que el compuesto **58** (74.5 mg) se obtuvo a partir de las fracciones ¹F6-7, siguiendo un procedimiento similar, con la diferencia de que en el último paso de purificación se utilizó un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH.

Los compuestos **55-59** se identificaron como DMAC (**55**),^{162, 163} oryzantrona A (**56**), clororyzantrona B (**57**), oryzantrona B (**58**)¹⁶⁴ y aloesaponarin II (**59**),¹⁶⁵ por comparación de los espectros HRESIMS, RMN 1D y 2D y sus rotaciones ópticas con los datos publicados en la bibliografía.

A continuación, se cultivó el actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio SAF, obteniéndose otros cinco metabolitos secundarios (**60-64**), que no se detectaron en el cultivo en condiciones estándar.

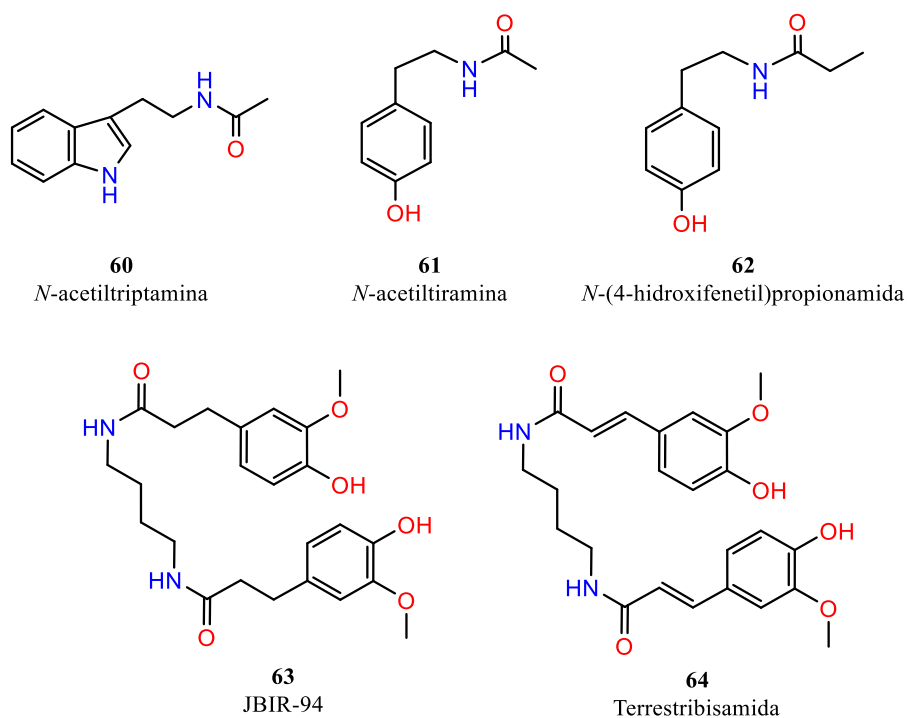


Figura 48. Metabolitos secundarios aislados de *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo SAF.

A partir del extracto orgánico (4.55 g) de esta fermentación se obtuvieron un total de doce fracciones ($^{SA1}F1$ - $^{SA1}F12$) mediante CPV. Las fracciones $^{SA1}F9$ - $^{SA1}F10$ se purificaron mediante cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ para obtener 10 subfracciones ($^{SA2}F1$ - $^{SA2}F10$). El compuesto **60** (8.4 mg) se purificó por cromatografía líquida de fase reversa utilizando un gradiente de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ a partir de la subfracción $^{SA2}F5$, mientras que los compuestos **61** (15.1 mg), **62** (5.6 mg), **63** (4.6 mg) y **64** (3 mg) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento a partir de las subfracciones $^{SA2}F7$ y $^{SA2}F8$.

Los compuestos **60-64** se identificaron como *N*-acetyltryptamina (**60**), *N*-acetyltiramina (**61**), *N*-(4-hidroxifenetil)propionamida (**62**),¹⁶⁶ JBIR-94 (**63**)¹⁶⁷ y terrestribisamida (**64**),¹⁶⁸ por comparación con los datos descritos en la bibliografía.

Siguiendo la estrategia OSMAC, la fermentación del microorganismo *S. griseorubiginosus* se cambió de medio líquido a medio sólido SymPV-21. El procesado del cultivo bacteriano permitió aislar cinco PNs adicionales (**65-69**).

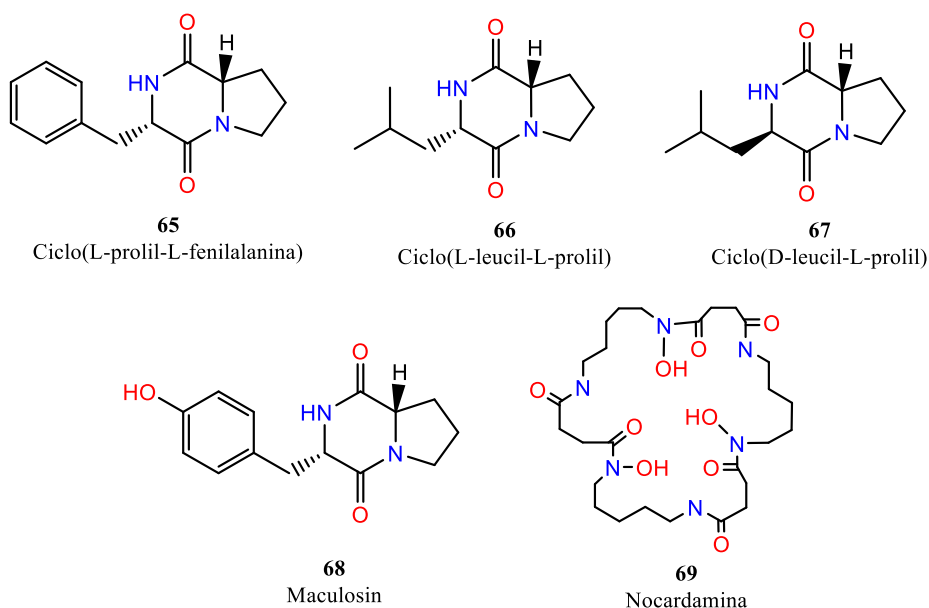


Figura 49. Metabolitos secundarios aislados de *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo sólido SymPV-21.

Al igual que el resto de extractos obtenidos mediante la estrategia OSMAC, el extracto orgánico del cultivo sólido en medio SymPV-21 (4.26 g) se fraccionó por CPV, utilizando el mismo gradiente de Hex/EtOAc/MeOH, para obtener doce fracciones (*Sy*¹F1-*Sy*¹F12). Los compuestos **65** (41.1 mg), **66** (56 mg) y **67** (7.8 mg) se aislaron a partir de *Sy*¹F10 tras purificación por cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH, seguido de un paso adicional de cromatografía líquida de fase normal con un gradiente de CH₂Cl₂/acetona. Por último, la fracción *Sy*¹F11-12 se fraccionó mediante cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH como fase móvil, seguido de cromatografía líquida de fase reversa, utilizando un gradiente de MeOH/H₂O, para obtener los compuestos **68** (27.5 mg) y **69** (8.4 mg).

Tras el análisis espectroscópico y la comparación con los datos disponibles en la bibliografía, estos compuestos fueron identificados como ciclo(L-prolil-L-fenilalanina) (**65**),¹⁶⁹ ciclo(L-leucil-L-prolil) (**66**),¹⁷⁰ ciclo(D-leucil-L-prolil) (**67**),¹⁷¹ maculosin (**68**)¹⁷¹ y nocardamina (**69**),¹⁷² los cuales no se produjeron en las condiciones de cultivo anteriores.

A continuación, se estudió la adición de inductores químicos al medio de cultivo. En este caso, se seleccionó el autoinductor γ -butirolactona, que como se ha mencionado

anteriormente, actúa como molécula de señalización bacteriana (sistema *quorum sensing*) y ha demostrado tener un amplio impacto en la regulación de la producción de compuestos bioactivos en actinomicetos.^{67, 85}

Así, la adición de γ -butirolactona al medio de cultivo estándar (FA-1) de *S. griseorubiginosus*, permitió el aislamiento de diez metabolitos secundarios (**70-79**), de los cuales siete de ellos resultaron ser nuevos PNs (**73-79**).

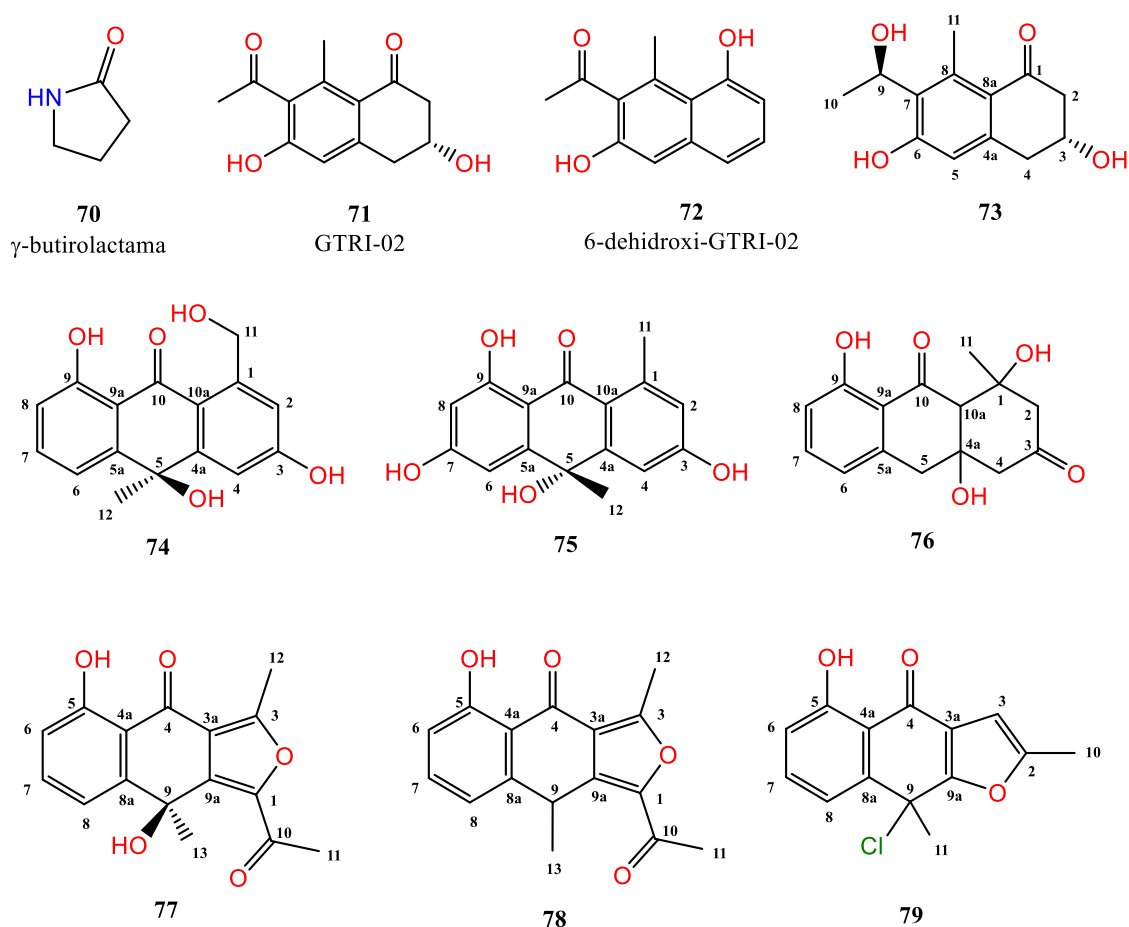


Figura 50. Metabolitos secundarios aislados de *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo sólido FA-1 con adición del inductor químico γ -butirolactona.

A partir del extracto de este cultivo (4.94 g), se obtuvieron 12 fracciones (B^1F1-B^1F12) por fraccionamiento mediante CPV. La fracción B^1F11 se sometió a una nueva cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, para obtener 12 subfracciones (B^2F1-B^2F12). El compuesto **70** (13.9 mg) se aisló a partir de las

subfracciones ^{B2}F5-7 tras purificación por cromatografía líquida de fase reversa usando un gradiente de MeOH/H₂O. Los compuestos **71** (46.9 mg), **72** (4.6 mg) y **73** (3.2 mg) se obtuvieron a partir de ^{B1}F9-10 siguiendo el mismo procedimiento. Por último, los compuestos **74** (2 mg), **75** (3 mg), **76** (9.6 mg), **77** (3.1 mg), **78** (1.1 mg) y **79** (1.6 mg), se aislaron a partir de ^{B1}F5 (**77-79**), ^{B1}F7 (**74**) y ^{B1}F8 (**75-76**), respectivamente, tras purificación por cromatografía líquida de fase normal utilizando un gradiente de hexano/EtOAc, seguido de purificación por HPLC semipreparativa, con un gradiente de MeOH/H₂O como sistema de elución.

Los compuestos **70-72** se identificaron como γ -butirolactama (**70**),¹⁷³ GTRI-02 (**71**)^{174, 175} y 6-dehidroxi-GTRI-02 (**72**)¹⁷⁵ tras el análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas y RMN y la comparación con los datos publicados en la bibliografía.

El compuesto **73** se aisló como un sólido amorfo amarillento con la fórmula molecular C₁₃H₁₆O₄ (seis grados de insaturación) según los datos de HRESIMS y RMN. Los datos de RMN (Tabla 16) eran muy similares a los de GTRI-02 (**71**), a excepción de la presencia de un nuevo grupo metino cuadruplete oxigenado (δ_H 5.31, δ_C 68.0), acoplado al grupo metilo H₃-10 (J = 6.7 Hz), en lugar de la cetona situada en C-9 en GTRI-02. Esto sugería la reducción de la cetona a alcohol, lo que también era evidente a partir de la fórmula molecular de **73** (C₁₃H₁₆O₄). El análisis de los espectros de RMN 2D confirmó la estructura de este compuesto como se muestra en la Fig. 50.

Este compuesto presenta dos centros quirales remotos, lo que hacía complicada la determinación de su configuración relativa. Sin embargo, el análisis computacional utilizando el método mix-J-DP4, arrojó una probabilidad >99% para el isómero 3*R**, 9*R** por comparación de los datos de RMN calculados y experimentales, quedando así establecida la configuración relativa del compuesto **73**.

Tabla 16. Datos de RMN del compuesto **73** en $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$ a 400 (^1H) y 100 (^{13}C) MHz

no.	δ_{H} , ppm (J en Hz)	δ_{C} , ppm	gCOSY	gHMBC
1		198.7, C		
2	2.53, (dd, 16.4, 8.1) 2.81, (dd, 16.4, 8.1)	49.4, CH_2	3	C-1, 3, 4, 8a
3	4.21, (tt, 8.1, 4.0)	65.8, CH	2, 4	
4	2.83, (dd, 16.4, 4.0) 3.03, (dd, 16.4, 4.0)	39.4, CH_2	3	C-2, 3, 4a, 5, 8a
4a		143.3, C		
5	6.51, s	115.5, CH		C-4, 6, 7, 8a
6		160.6, C		
7		127.5, C		
8		139.2, C		
8a		124.3, C		
9	5.31, (q, 6.7)	68.0, CH	10	C-6, 7, 10
10	1.42, (d, 6.7)	22.0, CH_3	9	C-7, 9
11	2.42, s	16.4, CH_3		C-7, 8, 8a

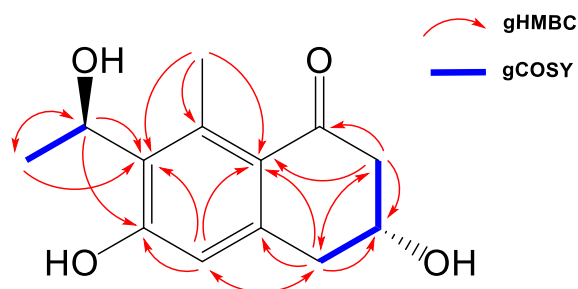


Figura 51. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **73**.

Tras realizar una búsqueda conformacional se observó la existencia de dos conformaciones principales para esta molécula (Figura 52), una en la que H3 está en posición axial, con una contribución entre 57-65% (dependiendo del campo de fuerza utilizado), mientras que en la otra H3 está en posición ecuatorial, con una contribución entre 43-35%. Esto deja entrever que existe un equilibrio conformacional entre ambas conformaciones lo que concuerda con los resultados experimentales obtenidos $J_{\text{H}3}$ (8.1 y 4.0 Hz).

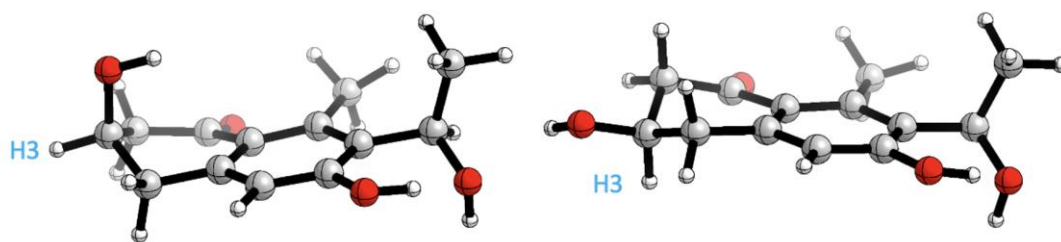


Figura 52. Conformaciones de mínima energía para el compuesto **73** con H3 en posición axial (derecha) y ecuatorial (izquierda).

El compuesto **74** se aisló y purificó para obtener un sólido amorfo amarillento y el análisis de los datos aportados por HRESIMS y RMN determinaron su fórmula molecular como $C_{16}H_{14}O_5$ (diez grados de insaturación). En un primer análisis, los espectros de 1H y ^{13}C RMN eran muy similares a los de moléculas derivadas de antrona aisladas previamente. En comparación con oryzantrona B (**58**), se observó la presencia de un metileno oxigenado (δ_H 4.66, 4.92; δ_C 65.9) en **74**, en lugar del metilo (δ_H 2.68, δ_C 24.3) unido al anillo aromático. Las correlaciones gHMBC observadas de H₂-11 con C-1, C-2 y C-10a confirmaron la sustitución del grupo metilo por el metileno oxigenado. El análisis todos los datos aportados por los espectros de RMN 2D, confirmaron que el resto de la molécula era idéntica a oryzantrona B, determinando la estructura de **74** como se muestra en la Fig. 50.

La comparación del valor de rotación óptica del compuesto **74** ($[\alpha]^{20}_D = -133.9^\circ$) con el publicado para oryzantrona B ($[\alpha]^{25}_D = +10.7^\circ$), permitió asignar la configuración absoluta *R* del único carbono quiral de este compuesto.

El análisis inicial de los espectros de RMN del compuesto **75**, reveló que se trataba de un nuevo derivado de antrona, cuya fórmula molecular se determinó como $C_{16}H_{14}O_5$ (10 grados de insaturación) en base a los datos obtenidos mediante HRESIMS y RMN. De nuevo, la comparación de los espectros 1H y ^{13}C RMN con los de oryzantrona B (**58**) mostró la similitud entre estas dos moléculas, siendo la presencia de un grupo hidroxilo adicional unido a C-7 la única diferencia entre ellas. La diferencia de 16 uma entre las masas moleculares de ambos compuestos también respaldaba esta sugerencia. Los experimentos 1H RMN y gCOSY desvelaron la presencia de un esqueleto de antrona, con dos anillos aromáticos tetrasustituídos, con dos protones en meta cada uno ($J_{2-4} = 2.5$

Hz; $J_{6-8} = 2.4$ Hz). Estos datos, junto con las correlaciones observadas en el experimento gHMBC de H-2 y H-4 con C-10a y de H-6 con C-5, C-8 y C-9a, confirmaron que el compuesto **75** se trataba de un isómero de posición de **74** en el que el grupo hidroxilo unido al metileno C-11, aparece ahora unido al carbono aromático C-7 (Fig. 50).

Siguiendo el mismo razonamiento que para el compuesto anterior, la rotación óptica de **75** ($[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +2.2^{\circ}$) era similar en signo y magnitud a la de oryzantrona B ($[\alpha]^{25}_{\text{D}} = +10.7^{\circ}$), por lo que se asignó tentativamente la configuración absoluta S del único centro quiral de la molécula.

Tabla 17. Datos de RMN de los compuestos **74** y **75** a 400 (^1H) y 100 (^{13}C) MHz

no.	Compuesto 74 ^a				Compuesto 75 ^b			
	δ_{H} , ppm (J en Hz)	δ_{C} , ppm*	gCOSY	gHMBC	δ_{H} , ppm (J en Hz)	δ_{C} , ppm	gCOSY	gHMBC
1		147.9, C				145.6, C		
2	6.87, s	117.2, CH		C-3, 4, 10a, 11	6.62, (d, 2.5)	120.0, CH	4	C-10a
3		164.3, C				**		
4	7.19, s	112.3, CH		C-2, 5, 10a	7.21, (d, 2.5)	111.7, CH	2	C-10a
4a		156.3, C				155.8, C		
5		71.5, C				71.8, C		
5a		150.9, C				153.9, C		
6	7.25, (d, 8.2)	116.6, CH	7, 8	C-5, 8, 9a	6.77, (d, 2.4)	105.7, CH	8	C-5, C-8, C-9a
7	7.38, (t, 8.2)	**	6, 8	C-5a, 6, 9		**		
8	6.75, (d, 8.2)	116.8, CH	6, 7	C-6, 9a	6.16, (d, 2.4)	102.6, CH	6	
9		162.8, C				**		
9a		115.5, C				109.4, C		
10		**				189.3, C		
10a		119.8, C				120.6, C		
11	4.66, (d, 14.3) 4.92, (d, 14.3)	65.9, CH ₂		C-1, 2, 10a	2.70, s	24.6, CH ₃		C-1, 2, 10a
12	1.47, s	39.5, CH ₃		C-4a, 5, 5a	1.52, s	39.4, CH ₃		C-4a, 5, 5a

^a Medido en CDCl₃ + MeOH-*d*₄

^b Medido en MeOH-*d*₄

* Desplazamientos químicos asignados a través de los espectros 2D gHSQC y gHMBC

** Señal no observada

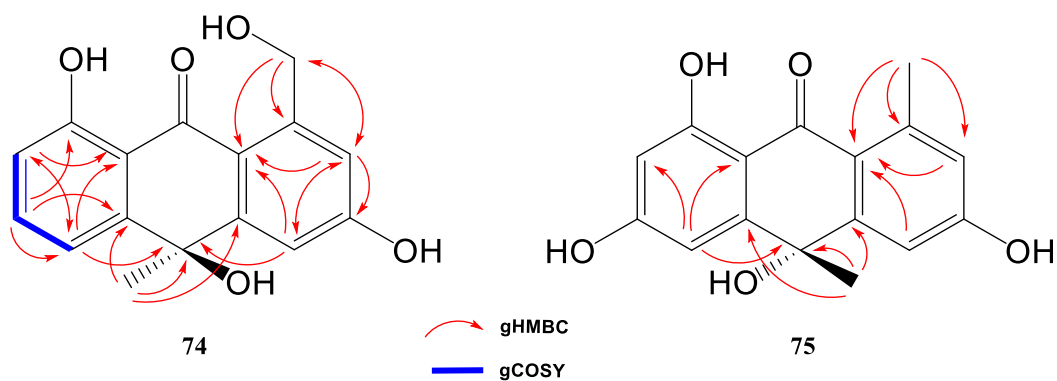


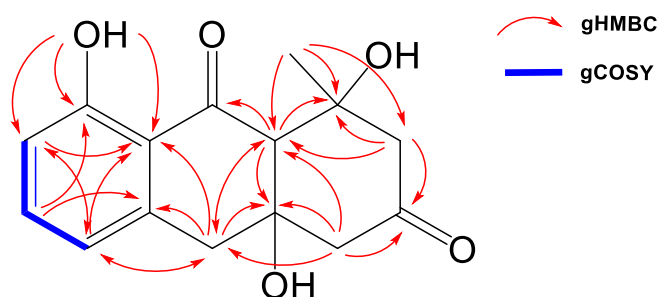
Figura 53. Correlaciones gCOSY y gHMBC de los compuestos **74** y **75**.

El compuesto **76** se aisló como un sólido amorfo marrón oscuro, con fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_5$ (ocho grados de insaturación). Los espectros de RMN 1H , ^{13}C y gHSQC (Tabla 18) sugirieron la presencia de un grupo metilo singlete, tres metilenos, un metino, tres protones aromáticos acoplados entre sí, dos carbonos cuaternarios sp^3 oxigenados (δ_C 74.5 y 75.3), dos carbonilos de cetona (δ_C 203.5 y 205.3) y un protón intercambiable (δ_H 12.37). El análisis del espectro gHMBC confirmó la presencia de un anillo aromático, lo que, junto a las dos cetonas, daba cuenta de 6 de los 8 grados de insaturación derivados de la fórmula molecular, lo que indicaba que este compuesto presentaba una estructura tricíclica. El resto de correlaciones observadas en el espectro gHMBC (ver tabla 18) establecieron dos anillos de ciclohexanona fusionados. Las correlaciones observadas de H_2-5 con C-4a, C-6, C-9a y C-10a, de H_2-4 con C-5, de H_2-2 y H_2-4 con C-3 y C-10a, de H-10a con C-10 y de H_3-11 con C-1, C-2 y C-10a fueron claves para establecer la estructura de la molécula, que fue confirmada posteriormente por comparación con los datos descritos en la bibliografía¹⁷⁶ para otras moléculas cuyos esqueletos eran prácticamente idénticos al de la estructura propuesta.

Tabla 18. Datos de RMN del compuesto **76** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
1		74.5, C		
2	2.49, (d, 14.2) 2.71, (d, 14.2)	55.3, CH ₂		C-1, 3, 10a
3		205.3, C		
4	2.76, s	54.8, CH ₂		C-3, 4a, 5, 10a
4a		75.3, C		
5	2.78* 3.70, (d, 17.0)	40.5, CH ₂		C-4a, 5a, 6, 9a, 10a
5a		141.6, C		
6	6.68, (d, 8.0)	120.0, CH	7, 8	C-5, 8, 9a
7	7.39, (t, 8.0)	137.2, CH	6, 8	C-5a, 9
8	6.82, (d, 8.0)	116.2, CH	6, 7	C-6, 9a
9		162.9, C		
9a		116.9, C		
10		203.5, C		
10a	2.95, s	62.8, CH		C-1, 4a, 5, 10
11	1.55, s	30.4, CH ₃		C-1, 2, 10a
9-OH	12.36, s			C-8, 9, 9a

* Señal solapada

**Figura 54.** Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **76**.

El compuesto **77** se aisló como un sólido amorfo amarillento con la fórmula molecular C₁₆H₁₄O₅ (diez grados de insaturación), establecida mediante HRESIMS y RMN.

En este caso, el espectro de ¹H RMN resultó ser muy similar al de las moléculas derivadas de antrona previamente elucidadas, sin embargo, el análisis detallado de los experimentos ¹³C y 2D RMN sugirió algunas diferencias en la estructura química. Las correlaciones gHMBC (ver tabla 19) y los desplazamientos químicos de H-6, H-7, H-8 y H₃-13 confirmaron que el resto de naftona era idéntico al de los compuestos oryzantrona A (**56**), oryzantrona B (**58**) y el compuesto **74**. Por otro lado, las

correlaciones gHMBC de H₃-12 con C-3 (δ_c 161.6) y C-3a (δ_c 117.5) y de H₃-11 con C-1 (δ_c 145.6) y C-10 (δ_c 190.4), junto con la información del peso molecular, sugirieron que la estructura del compuesto **77** presentaba un inusual cromóforo de nafto[2,3-*c*]furan-4(9*H*)-ona. La estructura de este compuesto se confirmó posteriormente por comparación con los datos descritos en la bibliografía para otros policétidos con el mismo esqueleto,^{177, 178} quedando definida como 1-acetil-5,9-dihidroxi-3,9-dimetilnafto[2,3-*c*]furan-4(9*H*)-ona (Fig. 50).

Para determinar la configuración absoluta de **77**, se realizaron cálculos TDDFT/ECD (teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo/dicroísmo circular electrónico) en el nivel teórico PCM/B3LYP/6-31G(d) utilizando estructuras previamente optimizadas en el mismo nivel. Hay que señalar que, debido a la rigidez de la molécula, sólo se encontró una estructura adecuada en una búsqueda conformacional de mecánica molecular dentro de un umbral de 21 kJ/mol. Como se observa en la figura 55, el espectro experimental mostró efecto Cotton negativo a ~210 nm y ~305 nm y efecto Cotton positivo a ~250 nm y ~350 nm. El espectro calculado para el enantiómero 9S coincidió claramente mejor con los datos experimentales, lo que permitió asignar la configuración absoluta de **77**.

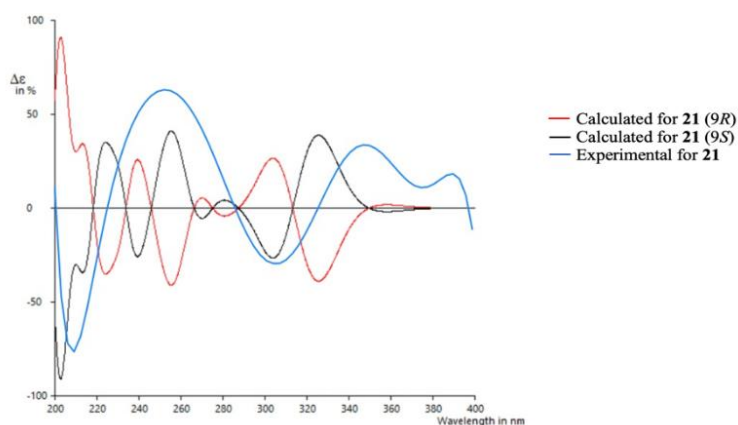


Figura 55. Espectros ECD experimental y calculados para el compuesto **77**.

Por otra parte, el espectro de ¹H RMN del compuesto **78** sugería una estructura muy similar a la de **77**, siendo la única diferencia la presencia de un grupo metino cuadruplete

(δ_H 4.58, δ_C 32.2) acoplado al grupo metilo H₃-13 (J = 7.1 Hz), en lugar del carbono cuaternario (δ_C 67.7) en C-9. Esto sugería la pérdida del grupo hidroxilo unido a C-9 en el compuesto **77**, lo que también era evidente por el hecho de que la masa molecular era 16 uma menor, estableciendo la estructura de **78** como 1-acetil-5-hidroxi-3,9-dimetilnafto[2,3-*c*]furan-4(9*H*)-ona (Fig. 50).

Tabla 19. Datos de RMN de los compuestos **77** y **78** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	Compuesto 77				Compuesto 78			
	δ_H , ppm (J en Hz)	δ_C , ppm	gCOSY	gHMBC	δ_H , ppm (J en Hz)	δ_C , ppm **	gCOSY	gHMBC
1		145.6, C				***		
3		161.6, C				160.1, C		
3a		117.5, C*				117.9, C		
4		186.2, C				***		
4a		114.4, C				***		
5		163.0, C				***		
6	6.95, (dd, 8.0, 1.0)	116.9, CH	7, 8	C-4a, 8	6.87, (d, 8.0)	115.8, CH	7	C-7, 8
7	7.57, (t, 8.0)	137.3, CH	6, 8	C-5, 8a	7.47, (t, 8.0)	132.0, CH	6, 8	
8	7.42, (dd, 8.0, 1.0)	117.5, CH*	6, 7	C-4a, 6, 9	6.91, (d, 8.0)	115.7, CH	7	C-6
8a		148.9, C				148.1, C		
9		67.7, C			4.58, (q, 7.1)	32.2, CH	13	C-9a
9a		141.4, C				136.9, C		
10		190.4, C				187.9, C		
11	2.62, s	26.6, CH ₃		C-1, 10	2.54, s	26.7, CH ₃		C-10
12	2.82, s	14.7, CH ₃		C-3, 3a	2.82, s	***		C-3, 3a
13	1.69, s	35.4, CH ₃		C-8a, 9, 9a	1.53, (d, 7.1)	26.1, CH ₃	9	C-8a, 9, 9a
5-OH	12.68, s			C-4a, 5, 6	12.82, s			
9-OH	6.05, s			C-8a, 9				

* Señales solapadas

** Desplazamientos químicos asignados a través de correlaciones gHMBC

*** Señal no observada

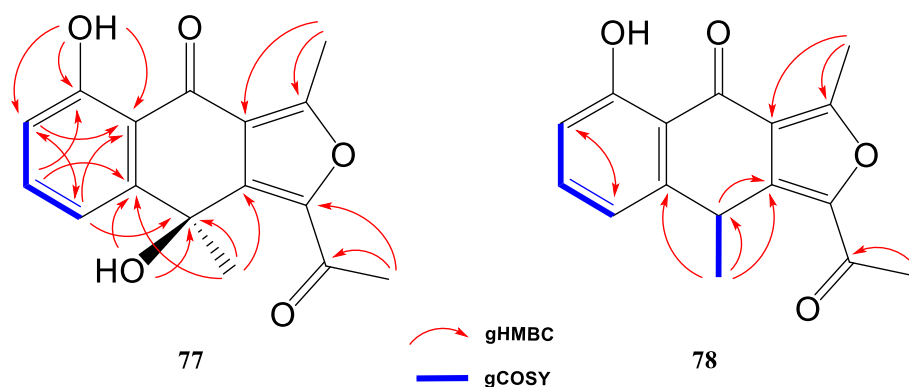


Figura 56. Correlaciones gCOSY y gHMBC de los compuestos **77** y **78**.

El compuesto **79** se aisló como un sólido amorfo amarillo. El análisis del espectro obtenido por HRESIMS reveló la presencia de un ion molecular a m/z 263.0396 ($[M+H]^+$) y un pico isotópico a m/z 265.0371 con una relación 3:1, lo que sugirió la presencia de un átomo de Cl en la molécula, determinando la fórmula molecular $C_{14}H_{11}ClO_3$ (nueve grados de insaturación). La comparación de los espectros 1H y ^{13}C RMN de este compuesto con los de **77**, mostró una clara similitud entre estas dos moléculas, salvo por la pérdida de la metil cetona y la presencia de un nuevo protón aromático (δ_H 5.96, δ_C 101.8) y del átomo de Cl en el compuesto **79**. Las correlaciones gHMBC de H_{3-10} con C-2 y C-3, junto con la absorción a campo más bajo de los carbonos C-9 y C-9a, sugirieron un cambio en la localización del átomo de oxígeno del residuo de furano y la sustitución del grupo hidroxilo unido a C-9 por el átomo de Cl. El resto de correlaciones gHMBC confirmaron que el resto de la molécula era idéntico al de **77**, quedando establecida la estructura del compuesto **79** como 9-cloro-5-hidroxi-2,9-dimetilnafto[2,3-*b*]furan-4(9*H*)-ona (figura 50).

Tabla 20. Datos de RMN del compuesto **79** en CDCl₃ a 400 (¹H) y 100 (¹³C) MHz

no.	δ _H , ppm (J en Hz)	δ _C , ppm	gCOSY	gHMBC
2		175.9, C		
3	5.96, s	101.9, CH		C-2
3a		*		
4		183.1, C		
4a		112.9, C		
5		162.7, C		
6	6.92, (d, 8.0)	118.0, CH	7	C-4a, 8
7	7.41, (t, 8.0)	134.8, CH	6, 8	C-5, 8a
8	7.03, (d, 8.0)	114.4, CH	7	C-4a, 6, 9
8a		143.8, C		
9		90.3, C		
9a		169.9, C		
10	2.26, s	16.3, CH ₃		C-2, 3
11	1.73, s	37.4, CH ₃		C-8a, 9, 9a
5-OH	12.54, s			C-4a, 5, 6

* Señal no observada

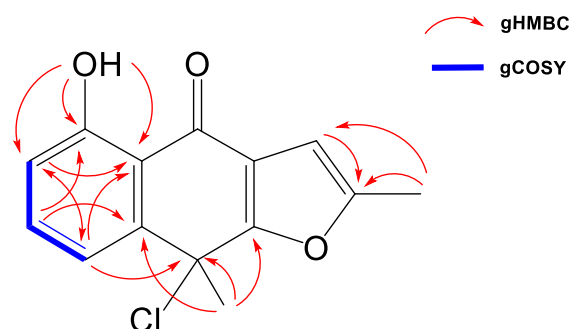


Figura 57. Correlaciones gCOSY y gHMBC del compuesto **79**.

Como resumen de los resultados de la estrategia OSMAC aplicada al microorganismo *Streptomyces griseorubiginosus*, la fermentación en medio FA-1 (condiciones estándar) produjo cinco PNs derivados de antraquinona y antrona (**55-59**). El cambio del medio de cultivo de FA-1 a SAF dio lugar a la producción de otros cinco metabolitos secundarios (**60-64**) con estructuras totalmente diferentes a las observadas en las condiciones estándar. El cambio de medio líquido a medio sólido SymPV-21 produjo otros cinco compuestos (**65-69**), cuatro ciclodipéptidos y el sideróforo nocardamina (**69**). Por último, la adición del autoinductor γ -butirolactona al medio FA-1 provocó la acumulación de diez metabolitos adicionales (**70-79**), de los cuales siete de ellos (**73-79**)

resultaron ser nuevos PNs no descritos previamente en la literatura, algunos de ellos con estructuras poco frecuentes.

3.2.4. AA-74-MO2-007 (*Streptomyces wuyuanensis*)

El último microorganismo objeto de estudio al que se aplicó la estrategia OSMAC fue el actinomiceto *Streptomyces wuyuanensis*, aislado de un molusco intermareal recogido en la playa de Bome (Guinea Ecuatorial).

La fermentación de este microorganismo en medio FA-1 (condiciones estándar) dio lugar al aislamiento de cuatro PNs (**80-83**), todos ellos previamente descritos en la literatura.

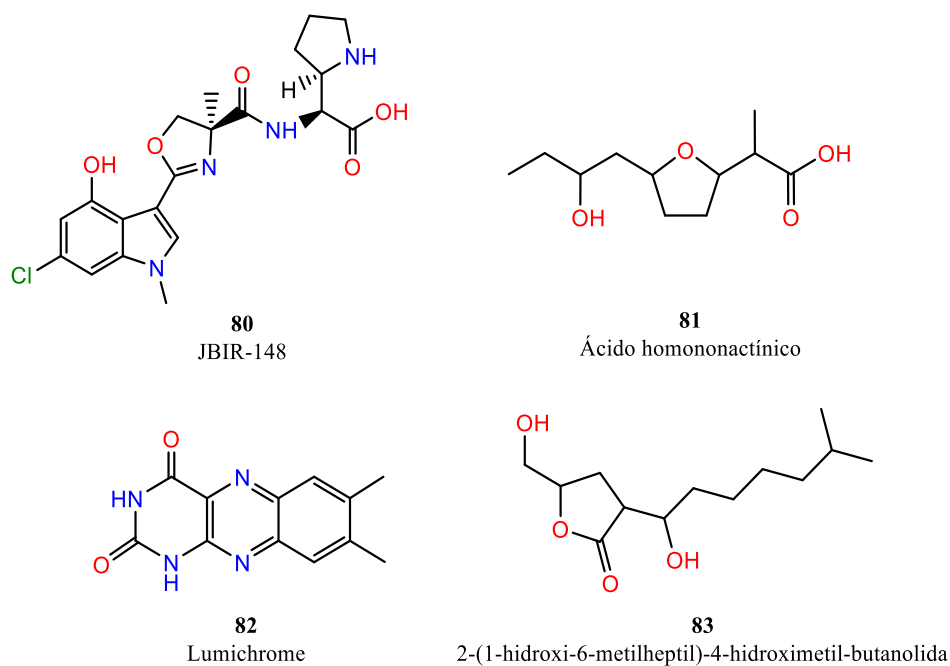


Figura 58. Metabolitos secundarios aislados de *S. wuyuanensis* en medio de cultivo FA-1.

El fraccionamiento del extracto orgánico (2.64 g) de este cultivo mediante CPV generó 12 fracciones (¹F1-¹F12). El compuesto **80** (5.9 mg) se obtuvo a partir de la fracción ¹F11-12 mediante cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH, seguido de un paso adicional de purificación por cromatografía líquida

de fase reversa, utilizando un gradiente de MeOH/H₂O. Mientras que los compuestos **81-83** se aislaron de la fracción ¹F7 mediante cromatografía líquida de fase reversa, utilizando un gradiente de MeOH/H₂O. La purificación total de estos tres últimos no fue necesaria, ya que quedaron perfectamente identificados mediante desreplicación química.

El compuesto **80** se identificó como JBIR-148,¹⁷⁹ por comparación de sus espectros HRESIMS y RMN con los publicados para este compuesto en bibliografía, mientras que los compuestos **81-83** se identificaron como ácido homononactínico (**81**), lumichrome (**82**) y 2-(1-hidroxi-6-metilheptil)-4-hidroximetil-butanolida (**83**), mediante desreplicación química HPLC/UV/MS, coincidiendo sus t_R y espectros HRESIMS y UV con los datos almacenados en la base de datos de compuestos puros de BMT.

A continuación, se cultivó el actinomiceto *S. wuyuanensis* en medio MN-2, obteniéndose otros tres metabolitos secundarios (**84-86**), que no se detectaron en el cultivo en condiciones estándar.

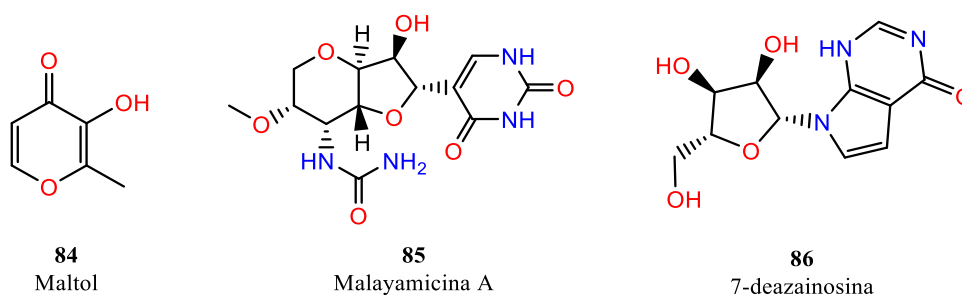
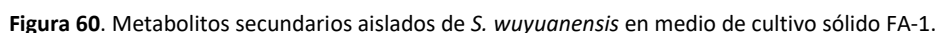


Figura 59. Metabolitos secundarios aislados de *S. wuyuanensis* en medio de cultivo MN-2.

A partir del extracto orgánico (1.33 g) se obtuvieron un total de doce fracciones (^{M1}F1-^{M1}F12) mediante CPV. Las fracciones ^{M1}F6-8 se purificaron mediante cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH, para obtener el compuesto **84** (28.2 mg). Los compuestos **85** y **86** aparecieron en las fracciones ^{M1}F11-12 y no se llegaron a aislar, sino que fueron identificados por desreplicación química.

El compuesto **84** se identificó como maltol,¹⁸⁰ por comparación de sus espectros HRESIMS y RMN con los publicados para este compuesto en bibliografía, mientras que

Para la fermentación de *S. wuyuanensis* en medio sólido se seleccionó el medio FA-1 agar. Este cambio de medio de cultivo permitió aislar tres PNs adicionales (**87-89**), entre los cuales se encontraba un llamativo complejo de cobalto.



Los compuestos **87** y **88** se identificaron como ciclo(4-hidroxiprolinil-fenilalanina) y ciclo(4-hidroxiprolinil-leucina), respectivamente, mediante desreplicación química HPLC/UV/MS, por comparación de sus t_R y espectros HRESIMS y UV con los datos almacenados en la base de datos de compuestos puros de BMT.

El compuesto **89** se aisló como un sólido amorfo naranja y el análisis del espectro obtenido por HRESIMS reveló la presencia de un ion molecular a m/z 454.8648 ($[M+H]^+$). Sin embargo, el análisis de los espectros RMN 1D y 2D condujo a la identificación de un único residuo de ácido piridin-2,6-ditiocarboxílico (PDTC) (PM = 197), lo que sugería que este compuesto debía tener una estructura simétrica. Tras una revisión bibliográfica, teniendo en cuenta la información del peso molecular y la presencia de PDTC en la molécula, se estableció la estructura de este compuesto como el complejo de cobalto de PDTC (Fig. 60).

El PDTC está descrito en bibliografía como un metabolito secundario producido por ciertas bacterias (*pseudomonas*) cuando crecen en medios limitados en hierro,¹⁸¹ y este compuesto tiene una gran afinidad por varios metales.^{182, 183} Esta información, junto con la presencia de compuestos de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) en el medio de cultivo, confirmaron la obtención de este complejo de cobalto por quelación de PDTC.

Por último, la adición de γ -butirolactona al medio de cultivo estándar (FA-1) de *S. wuyuanensis*, permitió el aislamiento de otros siete metabolitos secundarios (**90-96**), con distintas estructuras químicas.

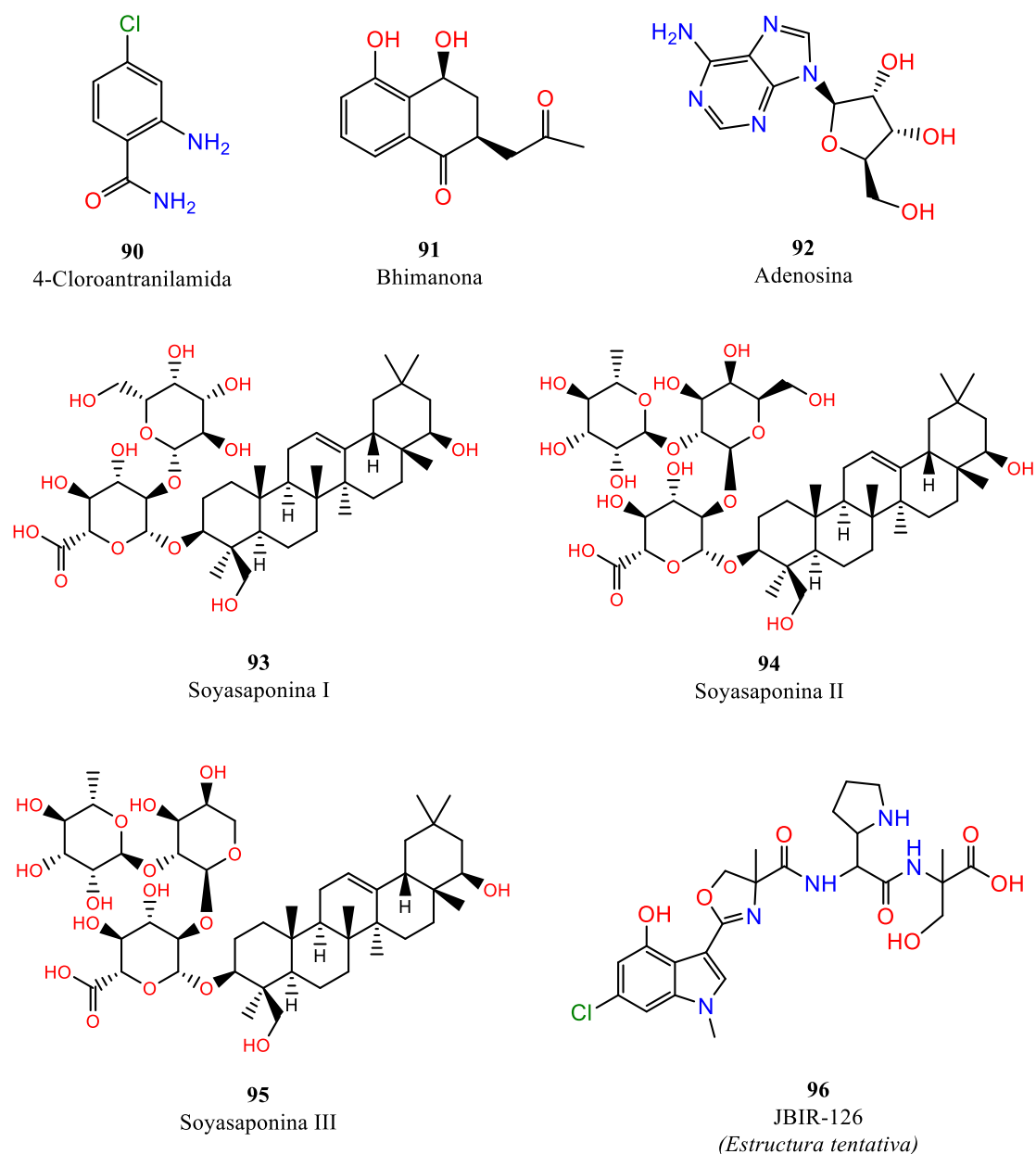


Figura 61. Metabolitos secundarios aislados de *S. wuyuanensis* en medio de cultivo sólido FA-1 con adición del inductor químico γ -butirolactona.

A partir del extracto de este cultivo (2.94 g) se obtuvieron 12 fracciones (B^1F1 - B^1F12) mediante CPV. Las fracciones B^1F6 -7 se fraccionaron adicionalmente mediante cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de hexano/EtOAc, para obtener 12 subfracciones (B^2F1 - B^2F12). El compuesto **90** (2.4 mg) se aisló a partir de la subfracción B^2F5 tras purificación por cromatografía líquida de fase reversa, usando un gradiente de MeOH/H₂O. El compuesto **91** apareció en las fracciones B^1F8 -9 y fue identificado por desreplicación química. Los compuestos **92** (9.2 mg) y **93-95** (44.1 mg)

se obtuvieron a partir de ^{B1}F11 mediante cromatografía líquida de fase normal, utilizando un gradiente de CH₂Cl₂/MeOH. Por último, el compuesto **96** (6.8 mg) se aisló a partir de la fracción ^{B1}F12, siguiendo el mismo procedimiento de purificación descrito anteriormente para los compuestos **92-95**.

El compuesto **91** se identificó como bhimanona mediante desreplicación química HPLC/UV/MS, por comparación de su t_R y espectros HRESIMS y UV con los datos almacenados en la base de datos de compuestos puros de BMT. Por otro lado, los compuestos **90**, **92-95** se identificaron como 4-cloroantranilamida (**90**),^{184, 185} adenosina (**92**),¹⁸⁶ y soyasaponinas I-III (**93-95**)¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ tras el análisis de los datos obtenidos por HRESIMS y RMN y la comparación con los publicados en la bibliografía para estos compuestos.

El compuesto **96** se aisló en forma de un sólido amorfo incoloro. El espectro de absorción UV de este compuesto (λ_{max} 225, 240, 300 nm) era idéntico al de una de las moléculas previamente aisladas en la fermentación en medio FA-1 (condiciones estándar), JBIR-148 (**80**), y el análisis espectrométrico por HRESIMS reveló la presencia de un ion molecular a m/z 536.1888 [M+H]⁺ (calcd. para C₂₄H₃₁ClN₅O₇, 536.1912). Esta información sugería que el compuesto **96** debía tratarse de un análogo de JBIR-148 (**80**) con una masa molecular 101 uma superior a este. La búsqueda bibliográfica y el análisis por RMN del compuesto **96** parecían indicar que se trataba de JBIR-126, un alcaloide aislado por primera vez por Izumikawa, M. *et al.*¹⁷⁹ junto al mencionado JBIR-148 (**80**) a partir de un cultivo de *Streptomyces sp.*, sin embargo, aunque toda la información obtenida sugería que el compuesto **96** se trataba de JBIR-126, el análisis completo de los espectros RMN 1D y 2D de este compuesto no permitieron confirmar inequívocamente su estructura.

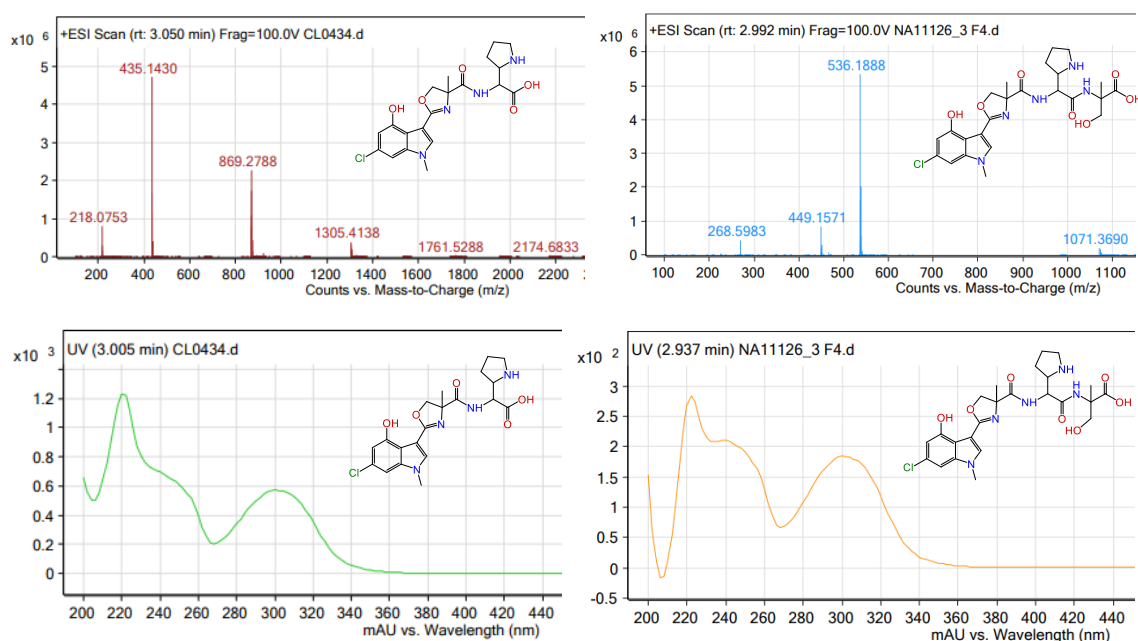


Figura 62. Espectros HRESIMS y UV de los compuestos JBIR-148 (**80**, PM = 434) (izda.) y el supuesto JBIR-126 (**96**, PM = 535) (dcha.) aislados de *S. wuyuanensis*.

En conclusión, la fermentación del actinomiceto *Streptomyces wuyuanensis* utilizando diferentes condiciones de cultivo (estrategia OSMAC), reportó un total de 17 metabolitos secundarios. Lamentablemente, ninguno de ellos resultó poseer una estructura novedosa, sin embargo, el aislamiento de moléculas conocidas, no incluidas hasta entonces en la colección de compuestos puros de BMT, uno de los principales activos de la empresa, ha contribuido al enriquecimiento de la misma, tanto en número como en variabilidad de compuestos.

Con todo este trabajo, queda demostrada la riqueza de metabolitos secundarios de interés producidos por las cepas de microorganismos estudiadas, y la influencia de la variación de los parámetros de cultivo (estrategia OSMAC) en el perfil de metabolitos secundarios producidos por un mismo microorganismo.

Así mismo, cabe destacar que en ocasiones los resultados obtenidos en las fermentaciones a escala reducida no se repiten en el proceso de ampliación de escala, lo que provoca que metabolitos secundarios producidos en las pruebas a escala reducida, no vuelvan a aparecer en el cultivo posterior a mayor escala en esas mismas condiciones, debido a la variabilidad entre distintos cultivos. En el presente trabajo, esta

dificultad estuvo presente en momentos puntuales, originando que ciertas condiciones de cultivo seleccionadas durante las pruebas en pequeño volumen, por su interés desde el punto de vista de producción de metabolitos secundarios potencialmente novedosos, no aportaran el resultado esperado en las fermentaciones a mayor volumen. Esto tuvo un especial impacto en el estudio de los cocultivos en los que participaron las cepas de actinomicetos con las que se ha trabajado a lo largo del proyecto, donde no se consiguió reproducir a mayor escala el perfil metabolómico observado en las pruebas a escala reducida, imposibilitando la identificación de las nuevas moléculas detectadas en dichas pruebas.

A este respecto, se muestran a continuación los resultados obtenidos con la técnica de cocultivo entre diferentes microorganismos, cuyo diseño viene detallado en la sección de materiales y métodos.

3.2.5. Cocultivos

En el caso del cocultivo entre los hongos *P. opacum* (HT-GU-SUES-1371) y *B. felina* (HL-102-24-R04) en medio de cultivo líquido a distintas concentraciones, se pudo observar que cuando el hongo *P. opacum* actuaba como cepa productora (90%) y *B. felina* como cepa inductora (10%), se producía un aumento del rendimiento de uno de los compuestos producidos por el hongo *P. opacum* en cultivo axénico, massarigenina C (**7**), mientras que en el caso contrario, cuando el hongo *B. felina* actuaba como cepa productora, el cromatograma del extracto era muy similar al del cultivo axénico de dicho hongo. Por otro lado, en el cocultivo 1:1 entre estos dos hongos aparecía un nuevo pico mayoritario en el cromatograma del extracto, sin desreplicación química por HPLC/UV/MS, derivado de la interacción entre estos dos hongos (Fig. 63). Sin embargo, este compuesto no pudo ser identificado debido a que no volvió a aparecer en cultivos posteriores.

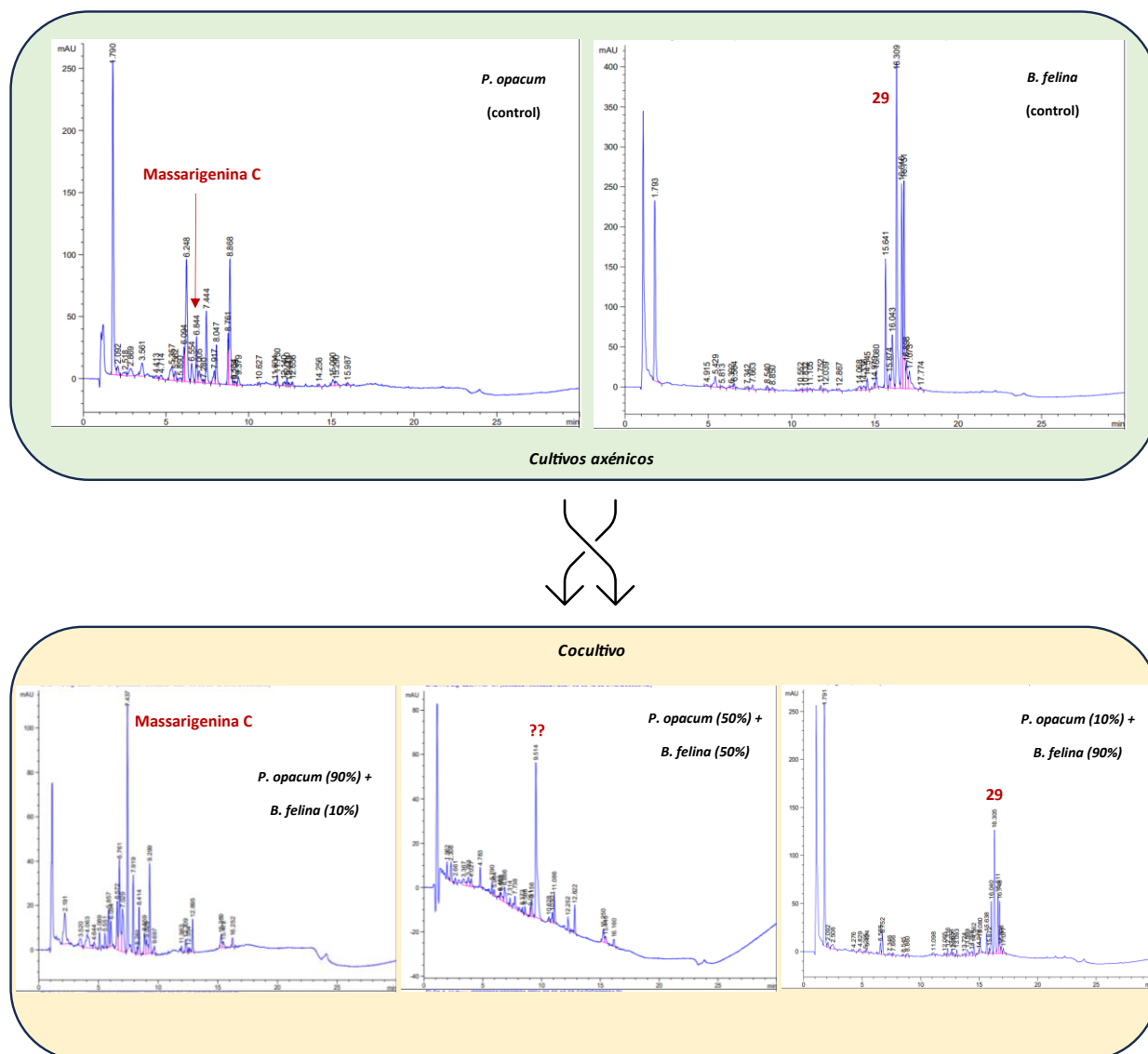


Figura 63. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cada cepa de hongos axénicos (arriba) y su cocultivo en medio líquido a distintas concentraciones (abajo).

En cuanto al cocultivo entre las actinobacterias *S. griseorubiginosus* (AA-AR-H-B002) y *S. wuyuanensis* (AA-74-MO2-007), también en medio de cultivo líquido, se observó una mayor población de metabolitos secundarios en el cromatograma del extracto del cocultivo cuando ambos microorganismos contribuyeron con un 50% del cultivo, respecto a los obtenidos para los correspondientes cultivos axénicos, que actuaron como control (Fig. 64). La baja intensidad de estos picos cromatográficos o, dicho de otro modo, la baja producción de estos metabolitos secundarios evitó el aislamiento e identificación de los mismos.

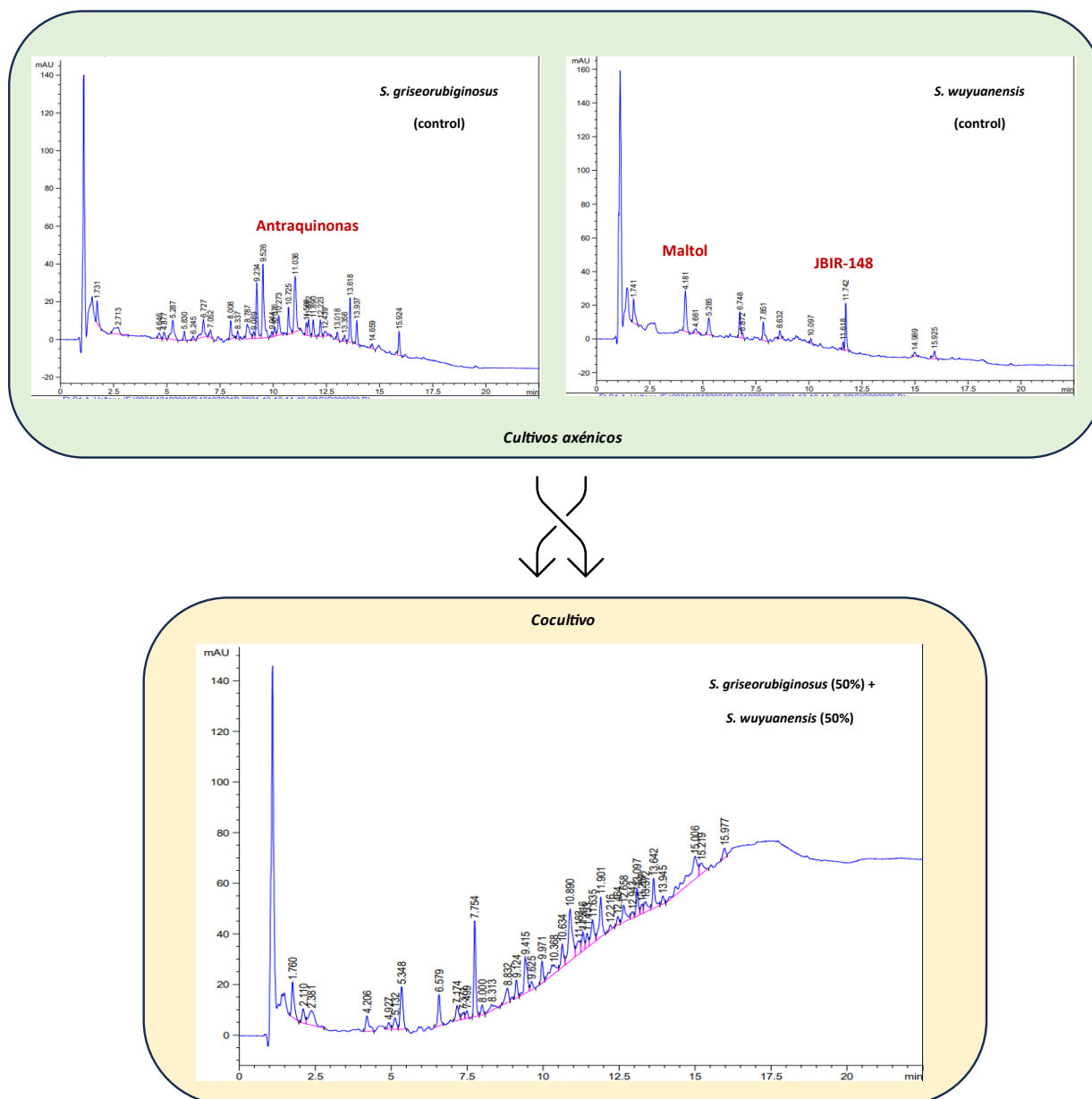


Figura 64. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cada cepa de actinomicetos en cultivo axénico (arriba) y su cocultivo 1:1 (abajo) en medio líquido.

Por otra parte, cuando se llevó a cabo el cocultivo mixto entre un hongo y un actinomiceto en medio líquido, se obtuvieron cromatogramas indicadores de la presencia de nuevos metabolitos no observados en las condiciones de cultivo axénico, en las pruebas a escala reducida. En la figura 65 se muestra un ejemplo de este tipo de cocultivo, en el que el hongo *P. opacum* y el actinomiceto *S. griseorubiginosus* se hicieron crecer en el mismo medio de cultivo, interactuando entre ellos. En este caso, la cepa fúngica actuó como productora (90%) y la cepa bacteriana como inductora (10%).

Además, como se menciona en la sección de materiales y métodos, en el caso de los actinomicetos, se llevaron a cabo experimentos de cocultivo con bacterias unicelulares (*Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*), en los que estas bacterias actuaban como inductoras al 10% y 25%. En este tipo de cocultivo, los resultados obtenidos no fueron significativos, dado que los cromatogramas de los extractos no aportaban novedad alguna en el perfil de metabolitos producidos, siendo idénticos al del cultivo axénico del actinomiceto productor.

Por otro lado, se llevaron a cabo nuevos cocultivos, pero esta vez en estado sólido. En este caso, al cocultivar los actinomicetos *S. griseorubiginosus* (AA-AR-H-B002) y *S. wuyuanensis* (AA-74-MO2-007) en medio sólido 172, se pudo observar la producción de sideróforos que no aparecían en los correspondientes cultivos axénicos, los cuales quedaron perfectamente desreplicados por HPLC/UV/MS, siendo el compuesto mayoritario desferrioxamina B (Fig. 66).

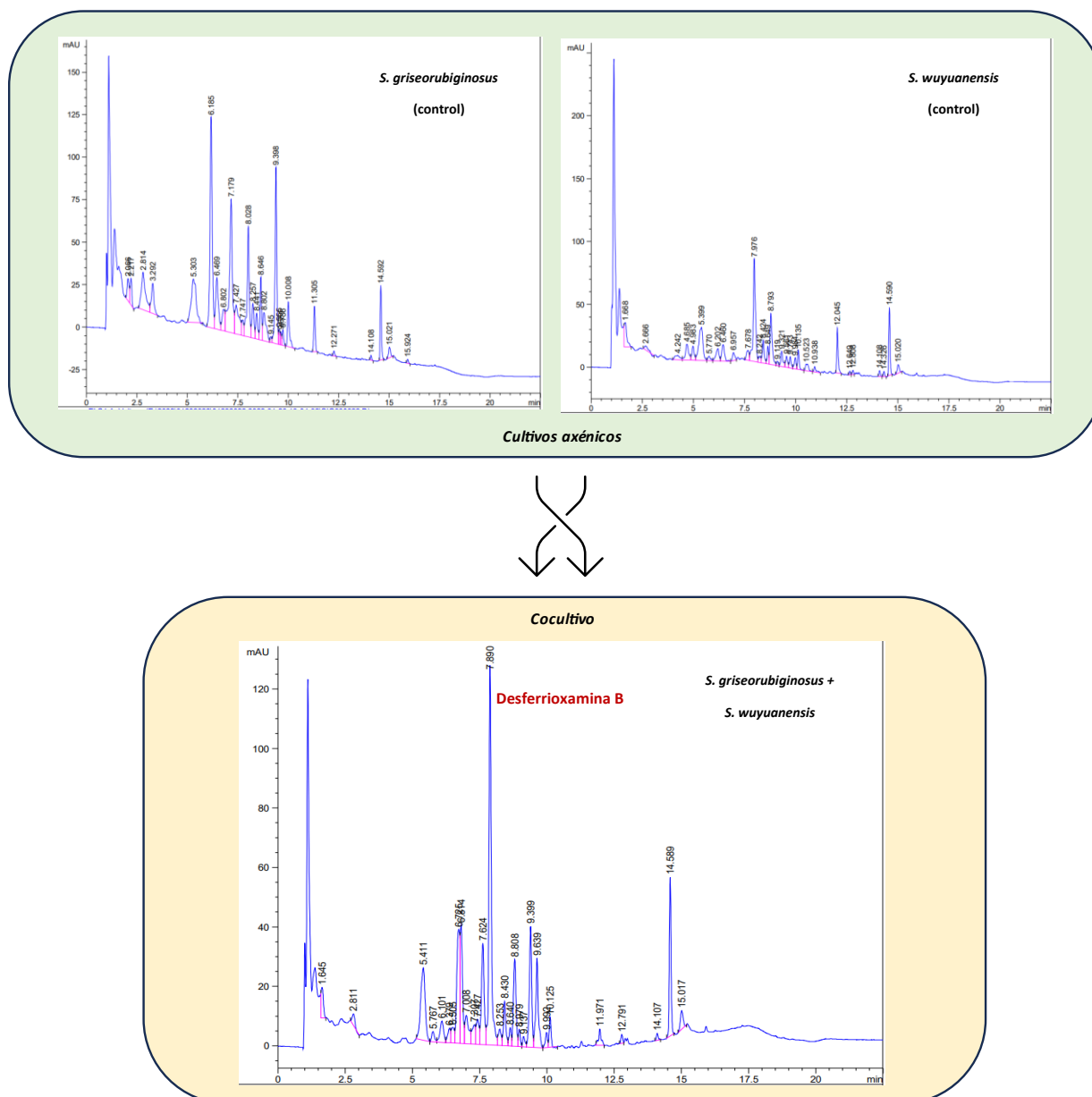


Figura 66. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cada cepa de actinomicetos en cultivo axénico (arriba) y su cocultivo en medio sólido 172 (abajo).

A este respecto, existe evidencia científica sobre la producción de sideróforos como herramienta en la lucha contra bacterias patógenas, por lo que parece razonable la producción de este tipo de compuestos como mecanismo de defensa bacteriano al interaccionar ambos microorganismos.

En los experimentos de cocultivo mixto entre un hongo y un actinomiceto en medio sólido, se obtuvieron resultados interesantes en cuanto a la producción de nuevos

metabolitos secundarios no observados en los controles (cultivos axénicos) en las pruebas a escala reducida. En las figuras 67 y 68 se muestran los resultados obtenidos en los cocultivos entre el hongo *P. opacum* y el actinomiceto *S. wuyuanensis* en medio PDA sólido, y entre el hongo *B. felina* y el actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio 172 sólido, respectivamente.

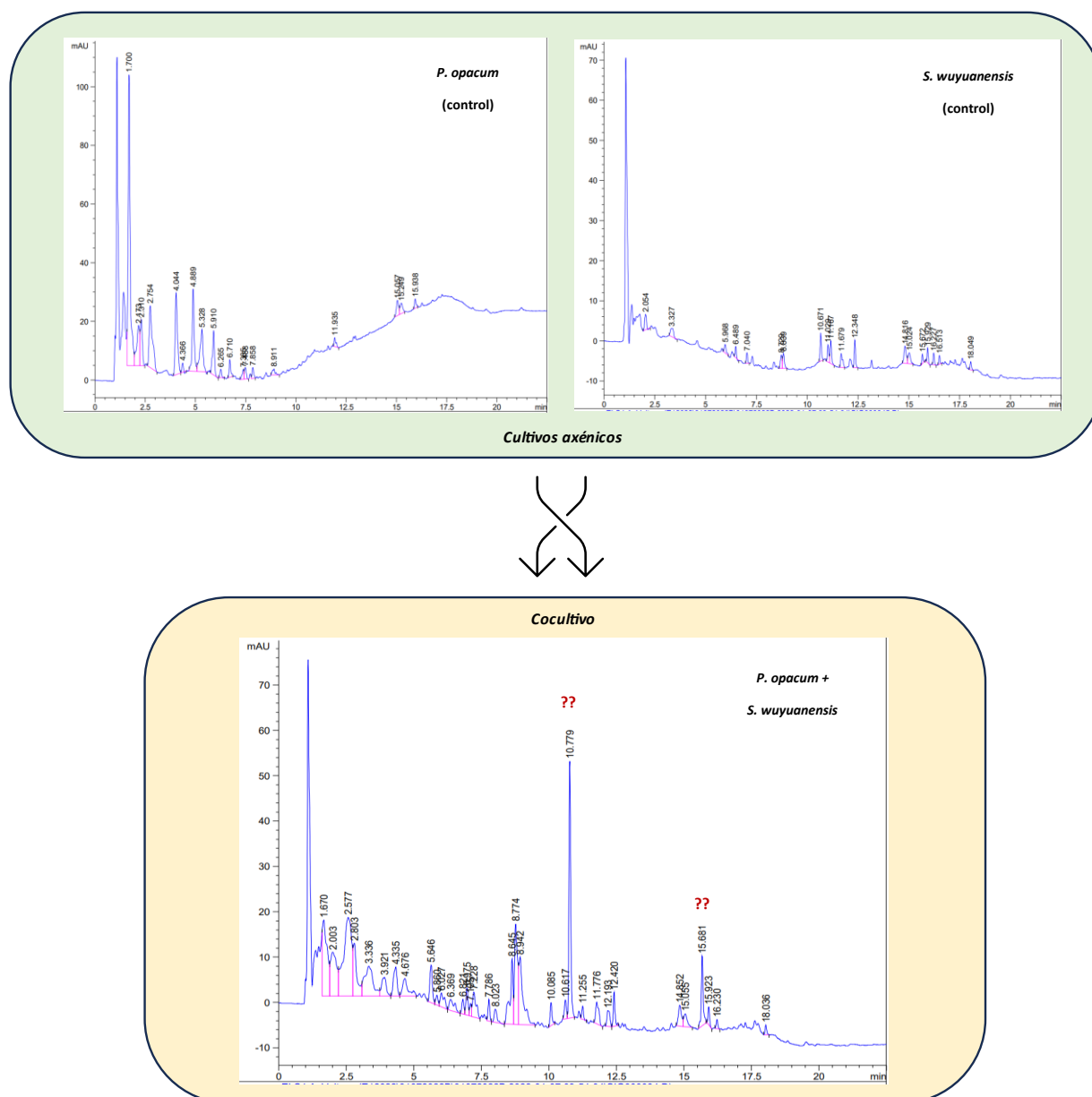


Figura 67. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cepas de *P. opacum* y *S. wuyuanensis* en cultivo axénico (arriba) y su cocultivo en medio PDA sólido (abajo).

Los perfiles de estos cocultivos fueron seleccionados para llevar a cabo nuevas fermentaciones a mayor escala y conseguir aislar cantidad suficiente de estos compuestos para proceder a la elucidación de sus estructuras. Sin embargo, estos perfiles de metabolitos no volvieron a producirse, por lo que estas moléculas no pudieron ser identificadas. Esto pudo deberse al escaso crecimiento de los microorganismos dentro de la placa Petri, originando que las cepas microbianas apenas entraran en contacto, lo cual se observó el día de la cosecha de los cocultivos.

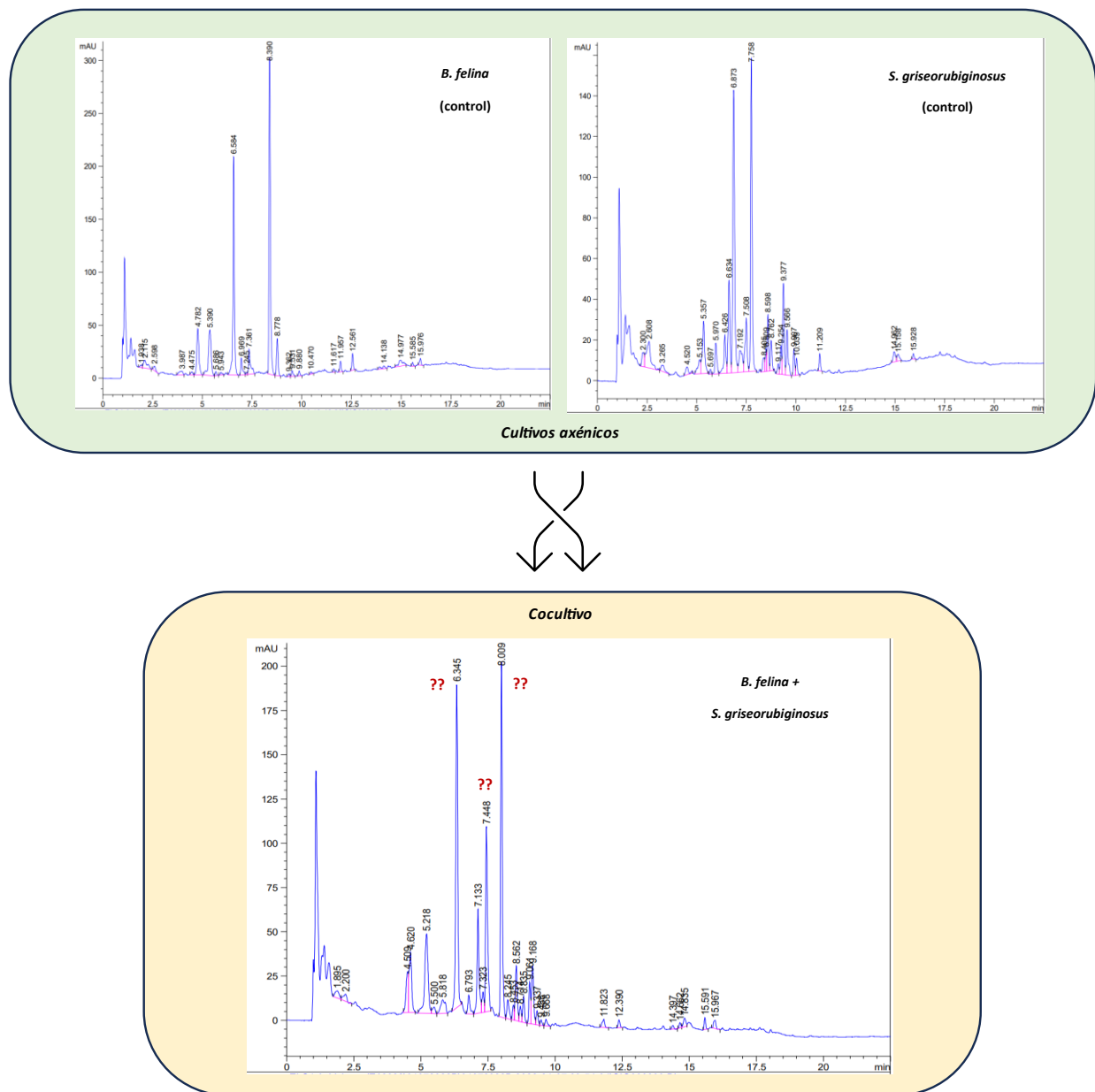


Figura 68. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cepas de *B. felina* y *S. griseorubiginosus* en cultivo axénico (arriba) y su cocultivo en medio sólido 172 (abajo).

Por último, mencion aparte requieren los cocultivos entre hongos en medio sólido, en concreto los cocultivos llevados a cabo entre *P. opacum* y *Echinocatena sp.* (Fig. 69), y entre *B. felina* y *Penicillium brevicompactum* (Fig. 70), los cuales aportaron los resultados más sobresalientes y cuyo estudio ya ha sido detallado anteriormente en esta tesis, junto con el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos en estas condiciones.

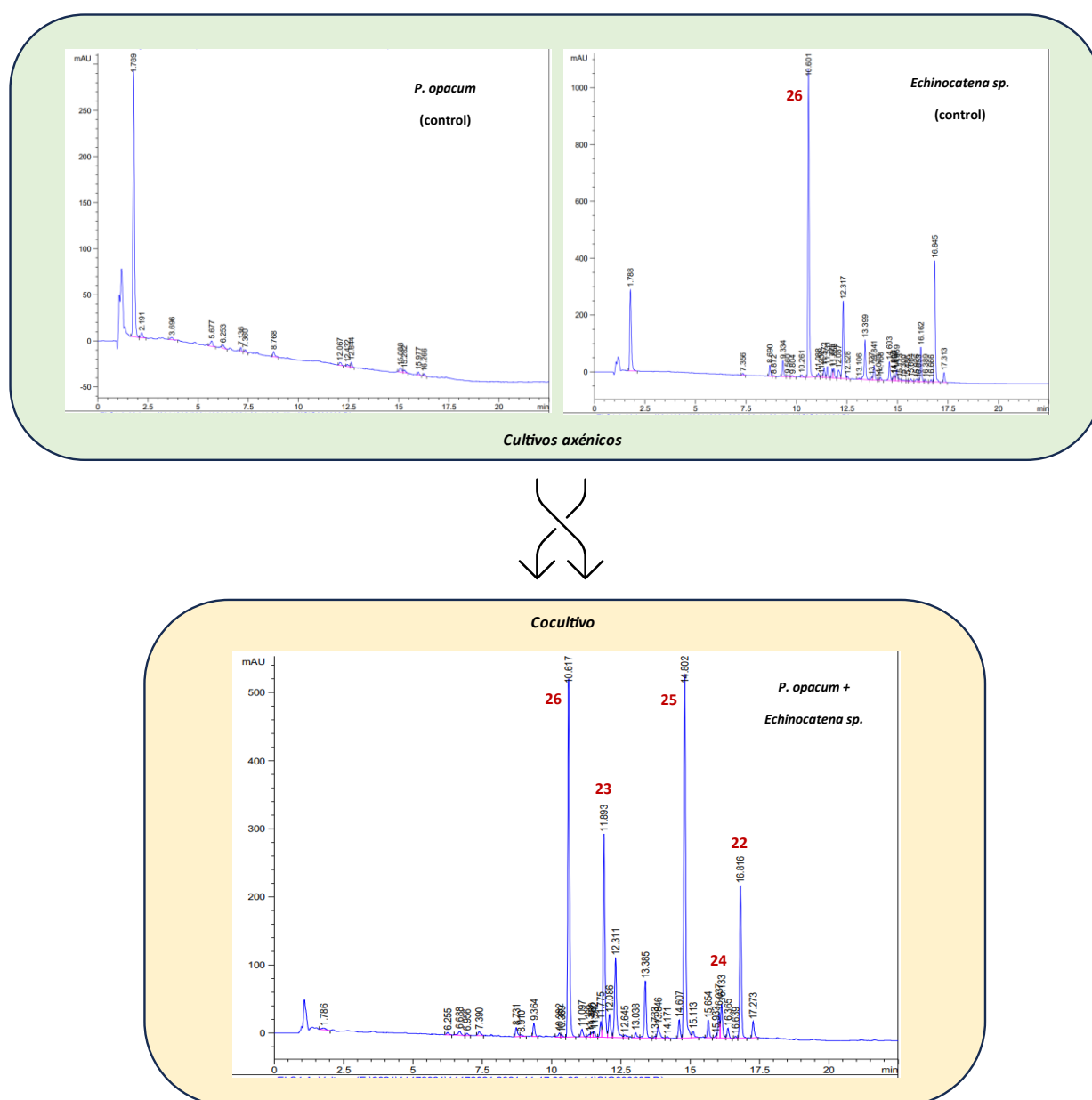


Figura 69. Comparación de los perfiles de metabolitos secundarios producidos por cepas de *P. opacum* y *Echinocatena sp.* en cultivo axénico (arriba) y su cocultivo en medio PDA sólido (abajo).

3.3. Actividad biológica en ensayos in vitro de los metabolitos aislados

Por último, se evaluó la actividad biológica de todos los compuestos aislados a lo largo de este trabajo, en diferentes ensayos in vitro, entre los que se incluyeron ensayos antibacteriano, antifúngico, citotóxico, antiangiogénico, insecticida, nematocida y de inhibición en la formación/crecimiento de biofilm en *Xylella fastidiosa* (ver sección 5.9 de materiales y métodos para información más detallada).

Los resultados derivados del ensayo antibacteriano (Tabla 21), revelaron un destacado potencial antimicrobiano para dos compuestos específicos. El primero de ellos es el compuesto nuevo **22**, el cual demostró una alta efectividad en la inhibición del crecimiento de *K. rhizophila*, con un valor de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) comprendido entre 4 y 8 ppm (12-25 μ M). Por otro lado, el compuesto **59** (clororyzantrona B) también se distinguió en este contexto, mostrando una capacidad similar para inhibir el crecimiento de *B. subtilis* y *K. rhizophila*. En el caso de *B. subtilis*, la concentración mínima de inhibición de crecimiento se situó en el rango de 4-8 ppm (14-28 μ M), mientras que para *K. rhizophila*, se obtuvo un valor de MIC entre 1-2 ppm (3-6 μ M).

Ambos compuestos, **22** y **59**, pertenecen a la familia de las antraquinonas, una clase de sustancias que ha sido asociada en diversos estudios con propiedades antibióticas.¹⁹¹⁻¹⁹³ Estos resultados subrayan la importancia de estos compuestos y su potencial para el desarrollo de soluciones antimicrobianas.

Los resultados obtenidos de los ensayos antibacterianos arrojaron conclusiones adicionales. En el caso de los demás compuestos listados en la tabla 21, se observó una actividad antibacteriana de carácter moderado frente al panel de cepas Gram positivas (G+). Sin embargo, en lo que concierne a las cepas Gram negativas (G-), en ningún caso se evidenció una inhibición significativa del crecimiento, a las concentraciones ensayadas.

Tabla 21. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC en ppm) de los compuestos activos frente a las dianas Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-) evaluadas.

Compuesto	Cepas G+			Cepas G-		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
2	128	>128	128	>128	>128	>128
5	>128	>128	16	>128	>128	>128
19	>128	>128	128	>128	>128	>128
22*	64	16	8	>128	>128	>128
44*	>128	>128	64	>128	>128	>128
49	16	>128	16	>128	>128	>128
51	>128	>128	128	>128	>128	>128
55	>128	>128	128	128	128	>128
58	>128	64	16	>128	>128	>128
59	8	16	2	>128	>128	>128
71	>128	128	32	>128	>128	>128
72	>128	>128	128	>128	>128	>128
75	>128	>128	128	>128	>128	>128
84	128	>128	64	>128	>128	>128

* Compuesto nuevo

En cuanto al ensayo antifúngico, se destaca que, de todos los compuestos que han pasado por el screening, únicamente tres de ellos mostraron actividad frente a alguna de las cepas fúngicas diana, a las concentraciones a las que fueron evaluados. Esto se refleja en la información recopilada en la tabla 22 del estudio.

Específicamente, los compuestos **57** (aloesaponarin II) y **59** (clororyzantrona B) destacaron por su marcada actividad antifúngica frente a *Aspergillus nidulans*. Los valores de MIC oscilaron en el rango de 0.05-0.5 ppm para **57** y <0.05 ppm para **59**, lo que se traducen en concentraciones de 0.2-2 µM y menos de 0.2 µM, respectivamente. Estos resultados sugieren un potencial significativo para el uso de estos compuestos en la lucha contra la propagación del hongo *Aspergillus nidulans*.

Por su parte, el compuesto **48** (ácido micofenólico) exhibió actividad antifúngica efectiva frente a *Candida albicans*, con un valor de MIC comprendido entre 0.5-1 ppm (1.5-3 µM).

En contraste, el resto de compuestos analizados no presentaron actividad antifúngica significativa a concentraciones inferiores a 10 ppm. Este hallazgo refuerza la singularidad y la importancia de los tres compuestos mencionados previamente, que mostraron la

capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos probados en niveles de concentración relativamente bajos.

Tabla 22. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC en ppm) de los compuestos activos frente a las cepas fúngicas evaluadas.

Compuesto	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
57	0,5	>10	>10	>10
59	0,05	>10	>10	>10
48	>10	1	>10	>10

En relación al ensayo insecticida, ciertos compuestos exhibieron una mortalidad notable en porcentaje frente a *F. occidentalis* (thrips) y *M. persicae* (áfidos), sin embargo, ningún compuesto demostró actividad frente a *Tenebrio molitor* (Tabla 23). En este último ensayo se evaluaron un número limitado de compuestos debido a la cantidad necesaria para llevar a cabo las pruebas, la cual resultó insuficiente en numerosos casos. *F. occidentalis* y *M. persicae* son insectos fitopatógenos de relevancia en diversos cultivos como frutas, hortalizas y cereales. Por su parte, *Tenebrio molitor* se eligió como especie subrogada de *Agriotes spp.*, ante la dificultad de establecer una población de este insecto en condiciones de laboratorio con la que llevar a cabo los ensayos insecticidas.

El compuesto **35** (roseotoxin B) se erigió como un claro protagonista de los ensayos insecticidas, al presentar una acción insecticida sumamente potente. Este compuesto logró inducir una tasa de mortalidad completa, alcanzando el 100% tanto en la población de *M. persicae* (áfidos) como en la de *F. occidentalis* (thrips), a la concentración más baja ensayada (640 ppm). Estos resultados ilustran la excepcional capacidad de este compuesto para ejercer un control contundente sobre estas plagas. Por su parte, los compuestos **5** (massarilactona H), **26** (sulochrin), **32** (destruxina B), **36** (roseocardin), **84** (maltol), y los compuestos nuevos **16** y **29**, también exhibieron cierta actividad insecticida frente a thrips, con tasas de mortalidad significativas a las concentraciones ensayadas, reforzando la diversidad de compuestos que exhiben un potencial interesante como agentes insecticidas específicos para el control de thrips. En cuanto a los compuestos **3** (massarilactona C), **56** (oryzantrona A) y **59** (clororyzantrona B), aunque se detectó cierta actividad, no se evidenció una relación dosis-respuesta clara,

presentando actividad a concentraciones bajas y no a las concentraciones más elevadas, lo que plantea interrogantes sobre su mecanismo de acción y su idoneidad para su uso en aplicaciones insecticidas.

Por otro lado, los compuestos **4** (massarilactona E), **5** (massarilactona H), **7** (massarigenina C), **31** (destruxina A), y el compuesto nuevo **44**, presentaron una potente actividad insecticida frente a áfidos, con porcentajes de mortalidad superiores al 90% a la concentración ensayada (1 mg/planta), lo que sugiere un alto grado de eficacia contra esta plaga específica. Además, también se observó una leve actividad insecticida frente a estos insectos para los compuestos **1** (massarilactona A), **36** (roseocardin) y **84** (maltol).

La actividad insecticida de los ciclopeptidos ha sido objeto de una amplia gama de estudios científicos, en los que han sido examinados para determinar su eficacia en el control de insectos y plagas.^{104, 107, 108, 137, 194} En este contexto, es relevante mencionar que los compuestos **31**, **32** (destruxinas A y B), **35** (roseotoxin B), y **36** (roseocardin) pertenecen a esta familia de compuestos.

Tabla 23. Actividad insecticida (% mortalidad) de compuestos aislados activos.

Compuesto	<i>Tenebrio molitor</i> (larva de coleóptero)	<i>Frankliniella occidentalis</i> (Thrips)	<i>Myzus persicae</i> (áfidos)
1	0%	> 6400 ppm	66,66%
3	0%	53,33% (6400ppm)	0%
4	0%	> 6400 ppm	100%
5	0%	53,33% (6400ppm)	100%
7	0%	> 6400 ppm	100%
16*	0%	60% (6400ppm)	0%
26	0%	73,33% (6400ppm)	0%
29*	0%	60% (3200ppm)	3,33%
31	0%	-	93,33%
32	0%	100% (3200ppm)	16,66%
35	0%	100% (640ppm)	100%
36	0%	80% (3200ppm)	86,66%
44*	0%	-	100%
56	0%	60% (640ppm)	43,33%
59	-	53,33% (3200ppm)	6,66%
84	0%	60% (640ppm)	83,33%

Concentración ensayos. Tenebrio: 25000-15000-5000-2500-1000-500 ppm; Thrips: 6400-3200-640 ppm; Áfidos: 1 mg/planta
Los resultados en amarillo no presentaron dosis-respuesta

* Compuesto nuevo

Por otro lado, al explorar la actividad citotóxica ante una variedad de líneas celulares tumorales, como A549 (pulmón), H116 (colon), PSN1 (páncreas), T98G (glioblastoma cerebral) y hepG2 (hígado), se desvelaron resultados altamente interesantes en cuanto a la capacidad citotóxica de ciertos compuestos aislados. Específicamente, en el caso de las líneas celulares pulmonar (A549) y colorrectal (H116), se destacaron los compuestos **37** (clonostachydiol), **48** (ácido micofenólico) y **61** (*N*-acetiltiramina), mostrando valores de IC₅₀, la concentración de compuesto necesaria para reducir el 50% de la viabilidad celular, que se mantuvieron iguales o por debajo de 0.5 ppm, equivalentes a 2.8 μM, 1.8 μM y 1.5 μM, respectivamente. Frente a las células pancreáticas (PSN1), únicamente el compuesto **37** (clonostachydiol) destacó al mostrar valores de IC₅₀ dentro de este umbral (1.8 μM). En lo que respecta a la línea celular de glioblastoma cerebral (T98G), los compuestos **37** (clonostachydiol) y **54** (N⁶-(Δ²-Isopentenil)-9-metiladenina) mostraron valores de IC₅₀ de 2.3 μM y 1.8 μM, respectivamente. Al explorar la línea celular hepática (hepG2), se evidenció que los compuestos **27** (iso-isariin B), **61** (*N*-acetiltiramina), **62** (N-(4-hidroxifenetil)propionamida) y el compuesto nuevo **75**, exhibieron valores de IC₅₀ de 2.5 μM, 2.8 μM, 0.8 μM y 1.7 μM, respectivamente. Los resultados completos, incluidos otros compuestos con actividad citotóxica moderada frente a estas líneas celulares, se detallan en la Tabla 24.

Además, cabe resaltar que los compuestos **37** (clonostachydiol) y **61** (*N*-acetiltiramina) también presentaron una notoria actividad antiangiogénica frente a células endoteliales de aorta bovina (BAEC), lo que añade un componente adicional a su potencial multifacético en la investigación oncológica y antiangiogénica.

Estos resultados amplían nuestra comprensión de los compuestos aislados y su potencial aplicación en la lucha contra las células tumorales, así como en la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos que alimentan a los tumores.

Tabla 24. Valores de IC₅₀ (ppm) de citotoxicidad de compuestos aislados activos frente a diferentes líneas celulares tumorales y actividad antiangiogénica frente a células endoteliales de aorta bovina (BAEC).

Compuesto	A549	H116	PSN1	T98G	hepG2	BAEC
3			5			
5	5	5	5	5		
6		5	5			
15*					5	
22*						
24	5	5	5		5	
26	1	1	1	10		1
27	10	5			0,5	
29*					2,5	
30*		5			5	
31			5			
32		2,5	2,5		2,5	
33			5			
35		2,5			5	1
36		2,5			2,5	
37	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5
40	5				5	
41		5			5	
42*	5	2,5			5	
43*	5	2,5			2,5	
44*					2,5	
45				5	5	
48	0,05	0,5	1		5	1
49	5	5		1		
50					5	
51					5	5
53					2,5	
54	2,5	2,5	2,5	0,5	2,5	
58						5
61	0,5	0,5			0,5	0,5
62					0,5	
68					2,5	
70			5			
72						
75*					0,5	
77*					2,5	
84					5	
85			5			
89					5	
91	5					

* Compuesto nuevo

Al evaluar la actividad nematocida de los compuestos aislados, el compuesto **1** (massarilactona A) demostró una leve eficacia como inhibidor de la movilidad frente a *Meloidogyne javanica*, lo que se tradujo en una inhibición del movimiento del 70% a la concentración de 300 ppm. Asimismo, ninguno de los compuestos evaluados exhibió actividad frente a *C. elegans* a la máxima concentración ensayada.

Por otro lado, el análisis de la actividad biológica de los compuestos en relación a la inhibición en la formación/crecimiento de biofilm en *Xylella fastidiosa*, destacó a los compuestos **57** (aloesaponarin II) y **80** (JBIR-148) como activadores de biofilm a una concentración de 10 ppm. Este descubrimiento puede arrojar luz sobre la interacción de estos compuestos con los mecanismos de formación de biofilm en esta bacteria fitopatógena, lo que podría tener implicaciones tanto en la investigación sobre la virulencia bacteriana como en el desarrollo de estrategias de control.

Todos los compuestos aislados e identificados durante la realización de este trabajo han sido incluidos en la colección de productos naturales de BMT y serán probados en todos los posibles screenings frente a dianas de interés que se pongan a punto en la empresa, así como en otros muchos que puedan llevar a cabo colaboradores, por lo que no se descarta que en el futuro alguno de ellos se seleccione en alguno de estos screenings por presentar una actividad interesante.

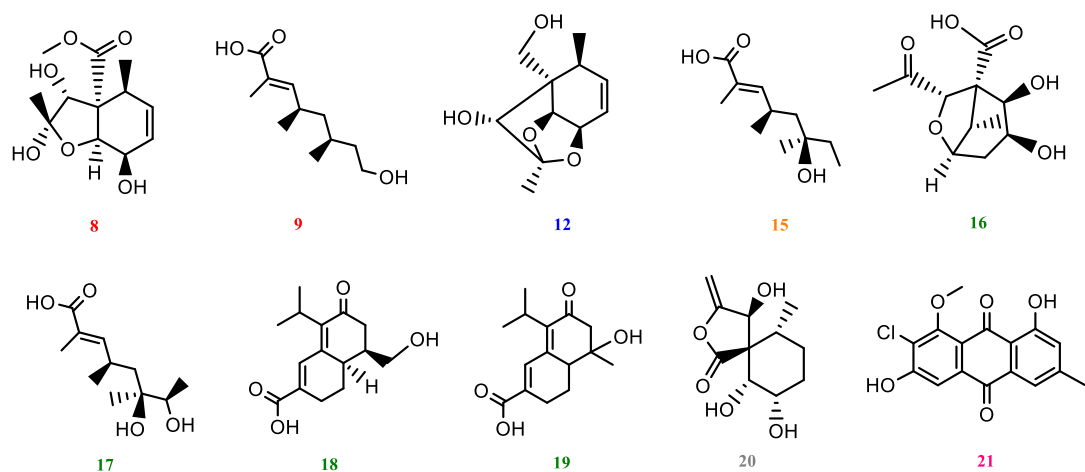
4. CONCLUSIONES

Como resultado de un enfoque multidisciplinario, en el transcurso del presente trabajo se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo, mediante el empleo de técnicas analíticas y de desreplicación de PNs, de una serie de extractos de cepas de microorganismos (hongos y actinomicetos, fundamentalmente de origen marino), con una amplia diversidad taxonómica y procedentes de distintas regiones geográficas. Entre ellas, destacaron las cepas de hongos HT-GU-SUES-1371 (*Pleotrichocladium opacum*), aislada de una muestra de suelo recogida en el norte de España y HL-102-24-R04 (*Beauveria felina*), procedente de una muestra de sedimento marino recolectada en Euskadi (España), así como las cepas de actinomicetos AA-AR-H-B002 (*Streptomyces griseorubiginosus*), recolectada de un arrecife cercano a Pointe de Bellevue, en la isla de la Reunión (Francia), y AA-74-MO2-007 (*Streptomyces wuyuanensis*), aislada de un molusco intermareal recogido en la playa de Bome (Guinea Ecuatorial), por su interesante perfil de metabolitos secundarios potencialmente novedosos. A este efecto, se consiguió identificar con éxito una amplia variedad de metabolitos secundarios producidos por estas cepas, que representan la enorme diversidad biológica de las colecciones de microorganismos de BMT, que constituyen una fuente muy importante de quimiodiversidad, haciendo especial énfasis en aquellas de origen marino, que están adquiriendo un papel cada vez más relevante en la exploración de nuevos horizontes en este campo de investigación, resaltando el potencial único de los recursos marinos en la búsqueda de soluciones bioactivas.

Por otro lado, se ha estudiado la inducción del metabolismo secundario en los microorganismos mencionados, siguiendo una estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds), que ha demostrado favorecer la producción de metabolitos secundarios crípticos mediante la alteración de las condiciones de cultivo, la adición al medio de determinadas moléculas que actúan como inductores químicos y la técnica de cocultivo entre distintos microorganismos. El proceso de aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos bajo diferentes condiciones de cultivo ha reportado casi un centenar de moléculas aisladas, de las cuales 22 de ellas han resultado ser nuevos PNs, lo que supone aproximadamente un 25% de estructuras novedosas (Figura 71).

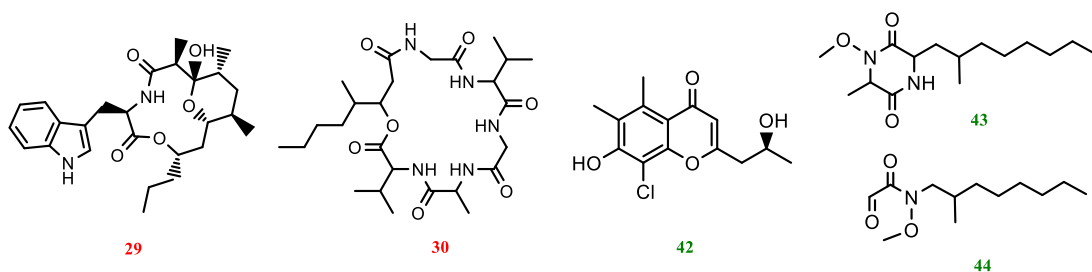
Pleotrichocladium opacum

■ JSA ■ Arroz ■ Trigo ■ Arroz + 5-az ■ Arroz + NAG ■ Cocultivo con *Echinocatena sp.*



Beauveria felina

■ MI/2 ■ Arroz + 5-az



Streptomyces griseorubiginosus

■ FA-1 + g-butirolactona

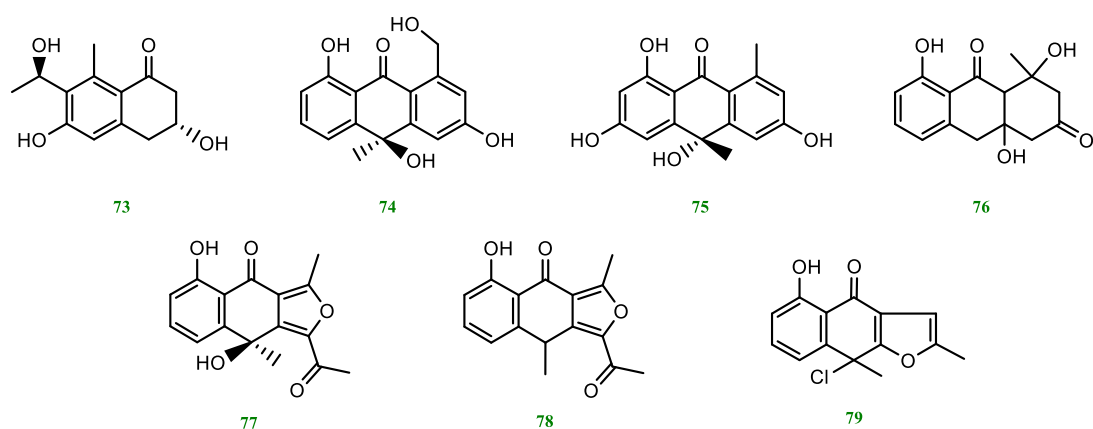


Figura 71. Selección de metabolitos secundarios aislados y caracterizados, no descritos en bibliografía, producidos por los microorganismos estudiados bajo diferentes condiciones de cultivo (OSMAC).

Este enfoque no solo amplía el conocimiento sobre la diversidad de metabolitos secundarios que son capaces de producir estos microorganismos, sino que también abre

la puerta a nuevas posibilidades en la investigación y desarrollo de compuestos bioactivos con potencial terapéutico y aplicaciones diversas.

Finalmente, y para completar este trabajo, se llevó a cabo un estudio de actividad biológica de los compuestos aislados en diferentes ensayos in vitro, que ha revelado prometedores hallazgos en diversos campos.

Por tanto, teniendo en consideración todo esto, resulta evidente el renovado interés de las colecciones de microorganismos productores de un amplio abanico de metabolitos secundarios bioactivos y su potencial aplicación en sectores como salud humana y animal, agricultura, alimentación, etc. A este respecto, la estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds) se alza como una herramienta prometedora, ofreciendo una perspectiva emocionante para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividades biológicas únicas, las cuales podrían ser esenciales para abordar los desafíos contemporáneos en el campo de la salud pública, generados por la proliferación de nuevas enfermedades y la aparición cada vez con mayor frecuencia de patógenos antibiótico-resistentes. Asimismo, su aplicabilidad se extiende a otros sectores vitales, como la agricultura, donde podrían contribuir al desarrollo de agentes protectores de cultivos más eficaces y sostenibles, y la seguridad alimentaria, al ejercer control sobre patógenos y agentes perjudiciales presentes en los alimentos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos: Hongos y actinomicetos de origen marino y terrestre

HT-GU-SUES-1371

El hongo se aisló de una muestra de suelo recogida en el norte de España. La cepa se transfirió de la colección del Dr. J. Guarro, Universitat Rovira i Virgili a la colección de microorganismos de BMT y se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 21234.

La determinación taxonómica se realizó mediante secuenciación génica de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico. Comparando la secuencia obtenida con las secuencias depositadas en las bases de datos del Genbank, se obtuvo una coincidencia del 99% con *Pleotrichocladium opacum*. Las colonias del hongo muestran un crecimiento micelial algodonoso blanco que se vuelve gris a los 15 días, y alcanzan 9 cm de diámetro en 15 días a 25 °C sobre agar dextrosa de patata, en una cámara de cultivo con una humedad del 42%. La cepa esporula formando aleurioconidios clavados de 1-3 células, de color marrón en la punta y más pálidos en la célula basal. Un cultivo puro de HT-GU-SUES-1371 se mantiene en la colección de BMT, congelado a -70 °C en glicerol al 20%.

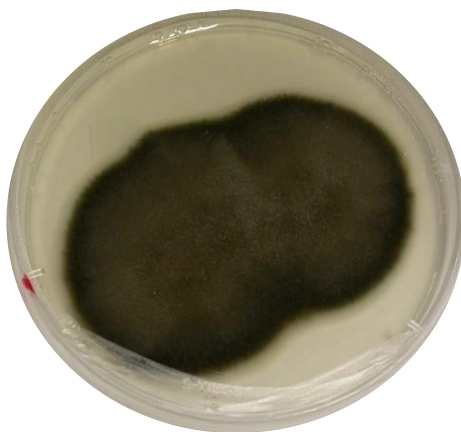


Figura 72. Imagen de un cultivo de *Pleotrichocladium opacum* (cepa HT-GU-SUES-1371) en placa Petri.

HL-102-24-R04

El hongo fue aislado de una muestra de sedimento marino recolectada en la costa de Euskadi (España), a una profundidad de 20-30 m y a una temperatura de 17 °C.

La determinación taxonómica se asignó después del análisis de secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico. Comparando la secuencia obtenida con las secuencias depositadas en las bases de datos de Genbank, se obtuvo una coincidencia del 97% con *Beauveria felina*. Las colonias muestran un aspecto algodonoso blanco al principio, y amarillento después de 15 días de crecimiento, y alcanzan 8-14 mm de crecimiento en medio PDA después de 15 días en una cámara de cultivo a 25 °C, con una humedad del 42% y en oscuridad. La conidiogénesis se obtiene fácilmente mediante la técnica de cultivo en portaobjetos sobre agar PDA. Las células conidiogénicas surgen individualmente y muestran una elongación simpodial, con una parte basal hinchada terminando en un raquis en zig-zag. Los conidios son elipsoidales, con base ligeramente puntiaguda, y ligeramente pigmentados en amarillo.

Un cultivo puro de la cepa HL-102-24-R04 se mantiene congelado en la colección de microorganismos de BMT, a -70 °C en glicerol al 20%.



Figura 73. Imagen de un cultivo de *Beauveria felina* (cepa HL-102-24-R04) en placa Petri.

AA-AR-H-B002

La cepa AA-AR-H-B002 se aisló de un cnidario no identificado recogido en un arrecife cercano a Pointe de Bellevue, en la isla de la Reunión (Francia) y fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España, con el número de acceso CECT 30830.

La cepa fue identificada como *Streptomyces griseorubiginosus* por secuenciación parcial de su ARN 16S, mostrando una homología del 99,78% en una secuencia de 913 nucleótidos de longitud. El ADN del microorganismo se obtuvo utilizando el kit DNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El gen 16S ADNr se amplificó utilizando los cebadores universales 27f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492r (TACGGYTACCTTGTTACGACTT). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 94 °C durante un minuto, luego 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 2 minutos, 72 °C durante 10 segundos, y finalmente un paso de 72 °C durante 7,5 minutos. El gen amplificado se purificó utilizando el kit QiaQuick de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados se enviaron a un servicio externo para su secuenciación. Todos los pasos del proceso fueron monitorizados utilizando electroforesis de agarosa al 1,2% en tampón TBE a mitad de fuerza.



Figura 74. Imagen de un cultivo de *Streptomyces griseorubiginosus* (cepa AA-AR-H-B002) en placa Petri.

AA-74-MO2-007

La cepa AA-74-MO2-007 se aisló de un molusco intermareal recogido en la playa de Bome, cercana a la ciudad de Bata (Guinea Ecuatorial).

La cepa fue identificada como *Streptomyces wuyuanensis* por secuenciación parcial de su ARN 16S, mostrando una homología del 99,89% en una secuencia de 881 nucleótidos de longitud. El procedimiento seguido para la identificación de la cepa fue idéntico al descrito anteriormente.



Figura 75. Imagen de un cultivo de *Streptomyces wuyuanensis* (cepa AA-74-MO2-007) en placa Petri.

Estos microorganismos fueron seleccionados por su perfil de producción de metabolitos secundarios, de entre una serie de hongos y actinomicetos de la colección de microorganismos de BMT, y han constituido el principal material biológico de este trabajo, aplicando la estrategia OSMAC para la inducción de su metabolismo secundario. El resto de los microorganismos que participaron en el proceso de selección mediante desreplicación química de los correspondientes extractos, así como en las pruebas de cocultivo con los microorganismos descritos anteriormente vienen recogidos en la tabla 25.

<i>Código cepa</i>	<i>Expedición</i>	<i>Región recogida</i>	<i>Muestra</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Especie</i>
MI-75-A20-043	MAR	Pontevedra (España)	Alga	Bacteria	<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>
MI-61-TEA-010	MAR	Pontevedra (España)	Desmoesponja Tethya aurantiacum	Bacteria	<i>Gordonia terrae</i>
BL-65-HOL2-018	MAR	Senegal	Echinodermata	Bacteria	<i>Dermatophilus sp.</i>
AA-78-CN2-009	MAR	Puerto Quetzal (Guatemala)	Arthropoda	Bacteria	<i>Salinicoccus roseus</i>
BL-59-SINU-006	MAR	Islas Mayotte (Francia)	Cnidaria	Bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>
AA-73-COF-018	MAR	Argentina	Alga	Bacteria	<i>Leifsonia poae</i>
AA-78-CR6-010	MAR	Puerto Quetzal (Guatemala)	Arthropoda	Bacteria	<i>Streptomyces sp.</i>
HL-84-MIS4-AD04	MAR	Guinea Ecuatorial	Cnidaria	Hongo	<i>Echinocatena arthrinioides.</i>
HL-84-TRO-AD01	MAR	Guinea Ecuatorial	Cnidaria	Hongo	<i>Ascomycete sp.</i>
HL-94-F20-Q01	MAR	Formentera (España)	Desconocido	Hongo	<i>Galactomyces sp.</i>
HL-94-F41-AA01	MAR	Formentera (España)	Desconocido	Hongo	<i>Penicillium raistrickii</i>
HL-94-F10-P02	MAR	Formentera (España)	Desconocido	Hongo	<i>Thielavia sp.</i>
HL-118-04-Q01	MAR	Azores (Portugal)	Porifera	Hongo	<i>Penicillium brevicompactum</i>
HL-118-08-P100	MAR	Azores (Portugal)	Porifera	Hongo	<i>Sterigmatomyces halophylus</i>

Tabla 25. Hongos y actinomicetos objeto de estudio junto con información taxonómica y sobre su origen.

5.2. Fermentaciones de los microorganismos seleccionados en diferentes medios y condiciones de cultivo y técnicas de cocultivo

Los microorganismos seleccionados (hongos y bacterias) se cultivaron siguiendo una estrategia OSMAC para la inducción de metabolitos secundarios crípticos, mediante fermentaciones en diferentes medios de cultivo, para lo que se realizaron pruebas en volumen pequeño con diferentes medios de fermentación, tanto líquidos como sólidos, seleccionando aquellos que aportaban mayor quimiodiversidad a la vista del perfil de

metabolitos producidos en los cromatogramas de HPLC de los extractos correspondientes. Por otro lado, se estudió la adición al medio de inductores químicos, entre los que destacaron N-acetil-D-glucosamina y 5-Azacidina para los hongos, y γ -butirolactona en el caso de los actinomicetos.

A continuación, se muestra una descripción más detallada de las fermentaciones axénicas llevadas a cabo con cada uno de los microorganismos estudiados en este trabajo.

La fermentación en condiciones estándar (JSA) del hongo *Pleotrichocladium opacum* (HT-GU-SUES-1371) se llevó a cabo en dieciséis matraces Erlenmeyer de 40 ml, con 10 ml de medio de siembra cada uno, compuesto por un 2% de harina de avena, un 2% de extracto de malta, un 0.01% de KH_2PO_4 y un 0.005% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (medio JSA). Para inocular cada matraz se utilizaron dos tacos picados de 1 cm de diámetro de un cultivo fúngico bien desarrollado en PDA. Los matraces se cultivaron a 25 °C, en un agitador rotatorio a 200 rpm, en oscuridad durante 48 h y se utilizaron como primer paso de inóculo. A continuación, se utilizaron 5 mL del primer inóculo por matraz para inocular dieciséis matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 40 mL del mismo medio de cultivo cada uno y se incubaron en las mismas condiciones durante 48 h, y se utilizaron como segundo paso de inóculo. La fermentación de 8 L en condiciones estándar (medio JSA) se llevó a cabo en treinta y dos matraces Erlenmeyer de 2 L, con 250 mL de medio de fermentación cada uno, en el mismo medio de cultivo y en las mismas condiciones de agitación y temperatura descritas anteriormente durante 7 días. Cada matraz se inoculó con 15 ml del segundo inóculo.

Además de la fermentación en condiciones estándar, se llevaron a cabo dos fermentaciones en medio sólido, en arroz y en trigo. La fermentación en estado sólido en arroz se llevó a cabo en treinta y dos matraces Erlenmeyer de 2 L con un medio de fermentación que contenía 125 g de arroz sancochado y 94 mL de H_2O destilada, mientras que para la fermentación en estado sólido en trigo se utilizó un medio que contenía 19.9% de trigo, 0.18% de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 0.9% de $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$, 0.045% de NH_4NO_3 , 1.33×10^{-5} % de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.33×10^{-5} % de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.33×10^{-5} % de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 79.75% de H_2O destilada. El resto del procedimiento de cultivo fue idéntico al descrito

anteriormente para el cultivo en condiciones estándar, excepto que los matraces se incubaron a 25 °C y en oscuridad durante 28 días.

Adicionalmente, se llevaron a cabo otras 2 fermentaciones para estudiar el efecto de la adición de inductores químicos al medio de cultivo. Los inductores químicos seleccionados fueron 5-azacitidina y N-acetil-D-glucosamina, los cuales se añadieron a fermentaciones en estado sólido en arroz a una concentración de 162 y 0.5 μ M, respectivamente.

Para la fermentación del hongo *Beauveria felina* (HL-102-24-R04), el procedimiento de preparación del medio de siembra e inoculación del hongo fue idéntico al descrito anteriormente para el hongo *P. opacum*. En este caso, la fermentación de 8 L en condiciones estándar (medio MI/2) se llevó a cabo en treinta y dos matraces Erlenmeyer de 2 L con 250 mL de medio de fermentación cada uno, compuesto por 0.1% extracto de carne, 0.2% triptona, 0.1% extracto de levadura, 0.5% levadura de panadería seca en escamas, 0.2% dextrosa, 1% almidón de arroz, 0.53% NaCl, 0.02% KCl, 0.24% MgCl₂-6H₂O y 0.75% Na₂SO₄, bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura descritas anteriormente, durante 7 días.

Además de la fermentación en condiciones estándar, el hongo *B. felina* fue cultivado en medio HGA líquido, cuya composición contiene 1.5% harina de soja, 0.8% glicerol y 1.5% almidón de arroz, bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura descritas anteriormente, durante 7 días. Adicionalmente, se llevaron a cabo otras 3 fermentaciones en medio sólido en arroz, con y sin la adición de inductores químicos, en las mismas condiciones descritas anteriormente para *P. opacum*.

En el caso de los dos actinomicetos seleccionados, las fermentaciones líquidas se realizaron en matraces incubados a 28 °C y con una agitación a 240 rpm. Todas se iniciaron a partir de un cultivo fresco y confluyente del actinomiceto en medio sólido 172, incubado durante una semana a 28 °C. Este medio está compuesto por 10 g de glucosa, 20 g de glucidex-12, 5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona de caseína, 15 g de agar y 1 g de carbonato cálcico, añadido tras el ajuste del pH (cantidades referidas a 1 L de medio). El inóculo se desarrolló en dos etapas. La primera se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 50 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio MIM, que contiene 3 g

de extracto de carne de vacuno, 5 g de peptona de caseína, 5 g de harina de semilla de soja, 24 g de almidón de maíz, 5 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa, 7.5 g de Na_2SO_4 , 5.34 g de NaCl, 2.4 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KCl y 4 g de carbonato cálcico, añadido tras el ajuste del pH (cantidades referidas a 1 L de medio). Estos matraces se sembraron con 3 discos tomados del cultivo sólido confluyente bajo las condiciones de incubación descritas anteriormente, durante 48 horas. La segunda etapa se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad llenos con 40 ml de medio MIM y sembrados con 4 ml de la primera etapa, bajo las condiciones de incubación descritas anteriormente, durante 48 horas. Finalmente, la fase de producción se llevó a cabo utilizando matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad, con 250 ml del medio apropiado, sembrados con 12 ml del inóculo de la segunda etapa, que se incubaron durante 96 o 120 h, según el experimento.

A continuación, se describe la composición de los medios de fermentación utilizados en la fase de producción para los actinomicetos *Streptomyces griseorubiginosus* (AA-AR-H-B002) y *Streptomyces wuyuanensis* (AA-74-MO2-007):

Medio FA-1 por litro: 5 g de levadura entera de panadería, 1 g de bacto peptona, 20 g de glucidex-12, 3 g de harina de semilla de soja, 5 g de glucosa, 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.0076 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.4 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7.5 g de Na_2SO_4 , 5.34 g de NaCl, 0.0013 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KCl y 4 g de carbonato cálcico añadido después del ajuste de pH.

Medio SAF por litro: 40 g de manitol, 10 g de glucosa, 12.5 g de maíz atomizado, 16 g de pharmamedia, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5 g de Na_2SO_4 , 2 g de NH_4Cl , 2 g de KCl, 2.34 g de NaCl, 0.0076 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 10 g de carbonato cálcico añadido después del ajuste de pH.

Medio SymPv-21 sólido por litro: 15 g de glicerol, 25 g de peptona proteosa, 5 g de farmacopea, 5 g de gluconato sódico, 2 g de K_2HPO_4 y 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Medio MN-2 por litro: 5 g de levadura entera de panadería, 10 g de glucidex-12, 10 g de harina de semilla de soja, 5 g de glucosa, 1 g de NaCl, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.0008 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 5 g de carbonato cálcico añadido después del ajuste de pH.

Medio FA-1 agar (sólido) por litro: 15 g de agar americano, 5 g de levadura entera de panadería, 1 g de bacto peptona, 20 g de glucidex-12, 3 g de harina de semilla de soja, 5

g de glucosa, 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.0076 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.4 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 7.5 g de Na_2SO_4 , 5.34 g de NaCl, 0.0013 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 g de KCl y 4 g de carbonato cálcico añadido después del ajuste de pH.

Para el experimento de adición de inductores químicos al medio de cultivo, se añadió γ -butirolactona al medio correspondiente (FA-1), a una concentración de 50 μM .

Por otro lado, todas las fermentaciones sólidas se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad, con 250 ml del medio sólido seleccionado. Los matraces sembrados se incubaron a 28 °C en condiciones aeróbicas durante 144 horas.

Por último, se realizaron experimentos de cocultivo de dos hongos o dos bacterias diferentes, o cocultivos mixtos entre un hongo y una bacteria, tanto en medio líquido en matraz, como en medio sólido en placa. Se llevaron a cabo cocultivos a escala reducida con diferentes microorganismos, seleccionando para una ampliación de escala, aquellos en los que el perfil de metabolitos producidos resultó ser diferente al de los cultivos axénicos por separado. Por regla general, los microorganismos involucrados en los diferentes cocultivos, presentaron diferentes tiempos de incubación, tanto para el desarrollo de sus inóculos, como para el desarrollo de la fermentación en el que se produjeron los diferentes metabolitos secundarios.

Los experimentos de cocultivo en medio líquido, tanto de dos hongos o dos actinomicetos, como los cocultivos mixtos hongo-actinomiceto, se llevaron a cabo en matraces de 250 ml de capacidad conteniendo 40 ml de medio de fermentación, utilizando distintas proporciones de los dos microorganismos (10:90, 50:50, 90:10). Se consideraron dos enfoques: uno en el que uno de los dos microorganismos actuaba como cepa productora, contribuyendo con un 90% del volumen de cultivo, y el otro como cepa inductora, contribuyendo con un 10% del cultivo, y otro en el que ambos microorganismos contribuyeron con un 50% del cultivo.

La cepa productora y la inductora siempre se inocularon y se incubaron durante 48 horas por separado. A las 48 horas se realizaron los cocultivos, añadiendo un 10% de cultivo de la cepa inductora al cultivo de la cepa productora. Una vez realizada la mezcla de cultivos, éstos se incubaron a diferentes tiempos, y se monitorizaron para la detección de posibles nuevos metabolitos secundarios. Para los cocultivos al 50%, el

procedimiento fue idéntico, uniendo volúmenes iguales de ambos cultivos. Las condiciones de incubación fueron 25 °C y 200 rpm para los cocultivos entre dos hongos y cocultivos mixtos, mientras que para los cocultivos entre 2 bacterias fueron 28 °C y 240 rpm.

Además, en el caso de los actinomicetos, también se llevaron a cabo experimentos de cocultivo con bacterias unicelulares (*Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*). En este tipo de cocultivo, la cepa productora siempre fue el actinomiceto y la cepa inductora la bacteria unicelular, que se añadió al 10% o al 25%. En estos experimentos, los cultivos bacterianos fueron previamente centrifugados y las bacterias ya lavadas se resuspendieron en saline estéril restaurando el volumen original y se usaron como inductoras a los porcentajes previamente indicados.

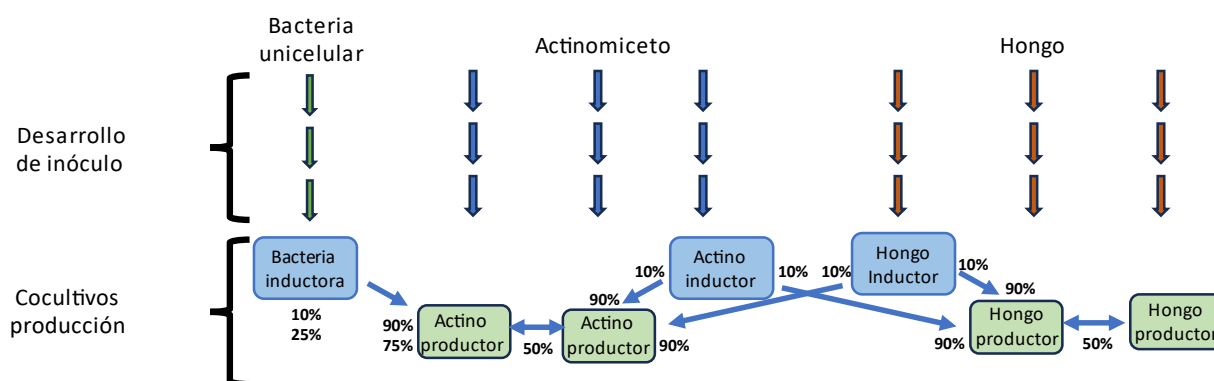


Figura 76. Esquema de los experimentos de cocultivo en medio líquido llevados a cabo entre diferentes microorganismos.

Por otro lado, los experimentos de cocultivo en medio sólido se realizaron entre dos hongos o dos actinomicetos, así como de manera mixta entre un hongo y un actinomiceto. Para ello, se emplearon placas de 6 pocillos, con 5 ml de medio por pocillo (medio PDA o medio 172). En los pocillos de la columna central se enfrentaron los dos microorganismos, mientras que en los de las columnas laterales se sembraron los microorganismos por separado como control, y se incubaron a distintos tiempos. Las condiciones de incubación fueron 25 °C en oscuridad para los cocultivos entre dos

hongos y cocultivos mixtos, mientras que los cocultivos entre 2 bacterias se incubaron a 28 °C, también en ausencia de luz.



Figura 77. Diseño experimental de los cocultivos en medio sólido en placa de 6 pocillos.

Los cocultivos en los que se detectó una alteración en el perfil de metabolitos secundarios producidos, respecto del de los cultivos axénicos por separado, se repitieron a mayor escala. En el caso de los cocultivos en medio sólido, los microorganismos se inocularon en dos puntos, uno en cada lado, en placas Petri de 90 mm que contenían medio PDA o medio 172, según el caso, bajo las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente, durante 14-28 días. Los cocultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 2 L con 250 ml de medio, en las condiciones habituales de incubación y fermentación descritas anteriormente para cada caso.

5.3. Extracción de los compuestos producidos por los microorganismos en los procesos de fermentación

Los extractos orgánicos se generaron a partir de las correspondientes fermentaciones de los microorganismos seleccionados, cultivados bajo distintas condiciones de fermentación, como se ha descrito en el apartado anterior.

En el caso de las fermentaciones en medio líquido, en primer lugar, se lleva a cabo una extracción en fase sólida utilizando un 10% v/v de un polímero de resina de adsorción (Amberlite XAD1180N™), una matriz muy robusta que permite trabajar en todo el rango de pH, a altas temperaturas y presiones, y con una amplia variedad de solventes orgánicos. Esta matriz se acondiciona en una mezcla 1:1 de MeOH/H₂O durante aproximadamente 24 h antes del proceso de extracción. Tras 1 h de agitación, se filtra el micelio, añadiendo Celite® como coadyuvante de la filtración, y se lleva a cabo una extracción sólido-líquido utilizando 50% v/v (respecto al volumen de fermentación) de una mezcla de disolventes orgánicos (EtOAc/MeOH 3:1 en la mayoría de los casos) que permite por una parte la desorción de los metabolitos extracelulares adsorbidos a la superficie de la resina, y por otra, la extracción de los metabolitos intracelulares contenidos en el micelio. Después de aproximadamente 1 h de agitación, se filtra para desechar la resina y los restos del micelio, y se separa la fase orgánica mediante decantación, evaporando el disolvente a vacío en un rotavapor.

Para las fermentaciones de los microorganismos cultivados en medio sólido, se lleva a cabo directamente la extracción con disolventes orgánicos, tras recoger y homogeneizar el contenido de los matraces (o placas Petri).

5.4. Desreplicación química mediante LC-UV-MS de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de los caldos de cultivo

Los extractos orgánicos de los caldos de fermentación se sometieron a un proceso de desreplicación química que permitió identificar aquellos compuestos (o picos en el perfil cromatográfico del extracto) que no se correspondían con ninguno de los compuestos

de la colección de compuestos puros de BMT, y que, por tanto, pudieran presentar algún tipo de novedad estructural.

La desreplicación se realizó a través de la técnica de HPLC, por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV-Vis de los compuestos del extracto con los de los compuestos puros (obtenidos en las mismas condiciones de análisis) que se encuentran almacenados en la base de datos de BMT. Para ello, 5 μ L de cada extracto, a una concentración de 5 μ g/ μ L, se analizaron utilizando un equipo de HPLC analítico Agilent 1200, con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (1.8 μ m; 4.6 x 50 mm), a 20 $^{\circ}$ C, con un flujo de 0.5 mL/min y un gradiente de MeOH/H₂O (con 0.04% de ácido trifluoroacético) que comenzó con un 15% de MeOH hasta alcanzar el 100% a los 15 minutos, se mantuvo al 100% de MeOH durante 5 minutos y volvió al 15% en 10 minutos, con un post-run de 5 minutos para inicializar el sistema.

También se hizo una desreplicación por comparación de los espectros de masas obtenidos en un equipo UHPLC modelo 1290 Infinity II acoplado a un espectrómetro de masas 6230 TOF LC/MS con fuentes de ionización ESI y APCI, usando una columna Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (1.8 μ m; 2.1 x 50 mm), a 40 $^{\circ}$ C, con un flujo de 0.6 mL/min y un gradiente de MeOH/H₂O (con 0.01% de ácido fórmico) que comenzó con un 20% de MeOH hasta alcanzar el 100% en 7 minutos, se mantuvo al 100% de MeOH durante 2 minutos y volvió al 20% en 1 minuto, con un post-run de 3 minutos para inicializar el sistema. Se recogieron barridos de UV mediante un array de diodos desde 200 a 600 nm.

La evaporación del disolvente de elución se obtuvo usando la fuente ESI estándar ajustada a un flujo de gas de secado de 10 L/min a 350 $^{\circ}$ C. El voltaje capilar se ajustó a 3000 V. Los espectros de masas se recogieron como full scans desde m/z 100 a 3200.

El análisis se realizó utilizando el software Masshunter suite (Agilent Technologies) versión B.08.00.

Además de los extractos, todas las fracciones obtenidas en cada paso de purificación se sometieron también a este proceso de desreplicación química.

5.5. Técnicas de cromatografía para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios

La purificación de los compuestos producidos durante los procesos de fermentación de los microorganismos se llevó a cabo utilizando distintas técnicas de cromatografía. En general, la primera etapa del proceso de purificación consistió en una cromatografía de fase normal, en placa filtrante a vacío (CPV), de los extractos orgánicos generados, seguida por uno o varios pasos de cromatografía líquida en columna, tanto en fase normal como reversa. En algunos casos el último paso del proceso se llevó a cabo en un HPLC semipreparativo.

El procedimiento seguido para la cromatografía en placa a vacío (CPV) fue el siguiente: se eligió una placa filtrante de tamaño adecuado al peso del extracto a cromatografiar y se añadió sílica gel (35-70 μm ; 60 Å; Thermo Scientific) como fase estacionaria hasta llenar aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes del volumen total de la placa filtrante. Paralelamente, se preparó una mezcla homogénea de la muestra a cromatografiar con aproximadamente el doble de peso de sílice, se acondicionó la sílica con el primer disolvente de elución y se cargó la muestra seca para dar comienzo a la cromatografía haciendo pasar por la columna de sílica gel la fase móvil, en un gradiente de polaridad creciente. El gradiente estándar utilizado para la cromatografía en placa de los extractos fue el siguiente: 6 fracciones de Hex/EtOAc (9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 3:7 y 2:8), una fracción de EtOAc, 4 fracciones de EtOAc/MeOH (9:1, 75:25, 1:1 y 25:75) y una última fracción de MeOH.

Para los siguientes pasos de cromatografía en columna, la fase estacionaria y la fase móvil se eligieron en función de la polaridad de los compuestos a cromatografiar, utilizando diferentes rellenos, tanto de fase normal como de fase reversa, así como mezclas de diferentes disolventes orgánicos (metanol, acetona, acetonitrilo, diclorometano, acetato de etilo, éter, hexano, etc.) como fase móvil. En todos los casos, se recogieron las fracciones en matraces esféricos, se evaporó el disolvente a vacío en rotavapor y se pesó el residuo obtenido de cada fracción. Por último, se prepararon muestras para desreplicación por HPLC y HPLC-MS, tal y como se describe en el apartado anterior. Para obtener una primera aproximación acerca de la composición de las fracciones recogidas, se realizó una cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas

de CCF (gel de sílice 60 F₂₅₄) como fase estacionaria y una mezcla de solventes orgánicos como fase móvil, que varió en cada caso en función de la polaridad de los compuestos aislados.

5.6. Purificación de productos aislados por HPLC semipreparativo

En aquellos casos en los que la cromatografía en columna, tanto en fase normal como en fase reversa, no fue suficiente para la purificación del compuesto de interés, se recurrió a la cromatografía líquida de alta eficacia en escala semipreparativa (HPLC semipreparativo), utilizando un equipo Agilent Semipreparativo 1100 series, equipado con una columna Kinetex® EVO C18 (5 µm; 100 x 21.2 mm; 100 Å). Los disolventes utilizados para la elución de compuestos fueron agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y metanol o acetonitrilo (B), en un gradiente preestablecido en el que el %A iba disminuyendo a lo largo de la carrera cromatográfica y que varió en función de la polaridad de los compuestos a cromatografiar.

De esta forma se consiguió la purificación de todos los compuestos puros descritos en el presente trabajo, y que, tras su identificación, se incluyeron en la colección de compuestos puros de BMT.

5.7. Elucidación estructural de los compuestos puros aislados. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

La elucidación de la estructura química de los compuestos aislados se llevó a cabo fundamentalmente mediante experimentos de RMN. Los espectros de RMN se registraron en un equipo Varian “Mercury 400MHz” (a 100 y 400 MHz para ¹H y ¹³C, respectivamente), con sonda de detección inversa con gradientes y unidad de temperatura variable, usando la señal del disolvente residual como referencia interna (δ_H 7.26 y δ_C 77.16 ppm para CDCl₃; δ_H 3.31 y δ_C 49.0 ppm para MeOH-*d*₄; δ_H 2.05 y δ_C 29.84, 206.26 ppm para acetone-*d*₆; δ_H 2.50 y δ_C 39.52 ppm para DMSO-*d*₆).

Una vez obtenida la muestra purificada y seca se reconstituyó en un disolvente deuterado y se realizó un estudio completo por RMN, llevando a cabo experimentos

mono y bidimensionales, homo y heteronucleares (^1H , ^{13}C , gCOSY, gHSQC, gHMBC, TOCSY, NOESY, etc.).

Con las características estructurales observables en estos espectros, y la información obtenida de los experimentos de espectrometría de masas y espectroscopía UV-vis, se hizo una desreplicación frente a diferentes Bases de Datos comerciales (*MarinLit*, *AntiBase*, *AntiMarine*, *SciFinder*, etc.). En los casos en los que se observó una coincidencia con algún compuesto previamente descrito en la bibliografía, se compararon los espectros experimentales, con los datos publicados en bibliografía. En los casos para los que no se encontró ninguna coincidencia, se procedió a la elucidación estructural del compuesto.

Una vez establecida de manera inequívoca la estructura plana del compuesto se hizo de nuevo una búsqueda en todas las bases de datos disponibles, para determinar si la estructura correspondía a un nuevo compuesto o a uno previamente descrito en bibliografía. En cualquiera de los casos, el compuesto se incorporó a la colección de PN's puros de BMT.

Para obtener más información acerca de la estereoquímica y la estructura tridimensional de las moléculas aisladas que presentaban algún centro quiral, se emplearon otras técnicas como polarimetría, dicroísmo circular y QM-NMR.

5.8. Medidas de rotación óptica, ECD y QM-NMR de los compuestos puros

Los compuestos quirales con estructura novedosa de los que se consiguió aislar cantidad suficiente fueron analizados por polarimetría en la Universidad de Jaén para obtener más información acerca de la estereoquímica de estas moléculas. Las medidas de rotación óptica se realizaron utilizando un polarímetro JASCO P-2000, a 589 nm (línea D del sodio) y 20 °C, con una celda de 10 cm y una apertura de 8 mm. Se utilizó una fuente de luz de Na, un detector de tubos fotomultiplicadores y un número de 10 ciclos por medida, con un intervalo de 5 s entre ciclos. Las muestras se prepararon disolviendo 5-10 mg de compuesto puro en 1.5 mL de MeOH (calidad HPLC). La rotación óptica específica de cada muestra se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$[\alpha]^{20}_D = \alpha/lc$$

Donde:

α = Rotación observada corregida

l = longitud del tubo del polarímetro en dm

c = concentración de la muestra en g/mL

También se utilizaron otras técnicas como:

ECD (Electronic Circular Dichroism), en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidad de A Coruña. Los espectros de ECD se registraron en un espectropolarímetro JASCO J-810.

Quantum Mechanical-Nuclear Magnetic Resonance (QM-NMR, métodos DP4+ y J-DP4), mediante una colaboración con el IPNA-CSIC, que se basa en cálculos computacionales por comparación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento calculados frente a los datos obtenidos experimentalmente en RMN, obteniendo la configuración relativa con mayor probabilidad. Los cálculos se realizaron siguiendo el flujo de trabajo general descrito para los métodos DP4+ y mix-J-DP4.^{125, 127} De este modo, se generaron todos los isómeros posibles y se realizaron búsquedas conformacionales empleando el protocolo de muestreo conformacional de modo torsional/bajo mixto en fase gaseosa utilizando el campo de fuerza MMFF y reoptimizando los conformeros con AMBER y el campo de fuerza MM3 en el método mix-J-DP4. Los cálculos de RMN se realizaron utilizando las conformaciones bajo un corte de energía de 12 kJ/mol y MAD 0.5 Å. Para calcular las constantes de apantallamiento magnético se utilizaron los niveles teóricos DFT recomendados para DP4+ (PCM/ mPW1PW91/6-31+G**//B3LYP/6-31G*) y J-DP4 (B3LYP/6-31G**) en Gaussian 16,¹⁹⁵ mediante el método gauge incluyendo orbitales atómicos¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ y $^3J_{HH}$ si era necesario, empleando exclusivamente la contribución del término de contacto de Fermi. Todas las figuras de los modelos moleculares se realizaron utilizando CYLview20.²⁰⁰

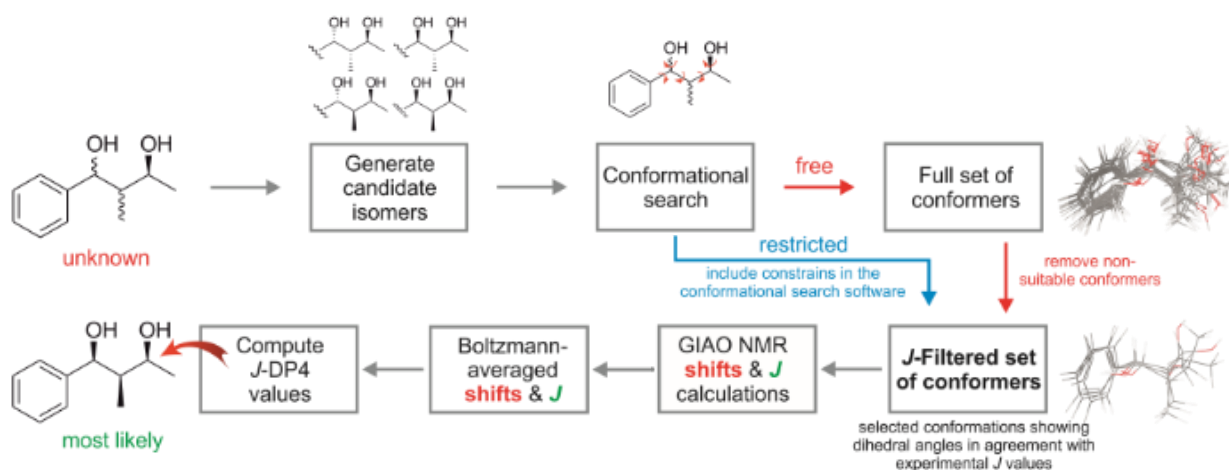


Figura 78. Flujo de trabajo de los métodos computacionales QM-NMR (*J*-DP4) empleados para la determinación de la configuración relativa de moléculas quirales.¹²⁶

5.9. Ensayos de bioactividad de los compuestos aislados

La actividad biológica de todos los compuestos puros aislados e identificados a lo largo del proyecto se evaluó en los diferentes ensayos in vitro puestos a punto en el Departamento de Ensayos de BMT.

- **Ensayo antibacteriano** frente a un panel de bacterias, entre las que se incluyen 3 cepas G+ (*Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Staphylococcus aureus* CECT794 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Kocuria rhizophila*) y 3 cepas G- (*Escherichia Coli* A25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 y *Pseudomonas aeruginosa* CECT108).
- **Ensayo antifúngico** frente a *Aspergillus nidulans* y *Candida albicans* y hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*).
- **Ensayo citotóxico** frente a diferentes líneas celulares tumorales (A549, H116, PSN1, T98G, hepG2).
- **Ensayo antiangiogénico** con células BAEC (células endoteliales de aorta bovina).
- **Ensayo insecticida** frente a *Myzus persicae* (áfidos), *Frankliniella occidentalis* (Thrips) y *Tenebrio molitor* (larva de coleóptero).
- **Ensayo nematocida** frente a *Caenorhabditis elegans* y *Meloidogyne javanica*.
- Ensayo de inhibición en la formación de biofilm en *Xylella fastidiosa*.

El procedimiento empleado para llevar a cabo estos ensayos se detalla a continuación.

Ensayo antibacteriano

Se evaluó la actividad antibacteriana de todos los compuestos mediante un ensayo de microdilución. Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli* A25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* CECT108, *Staphylococcus aureus* CECT 794, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 y *Bacillus subtilis* ATCC 6051. Las placas de microtitulación con los compuestos se prepararon en condiciones estériles siguiendo el siguiente procedimiento. Los compuestos se disolvieron en metanol:DMSO (9:1, v:v) a una concentración inicial de 1280 µg/ml. Las diluciones posteriores se realizaron únicamente con metanol. Los compuestos se dispensaron en los pocillos de la placa de microtitulación para alcanzar concentraciones finales que oscilaban entre 128 µg/ml y 0.0625 µg/ml en diluciones sucesivas. Las placas de microtitulación que contenían los compuestos se secaron en condiciones estériles. El DMSO, que no se evaporaría, alcanzó una concentración máxima del 1% para la concentración más alta ensayada de los compuestos, y se comprobó previamente que esta concentración no inhibía el crecimiento de los microorganismos. Los inóculos se prepararon de acuerdo con el siguiente procedimiento: se obtuvieron cultivos frescos bacterianos durante la noche previa al ensayo incubando las bacterias a 35 °C en un medio sólido 172 de ATTC modificado. Se preparó una suspensión de las bacterias en medio Mueller Hinton ajustado con cationes (CAMH) equivalente a 1.5×10^8 bacterias/ml utilizando los estándares de turbidez de McFarland. Estas suspensiones se diluyeron aún más en medio CAMH para alcanzar una concentración bacteriana de 5.5×10^5 bacterias/ml. Esta suspensión final se utilizó para llenar los pocillos de la placa de microtitulación con alícuotas de 200 µl. Las placas de microtitulación inoculadas que contenían los compuestos y las bacterias se incubaron a 35 °C durante 20 horas. Paralelamente se realizaron controles de medio no inoculado y de medio inoculado sin tratamientos. Se consideró que la concentración inhibitoria mínima (MIC) para cada compuesto era la concentración más baja de compuesto a la que no se podía detectar crecimiento. Además, debido al escaso crecimiento de *Kocuria rhizophila* en CAMH, se llevaron a cabo

los mismos protocolos, pero utilizando esta vez un medio líquido 172 de ATTC modificado e incubando las placas de microtitulación durante 24 y 40 horas.

Composición de los medios. Todos los ingredientes utilizados fueron de grado analítico. Todos los ingredientes complejos utilizados como extracto de levadura y peptonas fueron de grado bacteriológico.

Medio sólido 172 de ATTC modificado. Ingredientes por litro: peptona de caseína 5 g, extracto de levadura 5 g, glucidex-12 20 g, glucosa 10 g, MOPS 1 g y agar 15 g. El pH se ajustó a 6.8 y el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Medio líquido 172 de ATTC modificado: la composición de este medio era como la descrita para el medio sólido excepto que esta vez se omitió el agar.

CAMH. Ingredientes por litro: triptona 17 g, extracto de vacuno 3 g, glucidex-12 1.5 g, CaCl₂ 0.05 g y MgCl₂-6H₂O 0.08 g. El pH se ajustó a 7.3 y el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Ensayo antifúngico

Las cepas empleadas en el ensayo fueron *Aspergillus nidulans* (HT-GU-SUES-530), *Candida albicans* CECT 1394, *Botrytis cinerea* CECT 2100, y *Phytophthora capsici*. Se cultivaron en distintos medios y se prepararon suspensiones de esporas mediante el raspado de la superficie de las placas. A partir de estas suspensiones madre, se prepararon las diluciones correspondientes, llevando la suspensión a una concentración final de 10⁶ esporas o células/ml en el caso de *Aspergillus* y *Candida*, 10⁴ para *Botrytis* y 10³ para *Phytophthora*. El recuento de esporas se realizó con una cámara Neubauer en el microscopio.

Los compuestos puros se disolvieron en metanol a una concentración inicial de 1000 µg/ml y se dispensaron en los pocillos de la placa de microtitulación para alcanzar concentraciones finales que oscilaban entre 10 µg/ml y 0.05 µg/ml en diluciones sucesivas. Se dejó evaporar el disolvente en los pocillos y se añadieron 200 µl de la suspensión de esporas/células sobre el extracto seco.

Las placas se incubaron durante dos días a 25 °C, para *Candida* y *Aspergillus*, después de los cuales se evaluó el crecimiento o germinación por turbidez en el espectrofotómetro a 630 nm, en el caso de *Candida albicans*. La inhibición del crecimiento de las esporas de *Aspergillus nidulans* se evaluó visualmente en el microscopio empleando un objetivo E4 para placas.

En el caso del ensayo con *Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*, las placas se incubaron en oscuridad durante 5 y 6 días, respectivamente, a 25°C. En ambos casos la evaluación del crecimiento fue visual en el microscopio.

Los controles de inhibición de actividad fungicida empleados fueron amphotericina B, para *Candida* y *Aspergillus*, e Iprodiona, para *Botrytis* y *Phytophthora*, a las mismas concentraciones empleadas para los compuestos puros.

Ensayo citotóxico

Para determinar la actividad citotóxica de los compuestos de estudio se utilizó el ensayo colorimétrico MTT, que permite medir la función mitocondrial de las células. El MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich) es un compuesto amarillo que, por acción de las enzimas mitocondriales succinato-deshidrogenasas, se transforma en un sustrato insoluble de color azul oscuro llamado formazán, proceso que indica que las células están vivas y metabólicamente activas. Este compuesto se puede disolver con DMSO y la intensidad de color se cuantifica mediante un espectrofotómetro en el espectro visible (560 nm). De esta manera, el color es directamente proporcional al número de células viables, y, por tanto, a la viabilidad celular.

La actividad citotóxica de los compuestos se evaluó en las líneas celulares tumorales humanas A549 (carcinoma de pulmón), H116 (carcinoma de colon), PSN1 (adenocarcinoma pancreático), T98G (glioblastoma) y hepG2 (hepatocarcinoma).

En placa de 96 pocillos se siembran entre $8-10 \times 10^4$ células/pocillo y se tratan con los compuestos en un rango de concentraciones de 5-2.5-1-0.5 µg/ml. El día de la lectura, se añade 50 µl de MTT (1mg/ml) a cada pocillo y las placas se incuban 2 horas a 37 °C y

5% de CO₂. Después, se retira el medio de cultivo, se añaden 100 µl de DMSO por pocillo y se agita para resuspender el precipitado. Finalmente, se lee la absorbancia a 560 nm en el lector de placa (Biotek Synergy HT).

Ensayo antiangiogénico

El ensayo antiangiogénico se realizó con células endoteliales de aorta bovina, denominadas células BAEC. Estas células, por sí solas, no pueden completar la angiogénesis, pero sí pueden iniciarla, proceso que nos sirve para poder identificar compuestos con capacidad antiangiogénica.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos estériles y tratadas para cultivo celular. Los compuestos puros se disolvieron en MeOH:DMSO (90:10) a una concentración inicial de 200 µg/ml y se dispensaron en los pocillos de la placa de microtitulación para alcanzar concentraciones finales que oscilaban entre 10 µg/ml y 1 µg/ml en diluciones sucesivas. Una vez se evapora el disolvente de los pocillos, las células BAEC se mezclan con unas perlas recubiertas de colágeno tipo IV (Cytodex), de manera que las células BAEC recubren la superficie de las perlas, permitiendo así el crecimiento tridimensional de las mismas y la observación de la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Preparación de las perlas recubiertas con colágeno tipo IV a la concentración de 4×10^6 perlas/ml: se pesa 0.5 mg de perlas en un tubo estéril que contiene 50 ml de PBS estéril y se dejan agitando durante dos horas. Trascurrido ese tiempo, se dejan decantar las perlas y se cambia el PBS. El contenido de cada tubo se pasa a un matraz de 250ml y se esteriliza a 121 °C durante 20 minutos. Se reparte el contenido del matraz en tubos estériles.

Preparación de las perlas con las células BAEC: en un tubo estéril de 15 ml, se añade 1ml de 4×10^6 perlas/ml en PBS estéril. Se aspira el PBS y se mezclan las perlas con 2ml de 6×10^5 células. A continuación, se añade medio específico de BAEC hasta completar un volumen de 5ml y se homogeneiza de manera cuidadosa el contenido del tubo. Finalmente, se pasa el contenido del tubo a una placa Petri de 50mm y se incuba durante dos días a 37 °C y 5% de CO₂.

Una vez que las células están preparadas para el ensayo, se cubre el fondo de cada uno de los pocillos de las placas que contienen los compuestos secos con 35 µl de Matrigel™ (Basement Membrane Matrix) a 4 °C (50µl/cm²) y se añaden las perlas recubiertas de células (10µl de medio por pocillo), mezclándolas con el Matrigel líquido. Las placas se introducen en el incubador a 37 °C y 5% de CO₂ durante 30 minutos, con el fin de que polimerice el Matrigel. Pasados los 30 minutos, se añaden 50 µl del medio de cultivo específico para BAEC en cada pocillo. El ensayo se deja incubando durante dos días. Transcurrido el periodo de incubación, se analizan morfológicamente los resultados con un microscopio Eclipse TE300 (Nikon).

Ensayo insecticida

En el ensayo insecticida se emplearon áfidos de la especie *Myzus persicae*, thrips (*Frankliniella occidentalis*) y larvas del coleóptero *Tenebrio molitor* como dianas.

Los áfidos proceden de una colonia madre que contiene plantas de *Raphanus sativus* infectadas con los pulgones. Para el ensayo se prepararon plantas de rabanito (*Raphanus sativus*) a las que se le cortaron los cotiledones y una hoja, dejándolas así con una hoja única. A continuación, se colocaron pequeños trozos de hojas infectadas con pulgones adultos y sin alas en cada una de estas plantas de rábano. Esta colonia se mantuvo bajo un fotoperiodo de luz/oscuridad (16/8 h) a 26-28 °C, durante 24 h, momento en el cuál las hojas frescas ya están completamente colonizadas por los áfidos.

3 mg de compuesto puro se disolvieron en 600 µl de una mezcla de cuatro disolventes (etanol 10% + acetona 20% + DMSO 1.2% + 68,8% H₂O), obteniendo una solución de 5 mg/ml. Con un aerógrafo se pulverizaron 200 µl de esta solución por planta obteniendo una concentración de ensayo de 1mg/planta. Se realizaron tres réplicas. Las plantas se aislaron en vasos de plástico cerrados con un filtro que impide la salida de los áfidos y permite el intercambio de gases. Se incubaron en el insectario durante 48h, con fotoperiodo de luz/oscuridad (16h/8h) a 26-28 °C. Al finalizar la incubación se examinaron las hojas y se evaluó el porcentaje de áfidos muertos.

Como control se utilizaron plantas no tratadas, tres réplicas de plantas tratadas con 200 µl/planta de imidacloprid 0.5 mg/L y tres réplicas de plantas tratadas con 200 µl de la mezcla de cuatro disolventes.

Este mismo ensayo se utilizó para evaluar el efecto de la pulverización de los compuestos puros sobre la planta de rabanito, dando una idea de la actividad fitotóxica de los mismos. El efecto fitotóxico se expresa en porcentaje de planta dañada, evaluado a las 48 h.

Para el ensayo frente a *Tenebrio molitor* se separaron las larvas de la colonia a una placa Petri sin sustrato y se dejaron 24h en ayuno. El día del ensayo se preparó agar 2% en agua destilada y se mantuvo en agitación a 60°C en una placa calefactora.

Los compuestos puros se disolvieron en una mezcla de cuatro disolventes (etanol:acetona:DMSO:H₂O) a una concentración inicial de 50000 ppm y se dispensaron en los pocillos de una placa de 6 pocillos de poliestireno, junto con un volumen variable de agar, para alcanzar concentraciones finales que oscilaban entre 25000 ppm y 1000 ppm de los compuestos puros agarizados. Se dejó evaporar el disolvente en los pocillos y se colocaron 5 larvas del coleóptero en cada pocillo.

El ensayo se desarrolló a 25 °C, en oscuridad durante 72h. La lectura se realizó de manera visual evaluando el porcentaje de mortalidad tras la ingestión del compuesto puro agarizado.

Como controles del ensayo se prepararon gotas agarizadas con H₂O, la mezcla de cuatro disolventes e Ivermectina 500ppm.

Por último, en el ensayo frente a thrips (*Frankliniella occidentalis*) se evaluó el efecto en términos de porcentaje de mortalidad en los thrips, después de ingerir judías recubiertas con los compuestos puros en diferentes concentraciones.

Para ello, los trozos de judía verde se sumergieron en 300 µl de compuesto puro disuelto en una mezcla de cinco disolventes (etanol: acetona: DMSO: Tween: H₂O), en un pocillo de una placa de 24 pocillos, durante 20 segundos. Tras este tiempo, los trozos de judía verde se transfirieron a una superficie limpia para su secado. El compuesto se preparó a

tres concentraciones diferentes (6400ppm, 3200ppm y 640ppm) y se ensayaron tres réplicas de cada concentración.

Se colocaron 5 individuos adultos en tubos de ensayo de polipropileno, se añadió un trozo de judía verde tratada y se cerró inmediatamente el tubo colocando un pequeño trozo de papel de filtro sujeto con parafilm para absorber el exceso de humedad y evitar la condensación en las paredes. Los tubos se mantuvieron en posición vertical a 25 °C en condiciones de luz/oscuridad (16/8 h) durante 48h. Después del tratamiento, se realizó una inspección visual para evaluar el porcentaje de mortalidad.

Los controles utilizados para el ensayo fueron los siguientes. Un control de judías sin tratar, un control de tratamiento con la mezcla de cinco disolventes y un control de actividad insecticida utilizando Spinosad 1200 ppm (Spintor 480SC, Dow agro sciences).

Ensayo nematocida

Se estudió la actividad nematocida de los compuestos frente a *Caenorhabditis elegans* y el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne javanica*, endoparásito “formador de agallas en la raíz”.

En el ensayo frente a *C. elegans*, estos nematodos se cultivaron a 23 °C en placas de agar con medio de crecimiento de nematodos sembrados con *E. coli* OP50 como fuente de alimento. Las cepas de *C. elegans* N2 y *Escherichia coli* OP50 se obtuvieron del Caenorhabditis Genomics Center, CGC (Minneapolis, MN, EEUU).

Para llevar a cabo el ensayo, se utilizaron nematodos en fase larvaria L1 sembrados en placas multipocillo a 22°C, a una densidad de 30 larvas/170 µL en medio de crecimiento suplementado con 0.75 mg/ml de *E. coli* OP50. Como control negativo se utilizó agua y el vehículo en el que se disuelven las muestras, MeOH:DMSO (90:10). Como control positivo se utilizó ivermectina (Sigma).

Los compuestos se ensayaron a una única concentración de 48 µM en placas de 96 pocillos con fondo en U, por triplicado. La motilidad y la supervivencia de los nematodos se analizó con el lector WMicroTracker (NemaMetrix) a las 72 h tras la incubación con la muestra.

Por otro lado, en el ensayo frente a *M. javanica*, los nematodos se amplificaron en cultivos monoaxénicos *in vitro* para evitar la interferencia con otros microorganismos en suelo. La población de *M. javanica* se mantuvo en raíces de pepinos en placas *in vitro*.

Para estudiar el efecto de los compuestos se utilizaron larvas infectivas móviles, o J2. Los compuestos se ensayaron a una única concentración de 300 ppm en placas de 96 pocillos con fondo en U, por triplicado. Para ello, los compuestos se disolvieron en MeOH:DMSO (95:5) a 1 µg/µl, añadiendo 50 µl de la disolución al fondo del pocillo y se dejó evaporar el disolvente durante toda la noche. El día del ensayo, 165 µL de agua con 50 J2s se añadieron a cada pocillo, consiguiendo una concentración final de 300 ppm y 1.5% de DMSO. Las placas se sellaron con Parafilm para prevenir la evaporación y se incubaron a 26 °C en oscuridad. Después de 48 h, se observaron los nematodos bajo el microscopio para determinar el número de nematodos móviles frente a los inmóviles. Para chequear supervivencia, se añadieron 10 µl de NaOH 1N pH 10 a cada pocillo para estimular el movimiento de los nematodos y poder distinguir entre vivos y muertos. Las muestras activas se confirmaron posteriormente en un rango de concentraciones (300-1 ppm).

Como control negativo se utilizó agua y el vehículo en el que se disuelven las muestras, MeOH:DMSO (95:5). Como control positivo se utilizaron ivermectina, fluopyram (Velum Prime) y abamactina (Tervigo).

Ensayo del efecto de los compuestos en el crecimiento y la formación de biofilm en *Xylella fastidiosa*

El ensayo de compuestos que pudieran inhibir el crecimiento y/o la adhesión del microorganismo patógeno vegetal *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* 5235 a sustratos abióticos se realizó en el interior de una cabina de seguridad biológica (CSB) nivel 2. El cribado se realizó previa disolución de los compuestos en un solvente (generalmente DMSO). Una vez disueltos, una cantidad determinada de los mismos se depositó en placas de microtitulación de 96 pocillos para alcanzar concentraciones finales que oscilaban entre 10 µg/ml y 0.5 µg/ml. Una vez preparadas las placas, se añadieron 200 µL/pocillo de las suspensiones bacterianas, previamente crecidas en medio sólido PD2

durante 5-8 días, a una OD_{600nm} normalizada (0.05, 10⁵ UFC/mL aproximadamente) y se incubaron a 24 °C durante 7 días sin agitación para favorecer la formación de biopelículas. En ese momento, se procedió a la medida del crecimiento (OD_{600nm}) con el lector de placas de microtitulación (Victor 3 1420 Multilabel Counter de Perkinelmer). Para cuantificar la formación de biofilms se llevó a cabo el revelado de las placas con cristal violeta. Para ello se eliminó el medio líquido PD3 con las bacterias en suspensión de los pocillos, que fueron lavados con 220 µL/pocillo de agua. A continuación, se añadió 200 µl por pocillo de solución de cristal violeta al 0.1% (Sigma) para teñir las bacterias adheridas al pocillo durante 20 min. Tras eliminar de nuevo el colorante, los pocillos fueron lavados de nuevo con 220 µL/pocillo de agua antes de agregar 200 µl por pocillo de ácido acético al 30% para solubilizar el cristal violeta. Finalmente se cuantificó la formación de biofilm mediante medida de la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Victor 3 utilizado anteriormente.

Medio sólido PD2. Ingredientes por litro: Bacto™ Soytone (BD Difco 243620) 2 g, Bacto tryptone (Fisher Scientific 11778143 = BD Difco™ 211705) 4 g, Disodium succinate (Sigma, S-2378) 1 g, Sodium citrate dihydrate (Sigma, S-4641) 1.14 g, MgSO₄·7H₂O (Sigma) 1 g, K₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 1 g, Hemin chloride (0.1% en NaOH 0.05 N) (Sigma, H-5533) 10 mL, Soluble potato starch (Sigma S2004) 2 g y agar 15 g. El pH se ajustó a 6.9 y el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 40 min.

Medio líquido PD3: la composición de este medio era como la descrita para el medio sólido excepto que esta vez se omitió el agar.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Jiménez C. El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Anales de Química de la RSEQ* 2013; **109**(2): 134-134.
2. Ruiz PG. *Productos naturales*, Universidad Pública de Navarra/Nafarroako Unibertsitate Publikoa, 2002.
3. Pirintsos S, Panagiotopoulos A, Bariotakis M, Daskalakis V, Lionis C, Sourvinos G *et al.* From Traditional Ethnopharmacology to Modern Natural Drug Discovery: A Methodology Discussion and Specific Examples. *Molecules* 2022; **27**(13). e-pub ahead of print 2022/07/10; doi: 10.3390/molecules27134060
4. Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 2012; **3**(4): 200-201.
5. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 2007; **70**(3): 461-477. doi: 10.1021/np068054v
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 2012; **75**(3): 311-335. doi: 10.1021/np200906s
7. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 2016; **79**(3): 629-661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055
8. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 2020; **83**(3): 770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285
9. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997; **60**(1): 52-60. e-pub ahead of print 1997/01/01; doi: 10.1021/np9604893
10. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003; **66**(7): 1022-1037. e-pub ahead of print 2003/07/26; doi: 10.1021/np030096l
11. Ravelo ÁG, Braun AE. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas Físicas Nat* 2009; **103**: 409-420.
12. Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today* 2016; **21**(2): 204-207. e-pub ahead of print 2015/01/27; doi: 10.1016/j.drudis.2015.01.009
13. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov* 2015; **14**(2): 111-129. e-pub ahead of print 2015/01/24; doi: 10.1038/nrd4510
14. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics* 2012; **65**(8): 385-395. doi: 10.1038/ja.2012.27

15. Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep* 2017; **34**(10): 1203-1232. e-pub ahead of print 2017/08/19; doi: 10.1039/c7np00026j
16. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* 2005; **58**(1): 1-26. doi: 10.1038/ja.2005.1
17. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* 2009; **62**(1): 5-16. doi: 10.1038/ja.2008.16
18. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar Drugs* 2011; **9**(6): 1101-1118. e-pub ahead of print 2011/07/13; doi: 10.3390/md9061101
19. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. *Bull World Health Organ* 2001; **79**(8): 780-790. e-pub ahead of print 2001/09/08;
20. Schatz A, Bugle E, Waksman SA. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1944; **55**(1): 66-69. doi: 10.3181/00379727-55-14461
21. Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T. Studies on bleomycin. *Cancer* 1967; **20**(5): 891-895.
22. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; **6**(4): 468-475. e-pub ahead of print 1976/07/01; doi: 10.1007/bf01973261
23. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; **69**(2): 193-202. e-pub ahead of print 1996/02/01; doi: 10.1007/bf00399424
24. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 2016; **80**(1): 1-43.
25. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA *et al.* Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact* 2014; **13**: 141. e-pub ahead of print 2014/10/02; doi: 10.1186/s12934-014-0141-0
26. Altmann K-H. Drugs from the oceans: Marine natural products as leads for drug discovery. *Chimia* 2017; **71**(10): 646-646.
27. Newman DJ, Cragg GM. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play". *Planta Med* 2016; **82**(9-10): 775-789. e-pub ahead of print 2016/02/19; doi: 10.1055/s-0042-101353
28. Romano G, Costantini M, Sansone C, Lauritano C, Ruocco N, Ianora A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Marine Environmental Research* 2017; **128**: 58-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.002>

29. Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2018; **35**(1): 8-53. e-pub ahead of print 2018/01/18; doi: 10.1039/c7np00052a
30. León J, Liza L, Soto I, Torres M, Orosco A. Marine bacteria producing antibacterial compounds isolated from inter-tidal invertebrates. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 2010; **27**(2): 215-221.
31. Gerwick William H, Moore Bradley S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chemistry & Biology* 2012; **19**(1): 85-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.014>
32. Sarmiento-Vizcaíno A, González V, Braña AF, Palacios JJ, Otero L, Fernández J *et al.* Pharmacological potential of phylogenetically diverse Actinobacteria isolated from deep-sea coral ecosystems of the submarine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. *Microbial ecology* 2017; **73**: 338-352.
33. Jagannathan SV, Manemann EM, Rowe SE, Callender MC, Soto W. Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. *Marine Drugs* 2021; **19**(7): 365.
34. Braña AF, Fiedler H-P, Nava H, González V, Sarmiento-Vizcaíno A, Molina A *et al.* Two Streptomyces species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. *Microbial ecology* 2015; **69**: 512-524.
35. Wiese J, Ohlendorf B, Blümel M, Schmaljohann R, Imhoff JF. Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge Tethya aurantium and identification of their secondary metabolites. *Marine drugs* 2011; **9**(4): 561-585.
36. Zhang Y, Mu J, Feng Y, Kang Y, Zhang J, Gu P-J *et al.* Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy. *Marine drugs* 2009; **7**(2): 97-112.
37. Paz Z, Komon-Zelazowska M, Druzhinina I, Aveskamp M, Shnaiderman A, Aluma Y *et al.* Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. *Fungal Diversity* 2010; **42**: 17-26.
38. Wong Chin JM, Puchooa D, Baborun T, Jeewon R. Antimicrobial properties of marine fungi from sponges and brown algae of Mauritius. *Mycology* 2021; **12**(4): 231-244. doi: 10.1080/21501203.2021.1895347
39. Le Calvez T, Burgaud G, Mahé S, Barbier G, Vandenkoornhuyse P. Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; **75**(20): 6415-6421.
40. Li C-Q, Ma Q-Y, Gao X-Z, Wang X, Zhang B-L. Research Progress in Anti-Inflammatory Bioactive Substances Derived from Marine Microorganisms, Sponges, Algae, and Corals. *Marine Drugs* 2021; **19**(10): 572.
41. Amend A, Burgaud G, Cunliffe M, Edgcomb VP, Ettinger CL, Gutiérrez MH *et al.* Fungi in the Marine Environment: Open Questions and Unsolved Problems. *mBio* 2019; **10**(2): 10.1128/mbio.01189-01118. doi: doi:10.1128/mbio.01189-18

42. Serrano R, González-Menéndez V, Rodríguez L, Martín J, Tormo JR, Genilloud O. Co-culturing of Fungal Strains Against *Botrytis cinerea* as a Model for the Induction of Chemical Diversity and Therapeutic Agents. *Frontiers in Microbiology* 2017; **8**. doi: 10.3389/fmicb.2017.00649
43. Ibrahim SRM, Mohamed SGA, Sindi IA, Mohamed GA. Biologically active secondary metabolites and biotechnological applications of species of the family Chaetomiaceae (Sordariales): an updated review from 2016 to 2021. *Mycological Progress* 2021; **20**(5): 595-639. doi: 10.1007/s11557-021-01704-w
44. Gutiérrez Patricio S. Identificación de nuevas especies bacterianas aisladas de cuevas Españolas. 2016.
45. Breinbauer R, Vetter IR, Waldmann H. From protein domains to drug candidates—natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angewandte Chemie International Edition* 2002; **41**(16): 2878-2890.
46. Butler MS, Buss AD. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical pharmacology* 2006; **71**(7): 919-929.
47. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2013; **1830**(6): 3670-3695.
48. Li JW-H, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009; **325**(5937): 161-165.
49. Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology* 2001; **176**: 386-390.
50. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances* 2015; **33**(8): 1582-1614. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
51. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; **4**(3): 206-220. doi: 10.1038/nrd1657
52. Seghal Kiran G, Ramasamy P, Sekar S, Ramu M, Hassan S, Ninawe AS *et al.* Synthetic biology approaches: Towards sustainable exploitation of marine bioactive molecules. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; **112**: 1278-1288. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.149>
53. Rouhi AM. Rediscovering natural products. *Chemical & engineering news* 2003; **81**(41): 77-77.
54. Pérez-Victoria I, Martín J, Reyes F. Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products. *Planta Med* 2016; **82**(9-10): 857-871. e-pub ahead of print 2016/03/24; doi: 10.1055/s-0042-101763
55. Sorokina M, Steinbeck C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *J Cheminform* 2020; **12**(1): 20. e-pub ahead of print 2021/01/13; doi: 10.1186/s13321-020-00424-9

56. Baker BJ. *Marine biomedicine: from beach to bedside*, CRC Press, 2015.
57. Hubert J, Nuzillard J-M, Renault J-H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews* 2017; **16**(1): 55-95. doi: 10.1007/s11101-015-9448-7
58. Bitzer J, Köpcke B, Stadler M, Hellwig V, Ju Y-M, Seip S *et al.* Accelerated dereplication of natural products, supported by reference libraries. *Chimia* 2007; **61**(6): 332-332.
59. Naman CB, Leber CA, Gerwick WH. Chapter 5 - Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. In: Kurtböke I (ed) *Microbial Resources*. Academic Press, 2017, pp 103-120.
60. Genilloud O, Pelaez F, Gonzalez I, Diez M. Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts. *Microbiologia (Madrid, Spain)* 1994; **10**(4): 413-422.
61. Planes S, Allemand D, Agostini S, Banaigs B, Boissin E, Boss E *et al.* The Tara Pacific expedition—A pan-ecosystemic approach of the “-omics” complexity of coral reef holobionts across the Pacific Ocean. *PLOS Biology* 2019; **17**(9): e3000483. doi: 10.1371/journal.pbio.3000483
62. Staufenberger T, Thiel V, Wiese J, Imhoff JF. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology* 2008; **64**(1): 65-77.
63. Wiese J, Thiel V, Nagel K, Staufenberger T, Imhoff JF. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Marine Biotechnology* 2009; **11**: 287-300.
64. Nithyanand P, Manju S, Karutha Pandian S. Phylogenetic characterization of culturable actinomycetes associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from Gulf of Mannar. *FEMS Microbiology Letters* 2011; **314**(2): 112-118. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02149.x
65. Sun W, Peng C, Zhao Y, Li Z. Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya* sp. *PLoS One* 2012; **7**(8): e42847. e-pub ahead of print 2012/08/11; doi: 10.1371/journal.pone.0042847
66. Li K, Chung-Davidson YW, Bussy U, Li W. Recent advances and applications of experimental technologies in marine natural product research. *Mar Drugs* 2015; **13**(5): 2694-2713. e-pub ahead of print 2015/05/06; doi: 10.3390/md13052694
67. Romano S, Jackson SA, Patry S, Dobson ADW. Extending the "One Strain Many Compounds" (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. *Mar Drugs* 2018; **16**(7). e-pub ahead of print 2018/07/26; doi: 10.3390/md16070244
68. Hewage RT, Aree T, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry* 2014; **108**: 87-94. e-pub ahead of print 2014/10/15; doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.013

69. Liu M, Grkovic T, Liu X, Han J, Zhang L, Quinn RJ. A systems approach using OSMAC, Log P and NMR fingerprinting: An approach to novelty. *Synth Syst Biotechnol* 2017; **2**(4): 276-286. e-pub ahead of print 2018/03/20; doi: 10.1016/j.synbio.2017.10.001
70. Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H, Wang H. Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Frontiers in Microbiology* 2019; **10**. doi: 10.3389/fmicb.2019.00294
71. Pham JV, Yilma MA, Feliz A, Majid MT, Maffetone N, Walker JR *et al.* A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Front Microbiol* 2019; **10**: 1404. e-pub ahead of print 2019/07/10; doi: 10.3389/fmicb.2019.01404
72. Pinedo-Rivilla C, Aleu J, Durán-Patrón R. Cryptic Metabolites from Marine-Derived Microorganisms Using OSMAC and Epigenetic Approaches. *Marine Drugs* 2022; **20**(2): 84.
73. Rani A, Saini KC, Bast F, Mehariya S, Bhatia SK, Lavecchia R *et al.* Microorganisms: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Molecules* 2021; **26**(4). e-pub ahead of print 2021/03/07; doi: 10.3390/molecules26041142
74. Brzonkalik K, Hümmel D, Syltatk C, Neumann A. Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. *AMB Express* 2012; **2**(1): 28. e-pub ahead of print 2012/05/23; doi: 10.1186/2191-0855-2-28
75. Li S, Ji L, Chen C, Zhao S, Sun M, Gao Z *et al.* Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioresource Technology* 2020; **309**: 123362. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123362>
76. Tran-Cong NM, Mándi A, Kurtán T, Müller WEG, Kalscheuer R, Lin W *et al.* Induction of cryptic metabolites of the endophytic fungus *Trichocladium* sp. through OSMAC and co-cultivation. *RSC Advances* 2019; **9**(47): 27279-27288. doi: 10.1039/C9RA05469C
77. Sari M, Kusharyoto W, Brazia AC. Profiling bioactive compounds in secondary metabolites from co-cultivation between actinomycetes and pathogenic bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2020; **439**(1): 012009. doi: 10.1088/1755-1315/439/1/012009
78. Marmann A, Aly AH, Lin W, Wang B, Proksch P. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. *Marine Drugs* 2014; **12**(2): 1043-1065.
79. Rateb ME, Hallyburton I, Houssen WE, Bull AT, Goodfellow M, Santhanam R *et al.* Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances* 2013; **3**(34): 14444-14450. doi: 10.1039/C3RA42378F
80. Oh D-C, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. *Journal of Natural Products* 2007; **70**(4): 515-520. doi: 10.1021/np060381f
81. Park HB, Kwon HC, Lee C-H, Yang HO. Glionitrin A, an Antibiotic–Antitumor Metabolite Derived from Competitive Interaction between Abandoned Mine Microbes. *Journal of Natural Products* 2009; **72**(2): 248-252. doi: 10.1021/np800606e

82. Cueto M, Jensen PR, Kauffman C, Fenical W, Lobkovsky E, Clardy J. Pestalone, a New Antibiotic Produced by a Marine Fungus in Response to Bacterial Challenge. *Journal of Natural Products* 2001; **64**(11): 1444-1446. doi: 10.1021/np0102713
83. Zhang Z, He X, Zhang G, Che Q, Zhu T, Gu Q *et al.* Inducing Secondary Metabolite Production by Combined Culture of *Talaromyces aculeatus* and *Penicillium variabile*. *J Nat Prod* 2017; **80**(12): 3167-3171. e-pub ahead of print 2017/11/17; doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00417
84. Pérez J, Muñoz-Dorado J, Braña AF, Shimkets LJ, Sevillano L, Santamaría RI. *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb Biotechnol* 2011; **4**(2): 175-183. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00208.x
85. Marcos Flores E, Aguilar Gutiérrez GR, Cabrera-Maldonado C, Guzmán-Flores JE, Flores-Encarnación MdS. El impacto biológico de los autoinductores bacterianos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2011; **31**: 104-111.
86. Alkhalifah DHM. Sponge-associated sp. RM66 metabolome induction with N-acetylglucosamine: Antibacterial, antifungal and anti-trypanosomal activities. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2021; **28**(8): 4691-4698. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.082>
87. Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA *et al.* Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep* 2008; **9**(7): 670-675. e-pub ahead of print 2008/05/31; doi: 10.1038/embor.2008.83
88. Vervoort HC, Drašković M, Crews P. Histone Deacetylase Inhibitors as a Tool to Up-Regulate New Fungal Biosynthetic Products: Isolation of EGM-556, a Cyclodepsipeptide, from *Microascus* sp. *Organic Letters* 2011; **13**(3): 410-413. doi: 10.1021/ol1027199
89. He X, Zhang Z, Chen Y, Che Q, Zhu T, Gu Q *et al.* Varitatin A, a Highly Modified Fatty Acid Amide from *Penicillium variabile* Cultured with a DNA Methyltransferase Inhibitor. *Journal of Natural Products* 2015; **78**(11): 2841-2845. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00742
90. He X, Zhang Z, Che Q, Zhu T, Gu Q, Li D. Varilactones and wortmannilactones produced by *Penicillium variabile* cultured with histone deacetylase inhibitor. *Archives of Pharmacal Research* 2018; **41**(1): 57-63. doi: 10.1007/s12272-017-0982-2
91. Chen M, Zhang W, Shao C-L, Chi Z-M, Wang C-Y. DNA Methyltransferase Inhibitor Induced Fungal Biosynthetic Products: Diethylene Glycol Phthalate Ester Oligomers from the Marine-Derived Fungus *Cochliobolus lunatus*. *Marine Biotechnology* 2016; **18**(3): 409-417. doi: 10.1007/s10126-016-9703-y
92. Yang XL, Huang L, Ruan XL. Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves of *Fragaria chiloensis*. *J Asian Nat Prod Res* 2014; **16**(4): 412-417. e-pub ahead of print 2014/02/07; doi: 10.1080/10286020.2014.881356
93. Miao FP, Liang XR, Liu XH, Ji NY. Aspewentins A-C, norditerpenes from a cryptic pathway in an algicolous strain of *Aspergillus wentii*. *J Nat Prod* 2014; **77**(2): 429-432. e-pub ahead of print 2014/02/07; doi: 10.1021/np401047w

94. Li G, Kusari S, Golz C, Laatsch H, Strohmamm C, Spiteller M. Epigenetic Modulation of Endophytic *Eupenicillium* sp. LG41 by a Histone Deacetylase Inhibitor for Production of Decalin-Containing Compounds. *J Nat Prod* 2017; **80**(4): 983-988. e-pub ahead of print 2017/03/24; doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00997
95. Fernandez Medarde A, Vinuesa Navarro MA, Sanchez Lopez JM, Bolaños Hernandez JP, Almeida Parra MA, Fernandez Sanchez E. Macrocycles with antioxidant and neuroprotective activities. In: Instituto Biomar, S.A, León (ES), 2020.
96. Villoch Fernandez J, Marques Martinez M, Marin Vieira MC, Martin Lopez M, Sanchez Lopez JM, Fernandez Medarde A *et al.* Compounds for the management of cell stemness and invasion in cancer and related diseases. In: Instituto Biomar, S.A, León (ES), 2022.
97. Koivunen M, Marrone P. Uses of Thatxtomin and Thaxtomin compositions as herbicides. In. United States: Marrone Bio Innovations, Inc., Davis, CA (US), 2016.
98. Thirumalai D. Antioxidant activity of melanin pigment from *Streptomyces* species D5 isolated from Desert soil, Rajasthan, India. *Drug Invention Today* 2010; **2**: 12-13.
99. David L, Duteurtre M, Kergomard A, Kergomard G, Scanzi E, Staron T. Production of cinerubins by a *Streptomyces* griseorubiginosus strain. *J Antibiot (Tokyo)* 1980; **33**(1): 49-53. e-pub ahead of print 1980/01/01; doi: 10.7164/antibiotics.33.49
100. Saleem M, Hassan A, Li F, Lu Q, Ponomareva LV, Parkin S *et al.* Bioprospecting of desert actinobacteria with special emphases on griseoviridin, mitomycin C and a new bacterial metabolite producing *Streptomyces* sp. PU-KB10-4. *BMC Microbiol* 2023; **23**(1): 69. e-pub ahead of print 2023/03/17; doi: 10.1186/s12866-023-02770-8
101. Alwahshi KJ, Purayil GP, Saeed EE, Abufarajallah HA, Aldhaheeri SJ, AbuQamar SF *et al.* The 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing *Streptomyces violaceoruber* UAE1 can provide protection from sudden decline syndrome on date palm. *Front Plant Sci* 2022; **13**: 904166. e-pub ahead of print 2022/08/16; doi: 10.3389/fpls.2022.904166
102. Alblooshi AA, Purayil GP, Saeed EE, Ramadan GA, Tariq S, Altaee AS *et al.* Biocontrol Potential of Endophytic Actinobacteria against *Fusarium solani*, the Causal Agent of Sudden Decline Syndrome on Date Palm in the UAE. *J Fungi (Basel)* 2021; **8**(1). e-pub ahead of print 2022/01/21; doi: 10.3390/jof8010008
103. Chung YM, El-Shazly M, Chuang DW, Hwang TL, Asai T, Oshima Y *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. *J Nat Prod* 2013; **76**(7): 1260-1266. e-pub ahead of print 2013/07/05; doi: 10.1021/np400143j
104. Du F-Y, Li X-M, Sun Z-C, Meng L-H, Wang B-G. Secondary Metabolites with Agricultural Antagonistic Potentials from *Beauveria felina*, a Marine-Derived Entomopathogenic Fungus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2020; **68**(50): 14824-14831. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05696
105. Du FY, Li XM, Zhang P, Li CS, Wang BG. Cyclodepsipeptides and other O-containing heterocyclic metabolites from *Beauveria felina* EN-135, a marine-derived entomopathogenic fungus. *Mar Drugs* 2014; **12**(5): 2816-2826. e-pub ahead of print 2014/05/16; doi: 10.3390/md12052816

106. Du FY, Zhang P, Li XM, Li CS, Cui CM, Wang BG. Cyclohexadepsipeptides of the isaridin class from the marine-derived fungus *Beauveria felina* EN-135. *J Nat Prod* 2014; **77**(5): 1164-1169. e-pub ahead of print 2014/04/20; doi: 10.1021/np4011037
107. Langenfeld A, Blond A, Gueye S, Herson P, Nay B, Dupont J *et al.* Insecticidal Cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. *Journal of Natural Products* 2011; **74**(4): 825-830. doi: 10.1021/np100890n
108. Morais-Urano RP, Chagas AC, Berlinck RG. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol* 2012; **132**(3): 362-366. e-pub ahead of print 2012/09/08; doi: 10.1016/j.exppara.2012.08.011
109. Mugnai L, Bridge PD, Evans HC. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycological Research* 1989; **92**(2): 199-209. doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80012-7)
110. Wang X, Gong X, Li P, Lai D, Zhou L. Structural Diversity and Biological Activities of Cyclic Depsipeptides from Fungi. *Molecules* 2018; **23**(1): 169.
111. Yuan B, Wu Z, Ji W, Liu D, Guo X, Yang D *et al.* Discovery of cyclohexadepsipeptides with anti-Zika virus activities and biosynthesis of the nonproteinogenic building block (3S)-methyl-l-proline. *J Biol Chem* 2021; **297**(1): 100822. e-pub ahead of print 2021/05/25; doi: 10.1016/j.jbc.2021.100822
112. Lira SP, Vita-Marques AM, Seleglim MH, Bugni TS, LaBarbera DV, Sette LD *et al.* New destruxins from the marine-derived fungus *Beauveria felina*. *J Antibiot (Tokyo)* 2006; **59**(9): 553-563. e-pub ahead of print 2006/12/02; doi: 10.1038/ja.2006.76
113. Oh H, Swenson D, Gloer J. Massarilactones A and B: Novel secondary metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*. *Tetrahedron Letters - TETRAHEDRON LETT* 2001; **42**: 975-977. doi: 10.1016/S0040-4039(00)02160-2
114. Kock I, Krohn K, Egold H, Draeger S, Schulz B, Rheinheimer J. New Massarilactones, Massarigenin E, and Coniothyrenol, Isolated from the Endophytic Fungus *Coniothyrium* sp. from *Carpobrotus edulis*. *European Journal of Organic Chemistry - EUR J ORG CHEM* 2007; **2007**: 2186-2190. doi: 10.1002/ejoc.200600987
115. Krohn K, Hussain H, Flörke U, Schulz B, Draeger S, Pescitelli G *et al.* Massarilactones E-G, new metabolites from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp., associated with the plant *Artimisia maritima*. *Chirality* 2007; **19**(6): 464-470. e-pub ahead of print 2007/03/30; doi: 10.1002/chir.20402
116. Cimmino A, Bahmani Z, Masi M, Di Lecce R, Amini J, Abdollahzadeh J *et al.* Massarilactones D and H, phytotoxins produced by *Kalmusia variispora*, associated with grapevine trunk diseases (GTDs) in Iran. *Nat Prod Res* 2021; **35**(23): 5192-5198. e-pub ahead of print 2020/08/04; doi: 10.1080/14786419.2020.1791116
117. Zhang GF, Han WB, Cui JT, Ng SW, Guo ZK, Tan RX *et al.* Neuraminidase inhibitory polyketides from the marine-derived fungus *Phoma herbarum*. *Planta Med* 2012; **78**(1): 76-78. e-pub ahead of print 2011/10/05; doi: 10.1055/s-0031-1280251

118. Oh H, Swenson DC, Gloer JB, Shearer CA. New bioactive rosigenin analogues and aromatic polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*. *J Nat Prod* 2003; **66**(1): 73-79. e-pub ahead of print 2003/01/25; doi: 10.1021/np020342d
119. Domínguez HJ, Napolitano JG, Fernández-Sánchez MT, Cabrera-García D, Novelli A, Norte M *et al.* Belizentrin, a highly bioactive macrocycle from the dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Org Lett* 2014; **16**(17): 4546-4549. e-pub ahead of print 2014/08/16; doi: 10.1021/ol502102f
120. Anderl F, Größl S, Wirtz C, Fürstner A. Total Synthesis of Belizentrin Methyl Ester: Report on a Likely Conquest. *Angew Chem Int Ed Engl* 2018; **57**(33): 10712-10717. e-pub ahead of print 2018/06/02; doi: 10.1002/anie.201805125
121. Napolitano JG, Norte M, Padrón JM, Fernández JJ, Hernández Daranas A. Belizeanolide, a cytotoxic macrolide from the dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; **48**(4): 796-799. e-pub ahead of print 2008/12/23; doi: 10.1002/anie.200804023
122. Kutateladze AG, Holt T. Structure Validation of Complex Natural Products: Time to Change the Paradigm. What did Synthesis of Alstofolinine A Prove? *J Org Chem* 2019; **84**(12): 8297-8299. e-pub ahead of print 2019/06/01; doi: 10.1021/acs.joc.9b00969
123. Chhetri BK, Lavoie S, Sweeney-Jones AM, Kubanek J. Recent trends in the structural revision of natural products. *Nat Prod Rep* 2018; **35**(6): 514-531. e-pub ahead of print 2018/04/07; doi: 10.1039/c8np00011e
124. Smith SG, Goodman JM. Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability. *J Am Chem Soc* 2010; **132**(37): 12946-12959. e-pub ahead of print 2010/08/28; doi: 10.1021/ja105035r
125. Grimblat N, Zanardi MM, Sarotti AM. Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *J Org Chem* 2015; **80**(24): 12526-12534. e-pub ahead of print 2015/11/19; doi: 10.1021/acs.joc.5b02396
126. Grimblat N, Gavín JA, Hernández Daranas A, Sarotti AM. Combining the Power of J Coupling and DP4 Analysis on Stereochemical Assignments: The J-DP4 Methods. *Org Lett* 2019; **21**(11): 4003-4007. e-pub ahead of print 2019/05/28; doi: 10.1021/acs.orglett.9b01193
127. Cuadrado C, Daranas AH, Sarotti AM. May the Force (Field) Be with You: On the Importance of Conformational Searches in the Prediction of NMR Chemical Shifts. *Mar Drugs* 2022; **20**(11). e-pub ahead of print 2022/11/11; doi: 10.3390/md20110699
128. Grimblat N, Sarotti AM. Computational Chemistry to the Rescue: Modern Toolboxes for the Assignment of Complex Molecules by GIAO NMR Calculations. *Chemistry* 2016; **22**(35): 12246-12261. e-pub ahead of print 2016/07/14; doi: 10.1002/chem.201601150
129. Guo H, Sun B-D, Gao H, Niu S, Liu X, Yao X-S *et al.* Trichocladinols A-C, Cytotoxic Metabolites from a Cordyceps-Colonizing Ascomycete *Trichodadium opacum*. *European Journal of Organic Chemistry* 2009; **2009**: 5525-5530. doi: 10.1002/ejoc.200900735

130. Iwatsuki K, Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Higashihara H, Mukainaka T *et al.* Sterol ferulates, sterols, and 5-alk(en)ylresorcinols from wheat, rye, and corn bran oils and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J Agric Food Chem* 2003; **51**(23): 6683-6688. e-pub ahead of print 2003/10/30; doi: 10.1021/jf030371+
131. Su M, Chen S, Liu X, Pei Y. Trichocladinols I-K, oxatricyclic and oxabicyclic polyketides from *Trichocladium opacum*. *Nat Prod Commun* 2014; **9**(5): 695-698. e-pub ahead of print 2014/07/17;
132. Fujimoto H, Nakamura E, Okuyama E, Ishibashi M. Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004; **52**(8): 1005-1008. e-pub ahead of print 2004/08/12; doi: 10.1248/cpb.52.1005
133. Waser M, Lackner B, Zuschrader J, Müller N, Falk H. An efficient regioselective synthesis of endocrocin and structural related natural anthraquinones starting from emodin. *Tetrahedron Letters* 2005; **46**(14): 2377-2380. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.02.061>
134. Liu D, Yan L, Ma L, Huang Y, Pan X, Liu W *et al.* Diphenyl derivatives from coastal saline soil fungus *Aspergillus iizukae*. *Arch Pharm Res* 2015; **38**(6): 1038-1043. e-pub ahead of print 2014/03/29; doi: 10.1007/s12272-014-0371-z
135. Hargreaves J, Park JO, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Skelton BW, White AH. New chlorinated diphenyl ethers from an *Aspergillus* species. *J Nat Prod* 2002; **65**(1): 7-10. e-pub ahead of print 2002/01/26; doi: 10.1021/np0102758
136. Banerjee A, Laya M, Mora H, Maldonado EV. The Chemistry of Bioactive Diterpenes. *Current Organic Chemistry* 2008; **12**: 1050-1070. doi: 10.2174/138527208785740292
137. Gupta S, Roberts DW, Renwick J. Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1989; (12): 2347-2357.
138. Li H, Tian J-M, Tang H-Y, Pan S-Y, Zhang A-L, Gao J-M. Chaetosemins A-E, new chromones isolated from an Ascomycete *Chaetomium seminudum* and their biological activities. *RSC Advances* 2015; **5**(37): 29185-29192.
139. Springer JP, Cole RJ, Dorner JW, Cox RH, Richard JL, Barnes CL *et al.* Structure and conformation of roseotoxin B. *Journal of the American Chemical Society* 1984; **106**(8): 2388-2392. doi: 10.1021/ja00320a028
140. Tsunoo A, Kamijo M, Taketomo N, Sato Y, Ajisaka K. Roseocardin, a novel cardiogenic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103. *J Antibiot (Tokyo)* 1997; **50**(12): 1007-1013. e-pub ahead of print 1998/03/25; doi: 10.7164/antibiotics.50.1007
141. Lang G, Mitova MI, Ellis G, van der Sar S, Phipps RK, Blunt JW *et al.* Bioactivity profiling using HPLC/microtiter-plate analysis: application to a New Zealand marine alga-derived fungus, *Gliocladium* sp. *J Nat Prod* 2006; **69**(4): 621-624. e-pub ahead of print 2006/04/29; doi: 10.1021/np0504917
142. KOYAMA K, NATORI S. Further characterization of seven bis (naphtho- γ -pyrone) congeners of ustilaginoidins, coloring matters of *Claviceps virens* (*Ustilaginoidea virens*). *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1988; **36**(1): 146-152.

143. KOYAMA K, NATORI S. Chaetochromins B, C and D, bis (naphtho- γ -pyrone) derivatives from *Chaetomium gracile*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1987; **35**(2): 578-584.
144. Lu S, Sun W, Meng J, Wang A, Wang X, Tian J *et al.* Bioactive bis-naphtho- γ -pyrones from rice false smut pathogen *Ustilagoidea virens*. *Journal of agricultural and food chemistry* 2015; **63**(13): 3501-3508.
145. Xu G-B, Yang T, Bao J-K, Fang D-M, Li G-Y. Isochaetomium A 2, a new bis (naphthodihydropyran-4-one) with antimicrobial and immunological activities from fungus *Chaetomium microcephalum*. *Archives of pharmacal research* 2014; **37**: 575-579.
146. Singh SB, Zink DL, Bills GF, Teran A, Silverman KC, Lingham RB *et al.* Four novel bis-(naphtho- γ -pyrones) isolated from *Fusarium* species as inhibitors of HIV-1 integrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; **13**(4): 713-717.
147. Sun W, Wang A, Xu D, Wang W, Meng J, Dai J *et al.* New ustilaginoidins from rice false smut balls caused by *Villosiclava virens* and their phytotoxic and cytotoxic activities. *Journal of agricultural and food chemistry* 2017; **65**(25): 5151-5160.
148. Ugaki N, Yamazaki H, Uchida R, Tomoda H. New isochaetochromin, an inhibitor of triacylglycerol synthesis in mammalian cells, produced by *Penicillium* sp. FKI-4942: II. structure elucidation. *The Journal of Antibiotics* 2012; **65**(1): 21-24.
149. Wang Y, Hämäläinen A, Tois J, Franzén R. Preparation of indole-phosphine oxazoline (IndPHOX) ligands and their application in allylic alkylation. *Tetrahedron: Asymmetry* 2010; **21**(19): 2376-2384.
150. Louis I, Hungerford NL, Humphries EJ, McLeod MD. Enantioselective total synthesis of (–)-dactylolide. *Organic Letters* 2006; **8**(6): 1117-1120.
151. Ojima K-i, Yangchum A, Laksanacharoen P, Tasanathai K, Thanakitpipattana D, Tokuyama H *et al.* Cordybis lactone, a stereoisomer of the 14-membered bislactone clonostachydiol, from the hopper pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 49294: revision of the absolute configuration of clonostachydiol. *The Journal of Antibiotics* 2018; **71**(3): 351-358.
152. Wu HM, Lin LP, Xu QL, Han WB, Zhang S, Liu ZW *et al.* Nodupetide, a potent insecticide and antimicrobial from *Nodulisporium* sp. associated with *Riptortus pedestris*. *Tetrahedron letters* 2017; **58**(7): 663-665.
153. Liang M, Lyu H-N, Ma Z-Y, Li E-W, Cai L, Yin W-B. Genomics-driven discovery of a new cyclodepsipeptide from the guanophilic fungus *Amphichorda guana*. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2021; **19**(9): 1960-1964. doi: 10.1039/D1OB00100K
154. Lu X, Zheng Z, Zhang H, Huo C, Dong Y, Ma Y *et al.* Two new members of mycophenolic acid family from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. *The Journal of Antibiotics* 2009; **62**(9): 527-529. doi: 10.1038/ja.2009.54
155. Catalán CAN, de Heluani CS, Kotowicz C, Gedris TE, Herz W. A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* 2003; **64**(2): 625-629. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00202-4)

156. Takenaka Y, Morimoto N, Hamada N, Tanahashi T. Phenolic compounds from the cultured mycobionts of *Graphis proserpens*. *Phytochemistry* 2011; **72**(11): 1431-1435. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.017>
157. Fujimoto H, Fujimaki T, Okuyama E, Yamazaki M. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1999; **47**(10): 1426-1432.
158. Godfrey RC, Green NJ, Nichol GS, Lawrence AL. Total synthesis of brevianamide A. *Nature Chemistry* 2020; **12**(7): 615-619. doi: 10.1038/s41557-020-0442-3
159. Higuchi S, Yasui K. Interaction of N6-substituted-9-methyladenines to poly-5-bromouridylic acid. *Nucleic Acids Symp Ser* 1983; (12): 185-188. e-pub ahead of print 1983/01/01;
160. Xu X, Zhang X, Nong X, Wang J, Qi S. Brevianamides and mycophenolic acid derivatives from the deep-sea-derived fungus *Penicillium brevicompactum* DFFSCS025. *Marine Drugs* 2017; **15**(2): 43.
161. Nozawa K, Udagawad S-I, Nakajima S, Kawai K-I. A dioxopiperazine derivative from *Penicillium megasporum*. *Phytochemistry* 1989; **28**(3): 929-931. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80145-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80145-1)
162. Hawas UW, El-Ansari MA, Laatsch H. A new alpha-methylanthraquinone glucoside from *Emex spinosus*. *Nat Prod Res* 2006; **20**(8): 742-747. e-pub ahead of print 2006/06/07; doi: 10.1080/14786410500281789
163. Krupa J, Lessmann H, Lackner H. Ein α -Methylanthrachinon aus Streptomyceten. *Liebigs Annalen der Chemie* 1989; **1989**(7): 699-701. doi: <https://doi.org/10.1002/jlac.198919890217>
164. Chen S, Zhang C, Zhang L. Investigation of the Molecular Landscape of Bacterial Aromatic Polyketides by Global Analysis of Type II Polyketide Synthases. *Angewandte Chemie International Edition* 2022; **61**(24): e202202286. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202202286>
165. Cui H, Shaaban KA, Qin S. Two Anthraquinone Compounds from a Marine Actinomycete Isolate M097 Isolated from Jiaozhou Bay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006; **22**(12): 1377-1379. doi: 10.1007/s11274-006-9197-2
166. Lin ZJ, Lu XM, Zhu TJ, Fang YC, Gu QQ, Zhu W. GPR12 selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. associated with *Cistanches deserticola*. *Arch Pharm Res* 2008; **31**(9): 1108-1114. e-pub ahead of print 2008/09/23; doi: 10.1007/s12272-001-1276-4
167. Kawahara T, Izumikawa M, Otaguro M, Yamamura H, Hayakawa M, Takagi M *et al.* JBIR-94 and JBIR-125, antioxidative phenolic compounds from *Streptomyces* sp. R56-07. *J Nat Prod* 2012; **75**(1): 107-110. e-pub ahead of print 2012/01/12; doi: 10.1021/np200734p
168. Wu T-S, Shi L-S, Kuo S-C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. *Phytochemistry* 1999; **50**(8): 1411-1415. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01086-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01086-8)

169. Fdhila F, Vázquez V, Sánchez JL, Riguera R. dd-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J Nat Prod* 2003; **66**(10): 1299-1301. e-pub ahead of print 2003/10/25; doi: 10.1021/np030233e
170. Selvakumar S, Sivasankaran D, Singh VK. Enantioselective Henry reaction catalyzed by C2-symmetric chiral diamine-copper(II) complex. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2009; **7**(15): 3156-3162. doi: 10.1039/B904254G
171. Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem Biol* 2009; **4**(12): 1051-1059. e-pub ahead of print 2009/11/26; doi: 10.1021/cb900165y
172. Maehr H, Benz W, Smallheer J, Williams T. Mikrobielle Produkte, I NMR-Spektren von Nocardamin und Massenspektrum des Tri-O-methyl-nocardamins / Microbiological Products, I NMR Spectra of Nocardamine and Mass Spectra of Tri-O-methyl-nocardamine. *Zeitschrift für Naturforschung B* 2014; **32**. doi: 10.1515/znB-1977-0819
173. Stavila E, Loos K. Synthesis of lactams using enzyme-catalyzed aminolysis. *Tetrahedron Letters* 2013; **54**(5): 370-372. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.10.133>
174. Yeo WH, Yun BS, Kim SS, Park EK, Kim YH, Yoo ID *et al.* GTRI-02, a new lipid peroxidation inhibitor from *Micromonospora* sp. SA246. *J Antibiot (Tokyo)* 1998; **51**(10): 952-953. e-pub ahead of print 1999/01/23; doi: 10.7164/antibiotics.51.952
175. Wu C, Ichinose K, Choi YH, van Wezel GP. Aromatic Polyketide GTRI-02 is a Previously Unidentified Product of the act Gene Cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Chembiochem* 2017; **18**(14): 1428-1434. e-pub ahead of print 2017/05/04; doi: 10.1002/cbic.201700107
176. Yan Y, Yang J, Yu Z, Yu M, Ma Y-T, Wang L *et al.* Non-enzymatic pyridine ring formation in the biosynthesis of the rubrolone tropolone alkaloids. *Nature Communications* 2016; **7**(1): 13083. doi: 10.1038/ncomms13083
177. Fotso S, Maskey RP, Grün-Wollny I, Schulz K-P, Munk M, Laatsch H. Bhimamycin AE and bhimanone: isolation, structure elucidation and biological activity of novel quinone antibiotics from a terrestrial streptomyces. *The Journal of Antibiotics* 2003; **56**(11): 931-941.
178. Koyama J, Ogura T, Tagahara K. Naphtho[2,3-c]furan-4,9-dione and its derivatives from *Aloe ferox*. *Phytochemistry* 1994; **37**(4): 1147-1148. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89546-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89546-1)
179. Izumikawa M, Kawahara T, Kagaya N, Yamamura H, Hayakawa M, Takagi M *et al.* Pyrrolidine-containing peptides, JBIR-126,-148, and-149, from *Streptomyces* sp. NBRC 111228. *Tetrahedron letters* 2015; **56**(39): 5333-5336.
180. Barta CA, Sachs-Barrable K, Jia J, Thompson KH, Wasan KM, Orvig C. Lanthanide containing compounds for therapeutic care in bone resorption disorders. *Dalton Transactions* 2007; (43): 5019-5030.
181. Ockels W, Romer A, Budzikiewicz H. An Fe (II) complex of pyridine-2, 6-di-(monothiocarboxylic acid)-a novel bacterial metabolic product. 1978.

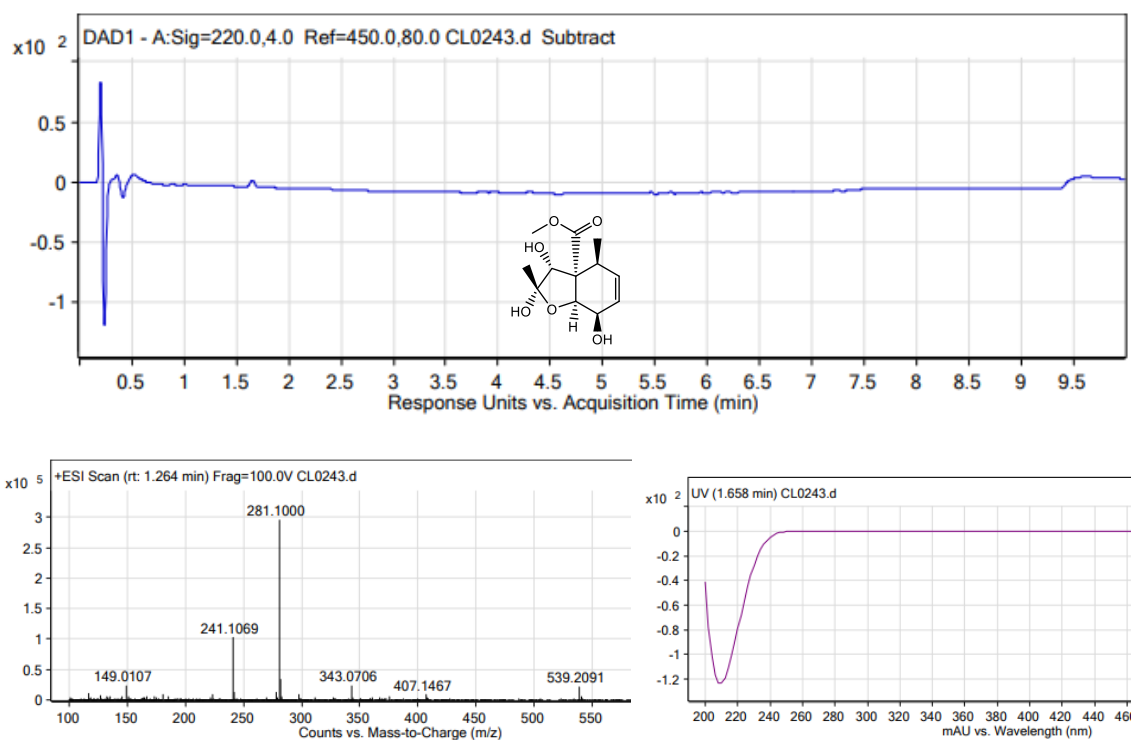
182. Stolworthy JC, Paszczynsk A, Korus R, Crawford RL. Metal binding by pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid), a biochelator produced by *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas putida*. *Biodegradation* 2001; **12**(6): 411-418. e-pub ahead of print 2002/06/08; doi: 10.1023/a:1015067729660
183. Cortese MS, Paszczynski A, Lewis TA, Sebat JL, Borek V, Crawford RL. Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes. *Biometals* 2002; **15**(2): 103-120. doi: 10.1023/A:1015241925322
184. Wang Y-W, Zheng L, Jia F-C, Chen Y-F, Wu A-X. Oxidative ring-opening of isatins for the synthesis of 2-aminobenzamides and 2-aminobenzoates. *Tetrahedron* 2019; **75**(11): 1497-1503. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.01.067>
185. Xie P, Ma M, Rateb ME, Shaaban KA, Yu Z, Huang S-X *et al.* Biosynthetic potential-based strain prioritization for natural product discovery: a showcase for diterpenoid-producing actinomycetes. *Journal of natural products* 2014; **77**(2): 377-387.
186. Hayat A-u-RS, Choudhary MI, Khan KM, Abbaskhan A. Two New Cinnamic Acid Esters from Marine Brown Alga *Spatoglossum variabile*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2002; **50**(9): 1297-1299. doi: 10.1248/cpb.50.1297
187. Abbas F, Zayed R. Bioactive Saponins from *Astragalus suberi* L. Growing in Yemen. *Zeitschrift für Naturforschung C* 2005; **60**(11-12): 813-820. doi: doi:10.1515/znc-2005-11-1201
188. Gorbacheva LA, Grishkovets VI, Drozd GA, Chirva V. Triterpene glycosides from *Sophora japonica* L. seeds. *Adv Exp Med Biol* 1996; **404**: 501-504. e-pub ahead of print 1996/01/01; doi: 10.1007/978-1-4899-1367-8_40
189. Suzuki K, Doi S, Yahara S, Uyeda M. 2070-DTI, A Topoisomerase Inhibitor Produced by *Streptomyces* sp. Strain No. 2070. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2003; **18**(6): 497-503. doi: 10.1080/14756360310001613076
190. Tsunoda Y, Okawa M, Kinjo J, Ikeda T, Nohara T. Studies on the Constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2008; **56**(8): 1138-1142. doi: 10.1248/cpb.56.1138
191. Ifesan BO, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai SP. Assessment of antistaphylococcal activity of partially purified fractions and pure compounds from *Eleutherine americana*. *Journal of food protection* 2009; **72**(2): 354-359.
192. Kosalec I, Kremer D, Locatelli M, Epifano F, Genovese S, Carlucci G *et al.* Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chemistry* 2013; **136**(2): 335-341. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.026>
193. Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S. Antimicrobial Activity of an Extract and Anthraquinones from *Caloplaca Schaereri*. *The Lichenologist* 2002; **34**(1): 83-85. e-pub ahead of print 2007/03/28; doi: 10.1006/lich.2001.0365
194. Molnár I, Gibson DM, Krasnoff SB. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports* 2010; **27**(9): 1241-1275. doi: 10.1039/C001459C

195. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR *et al.* Gaussian 16 Rev. C.01. In. Wallingford, CT, 2016.
196. Ditchfield R. Molecular Orbital Theory of Magnetic Shielding and Magnetic Susceptibility. *The Journal of Chemical Physics* 2003; **56**(11): 5688-5691. doi: 10.1063/1.1677088
197. Ditchfield R. Self-consistent perturbation theory of diamagnetism. *Molecular Physics* 1974; **27**(4): 789-807. doi: 10.1080/00268977400100711
198. McMichael Rohlffing C, Allen LC, Ditchfield R. Proton and carbon-13 chemical shifts: Comparison between theory and experiment. *Chemical Physics* 1984; **87**(1): 9-15. doi: [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(84\)85133-2](https://doi.org/10.1016/0301-0104(84)85133-2)
199. Wolinski K, Hinton JF, Pulay P. Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *Journal of the American Chemical Society* 1990; **112**: 8251-8260.
200. Legault CY. CYLview, 1.0b. In. Université de Sherbrooke, 2009.

7. ANEXOS

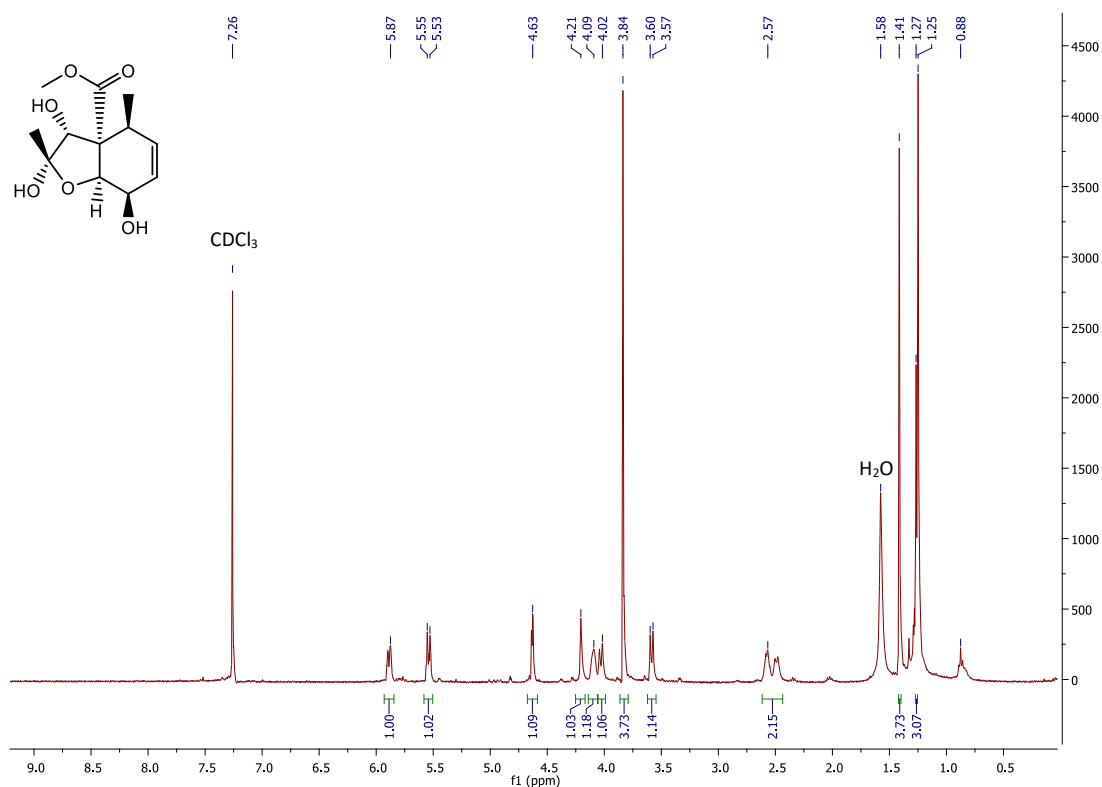
HT-GU-SUES-1371 (*Pleotrichocladium opacum*)

Compuesto 8. Sólido incoloro; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (fin de absorción); datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 2; HRESIMS m/z 281.1000 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$, 281.1001).

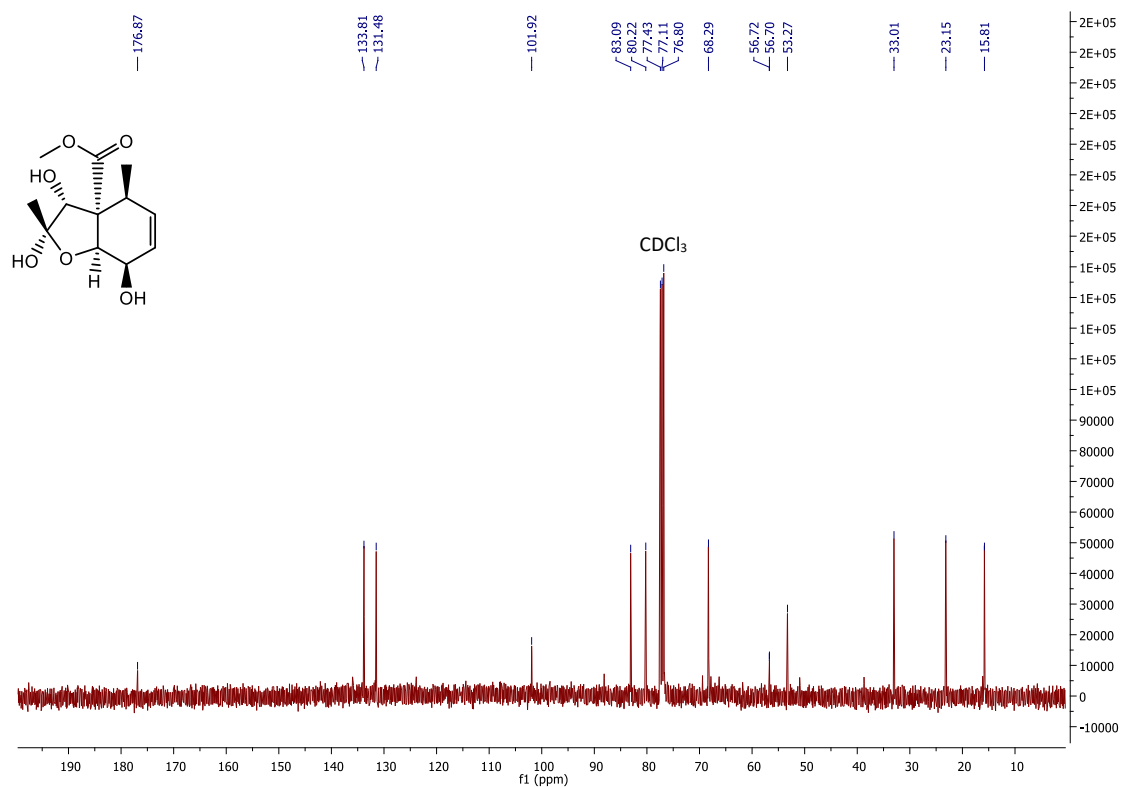


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **8** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo líquido JSA (condiciones estándar de fermentación).

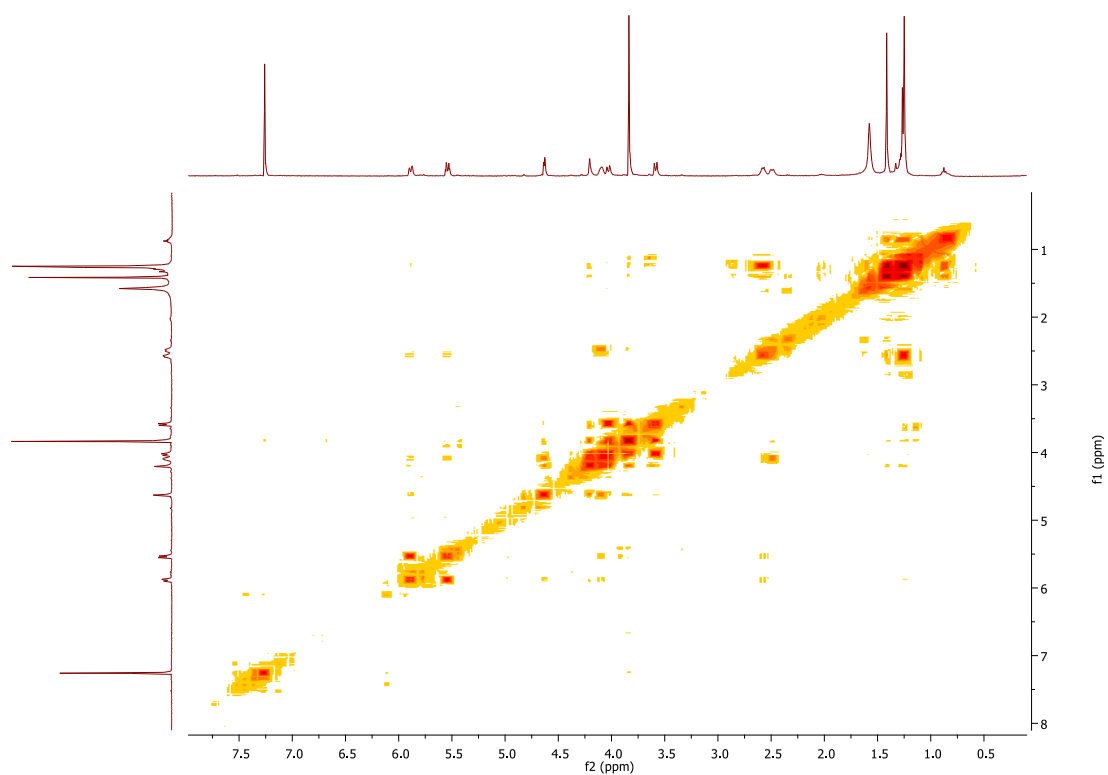
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**



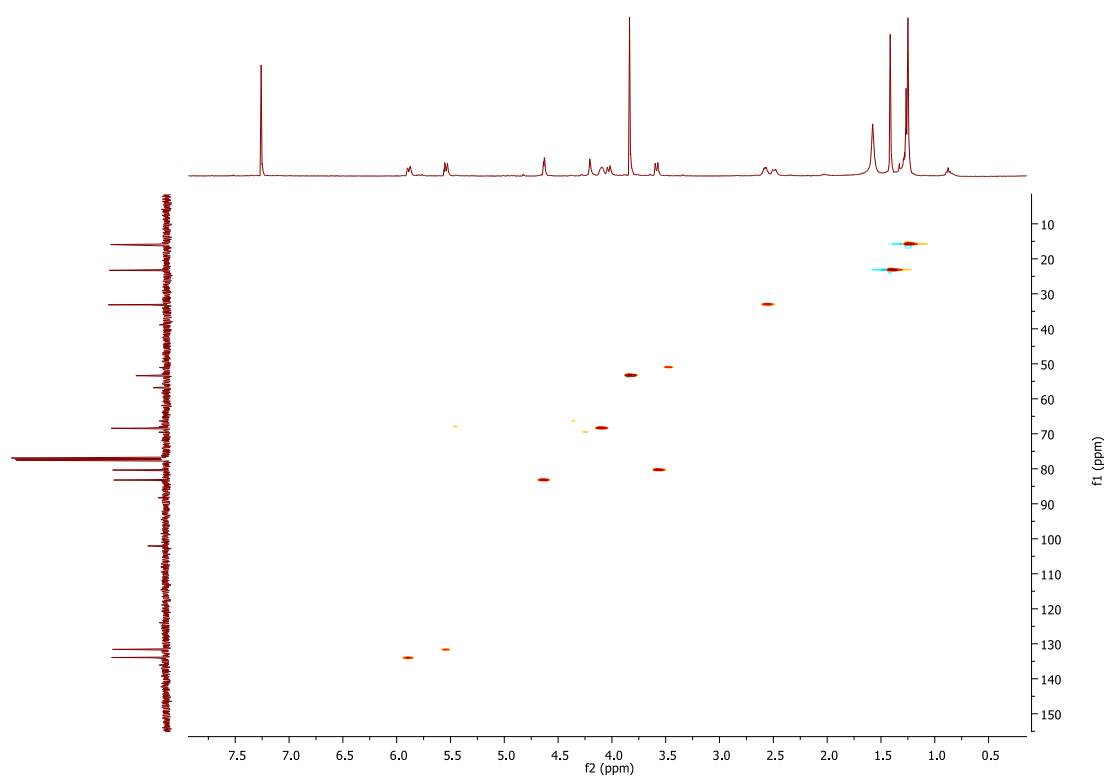
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**



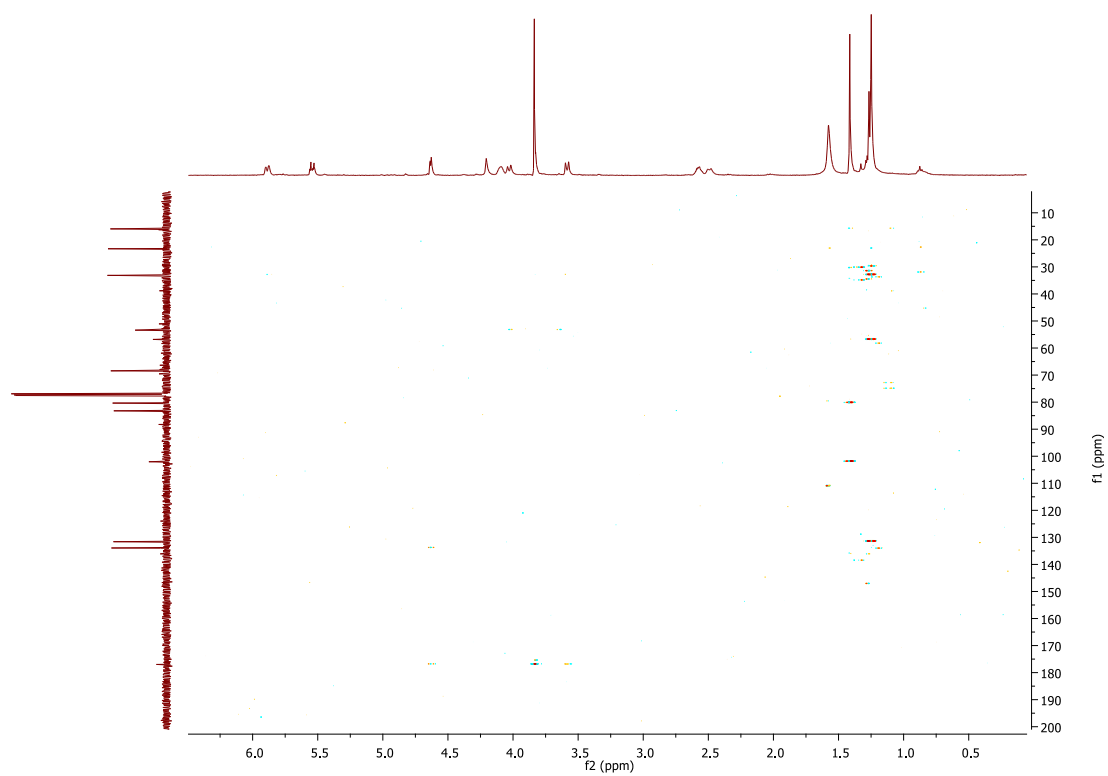
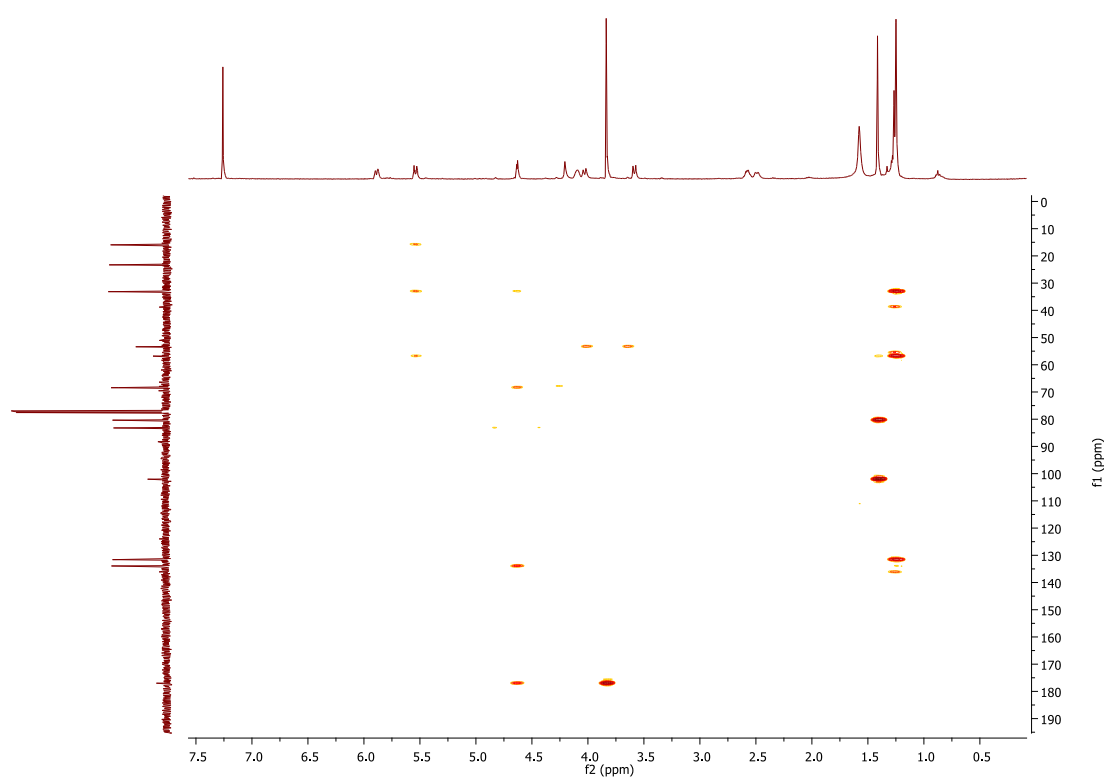
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**



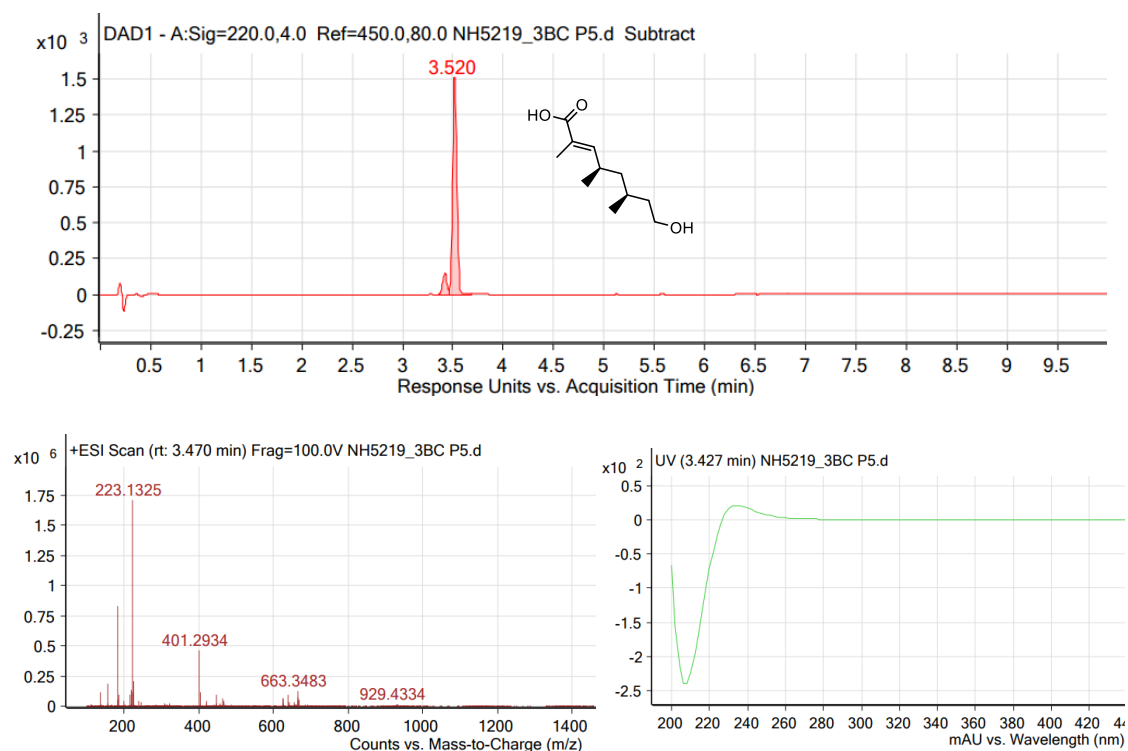
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, CDCl_3) del compuesto **8**



Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, CDCl₃) del compuesto **8**

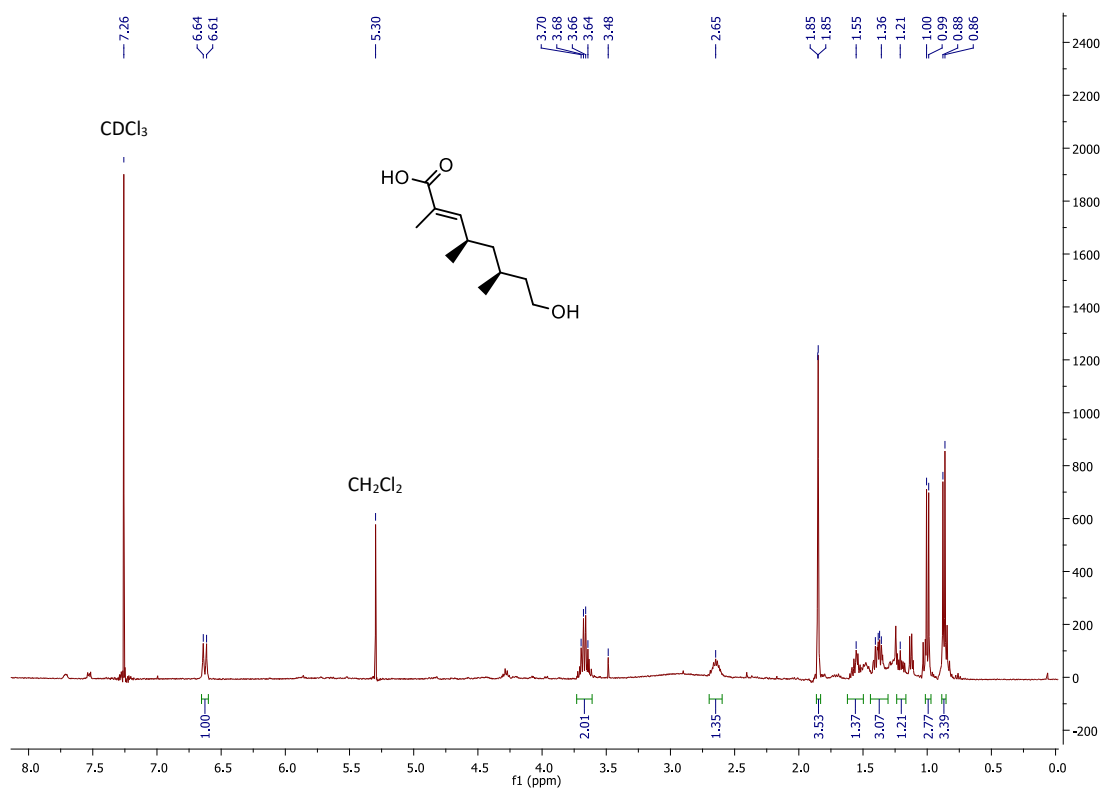


Compuesto 9. Aceite incoloro; $[\alpha]_D^{20} = +10.4^\circ$ (c 0.133, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 218 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 3; HRESIMS m/z 223.1325 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Na}$, 223.1310).

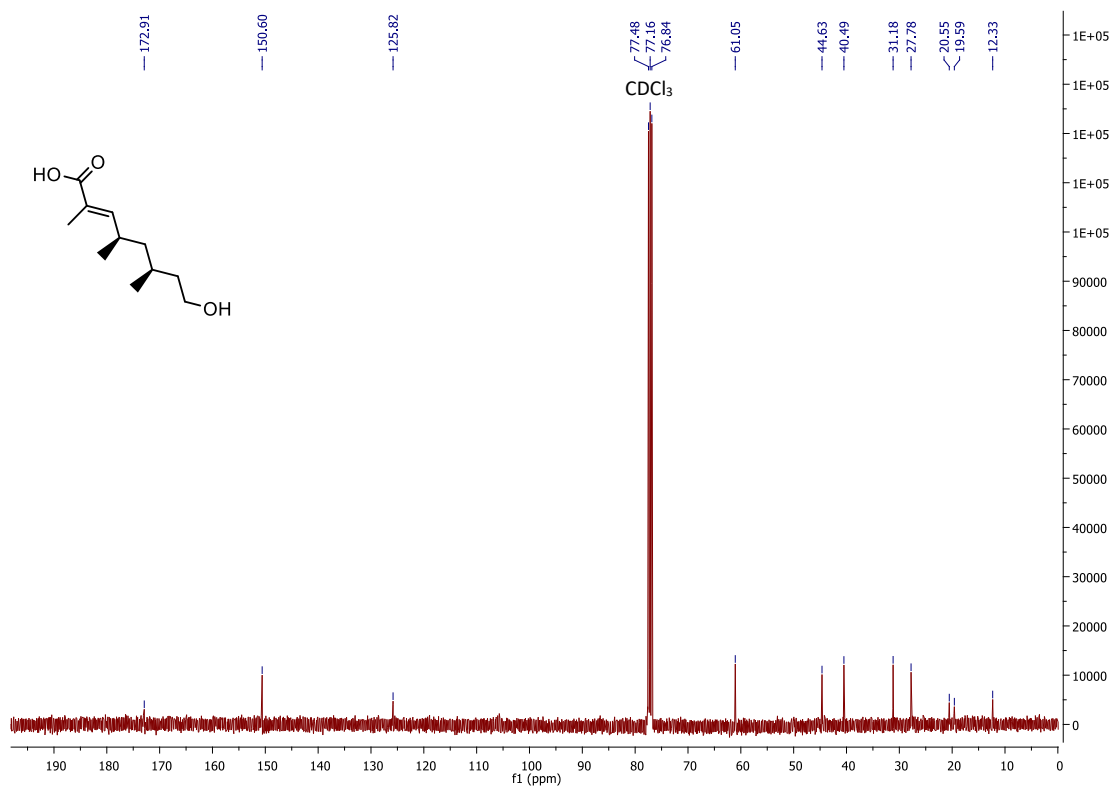


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **9** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo líquido JSA (condiciones estándar de fermentación).

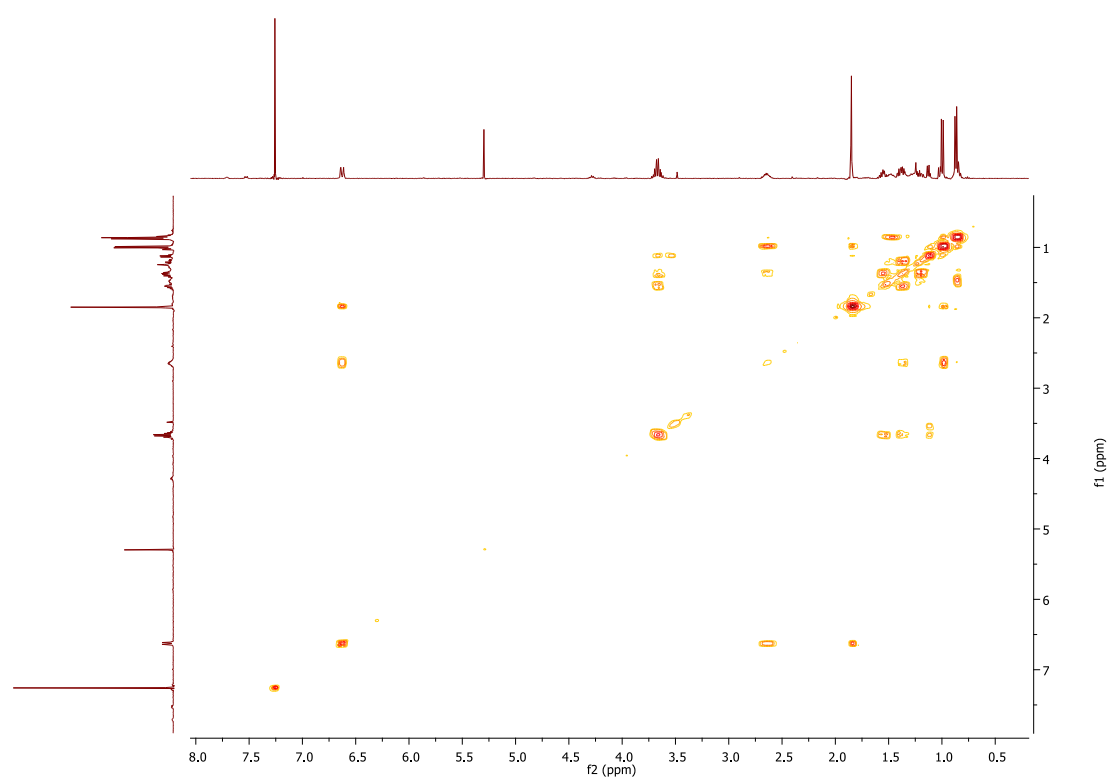
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **9**



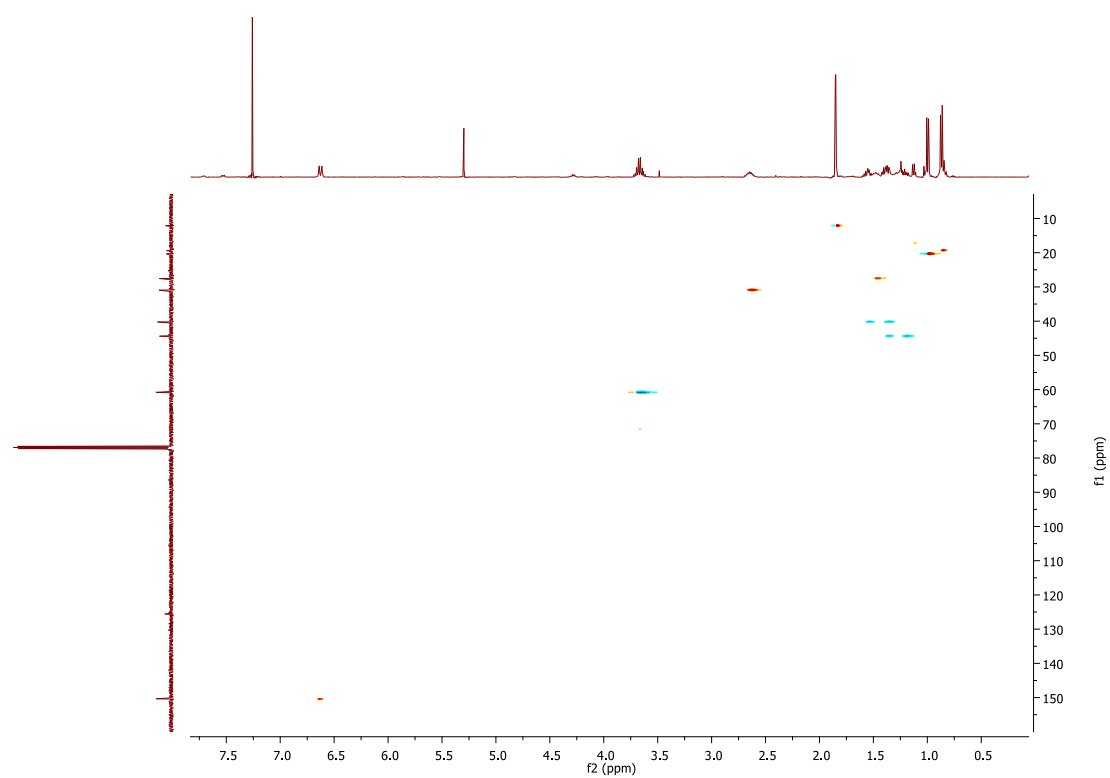
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **9**



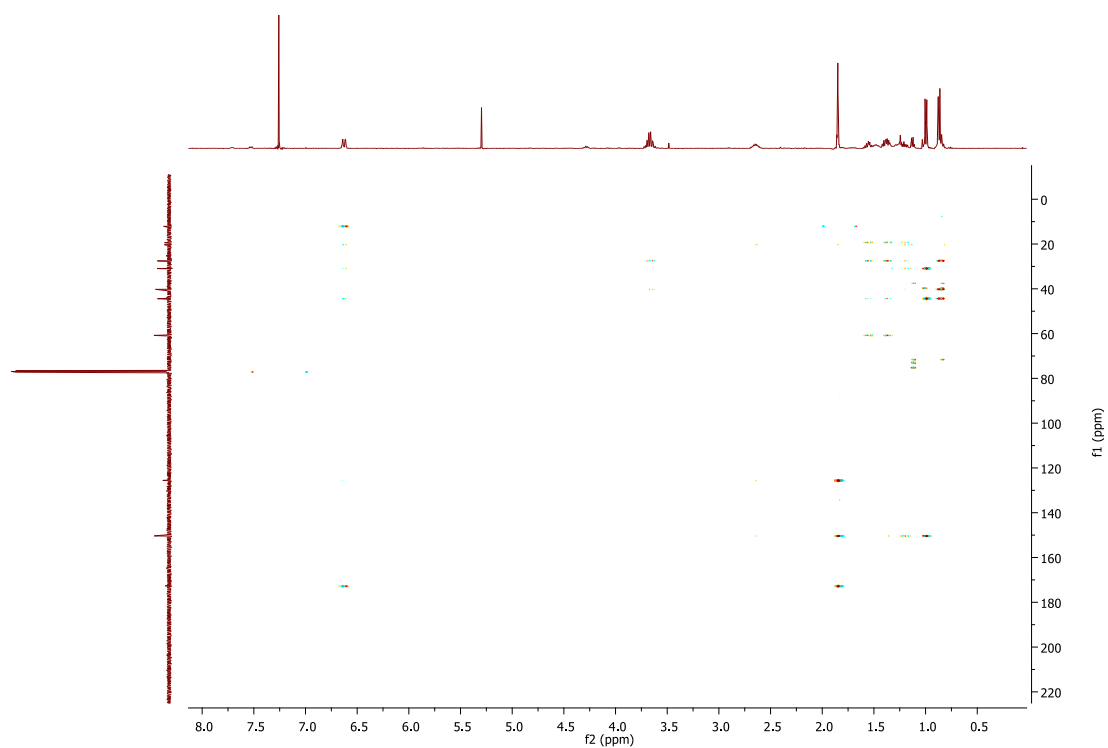
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **9**



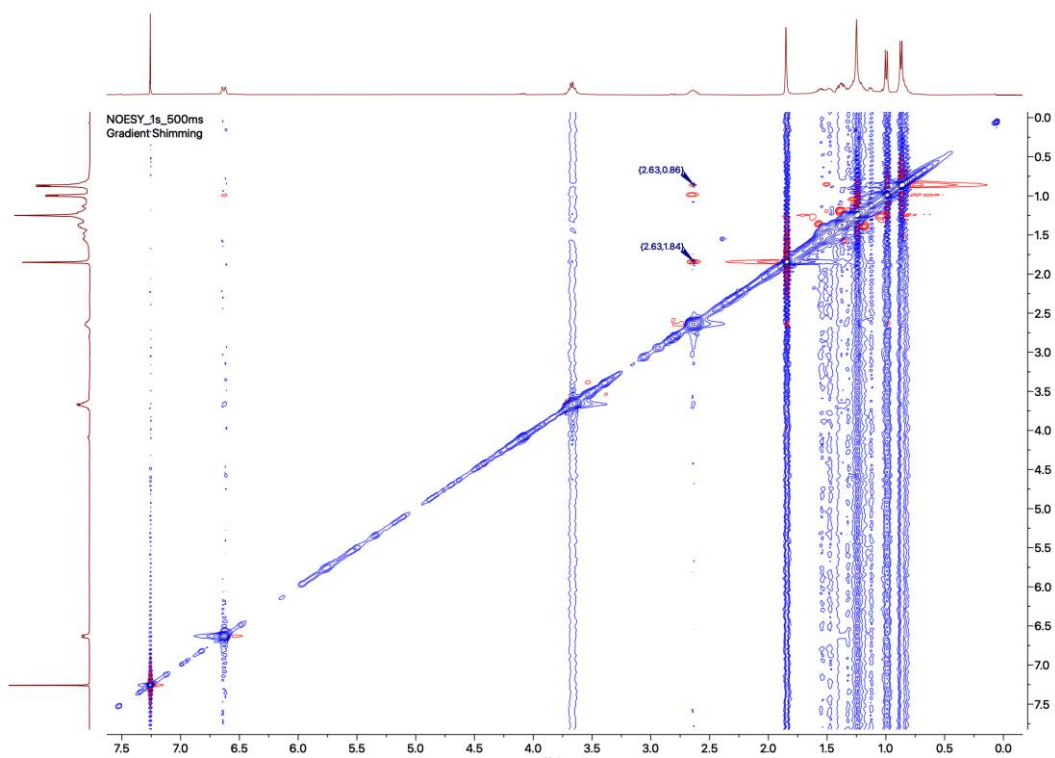
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, CDCl_3) del compuesto **9**



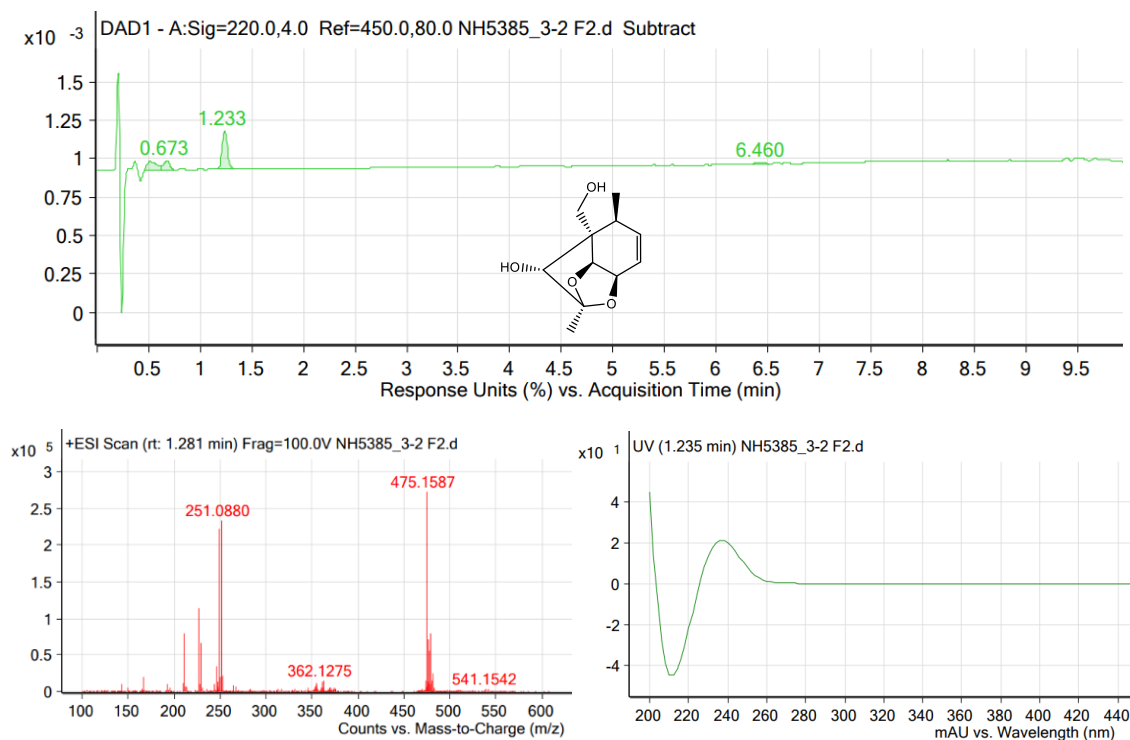
Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, CDCl_3) del compuesto **9**



Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **9**

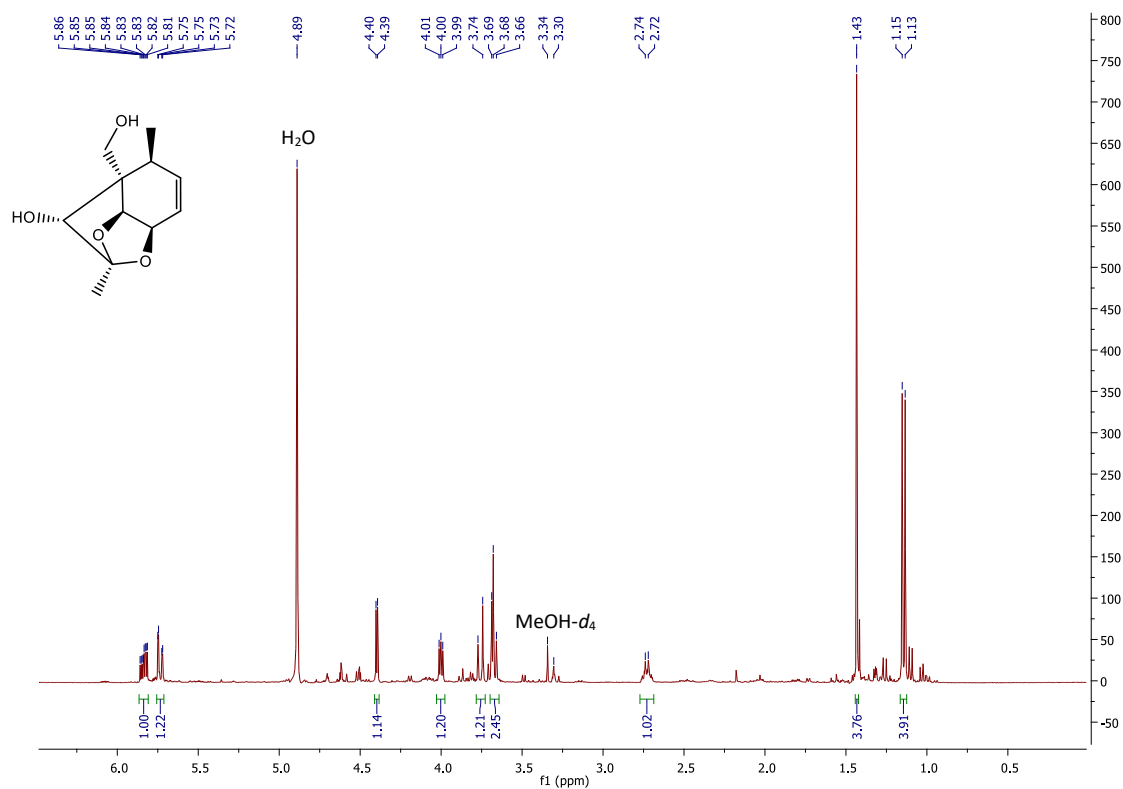


Compuesto 12. Cristales incoloros; $[\alpha]^{20}_D = +66.8^\circ$ (c 0.33, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 210 nm (fin de absorción); datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 4; HRESIMS m/z 235.0918 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$, 235.0946).

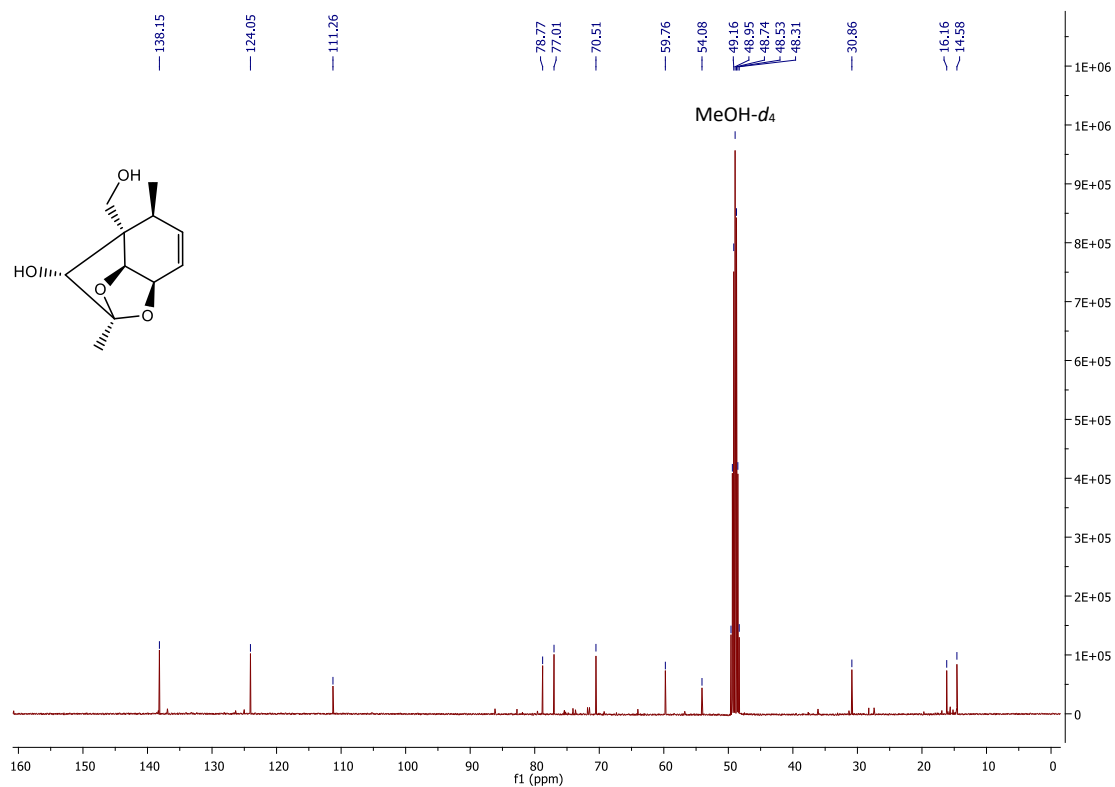


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **12** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz.

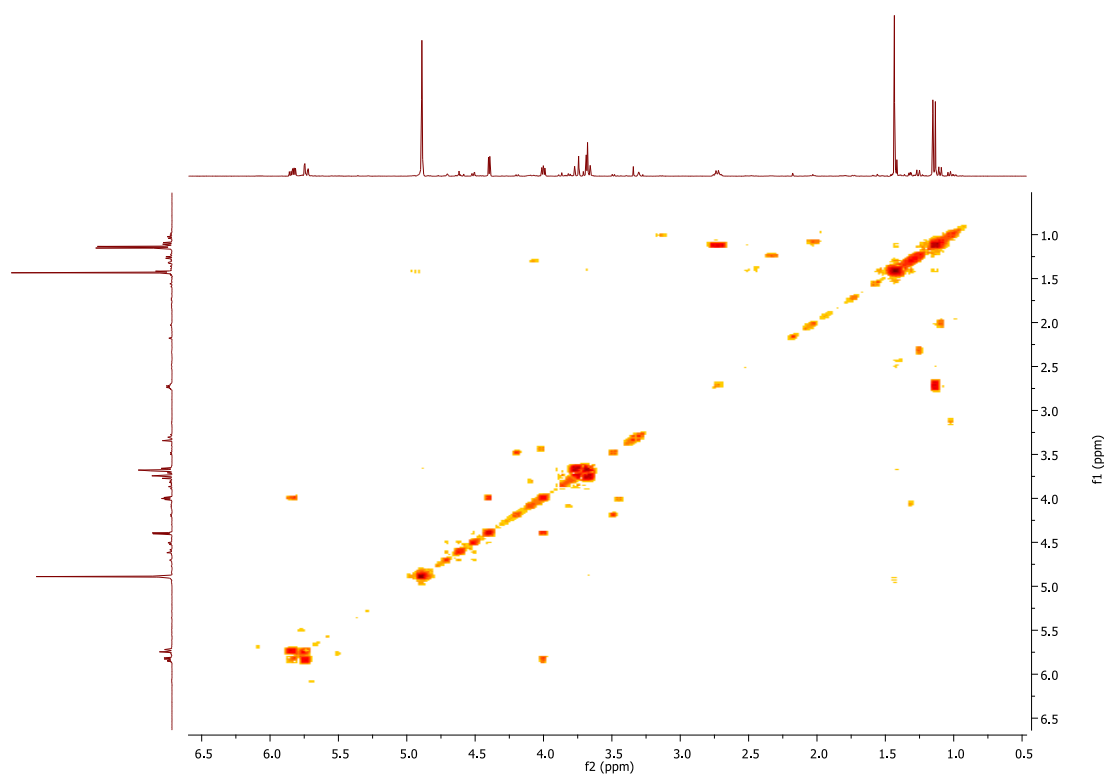
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **12**.



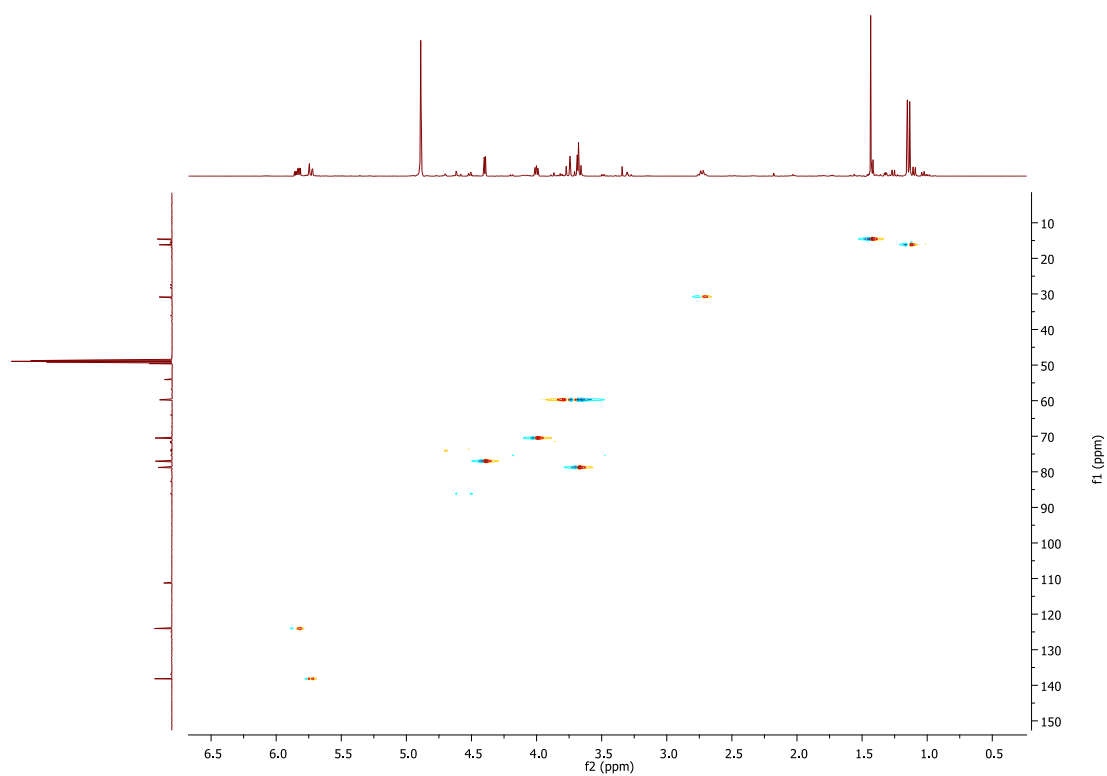
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **12**.



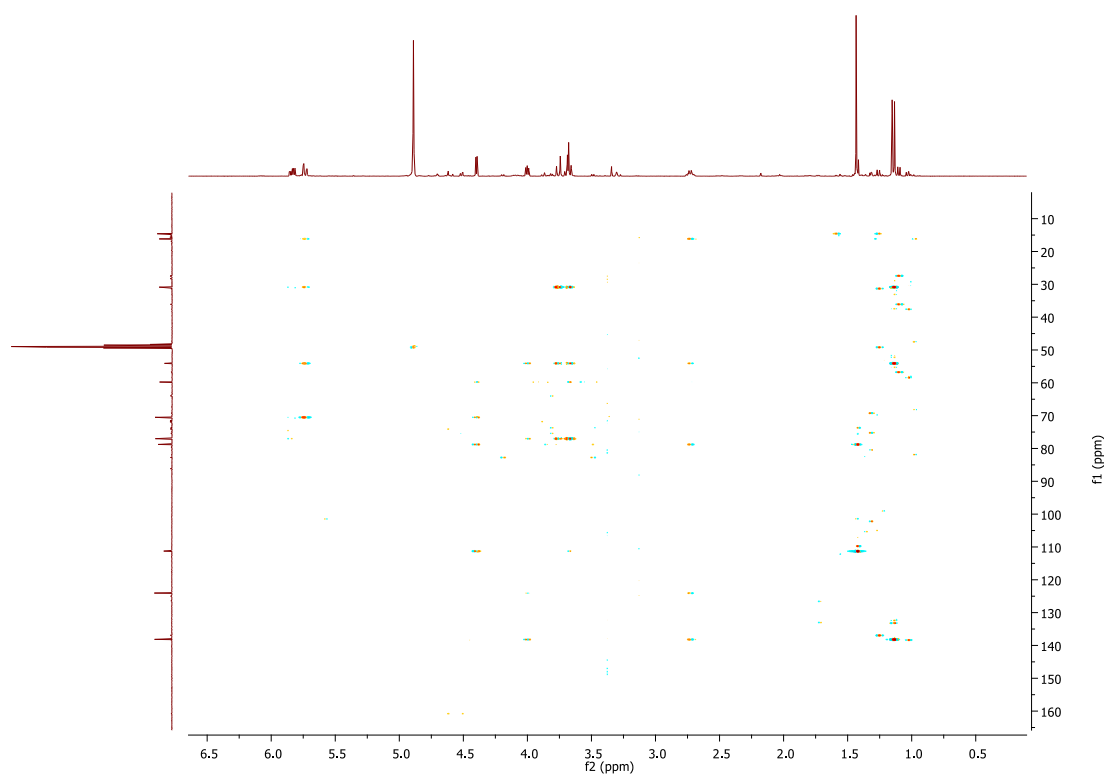
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **12**.



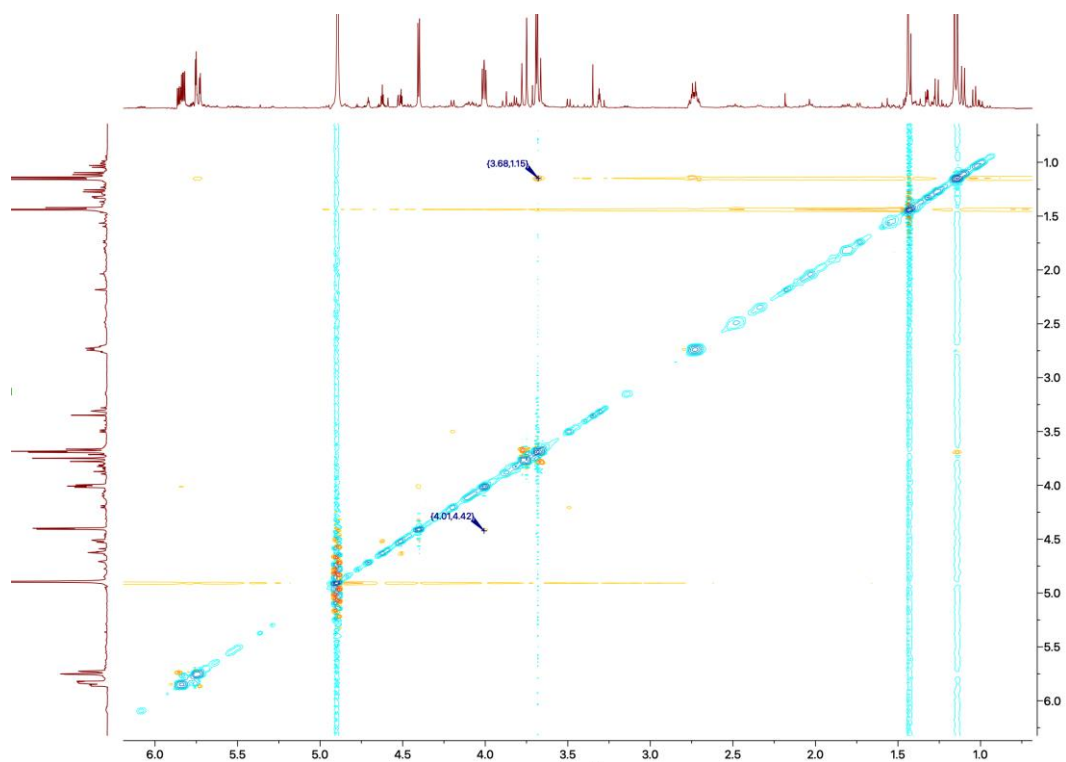
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **12**.



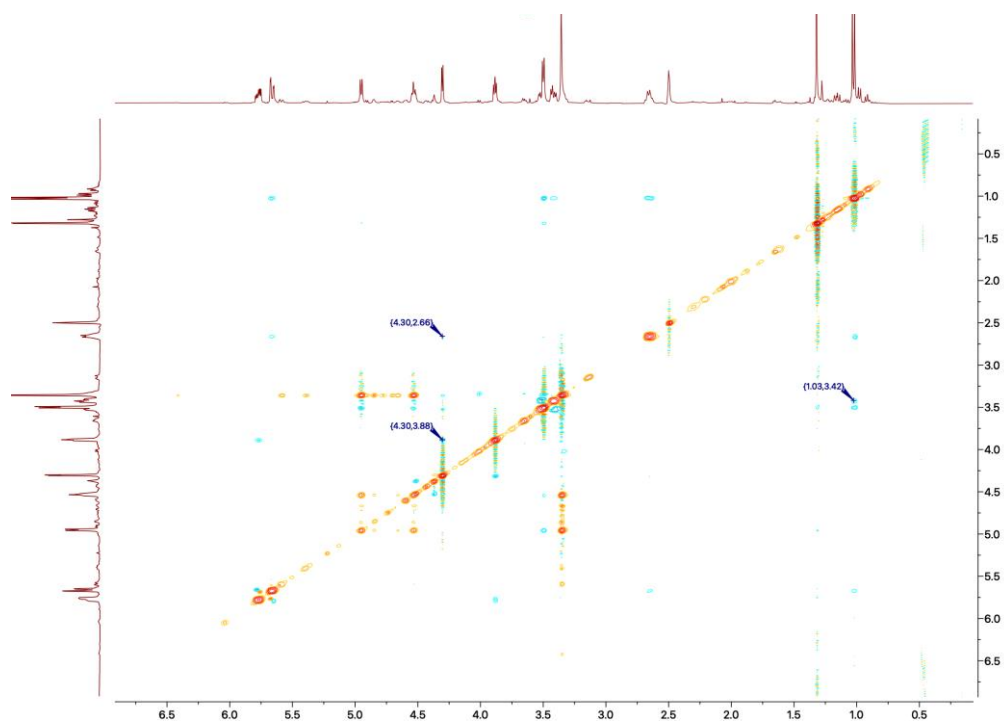
Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, MeOH- d_4) del compuesto **12**.



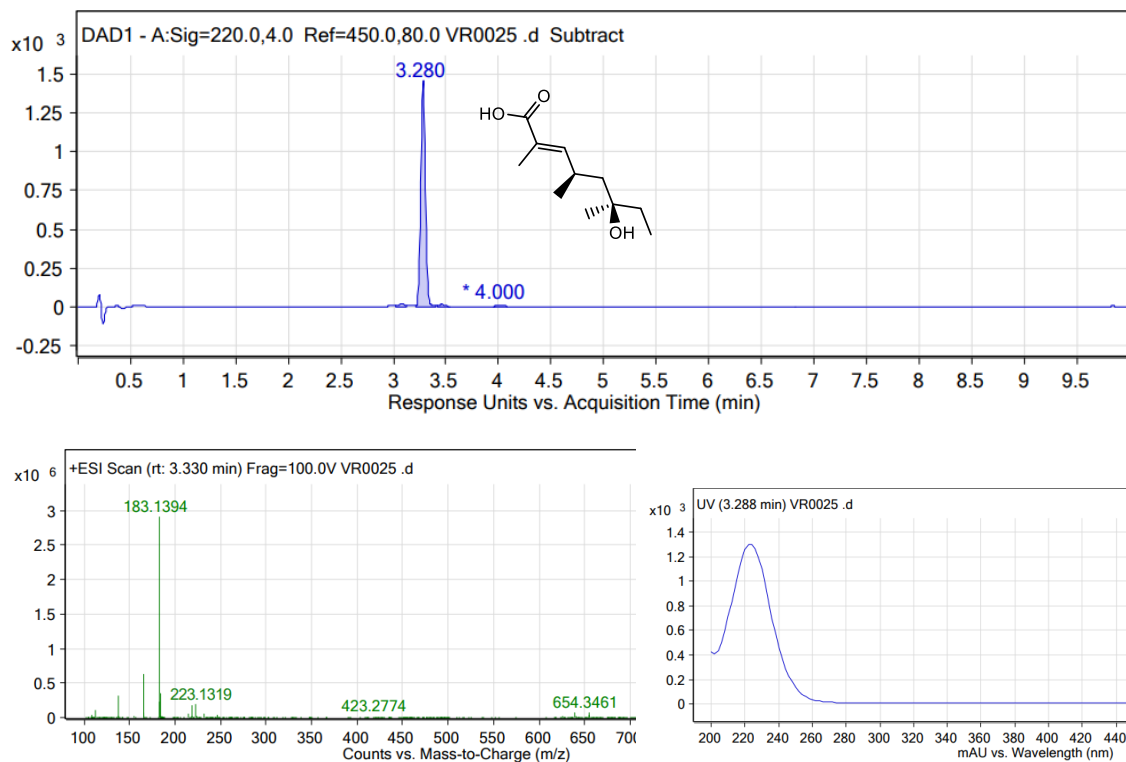
Espectro NOESY (400 MHz, MeOH- d_4) del compuesto **12**.



Espectro NOESY (400 MHz, DMSO- d_6) del compuesto **12**.

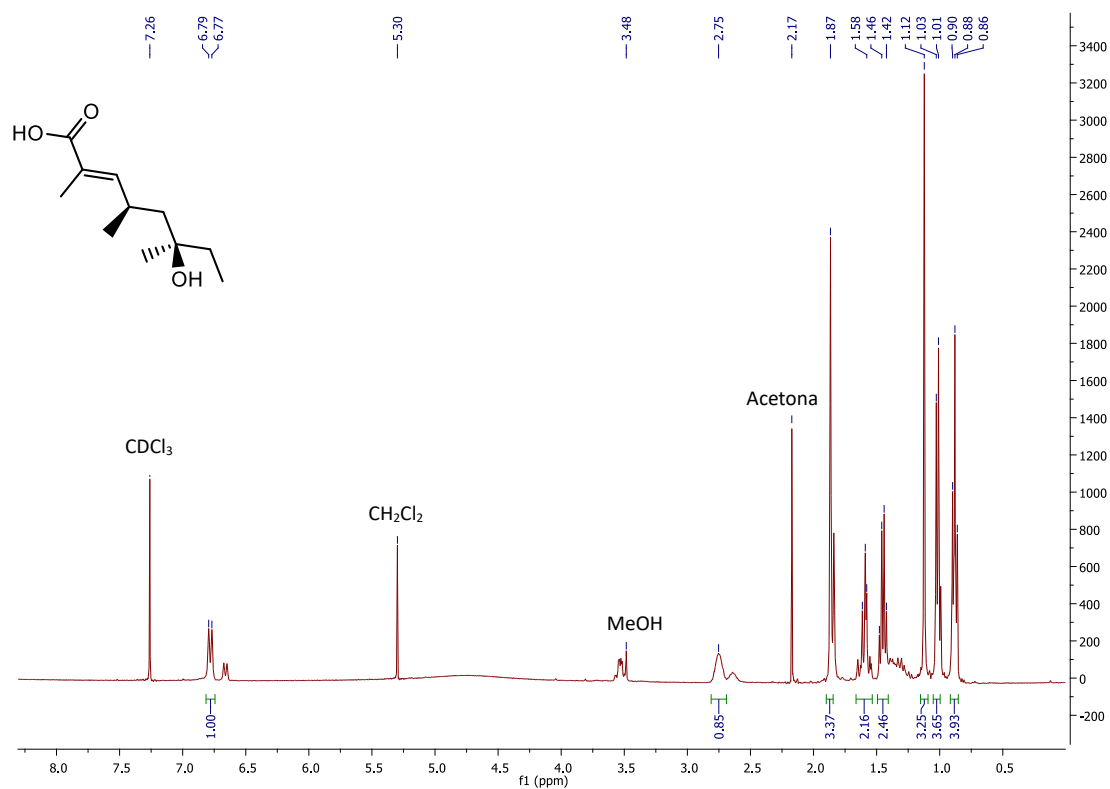


Compuesto 15. Aceite amarillento; UV (MeOH) λ_{max} 220 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 5; HRESIMS m/z 223.1319 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Na}$, 223.1310).

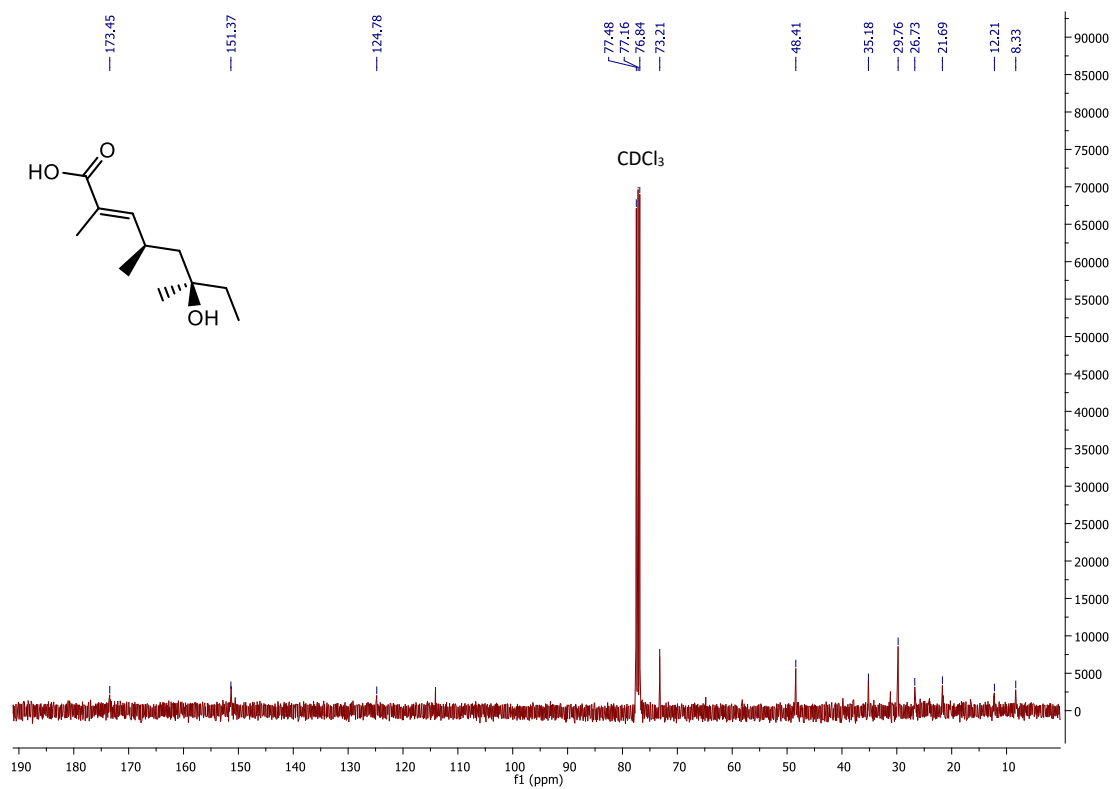


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **15** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de trigo.

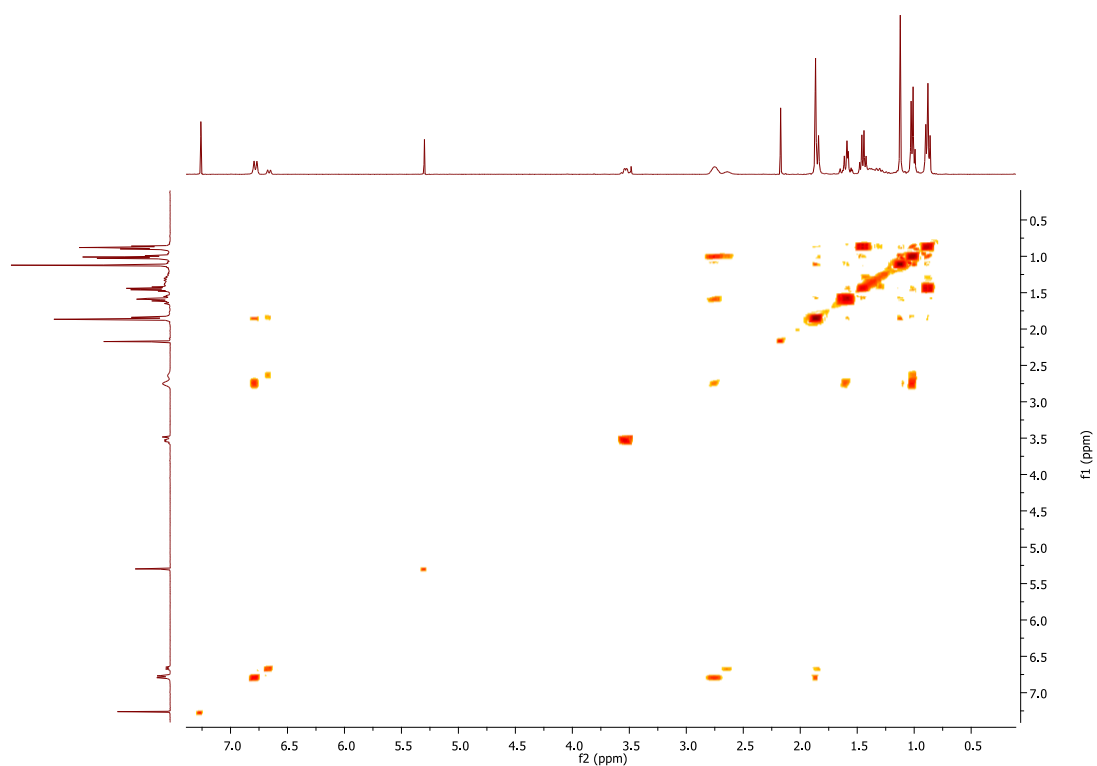
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **15**.



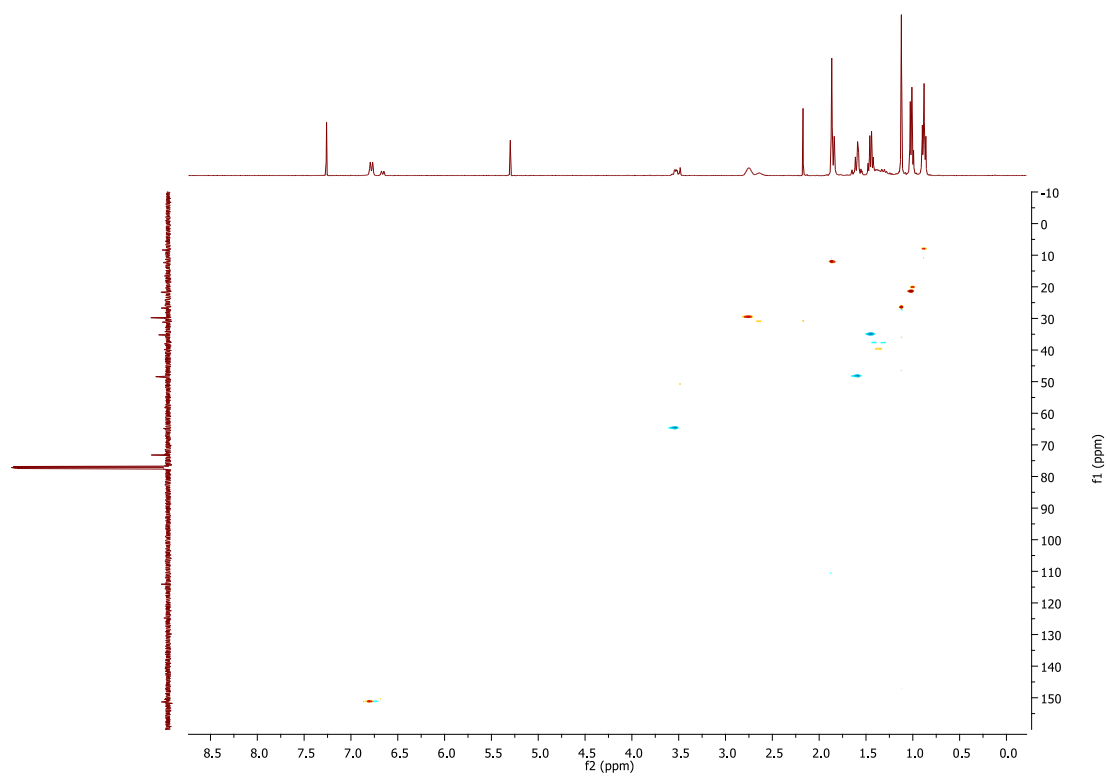
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **15**.



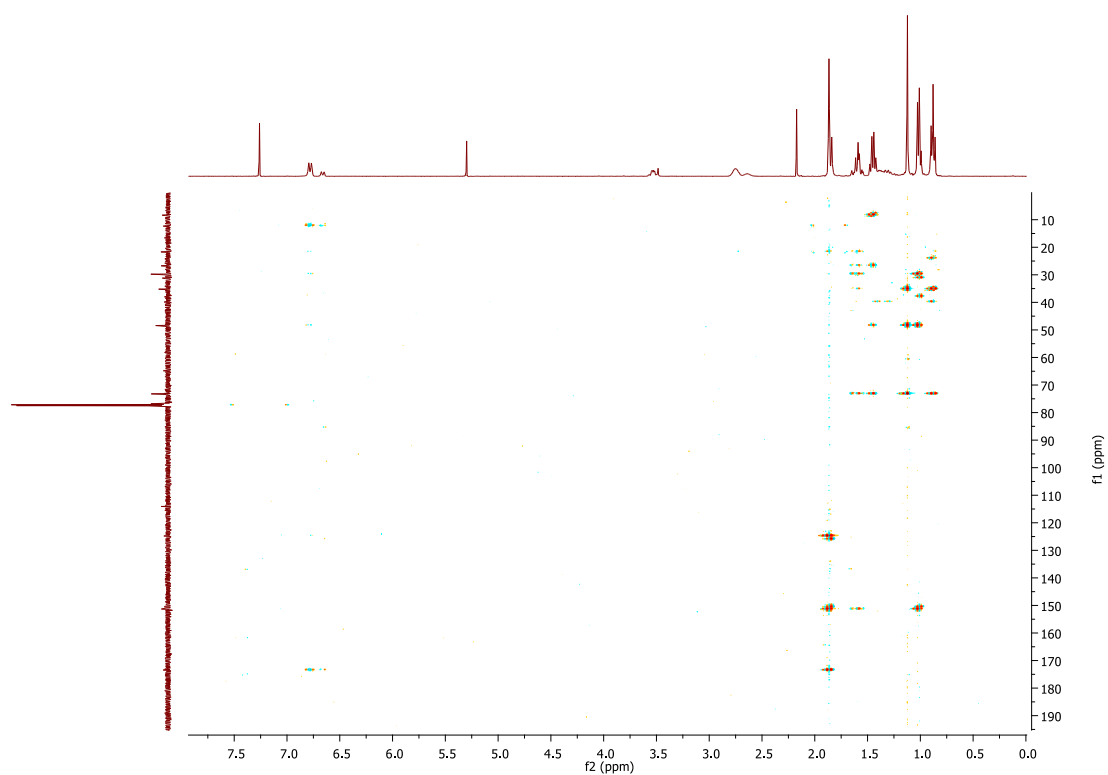
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **15**.



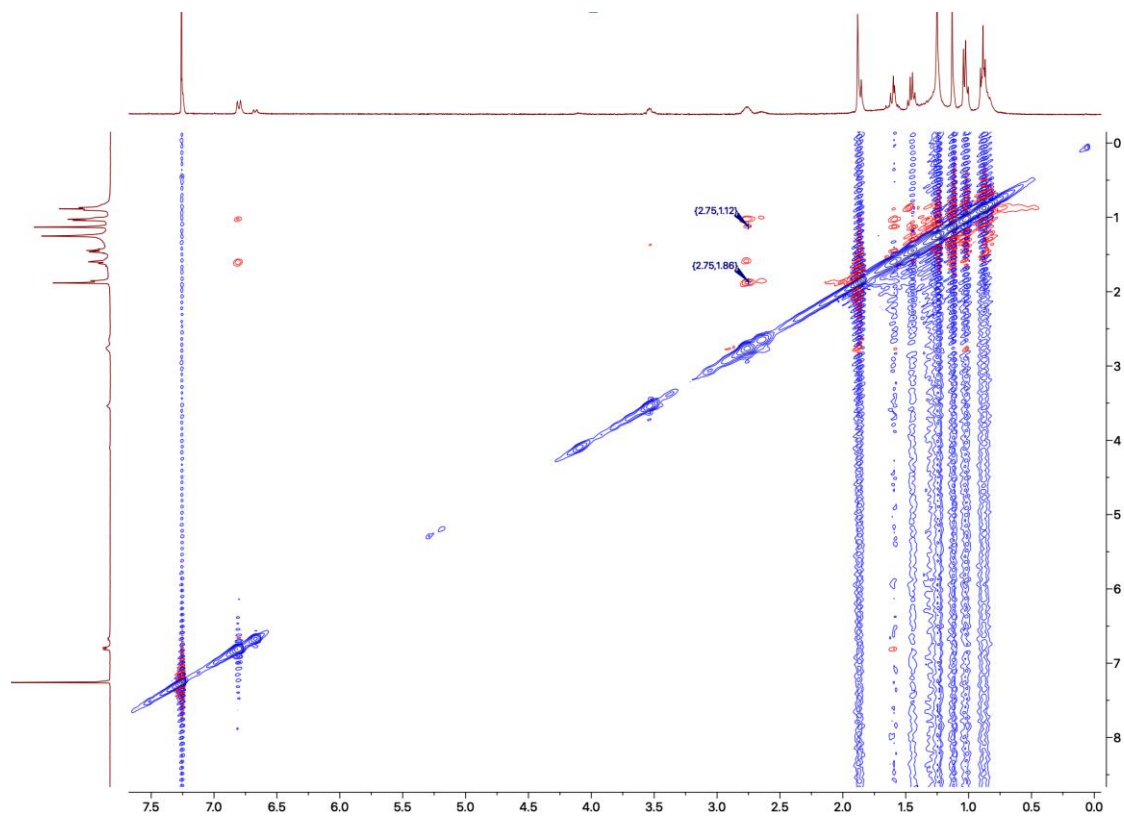
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, CDCl_3) del compuesto **15**.



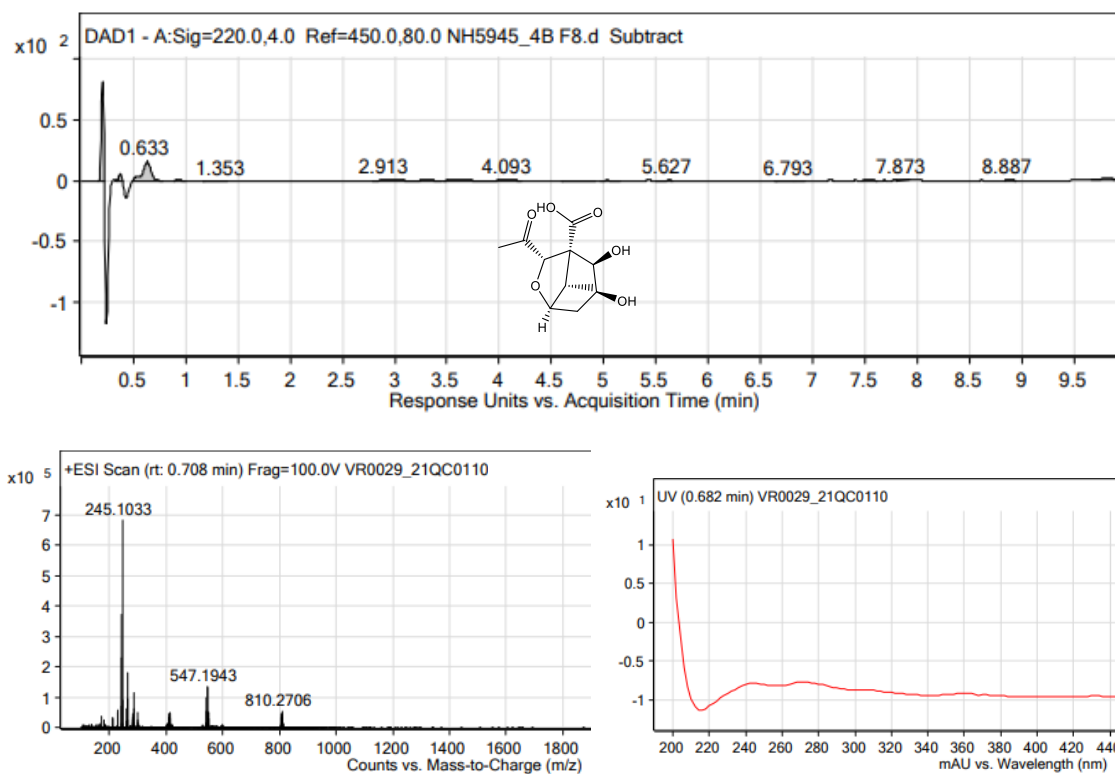
Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, CDCl₃) del compuesto **15**.



Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃) del compuesto **15**.

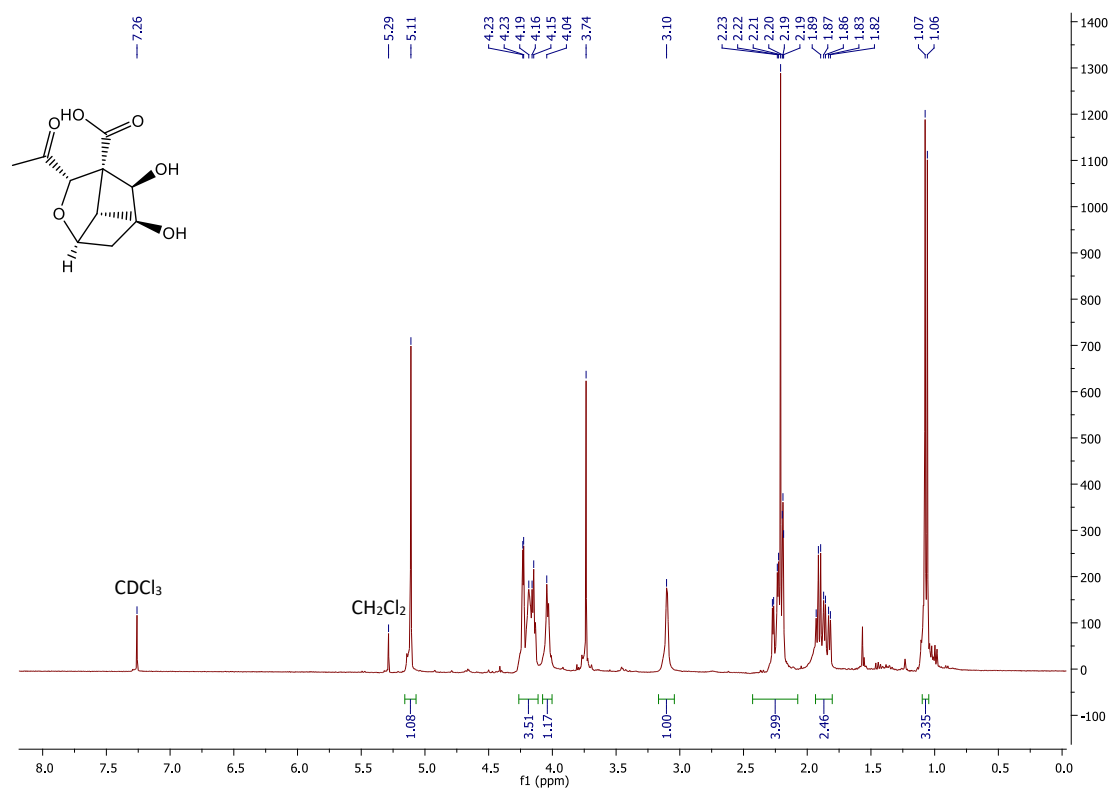


Compuesto 16. Aceite incoloro; $[\alpha]^{20}_D = +104.2^\circ$ (c 0.67, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 210, 278 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 6; HRESIMS m/z 245.1033 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_6$, 245.1025).

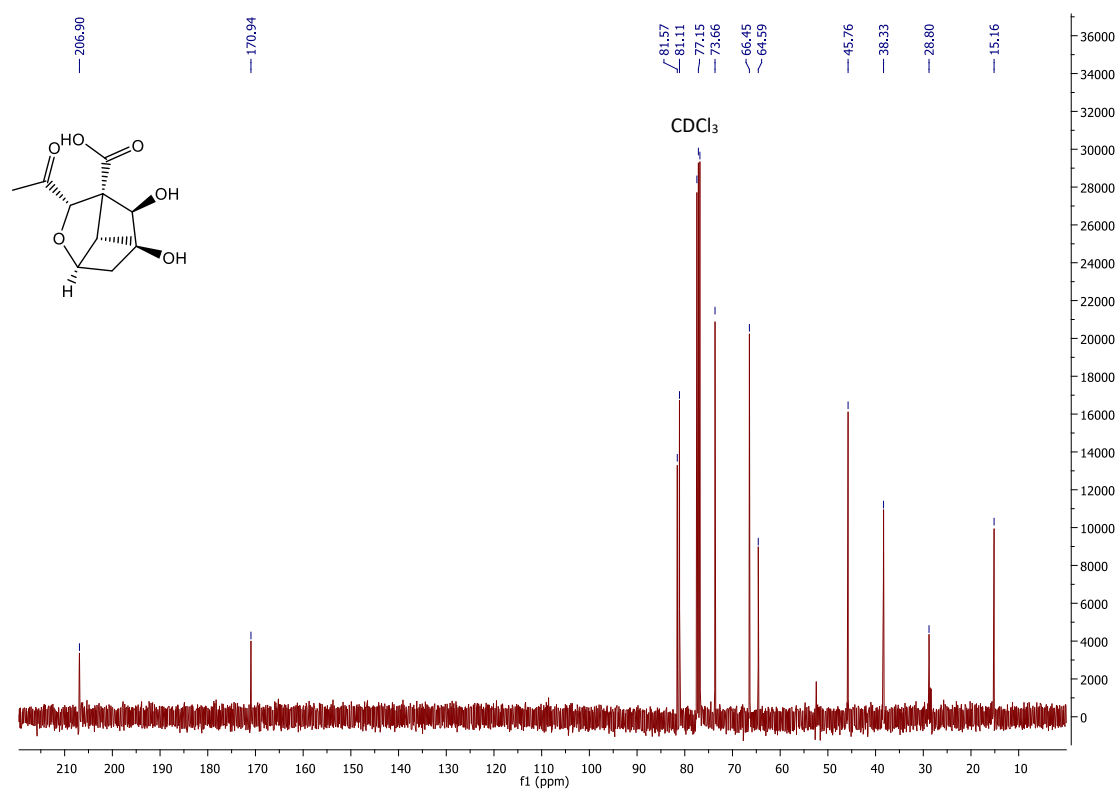


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **16** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

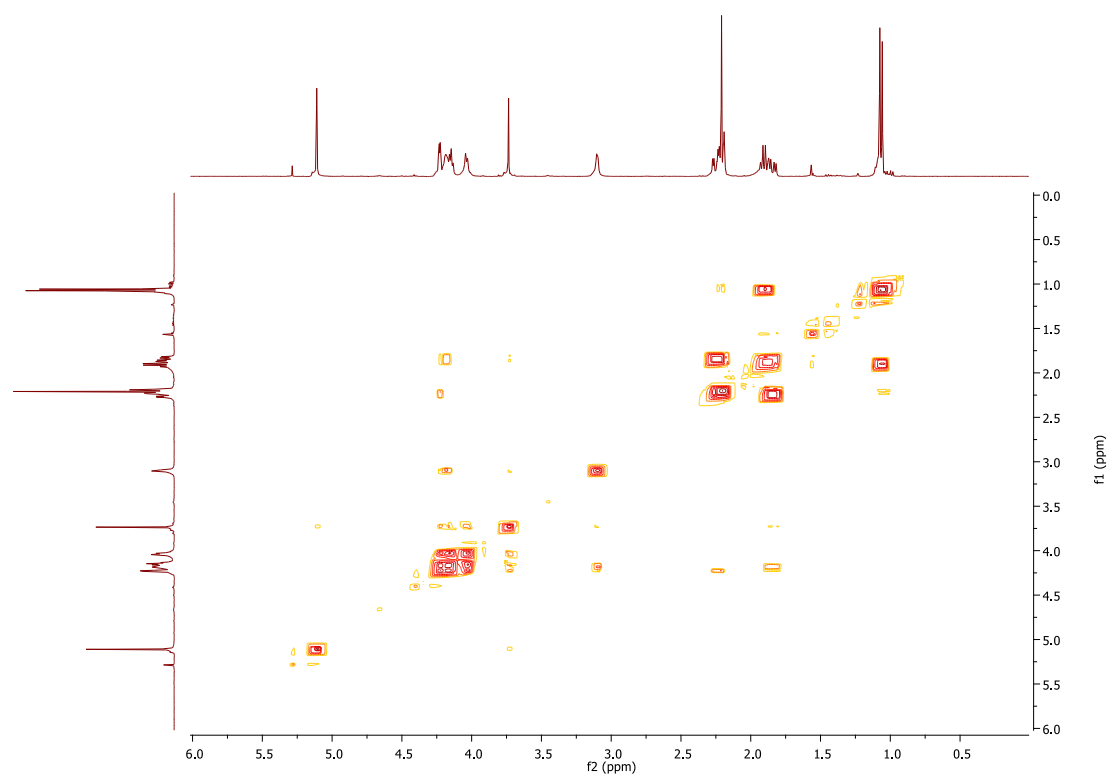
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **16**.



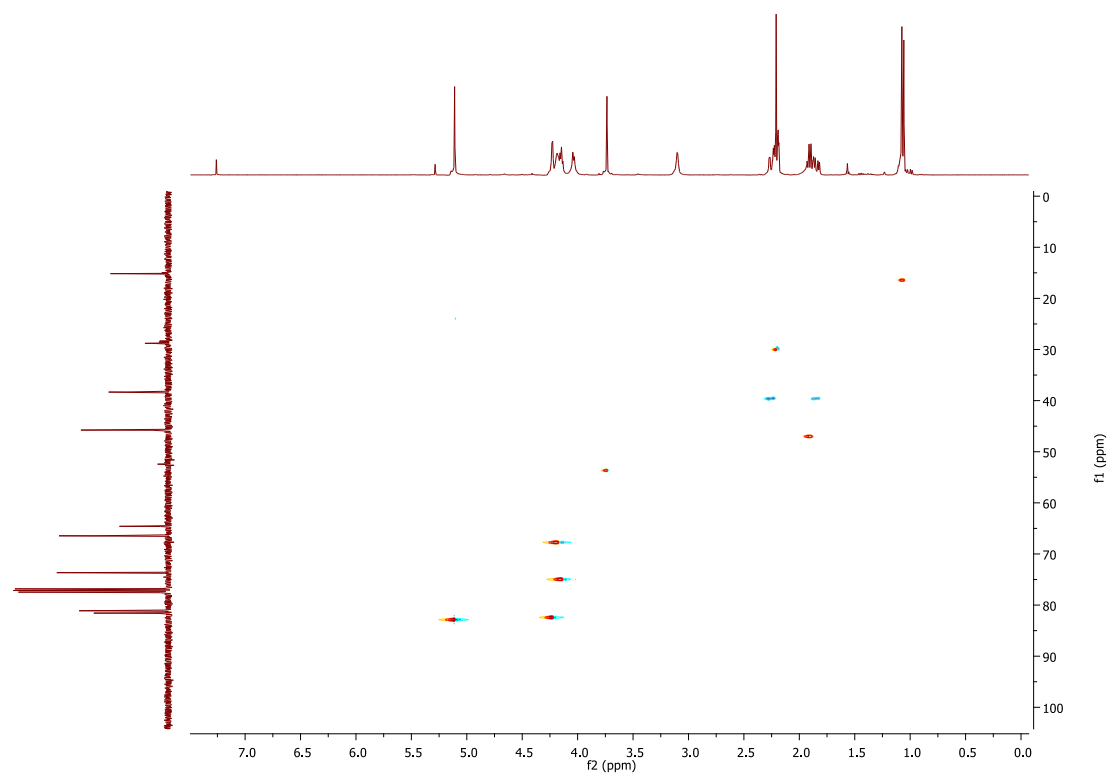
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **16**.



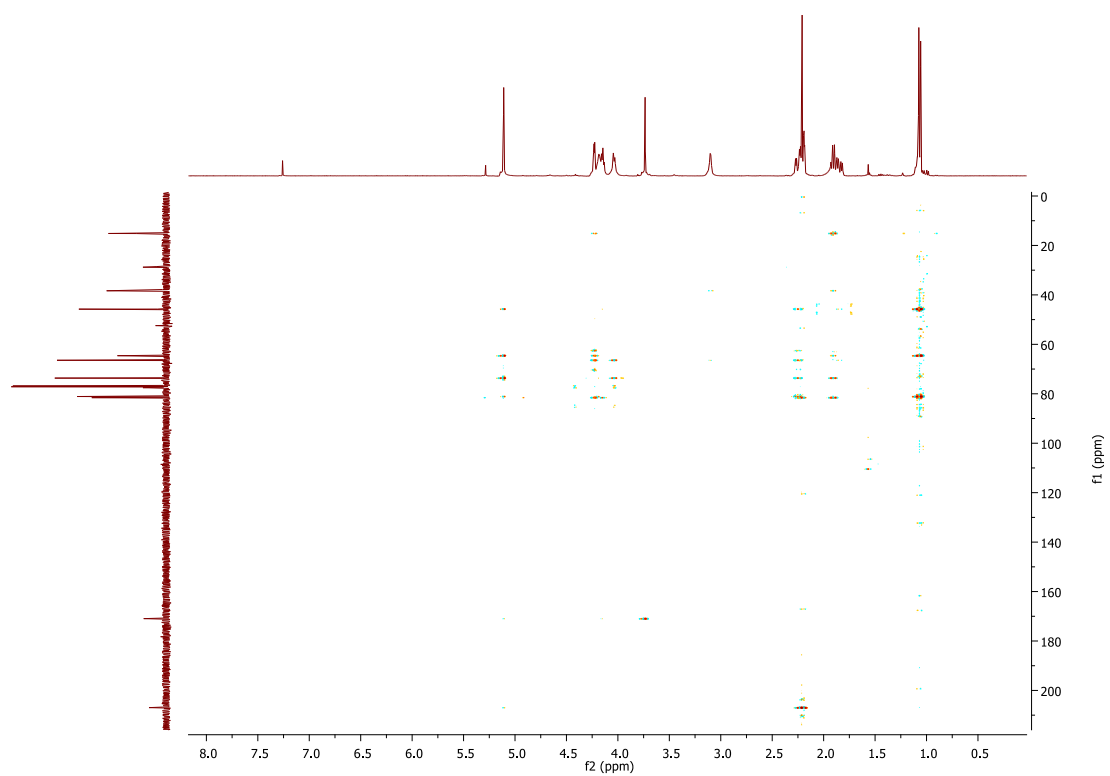
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **16**.



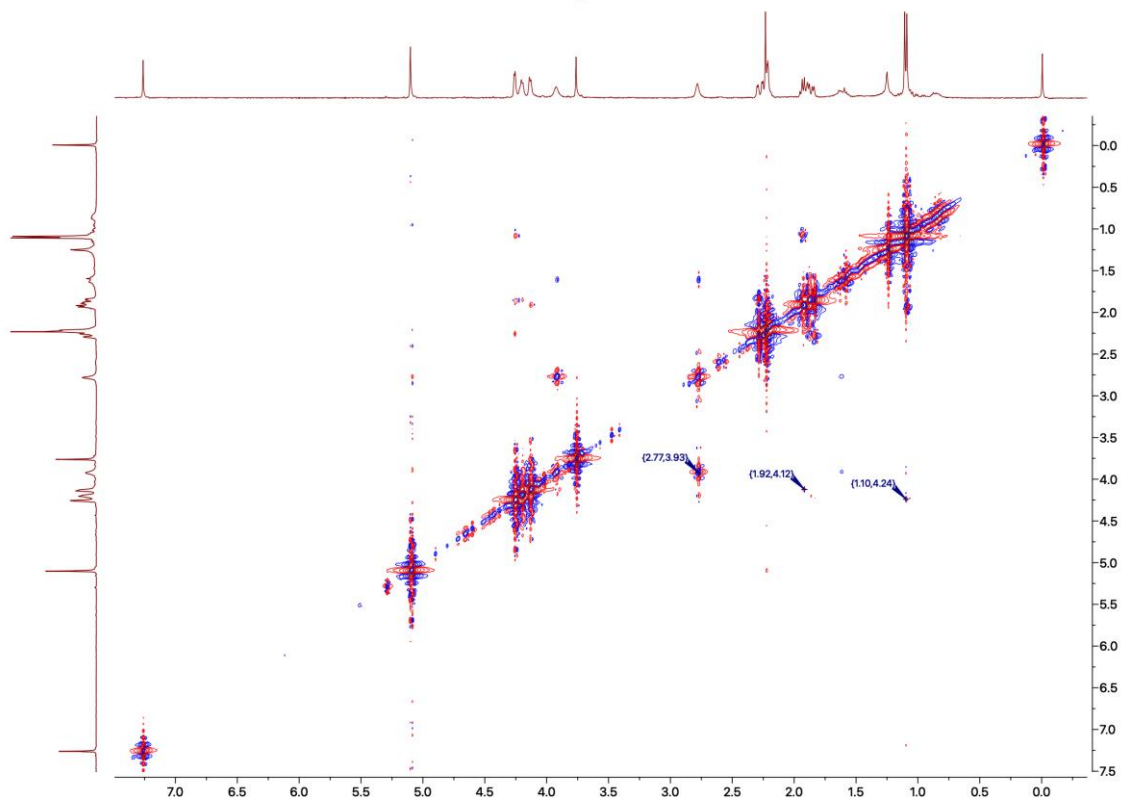
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, CDCl_3) del compuesto **16**.



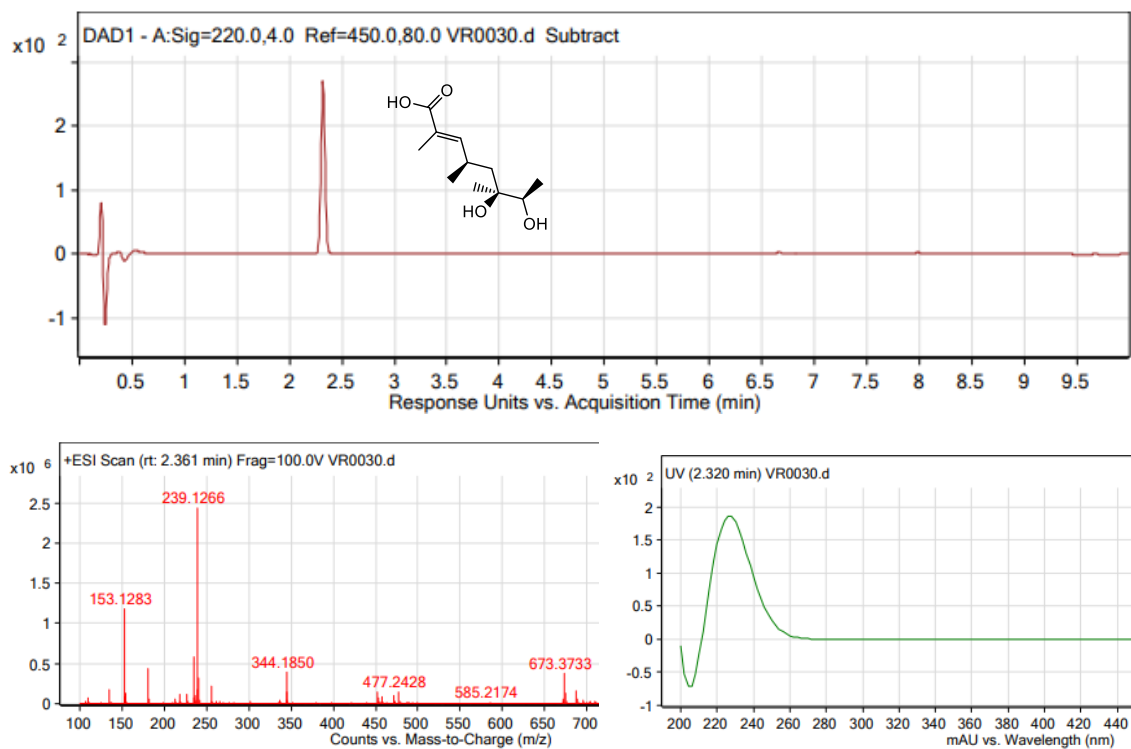
Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, CDCl₃) del compuesto **16**.



Espectro ROESY (400 MHz, CDCl₃) del compuesto **16**.

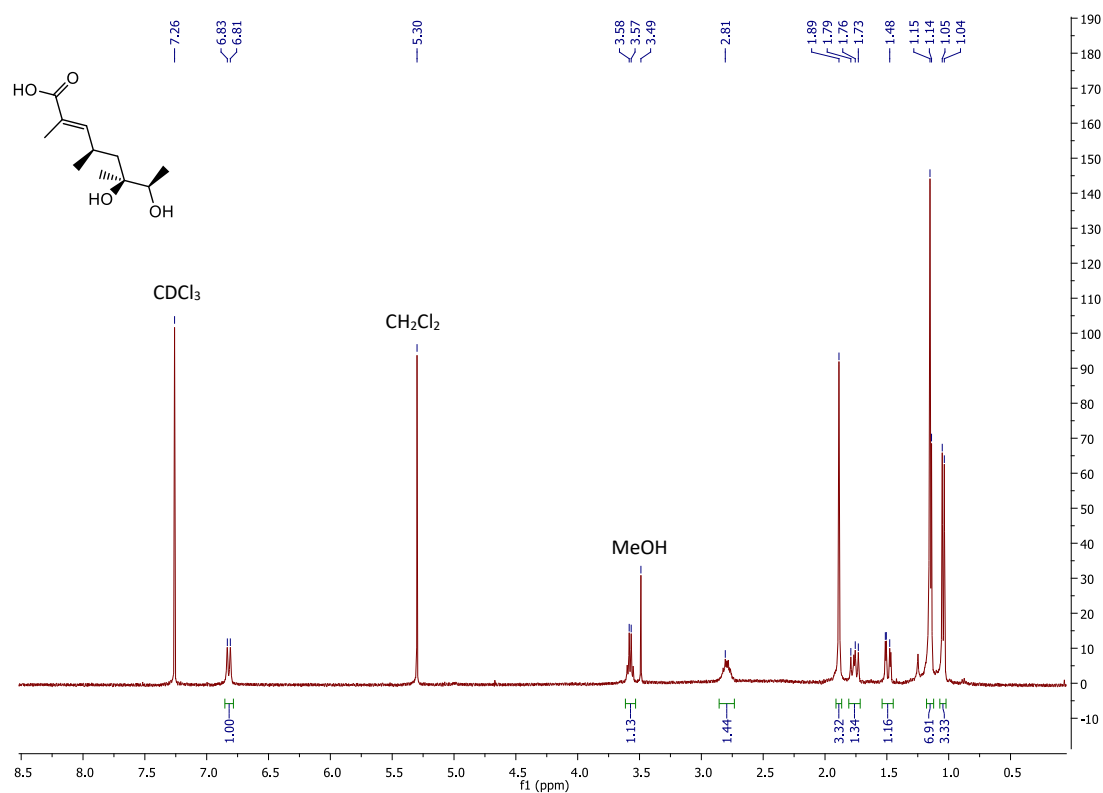


Compuesto 17. Aceite incoloro; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 222 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase la tabla 7; HRESIMS m/z 239.1266 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Na}$, 239.1259).

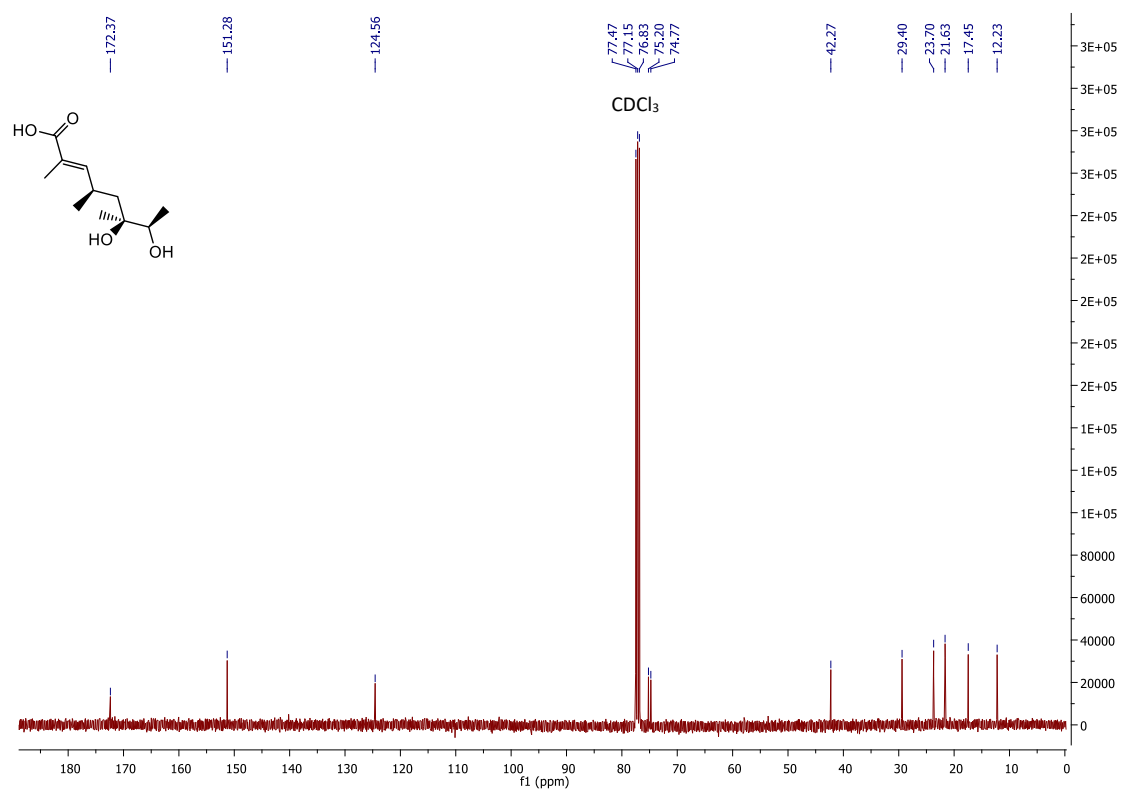


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **17** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

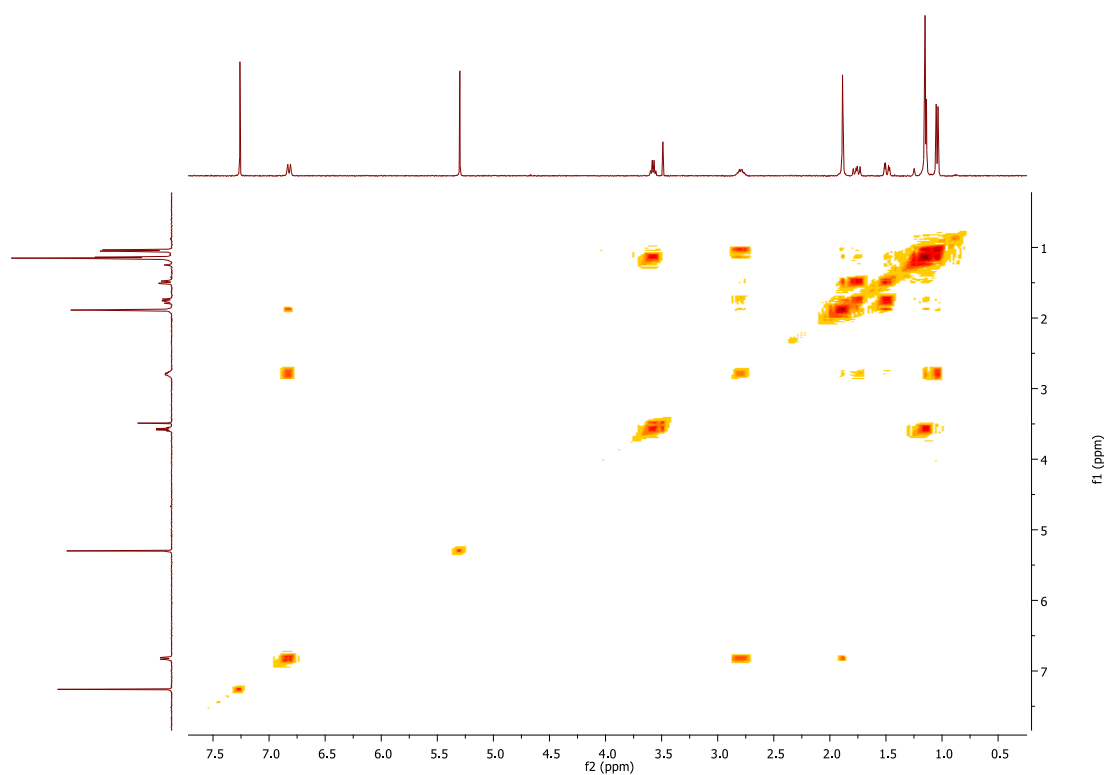
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.



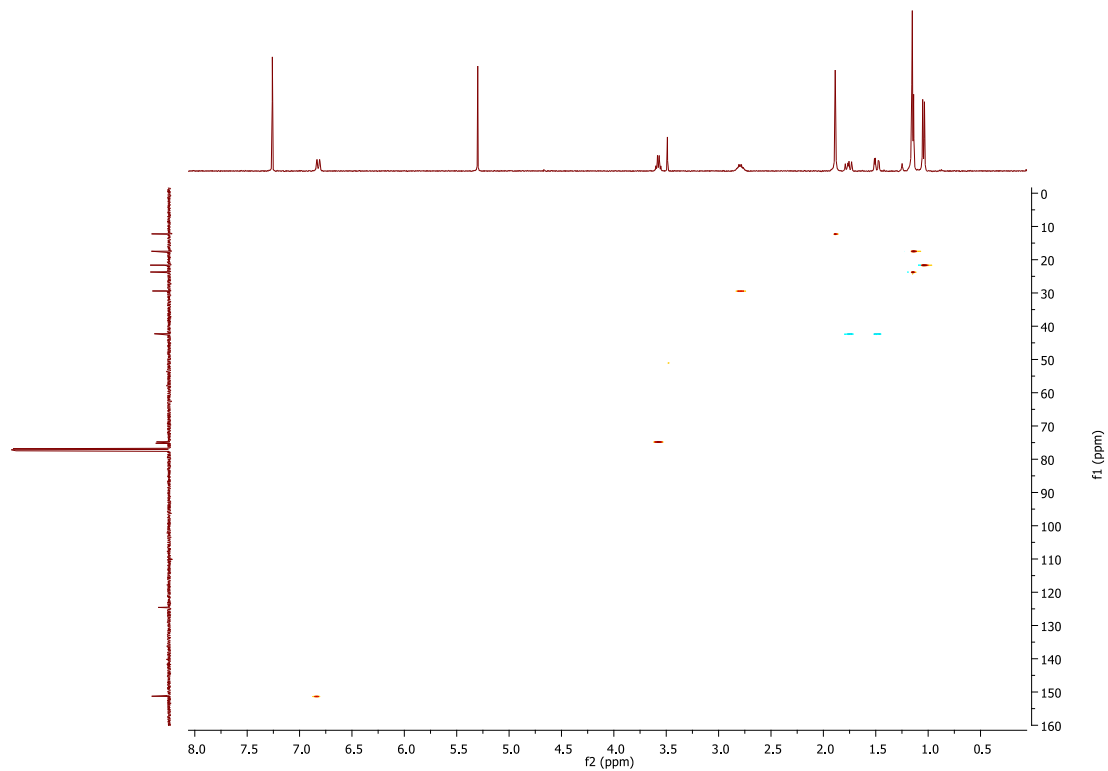
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.



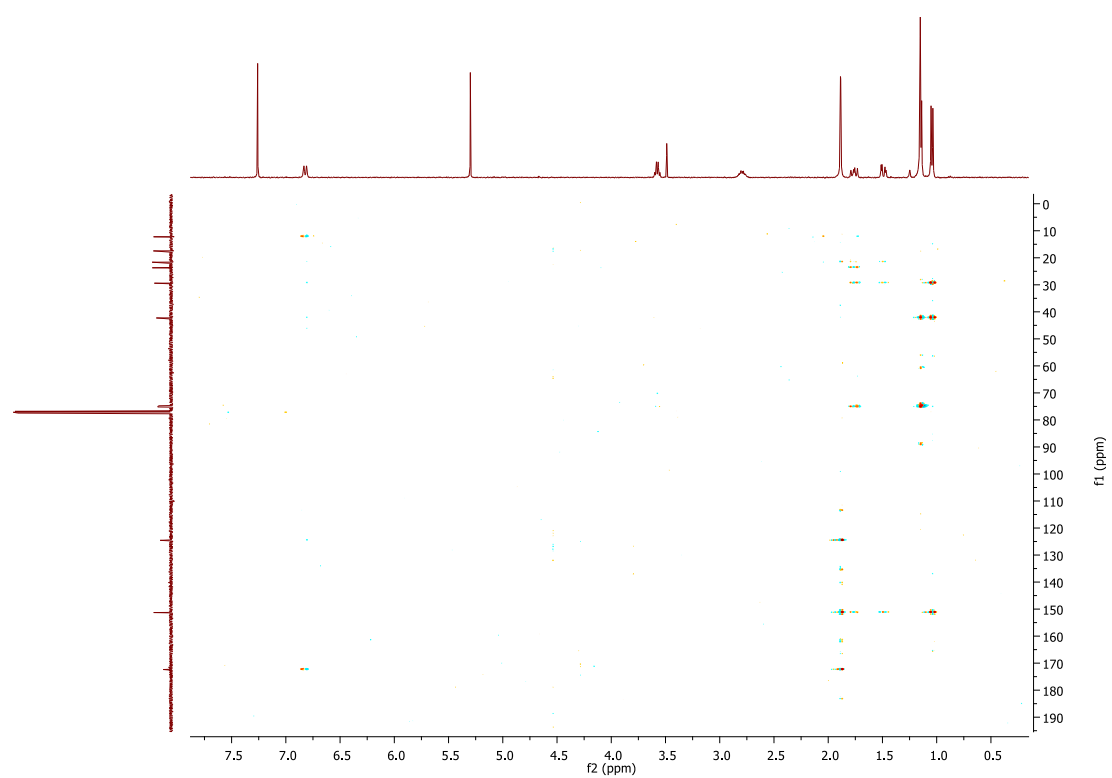
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.



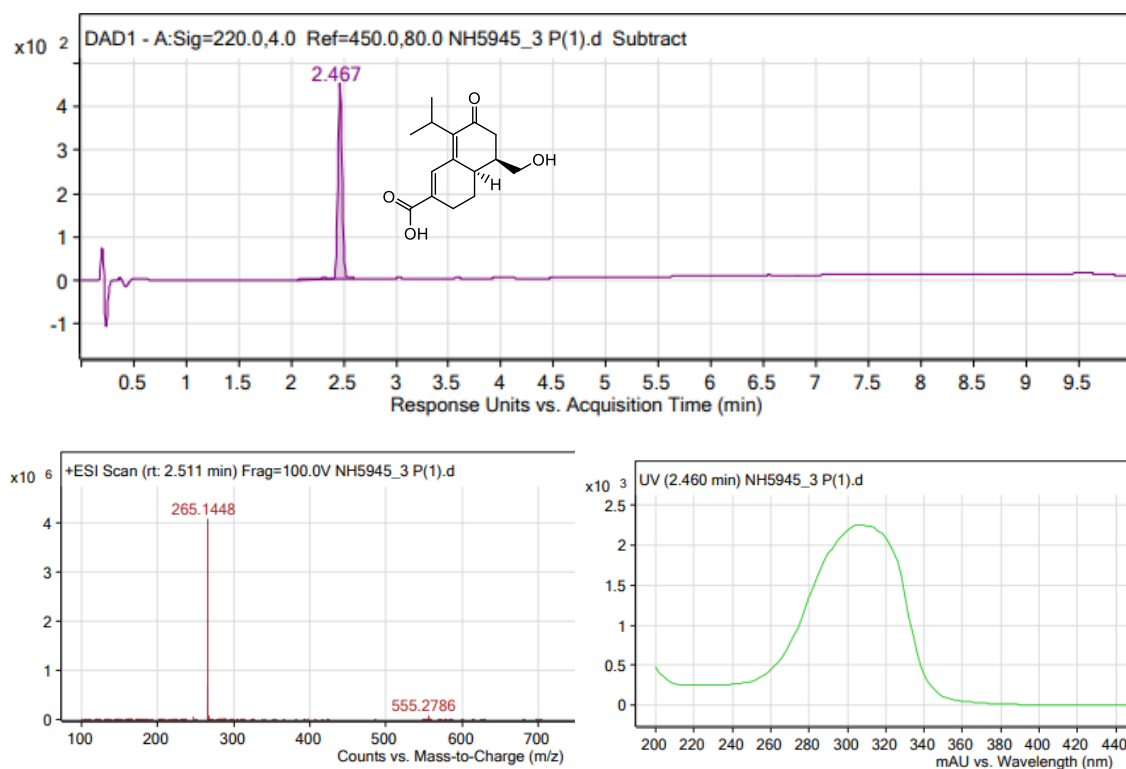
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, CDCl₃) del compuesto **17**.

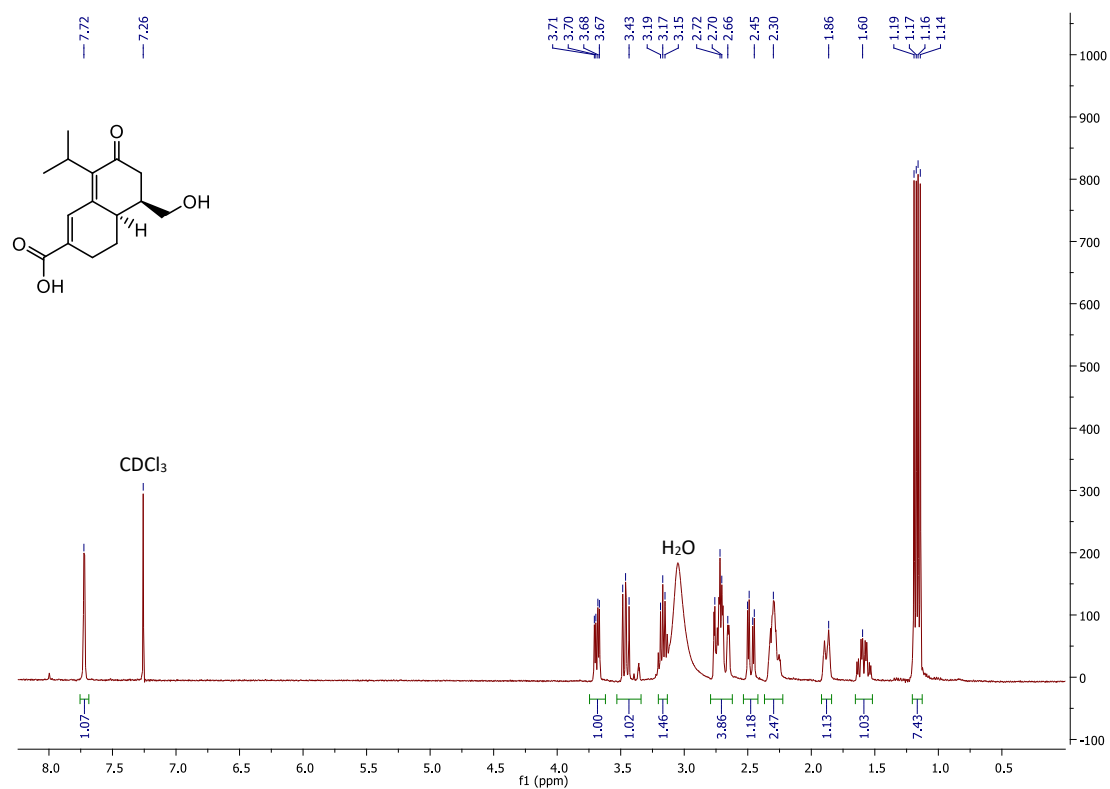


Compuesto 18. Sólido amorfo incoloro; $[\alpha]^{20}_D = +210.2^\circ$ (c 0.13, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 310 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 8; HRESIMS m/z 265.1448 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_4$, 265.1440).

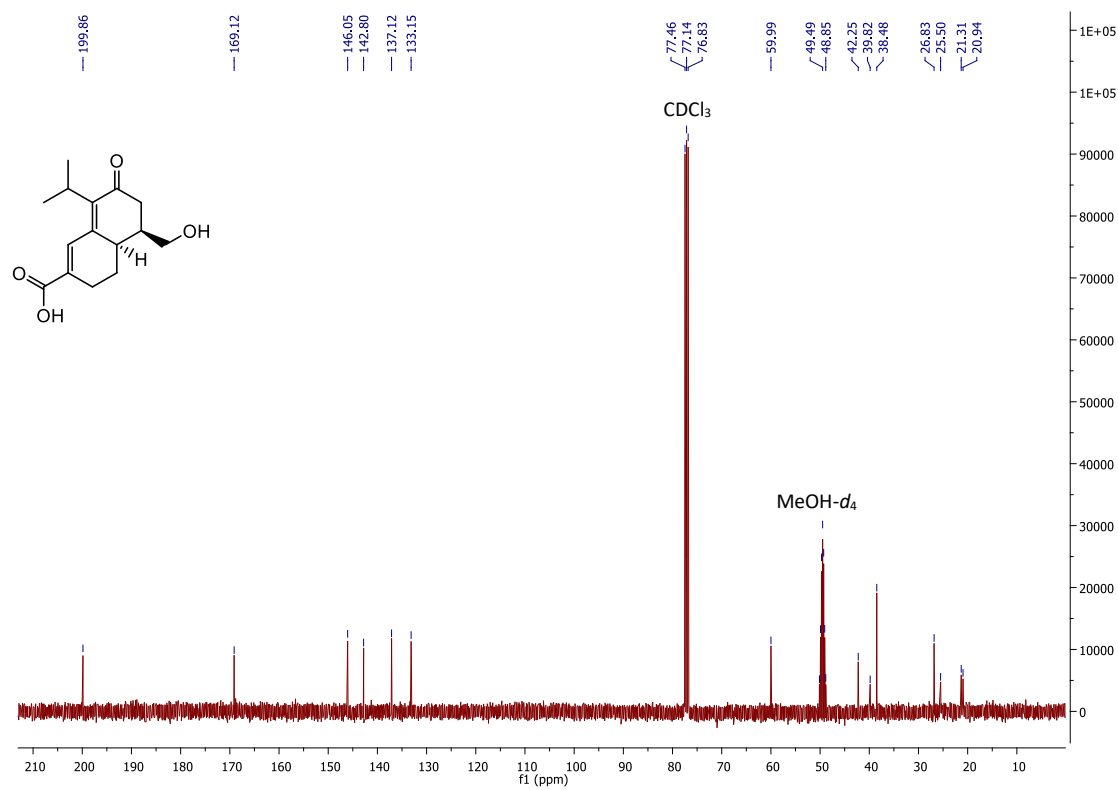


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **18** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

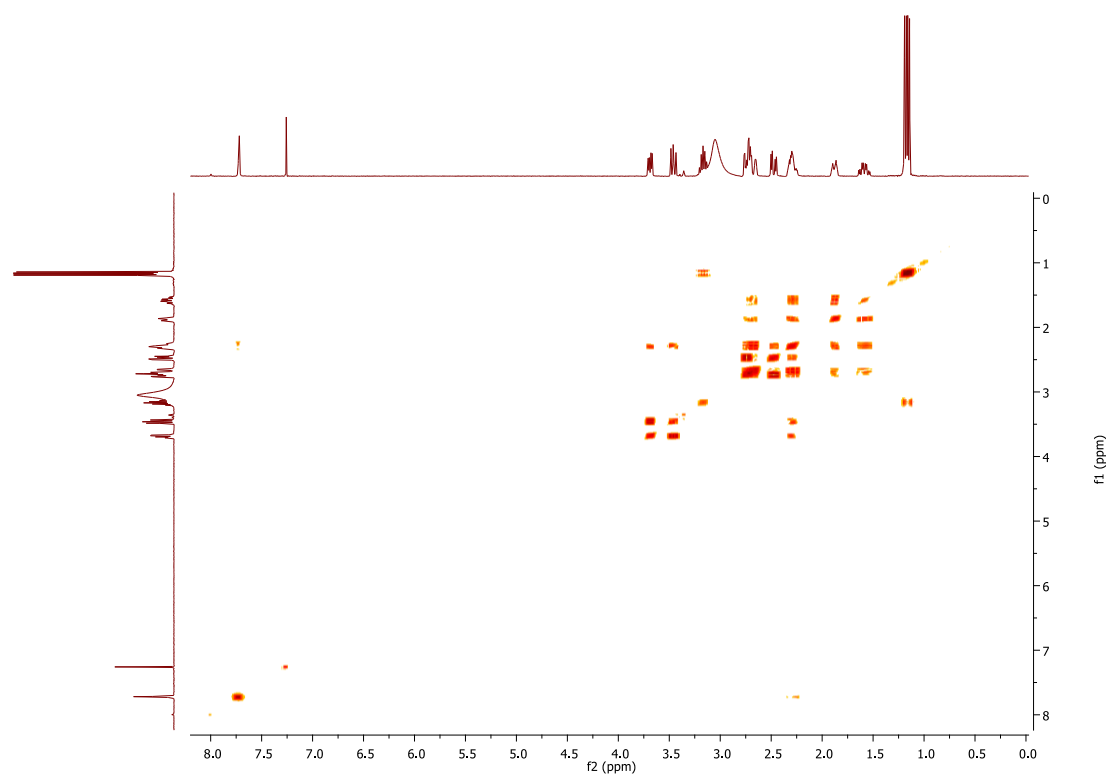
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **18**.



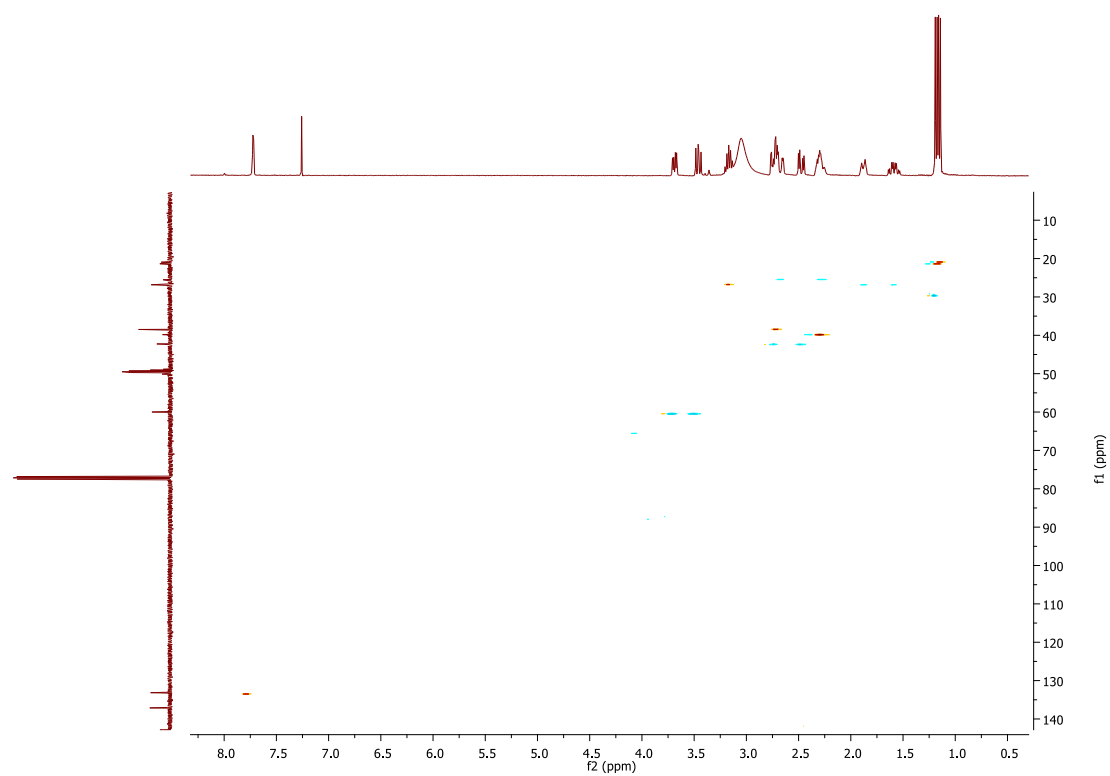
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **18**.



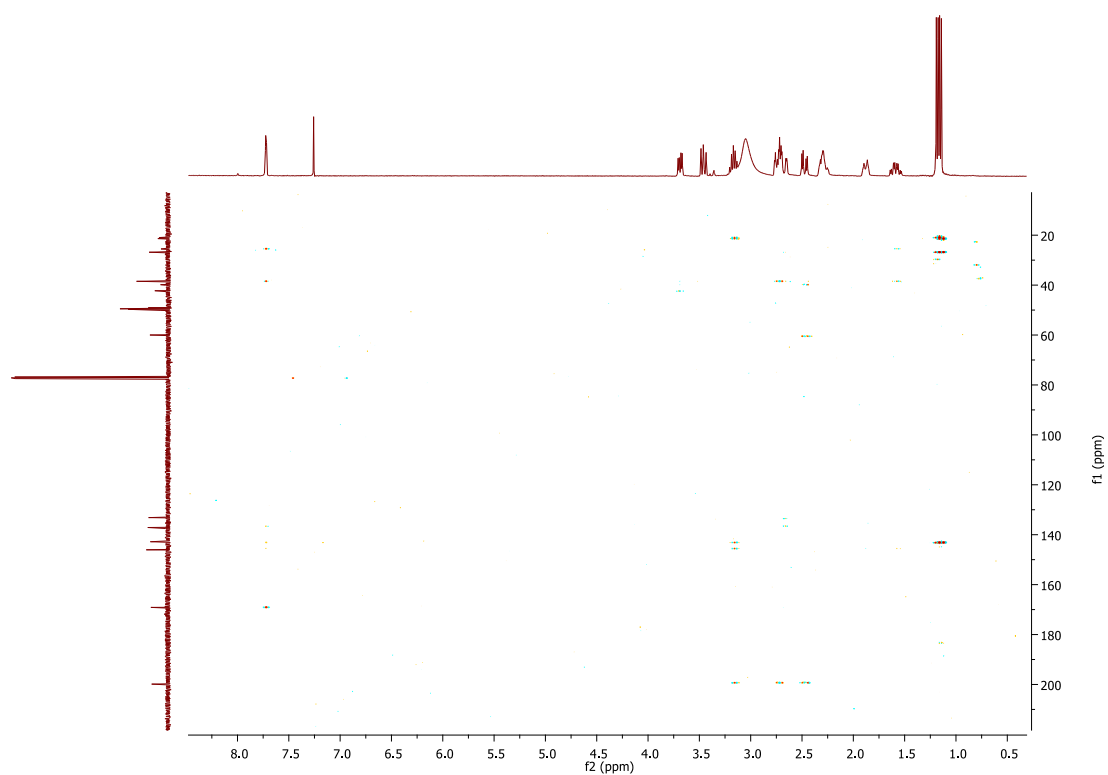
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **18**.



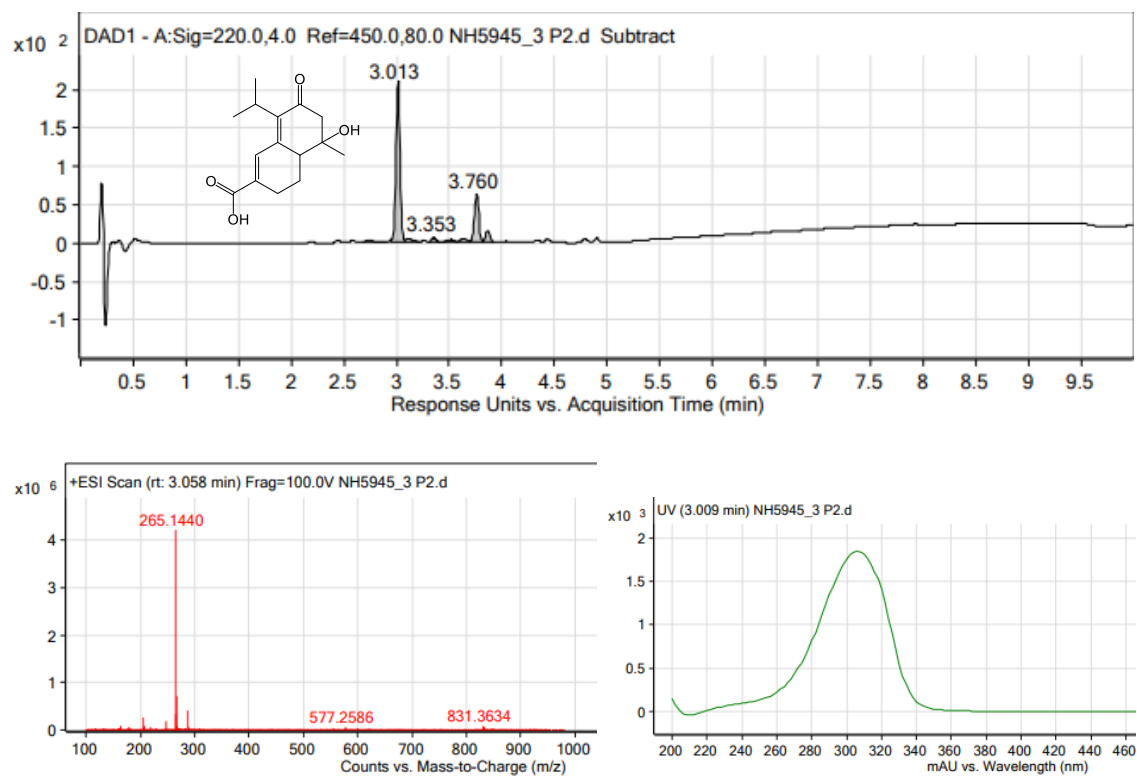
Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **18**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **18**.

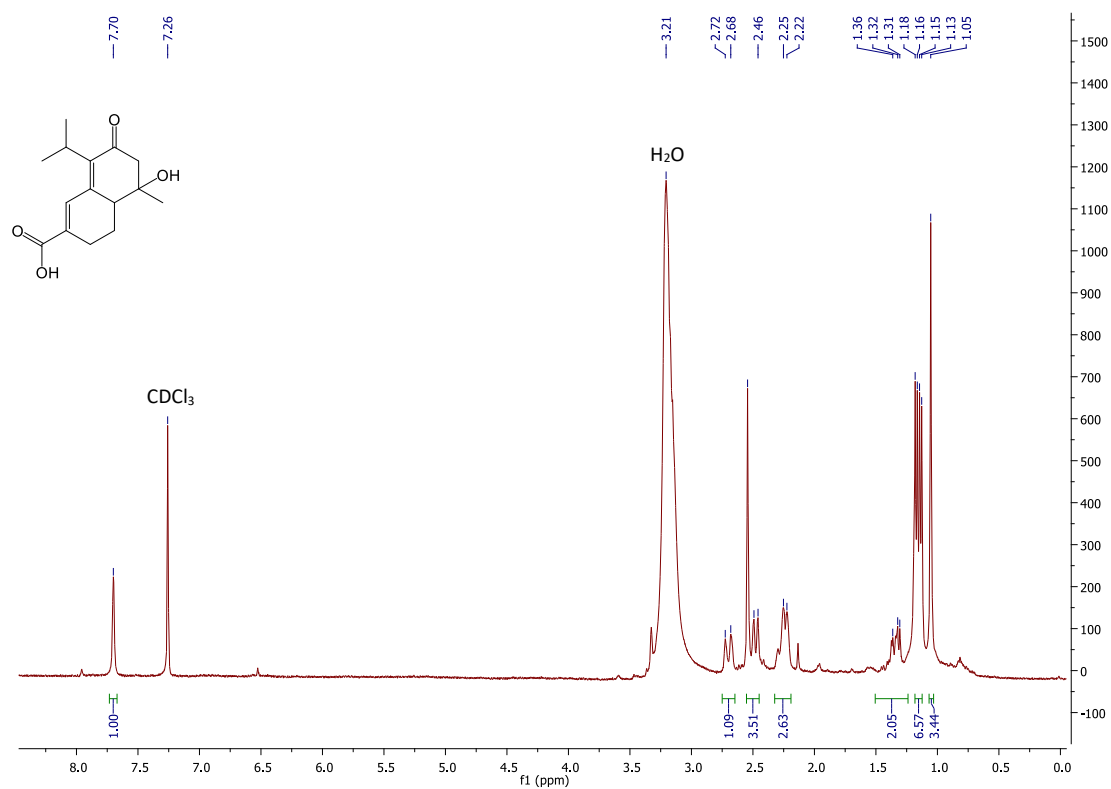


Compuesto 19. Sólido amorfo amarillento; UV (MeOH) λ_{max} 310 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 8; HRESIMS m/z 265.1440 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_4$, 265.1440).

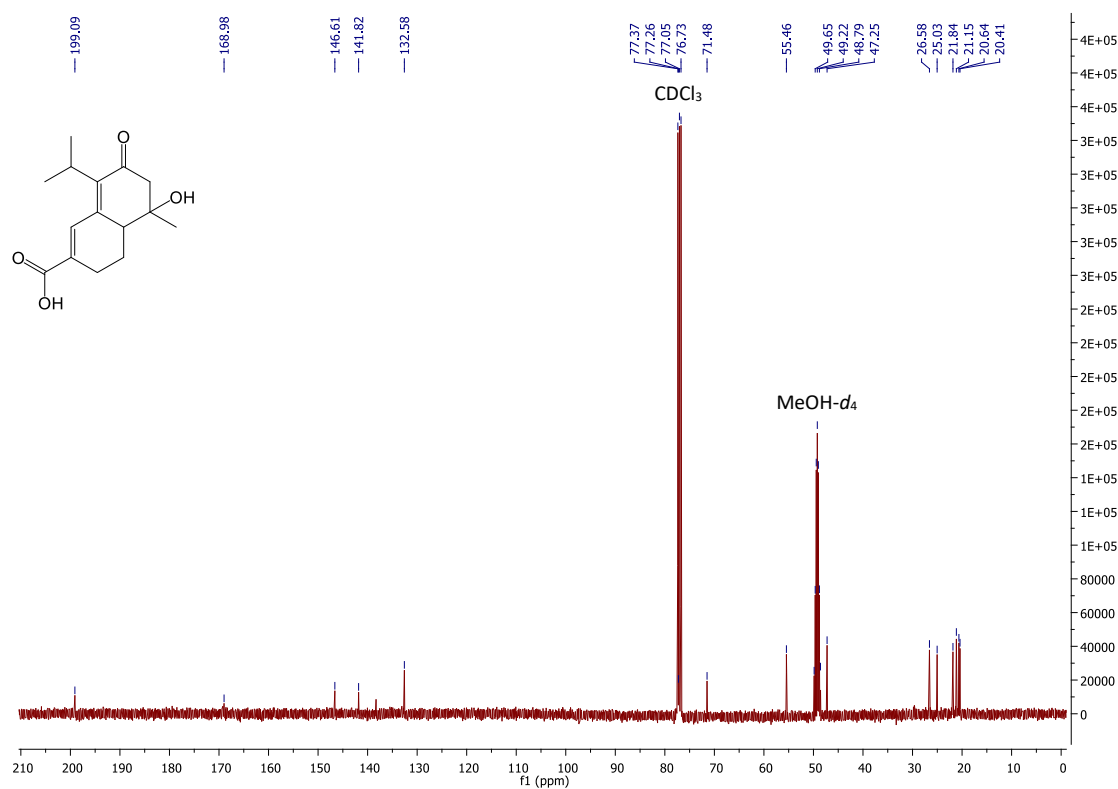


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **19** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

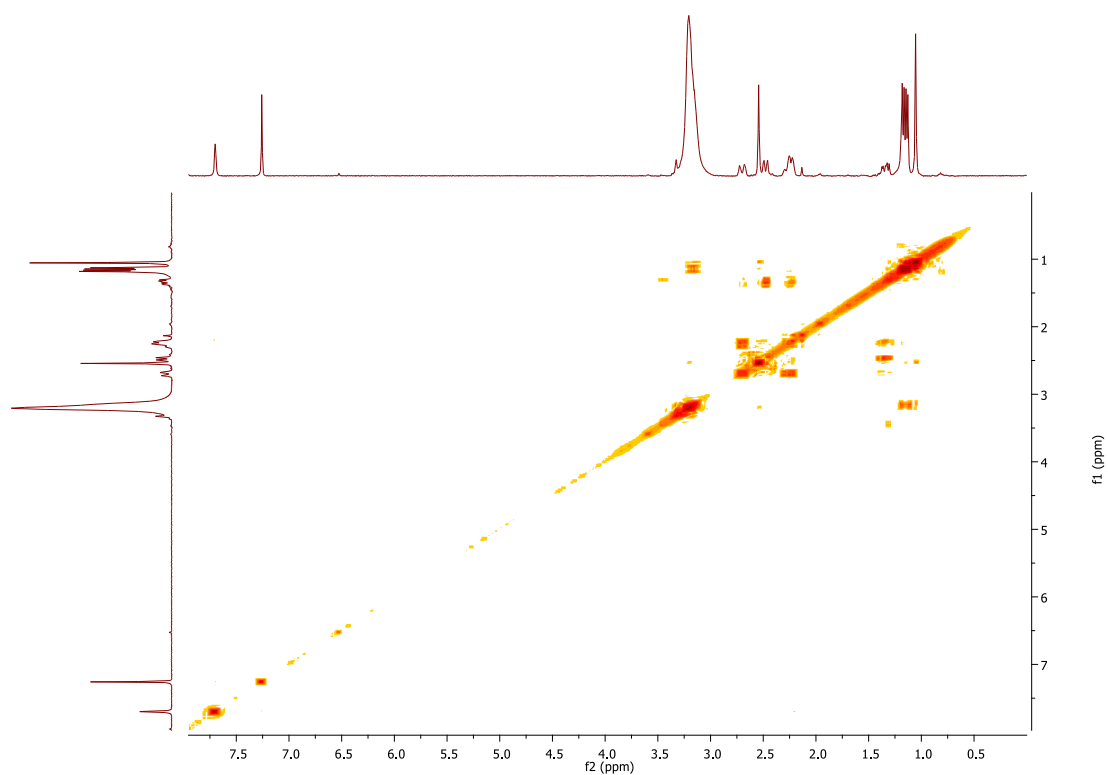
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **19**.



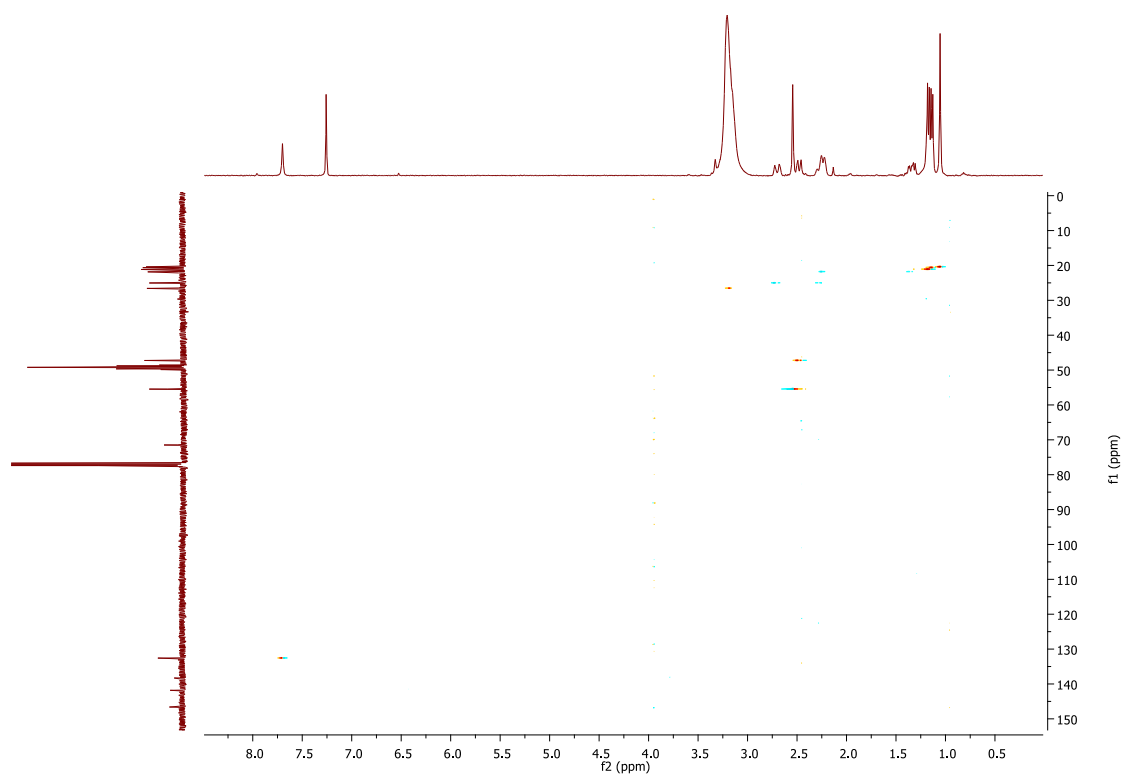
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **19**.



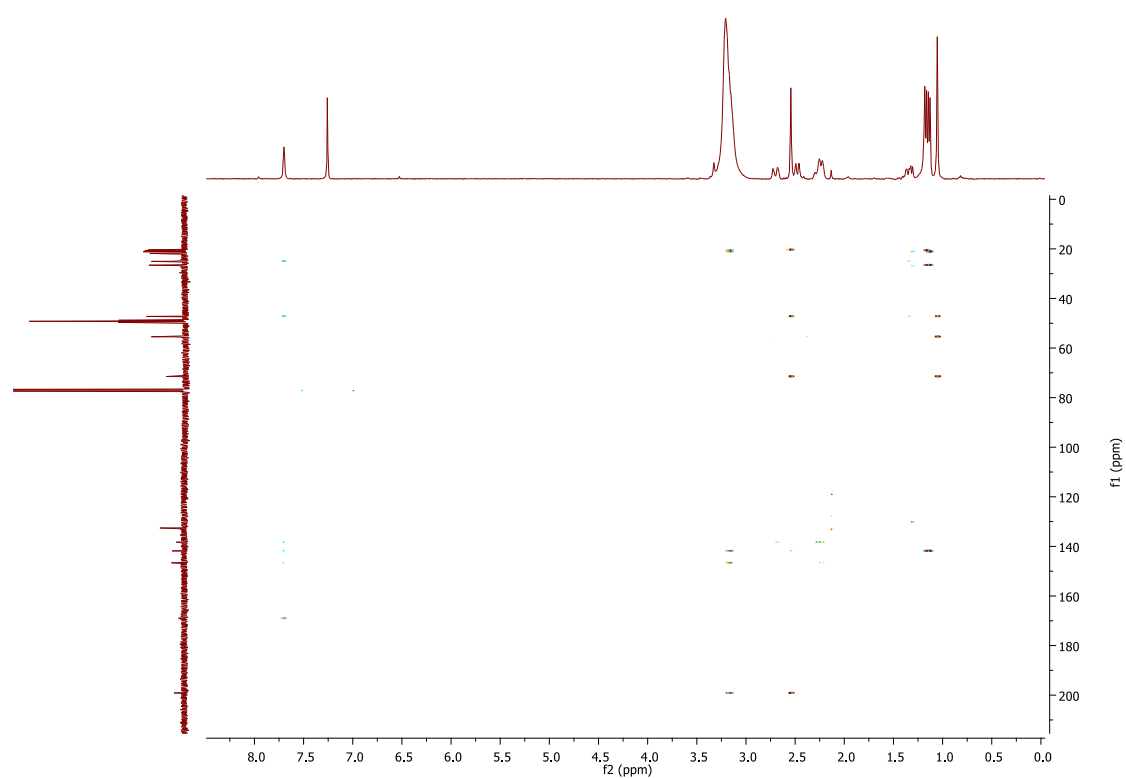
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **19**.



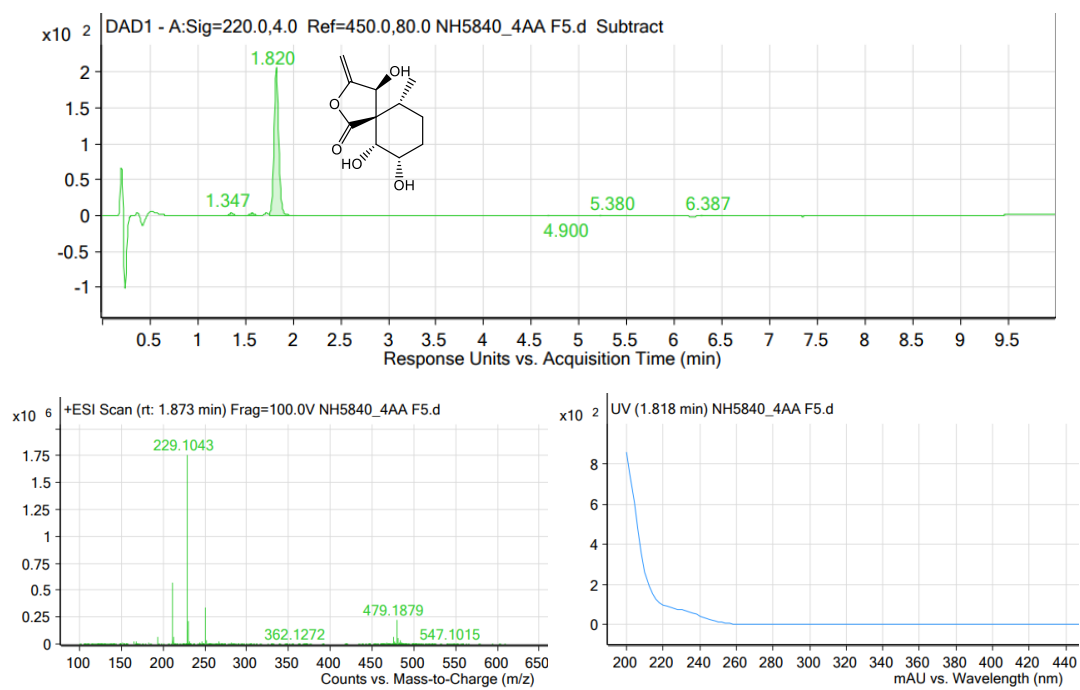
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **19**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **19**.

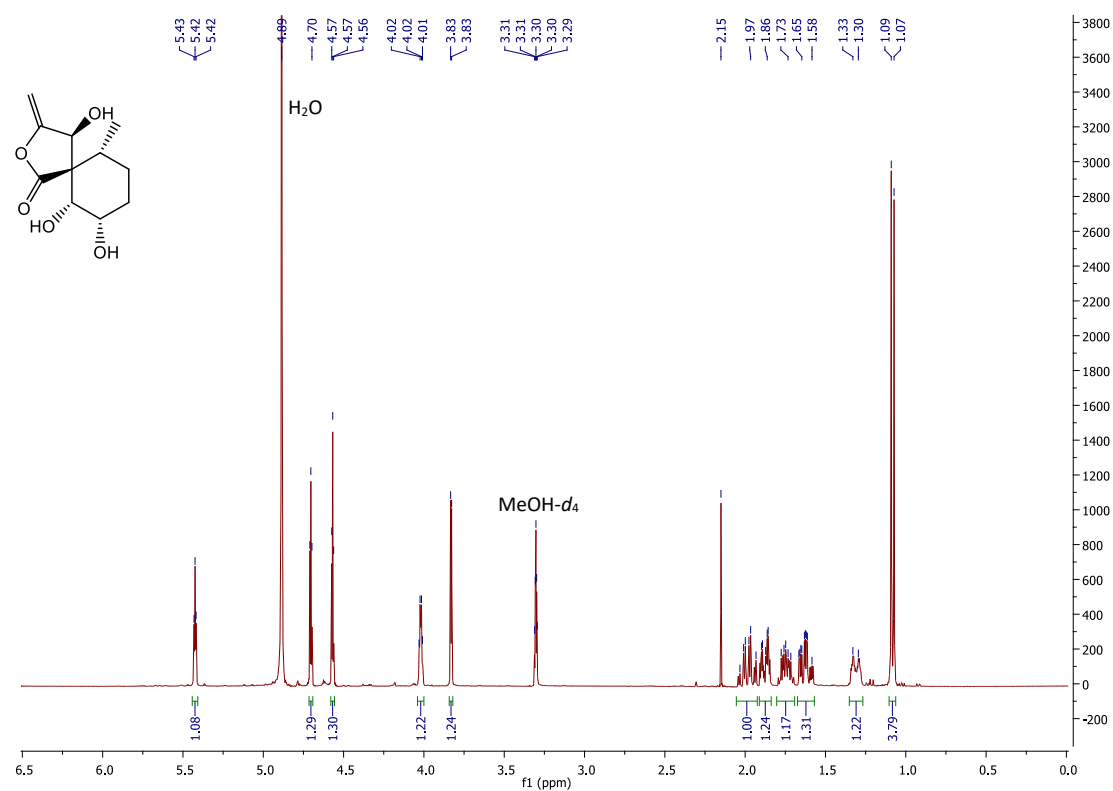


Compuesto 21. Aceite incoloro; $[\alpha]^{20}_D = +9.4^\circ$ (c 1.06, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (fin de absorción); datos de RMN ^1H y ^{13}C véase la tabla 9; HRESIMS m/z 229.1043 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_5$, 229.1076).

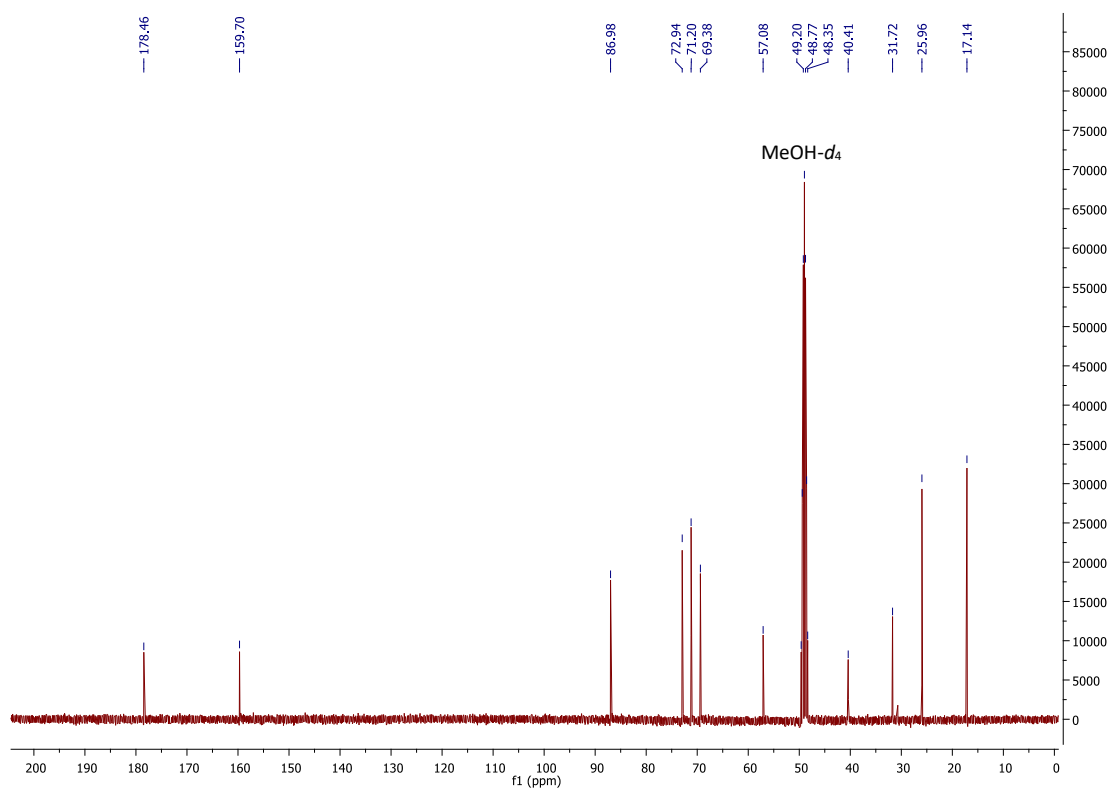


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **21** aislado del hongo *P. opacum* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico N-acetil-D-glucosamina.

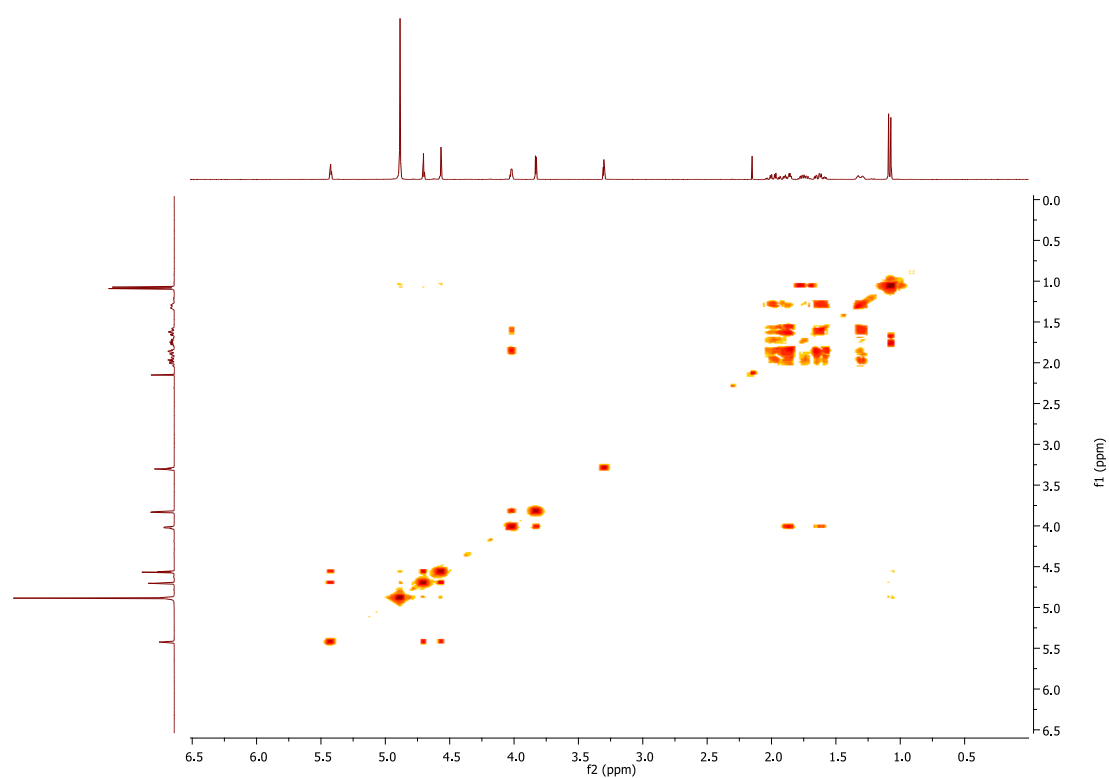
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **21**.



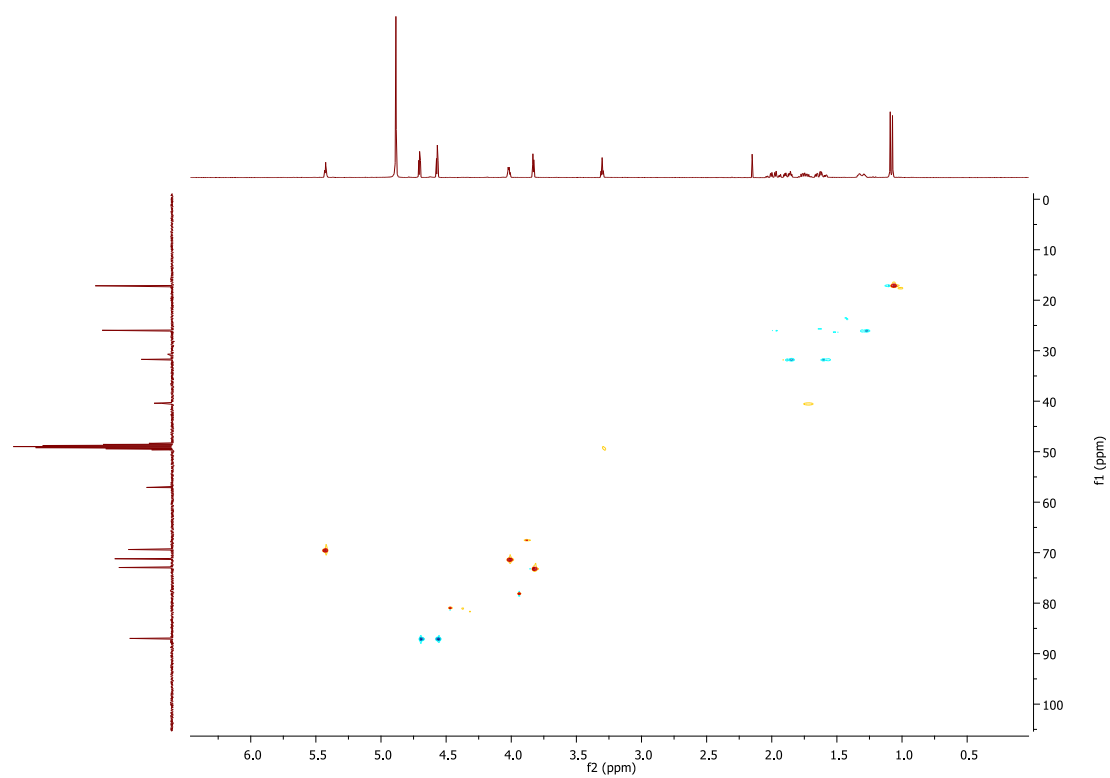
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **21**.



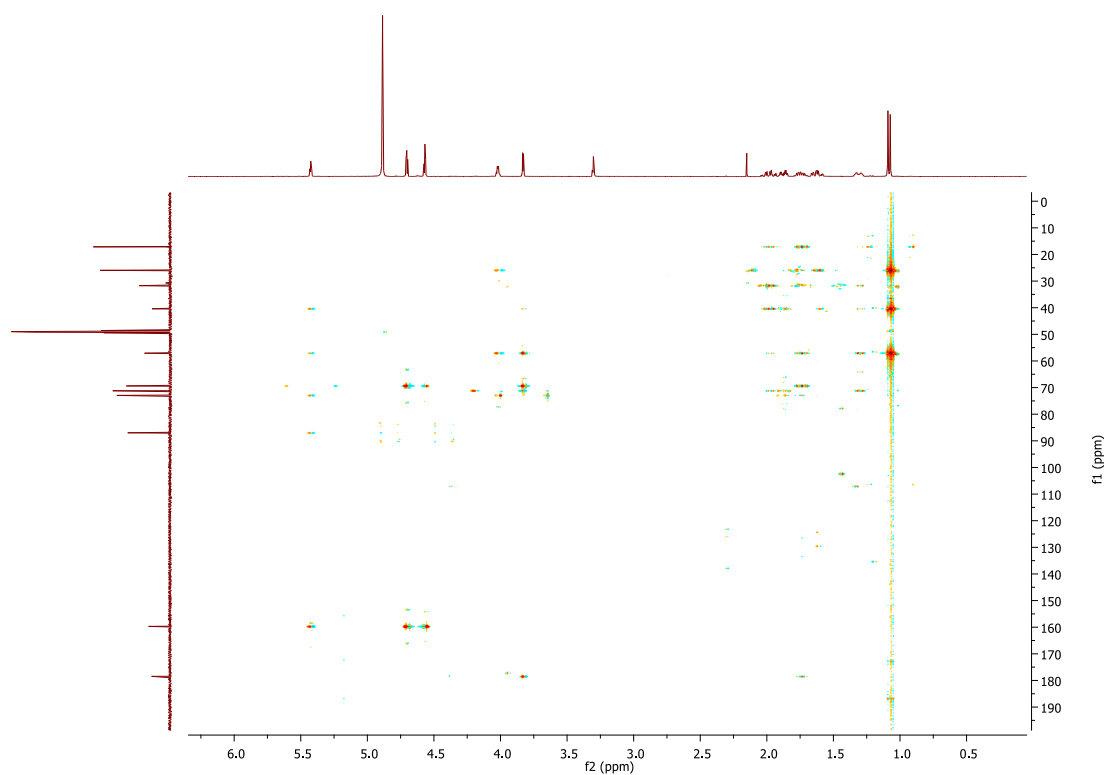
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **21**.



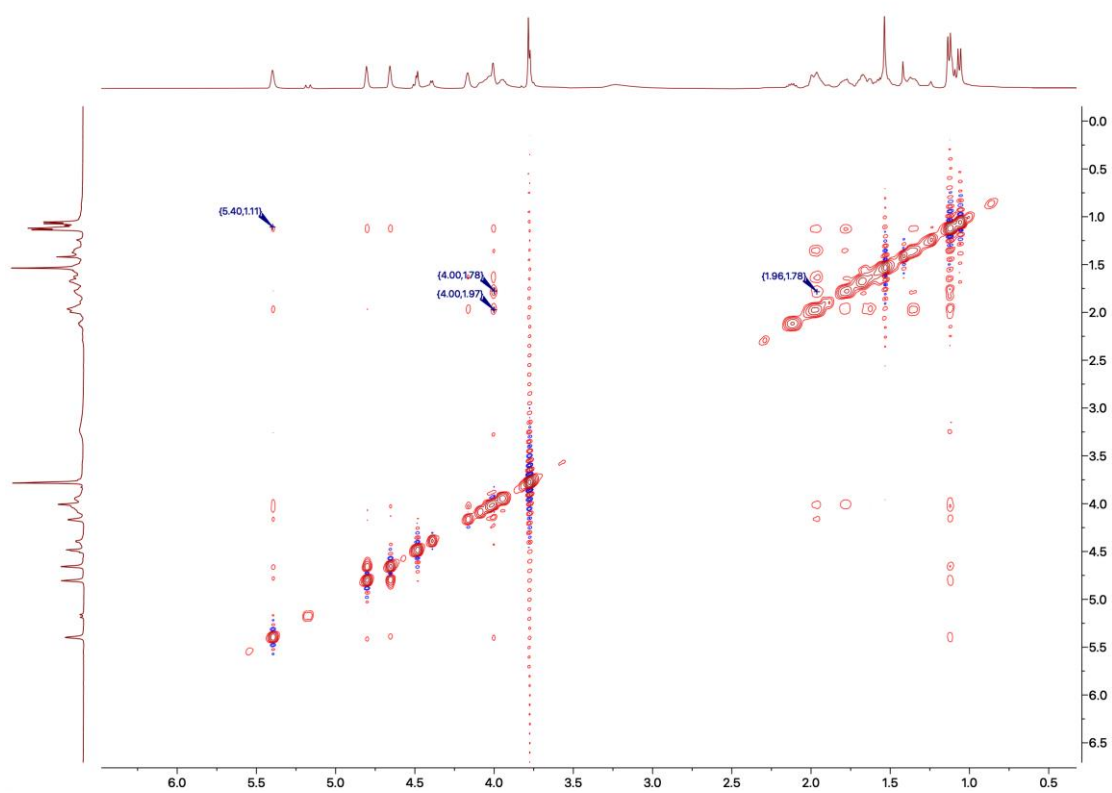
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **21**.



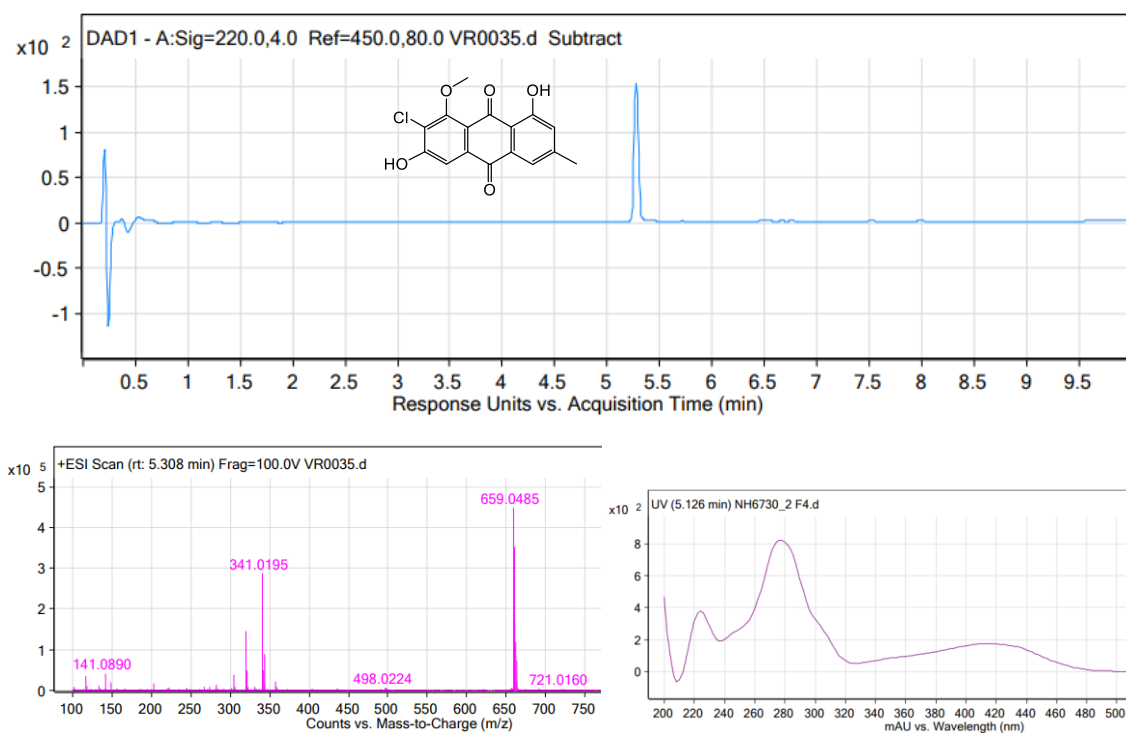
Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, MeOH- d_4) del compuesto **21**.



Espectro NOESY (400 MHz, MeOH- d_4) del compuesto **21**.

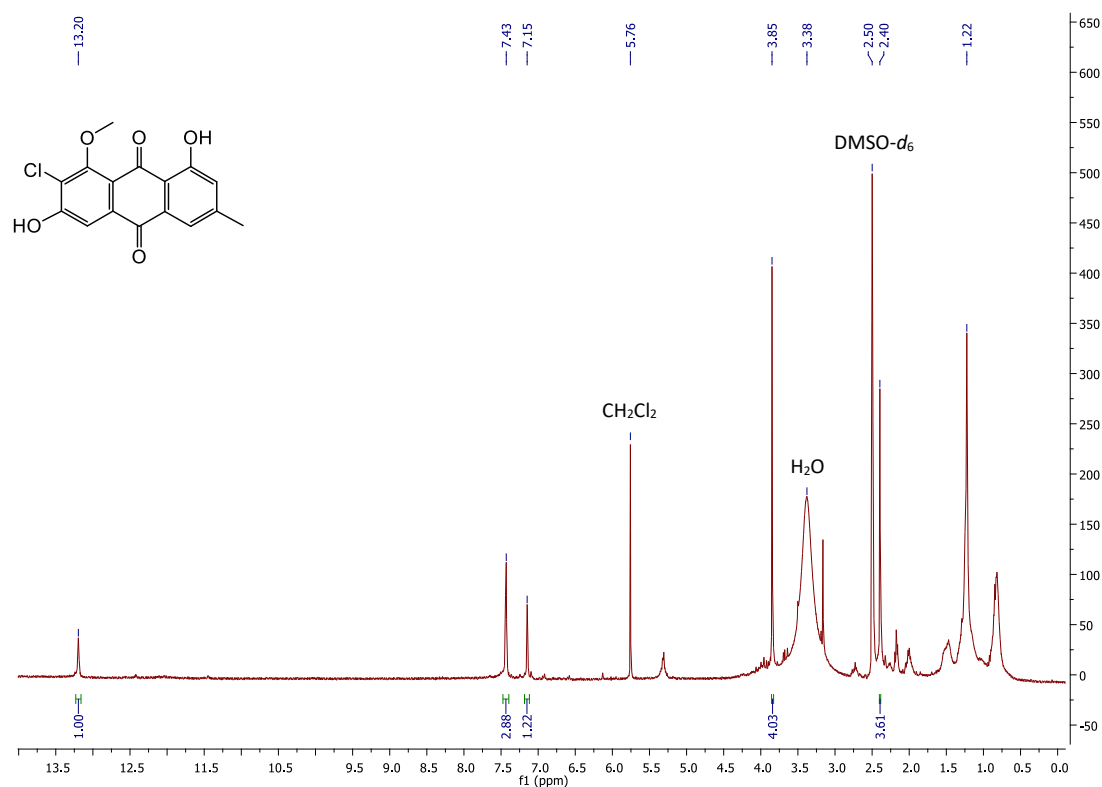


Compuesto 22. Sólido amorfo amarillo; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 220, 276, 416 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase la tabla 10; HRESIMS m/z 341.0195 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClO}_5\text{Na}$, 341.0193).

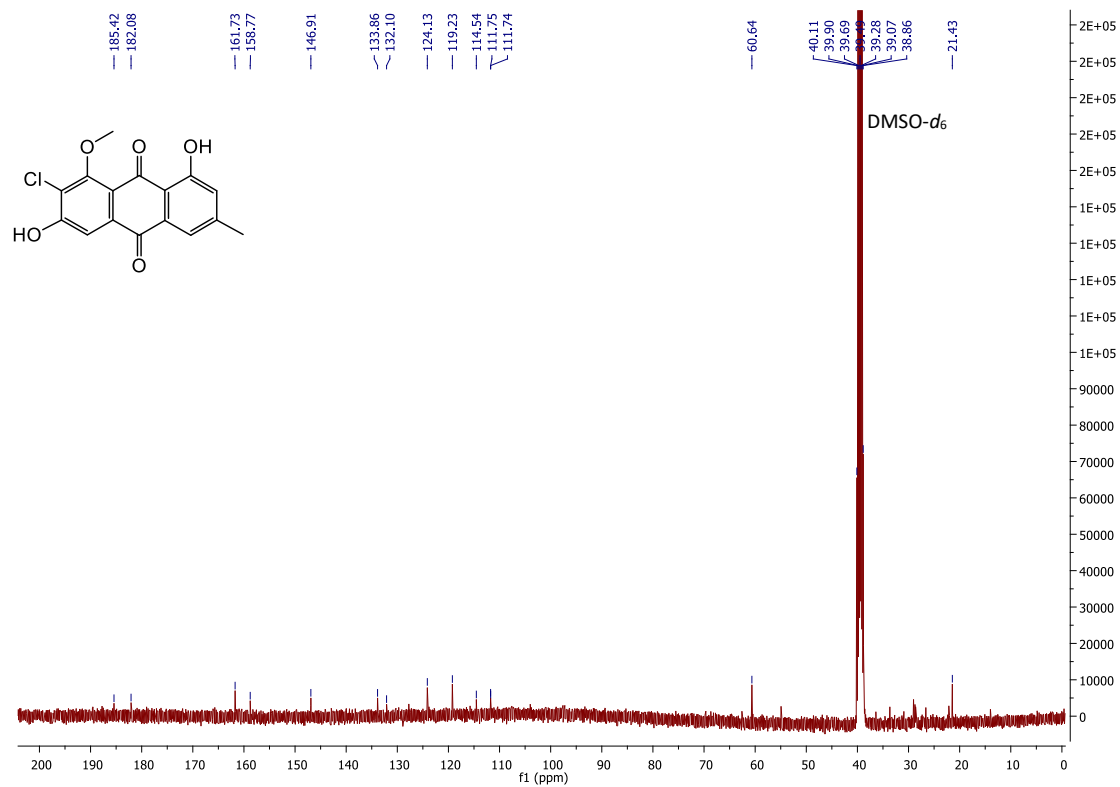


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **22** aislado del cocultivo entre *P. opacum* y *Echinocatena sp.* en medio de cultivo PDA sólido.

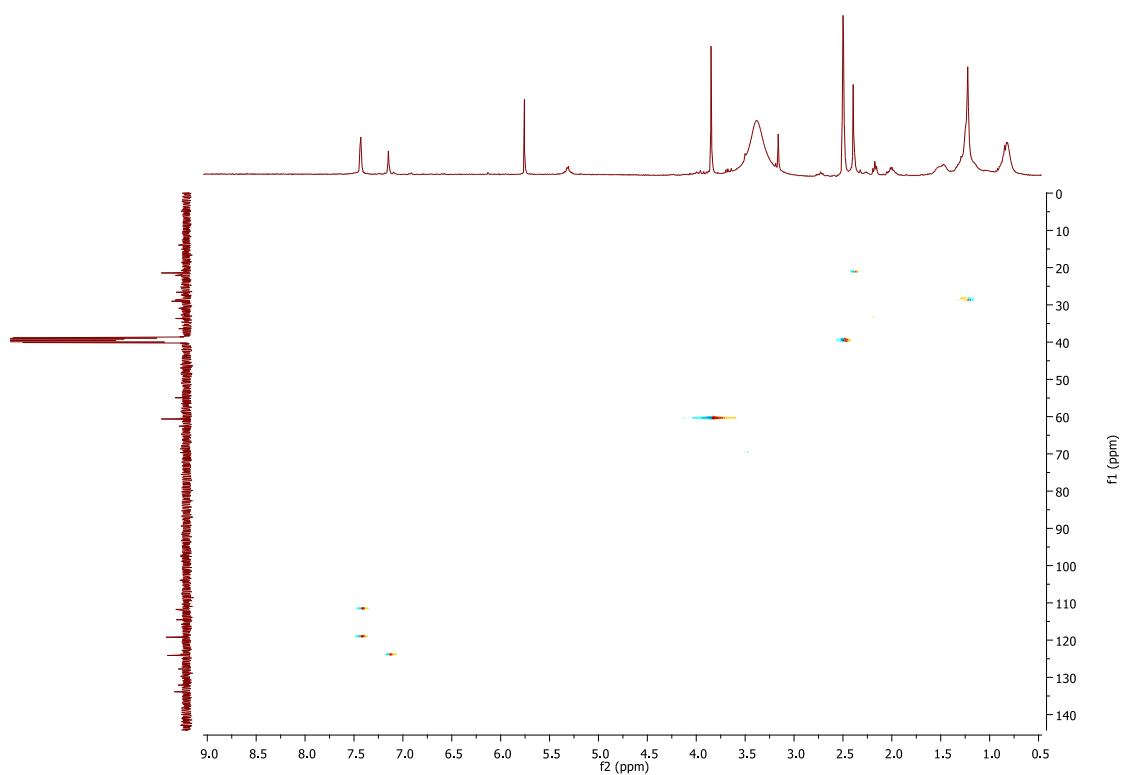
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **22**.



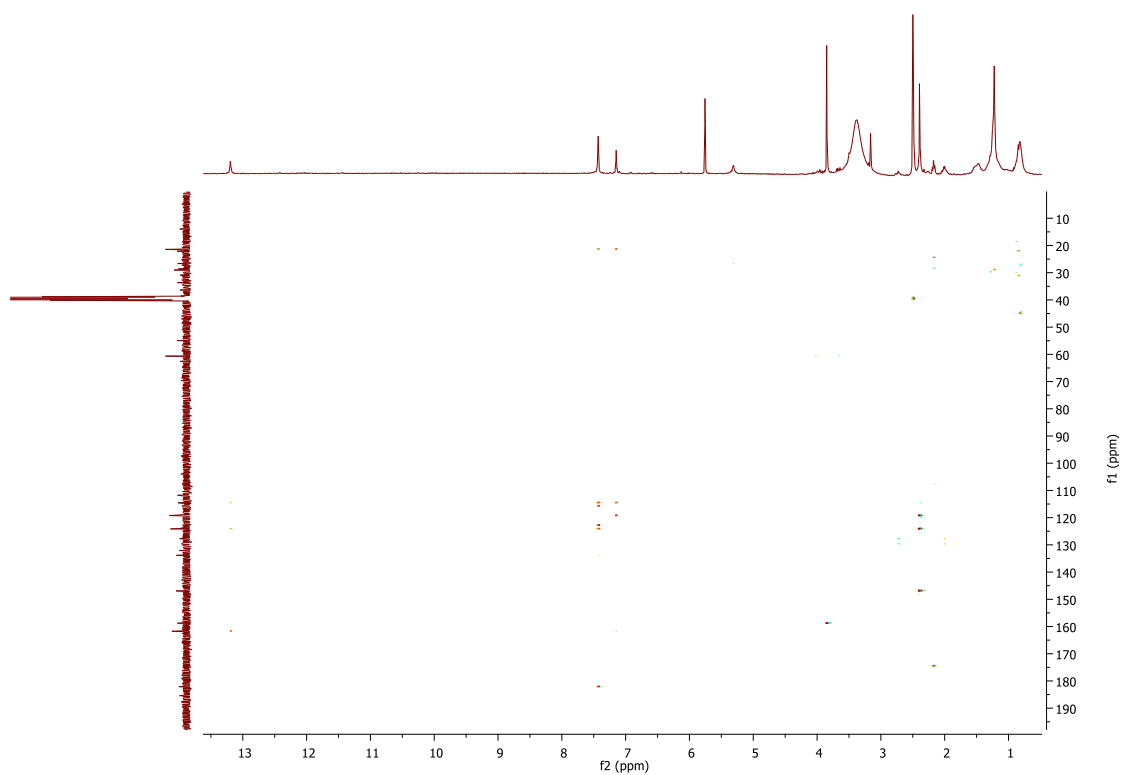
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **22**.



Espectro gHSQC (400 MHz y 100MHz, DMSO- d_6) del compuesto **22**.

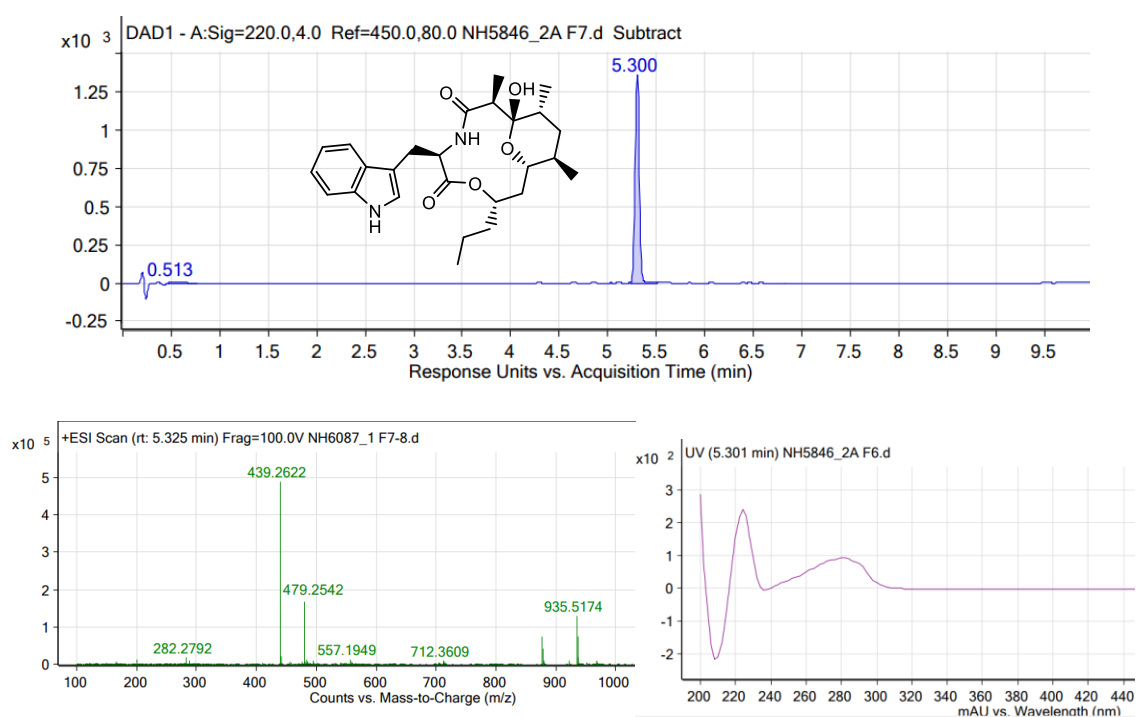


Espectro gHMBC (400 MHz y 100MHz, DMSO- d_6) del compuesto **22**.



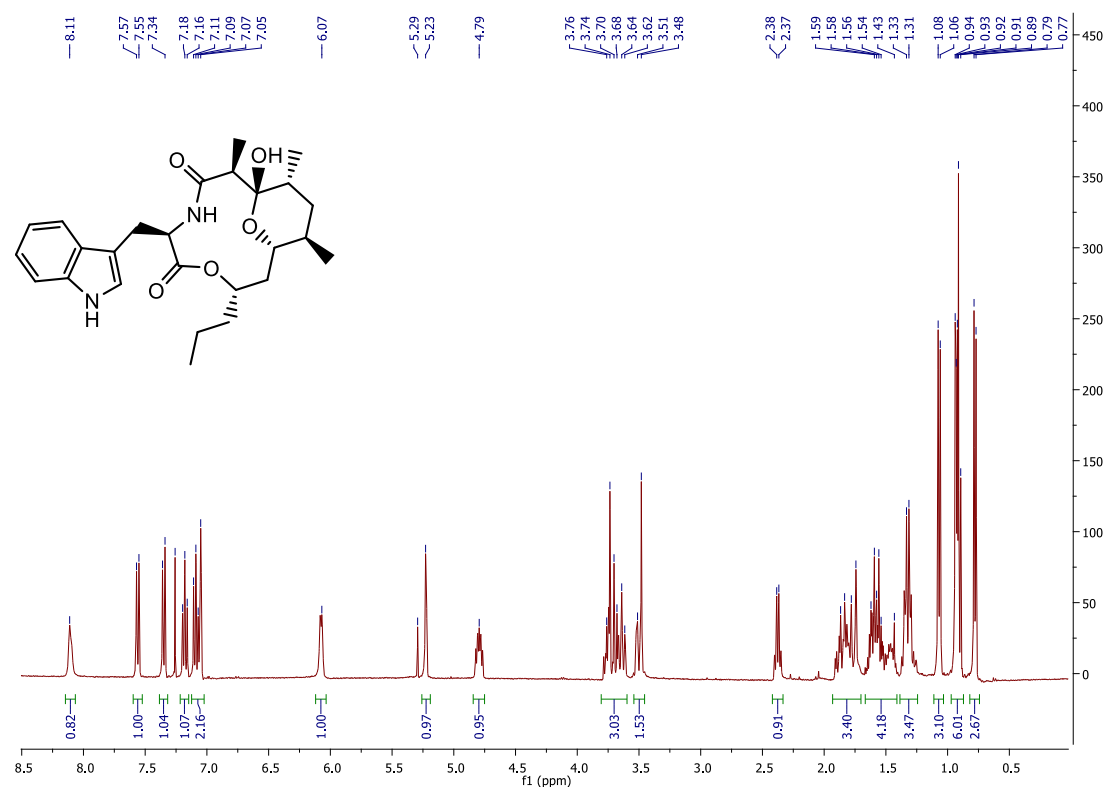
HL-102-24-R04 (*Beauveria felina*)

Compuesto 29. Sólido amorfo blanco; $[\alpha]^{20}_D = -79.7^\circ$ (c 0.66, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 225, 282 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 11; HRESIMS m/z 479.2542 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$, 479.2522).

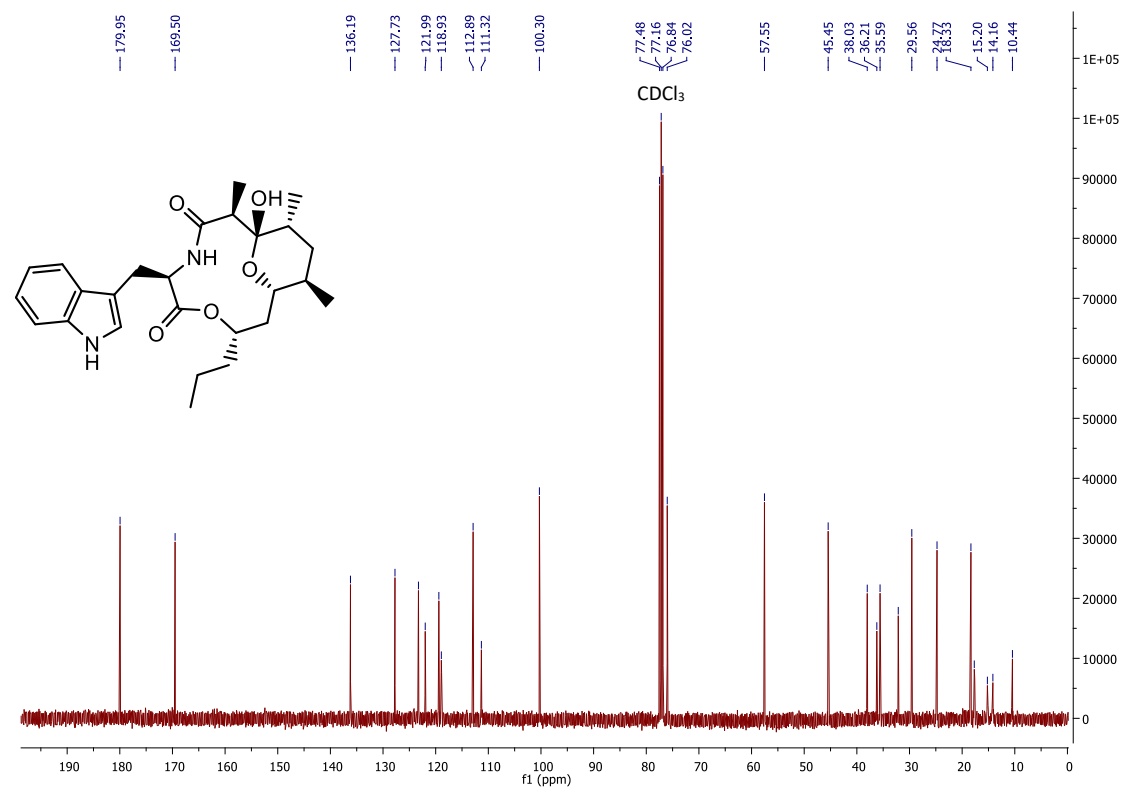


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **29** aislado del hongo *B. felina* en medio de cultivo líquido MI/2 (condiciones estándar de fermentación).

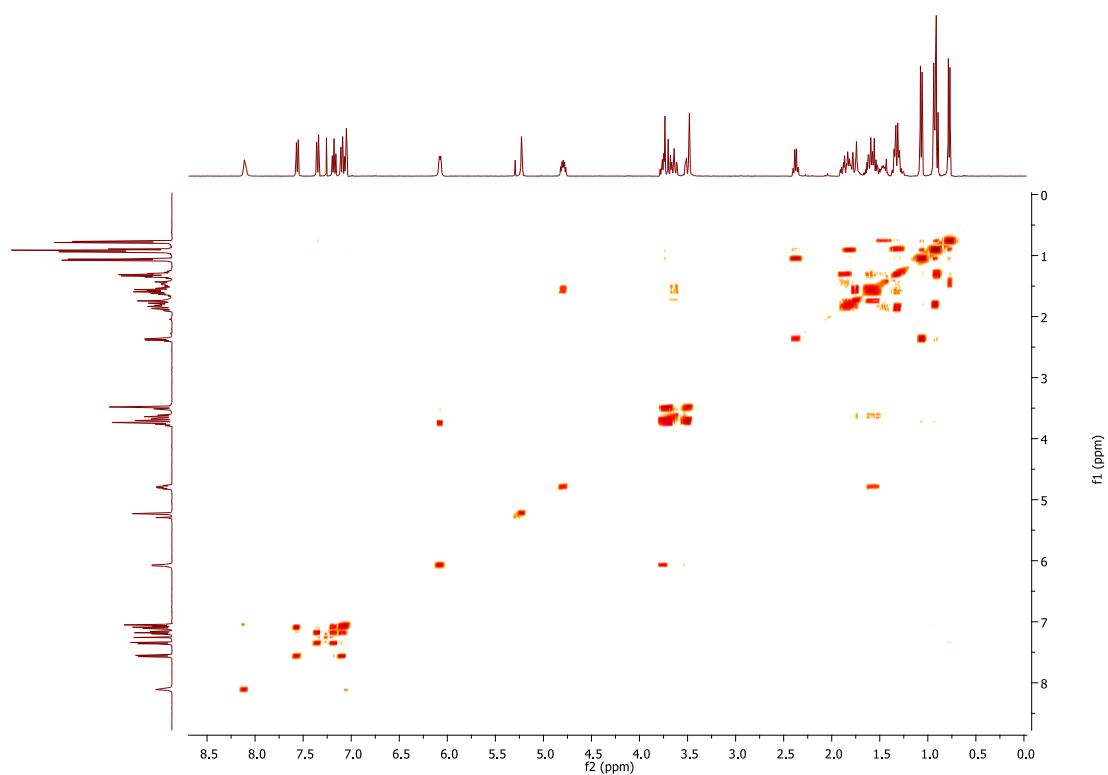
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **29**.



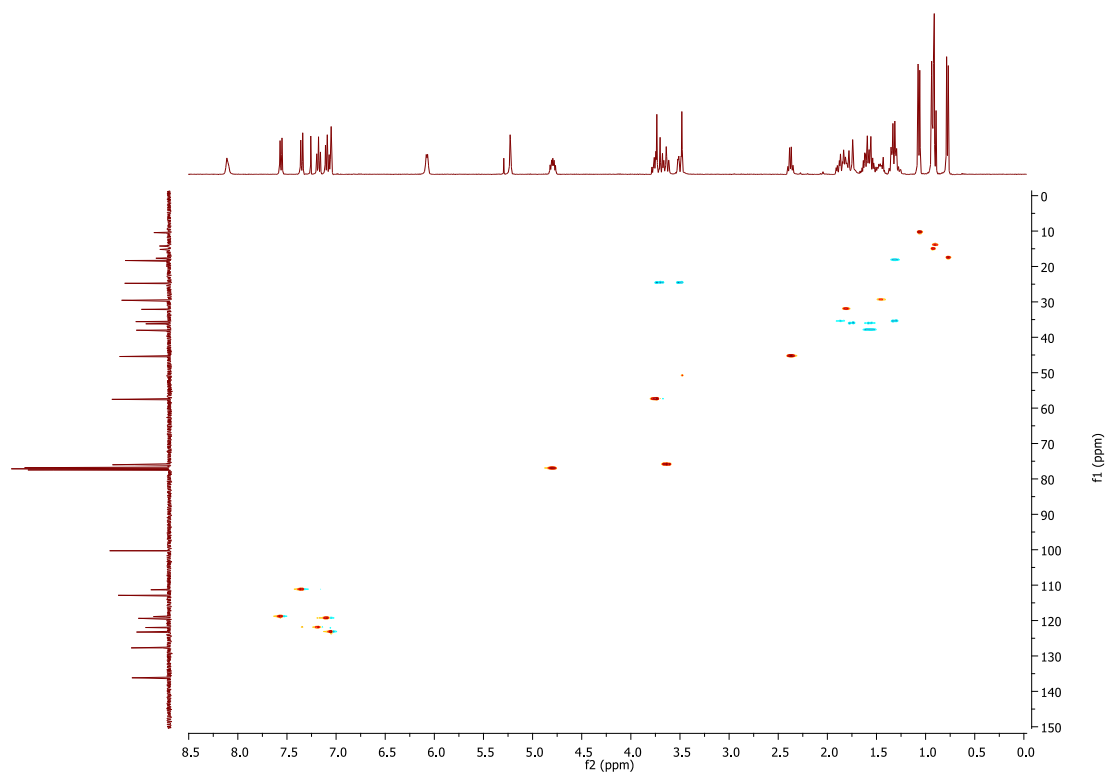
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **29**.



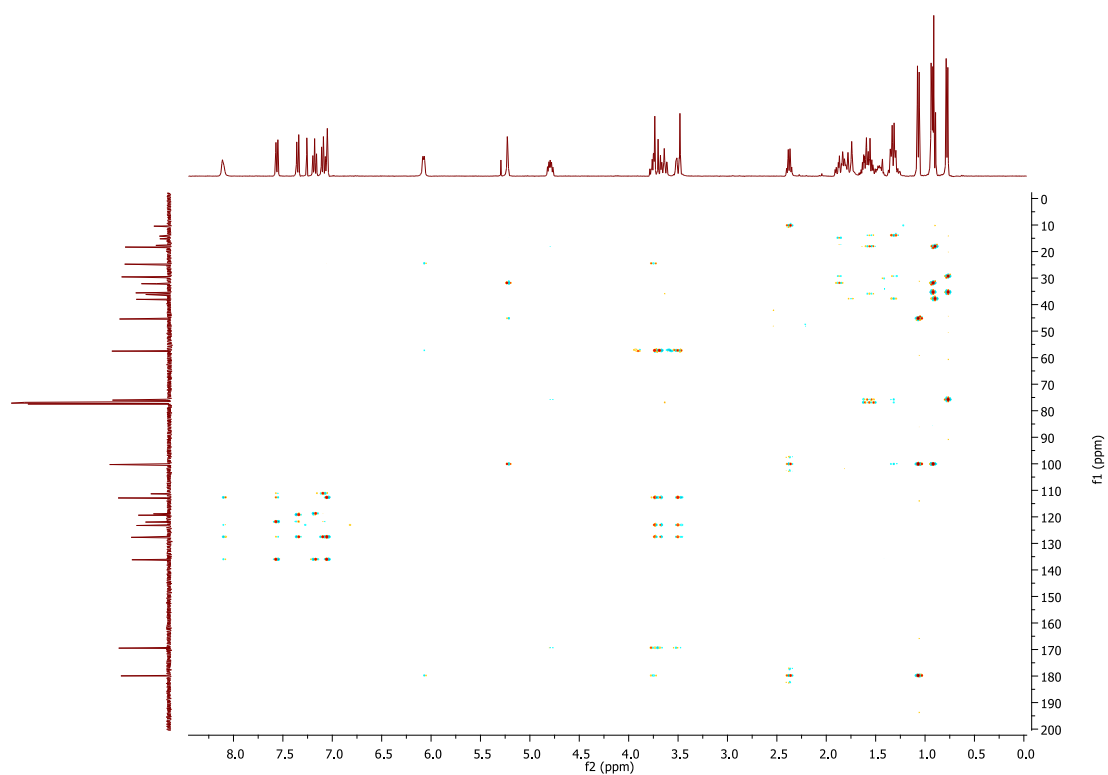
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **29**.



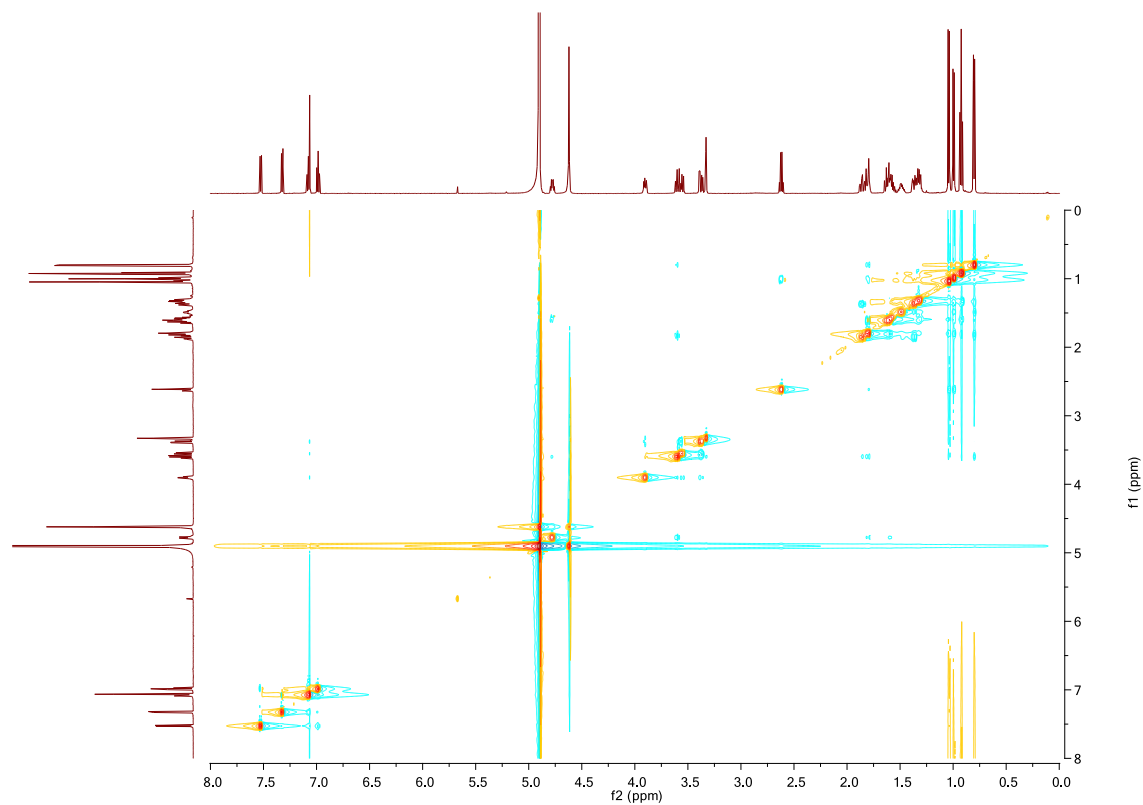
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **29**.



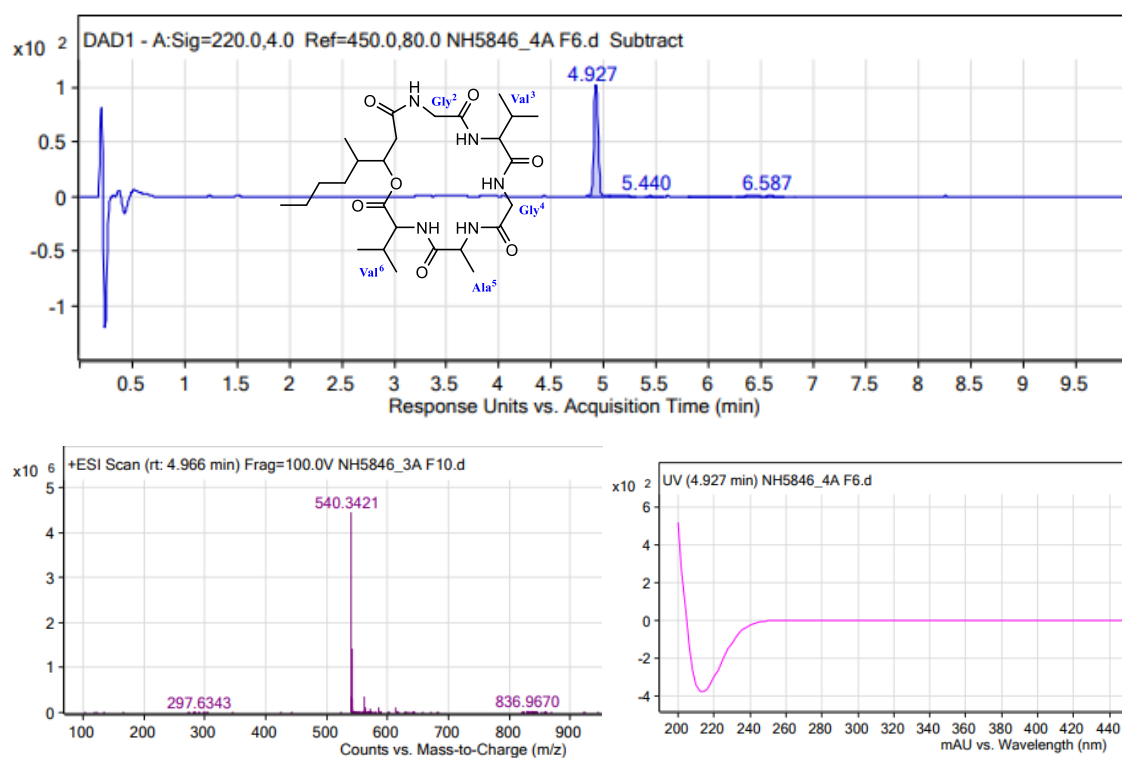
Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **29**.



Espectro NOESY (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **29**.

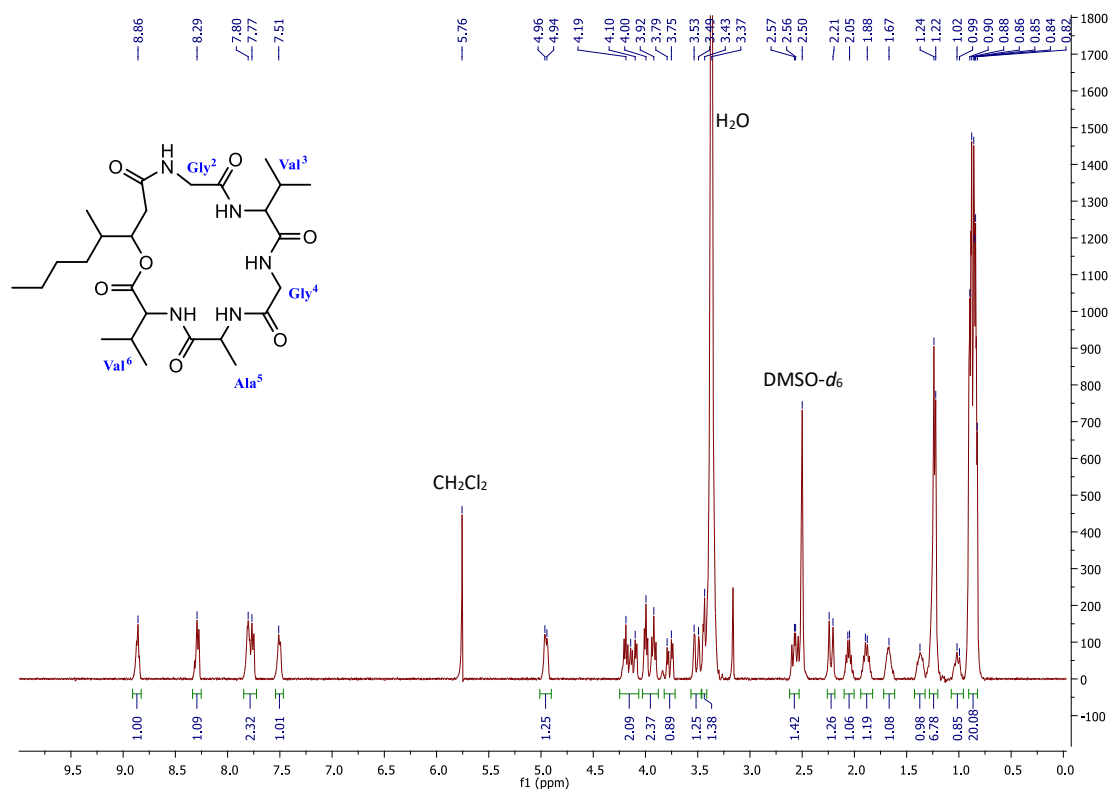


Compuesto 30. Sólido amorfo blanquecino; UV (MeOH) λ_{max} (fin de absorción); datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 12; HRESIMS m/z 540.3421 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_7$, 540.3397).

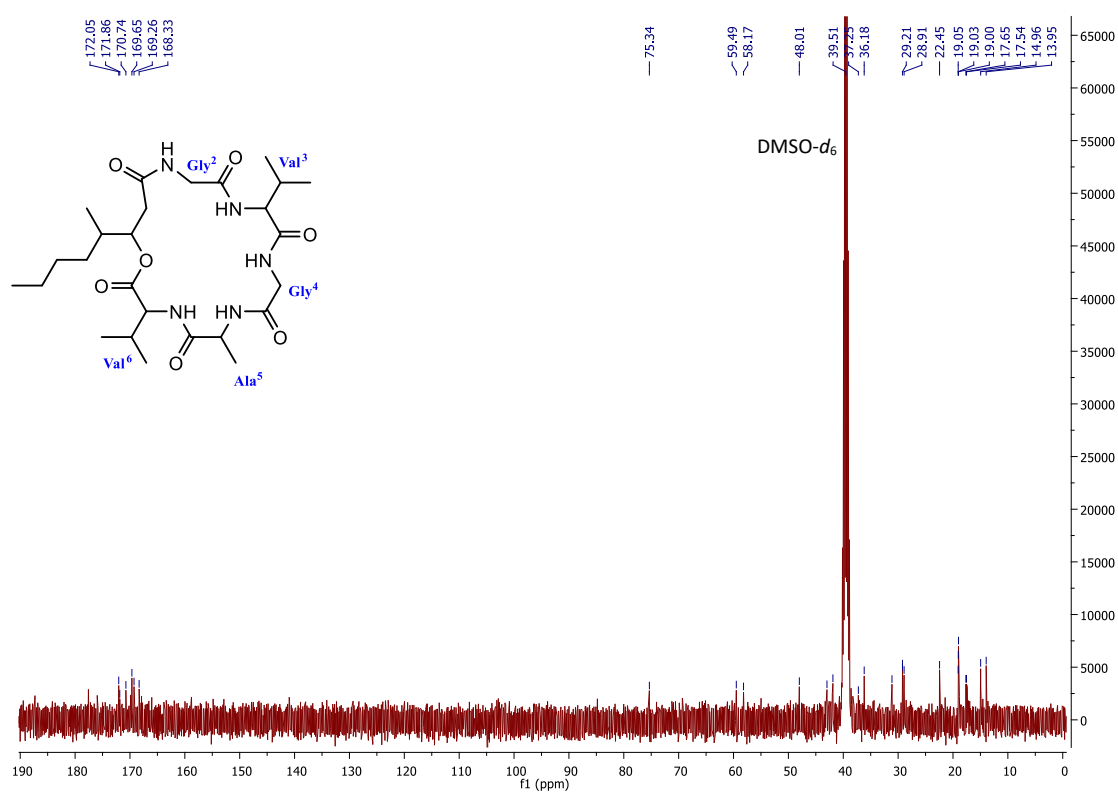


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **30** aislado del hongo *B. felina* en medio de cultivo líquido MI/2 (condiciones estándar de fermentación).

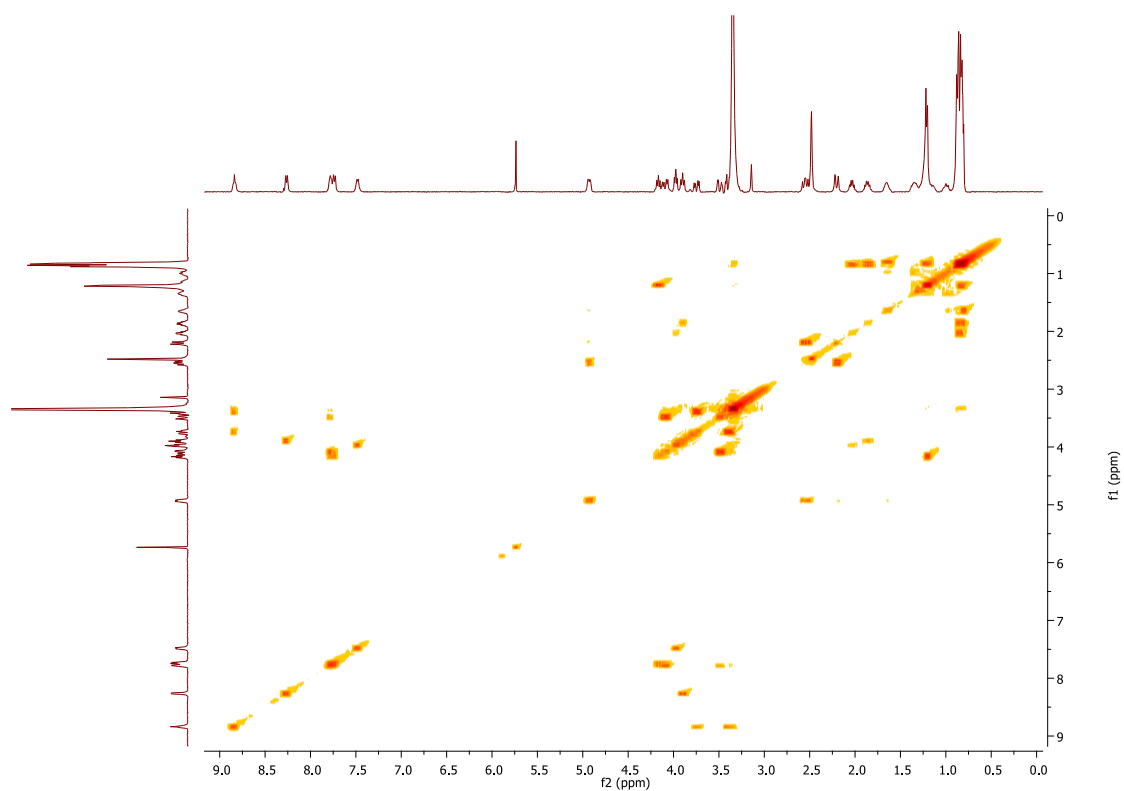
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **30**.



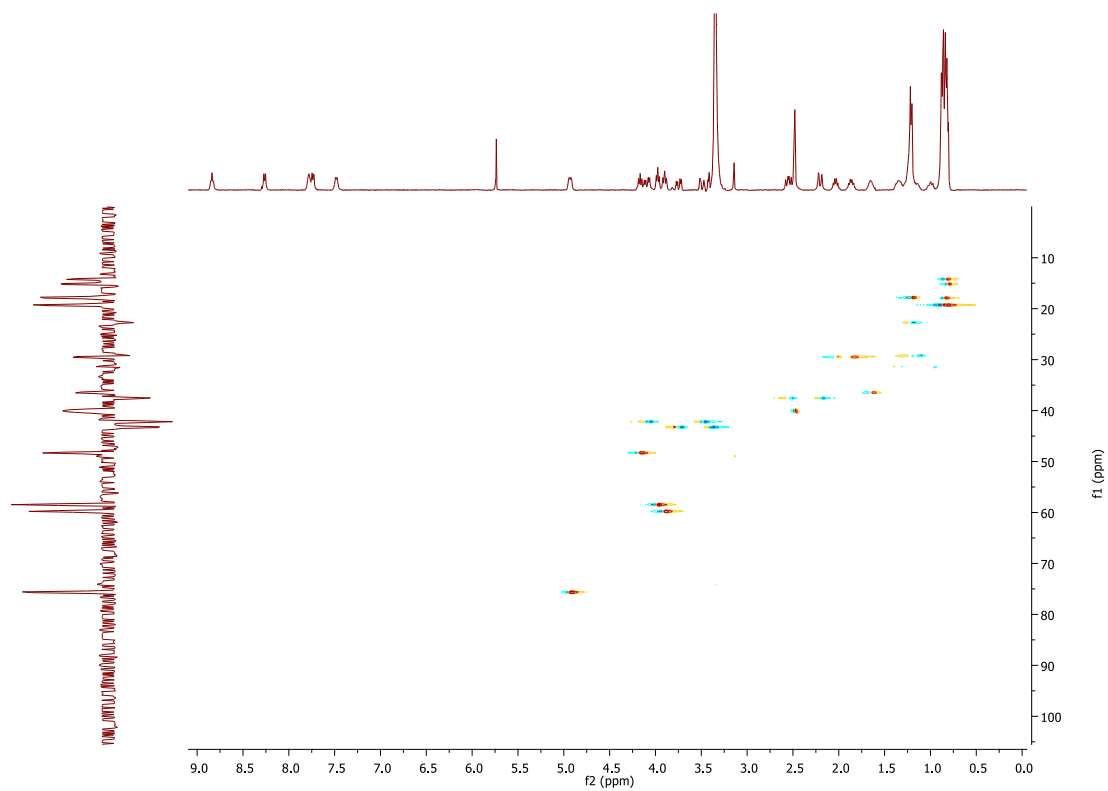
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **30**.



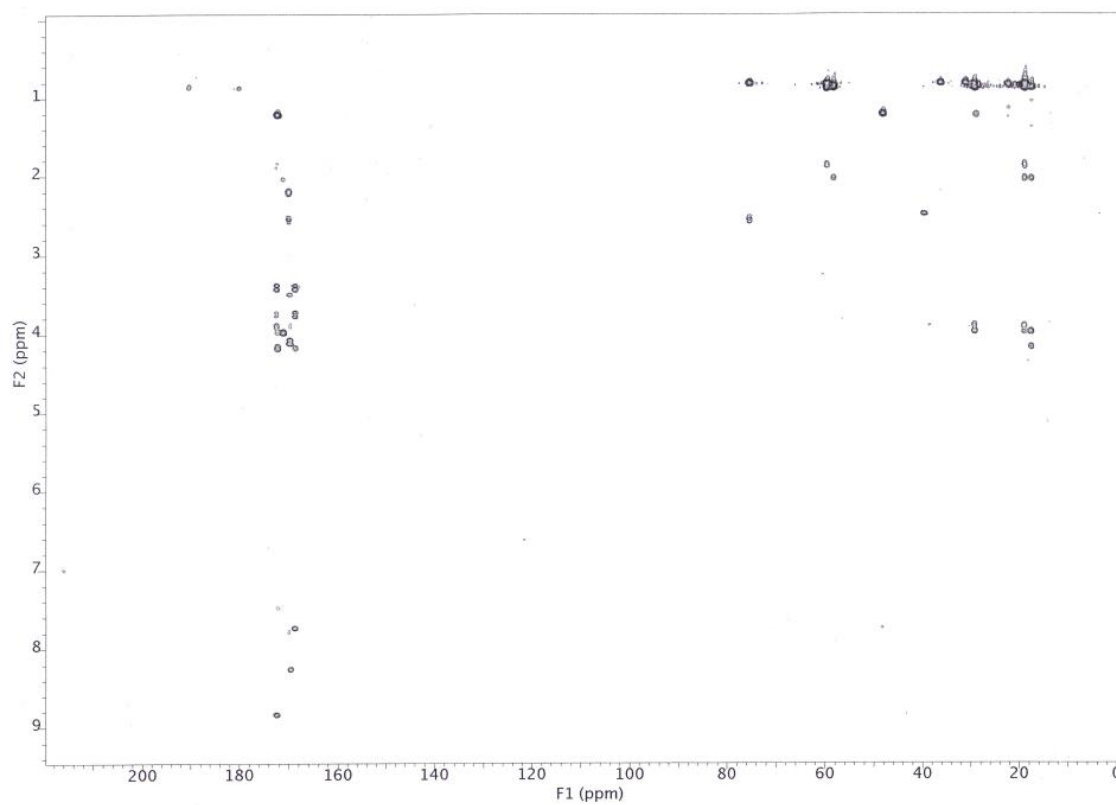
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **30**.



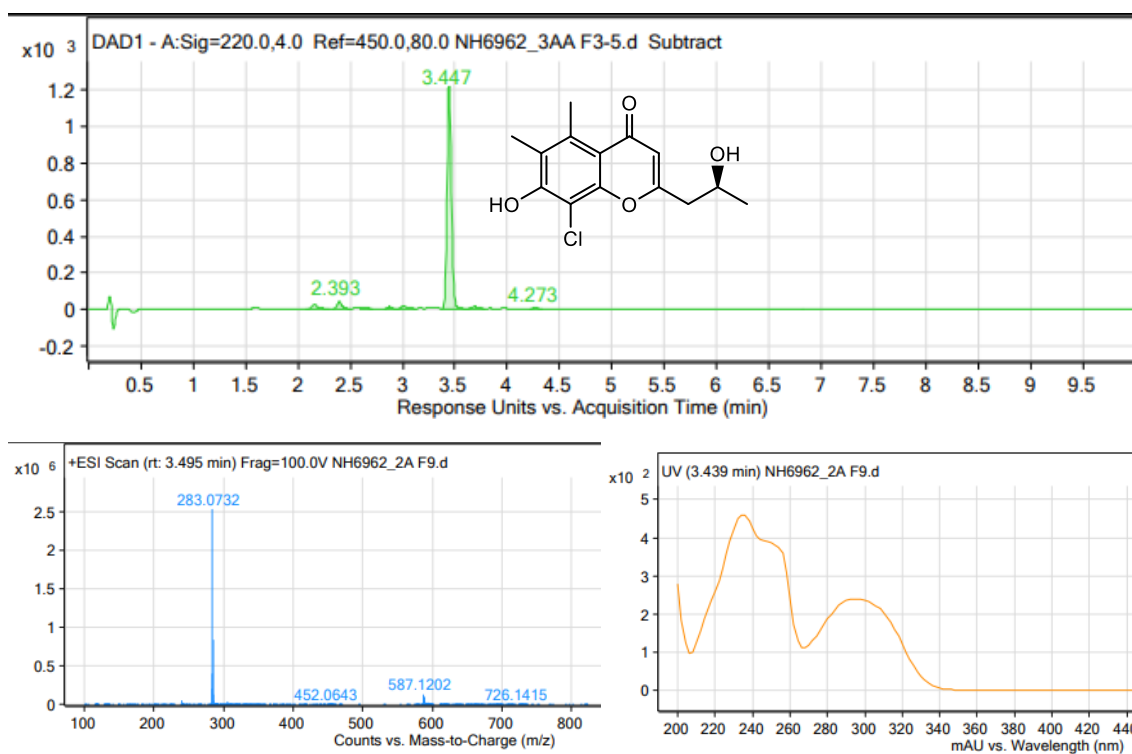
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **30**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, DMSO- d_6) del compuesto **30**.

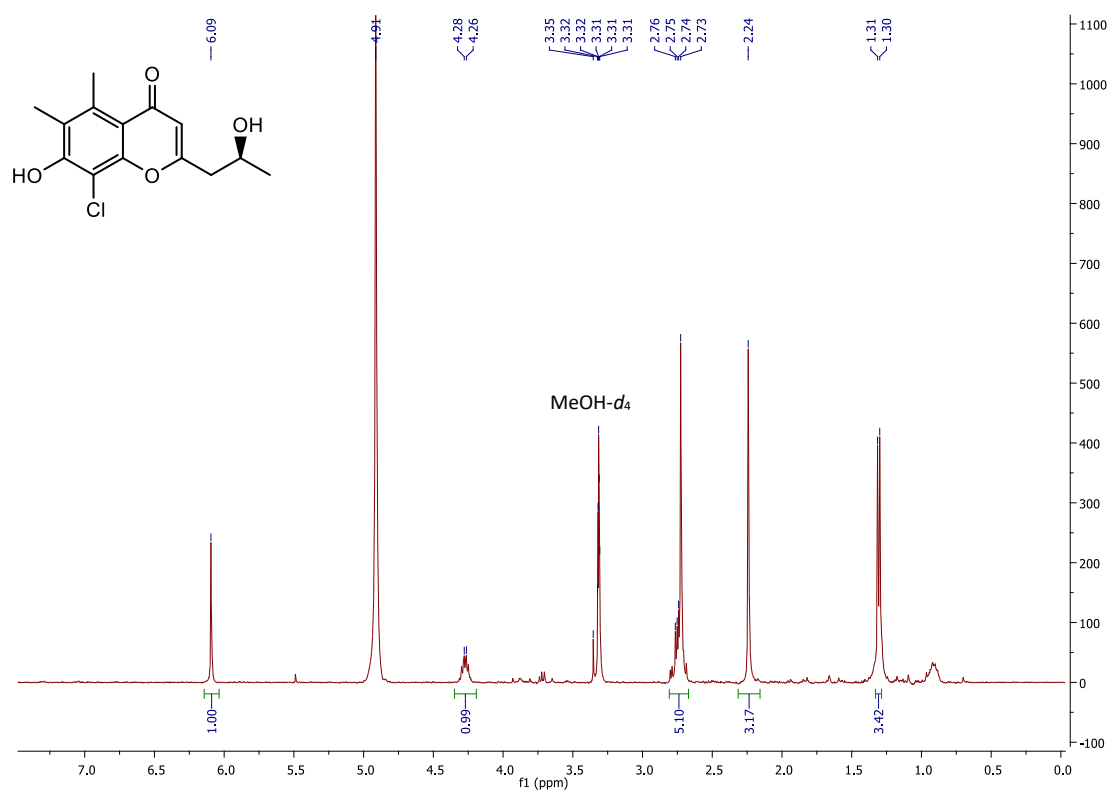


Compuesto 42. Sólido amorfo verdoso; $[\alpha]^{20}_D = +14.8^\circ$ (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 235, 250, 300 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 13; HRESIMS m/z 283.0732 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClO}_4$, 283.0737).

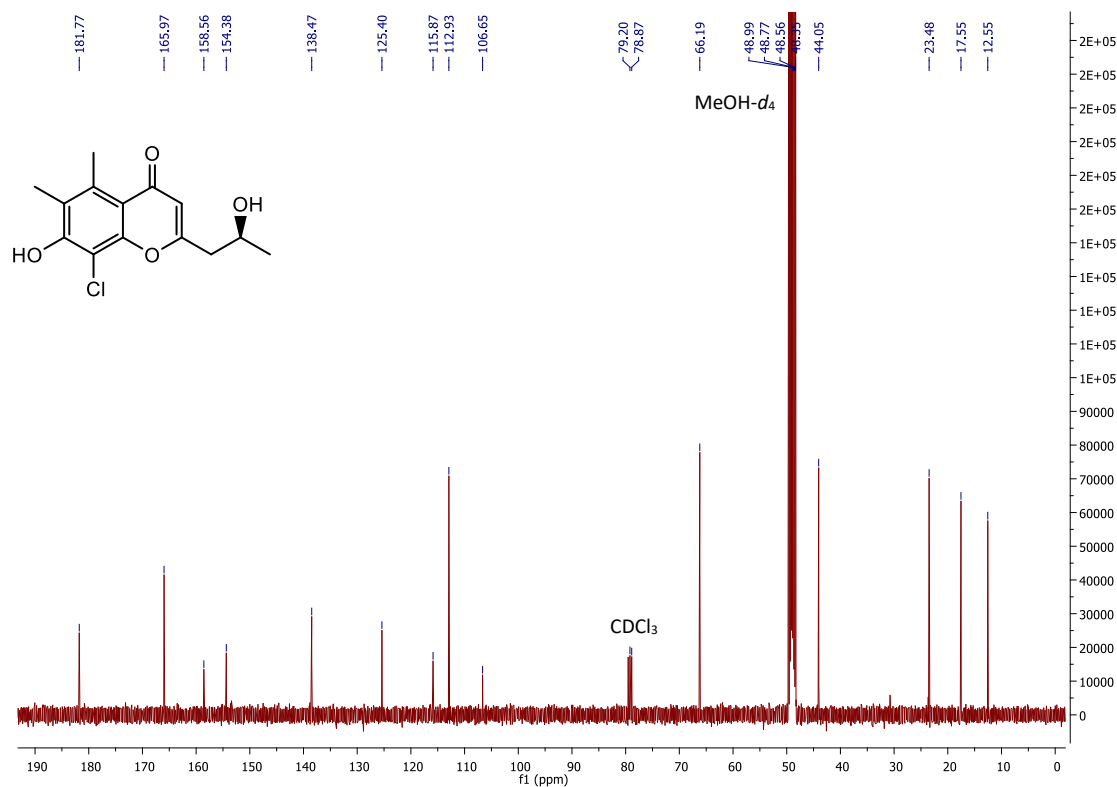


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **42** aislado del hongo *B. felina* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

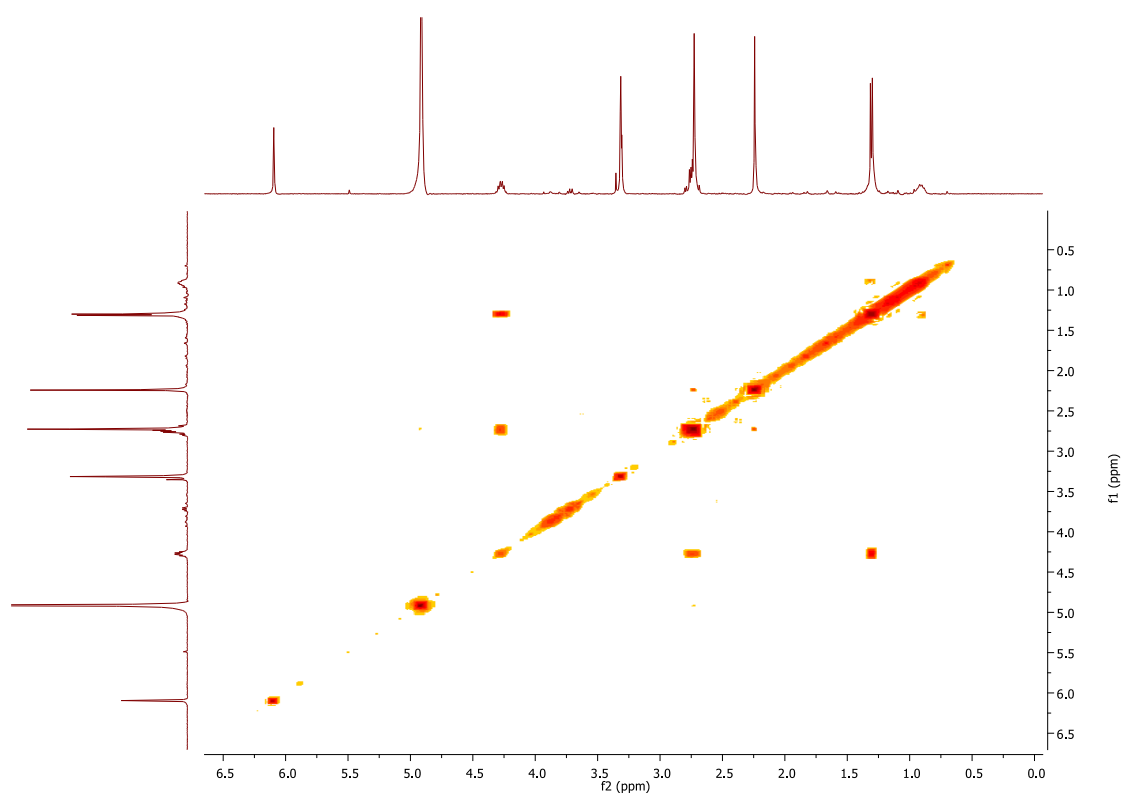
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4 + \text{CDCl}_3$) del compuesto **42**.



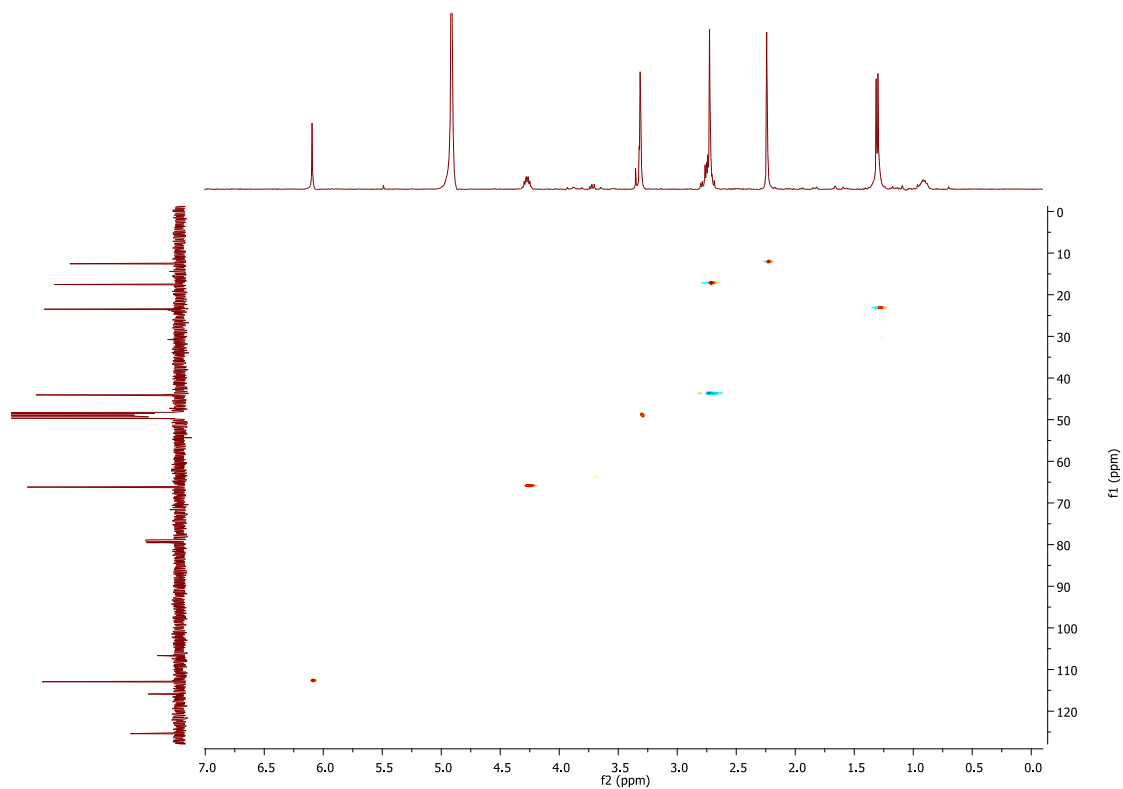
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4 + \text{CDCl}_3$) del compuesto **42**.



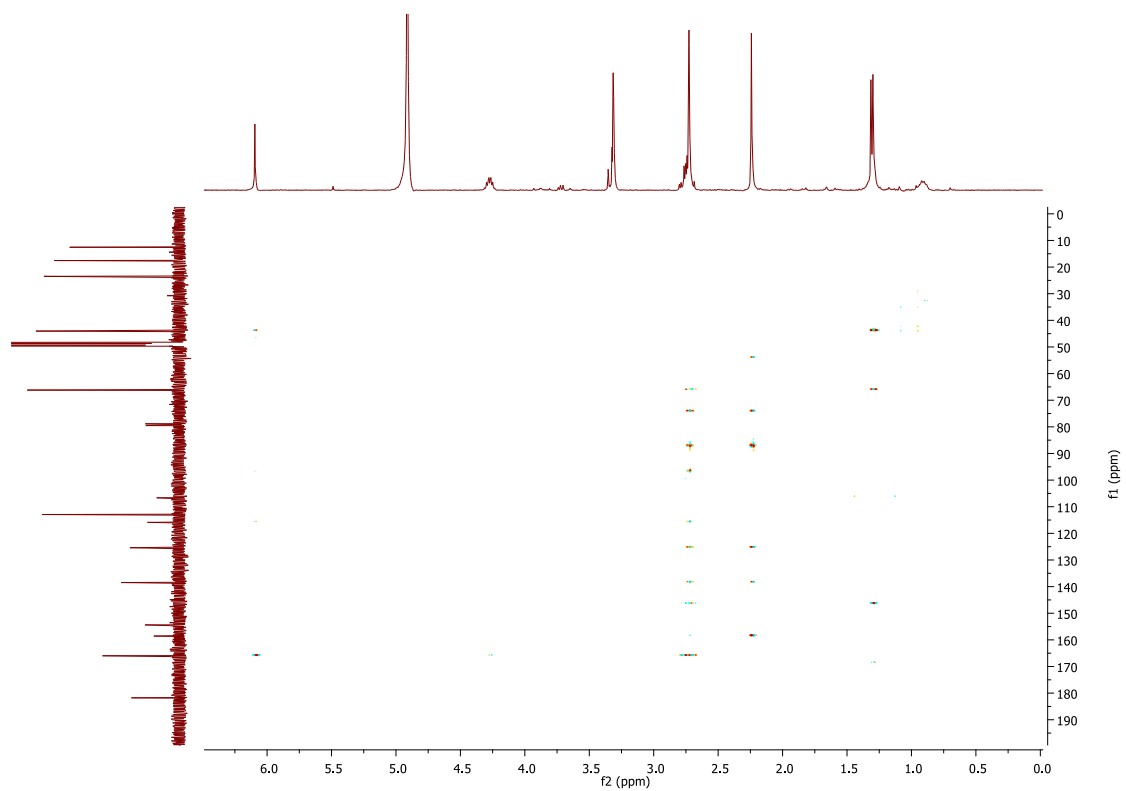
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4 + \text{CDCl}_3$) del compuesto **42**.



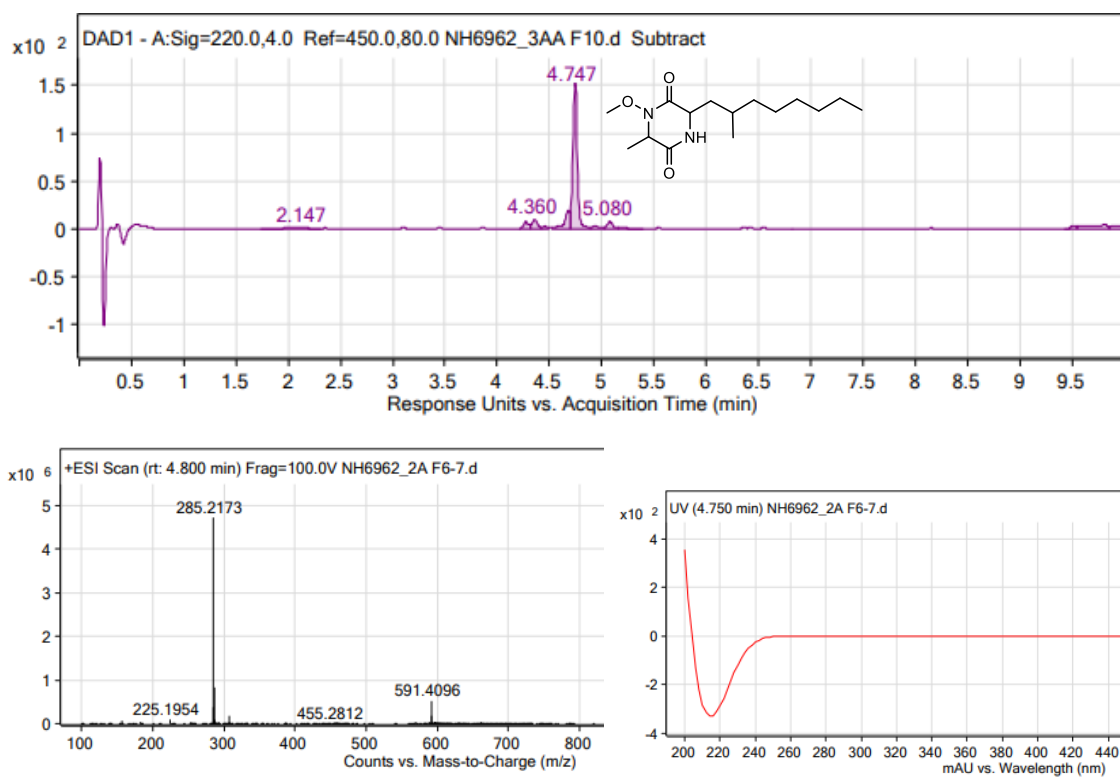
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{MeOH-}d_4 + \text{CDCl}_3$) del compuesto **42**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, MeOH- d_4 + CDCl_3) del compuesto **42**.

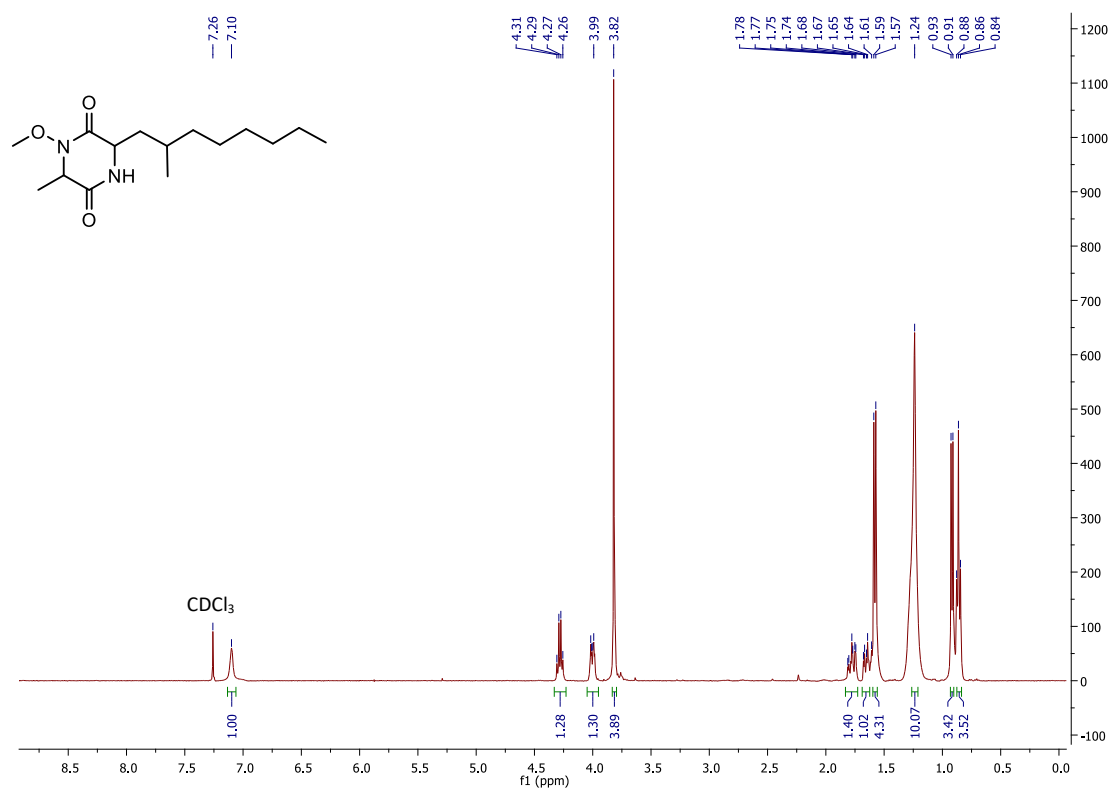


Compuesto 43. Aceite verde; UV (MeOH) λ_{max} (fin de absorción); datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 14; HRESIMS m/z 285.2173 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3$, 285.2178).

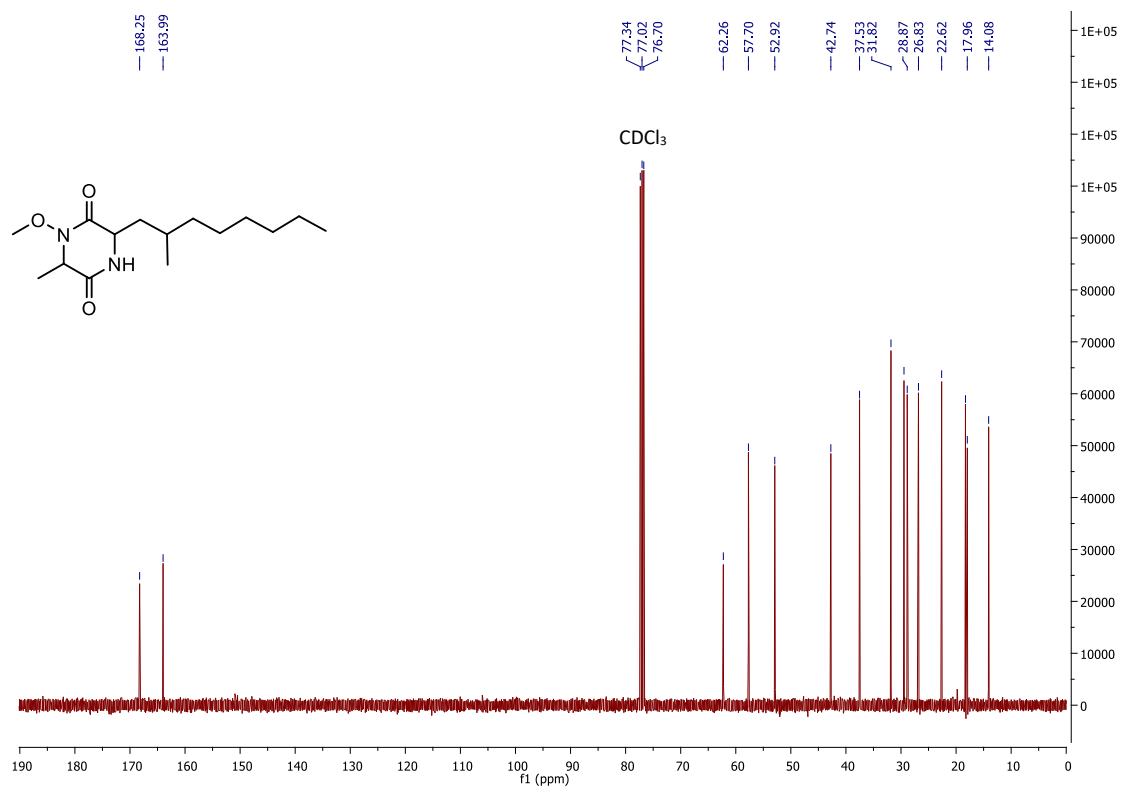


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **43** aislado del hongo *B. felina* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

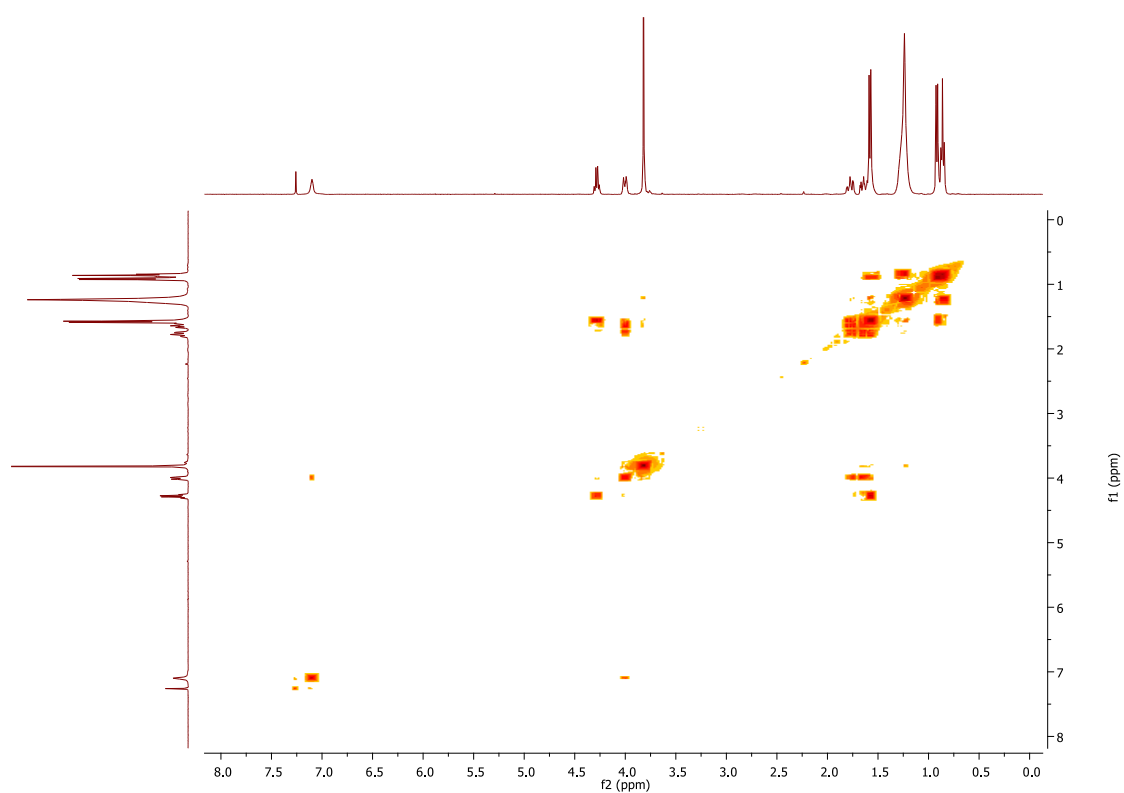
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **43**.



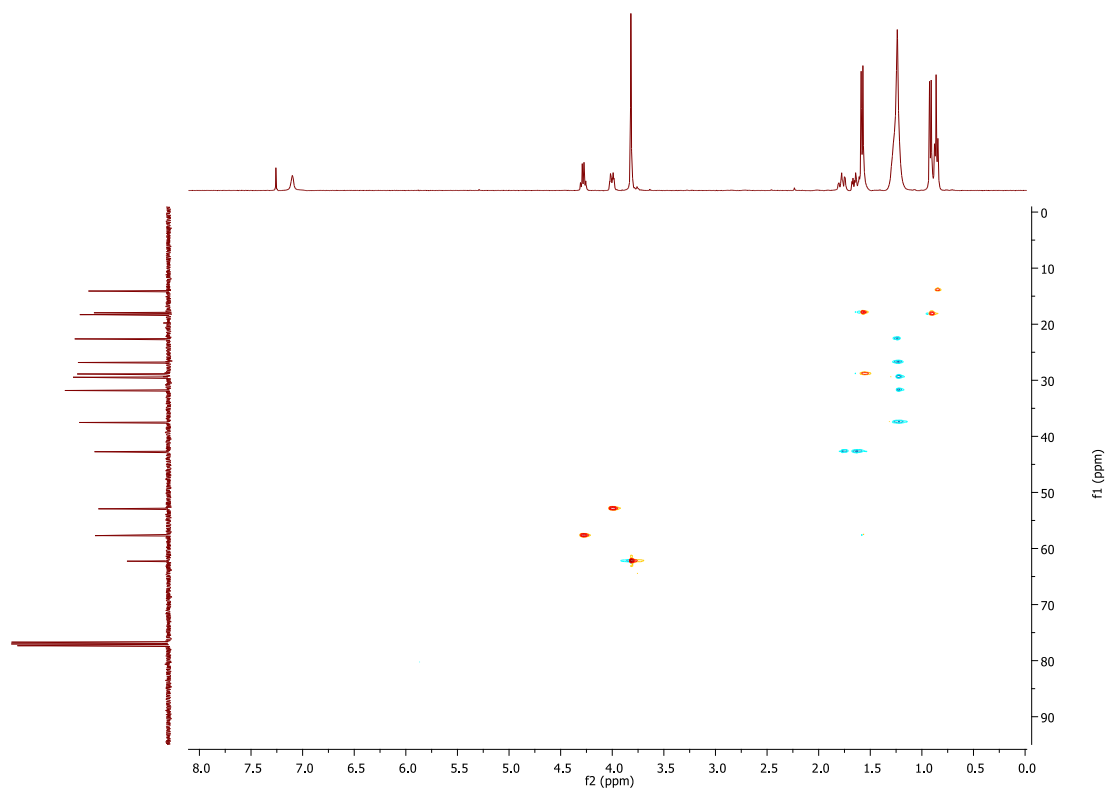
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **43**.



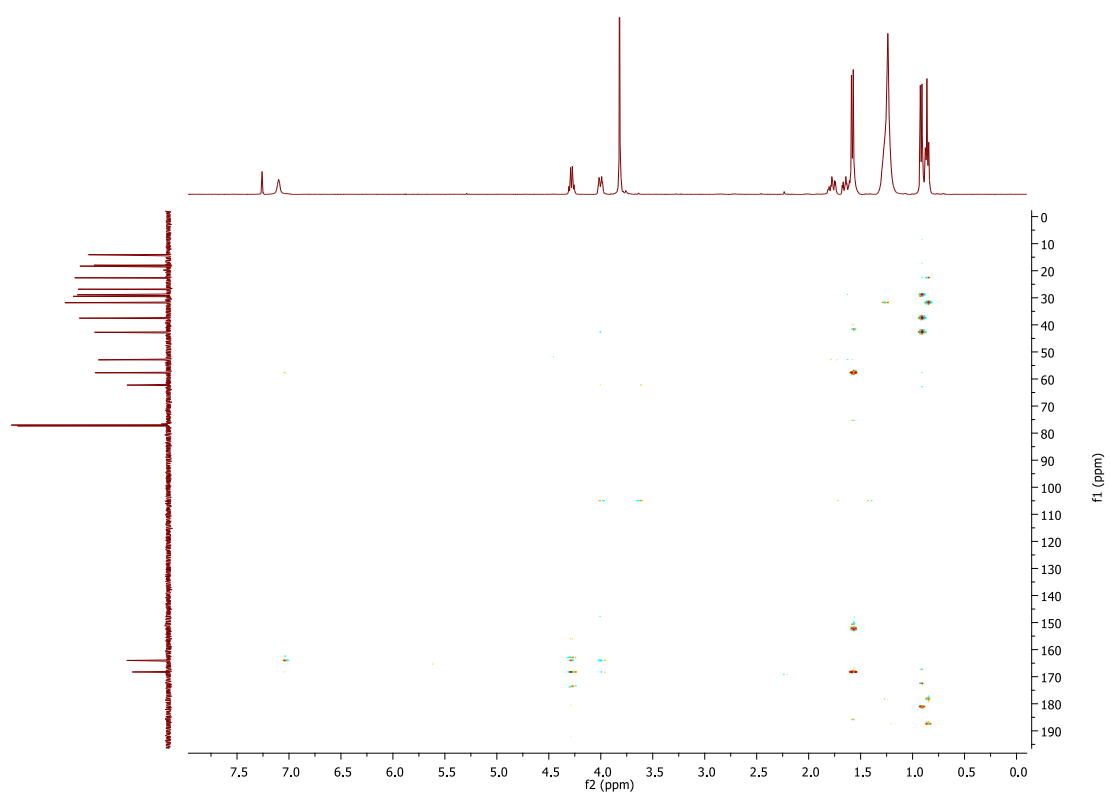
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **43**.



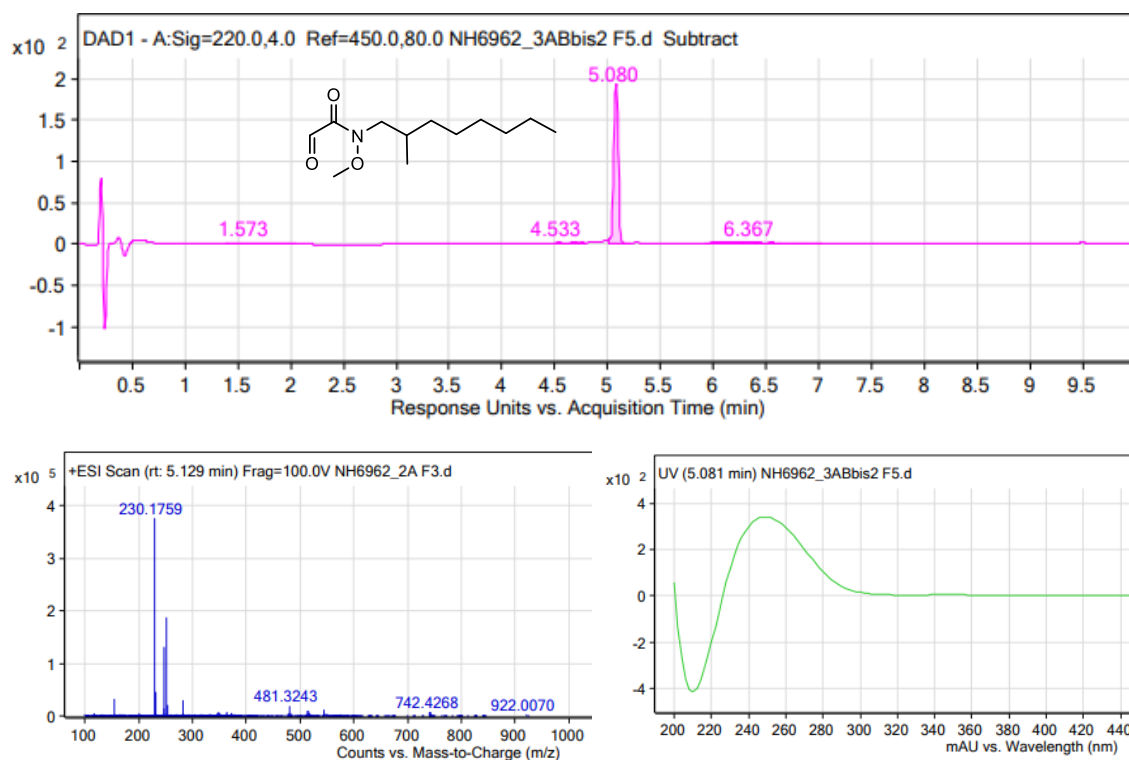
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **43**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **43**.

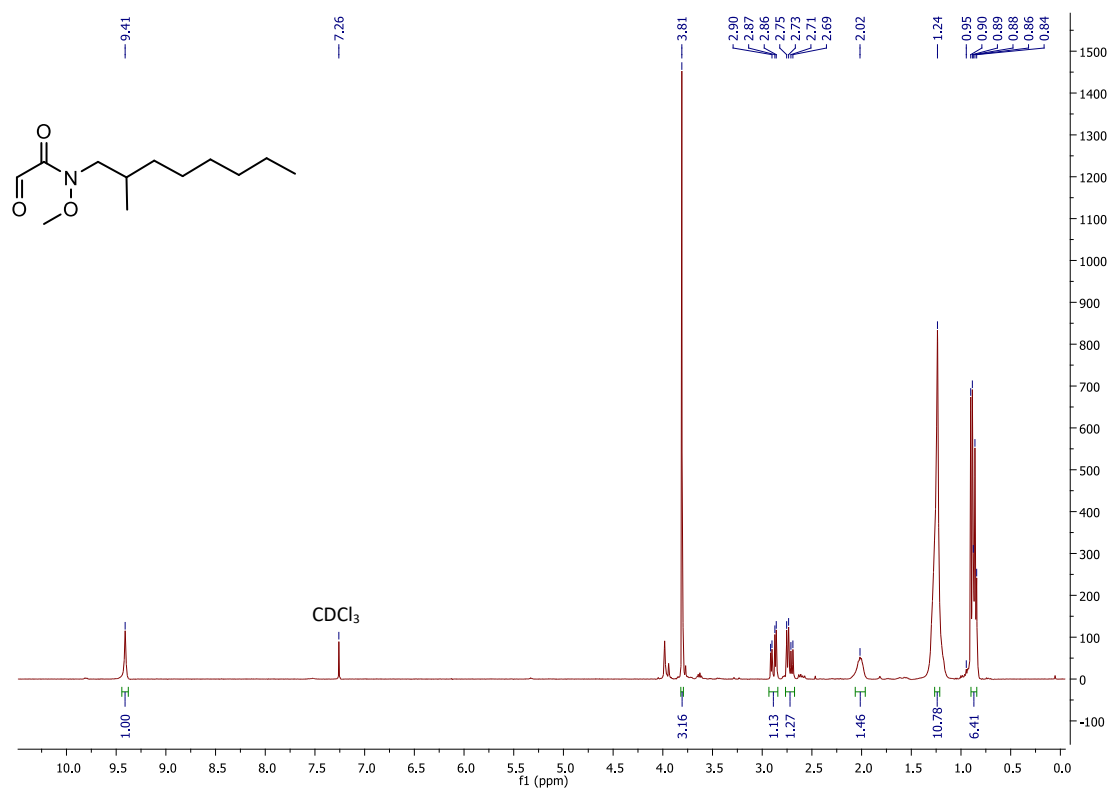


Compuesto 44. Aceite amarillento; $[\alpha]_D^{20} = +0.51^\circ$ (c 0.53, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 250 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 15; HRESIMS m/z 230.1759 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NO}_3$, 230.1756).

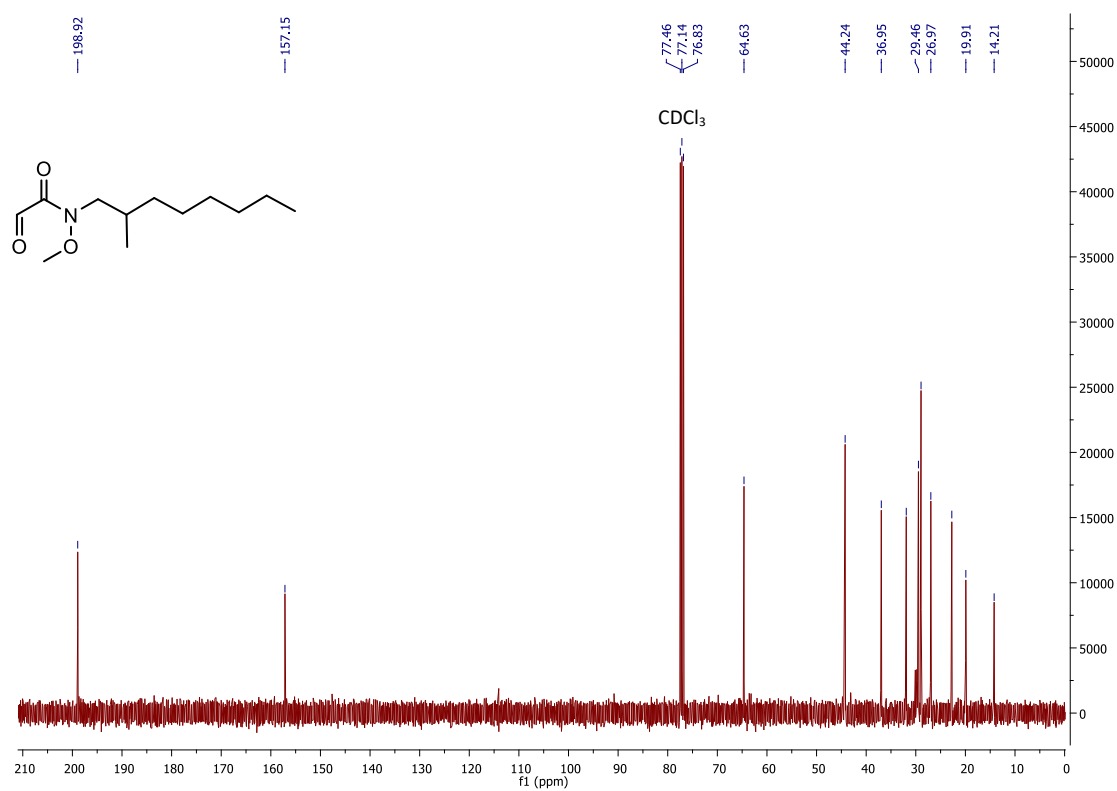


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **44** aislado del hongo *B. felina* en medio de cultivo sólido de arroz junto con la adición del inductor químico 5-azacitidina.

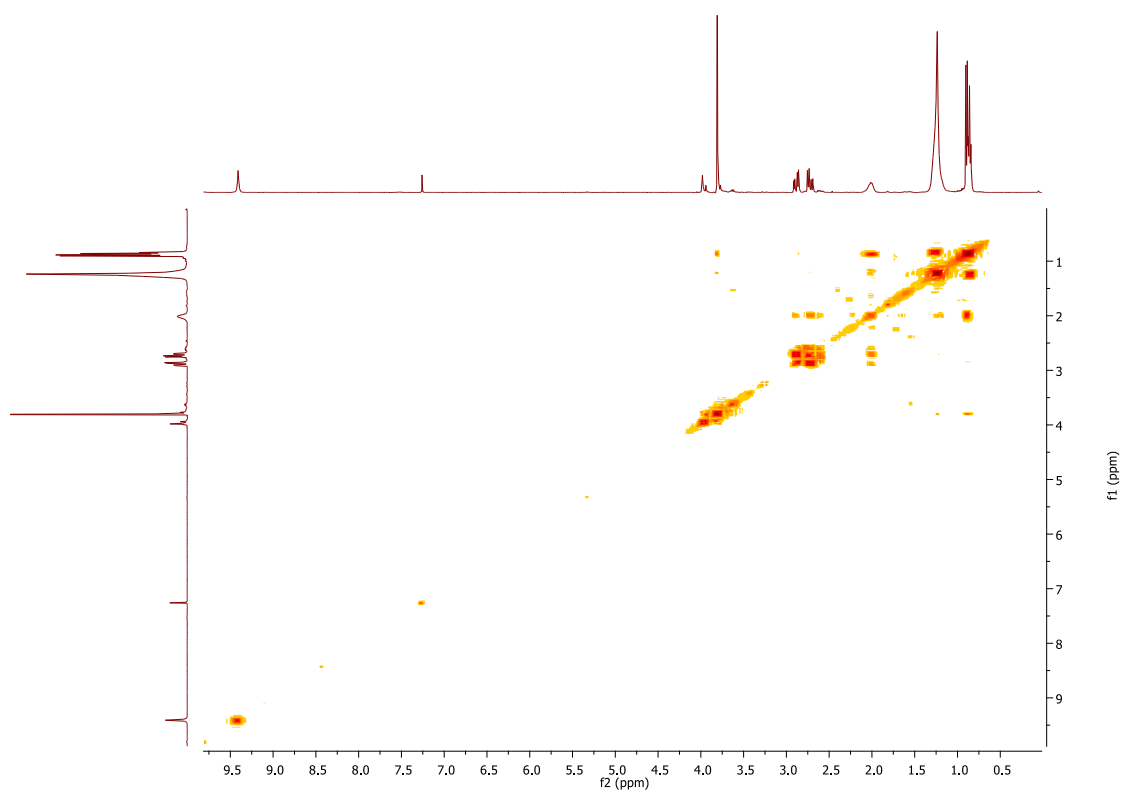
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **44**.



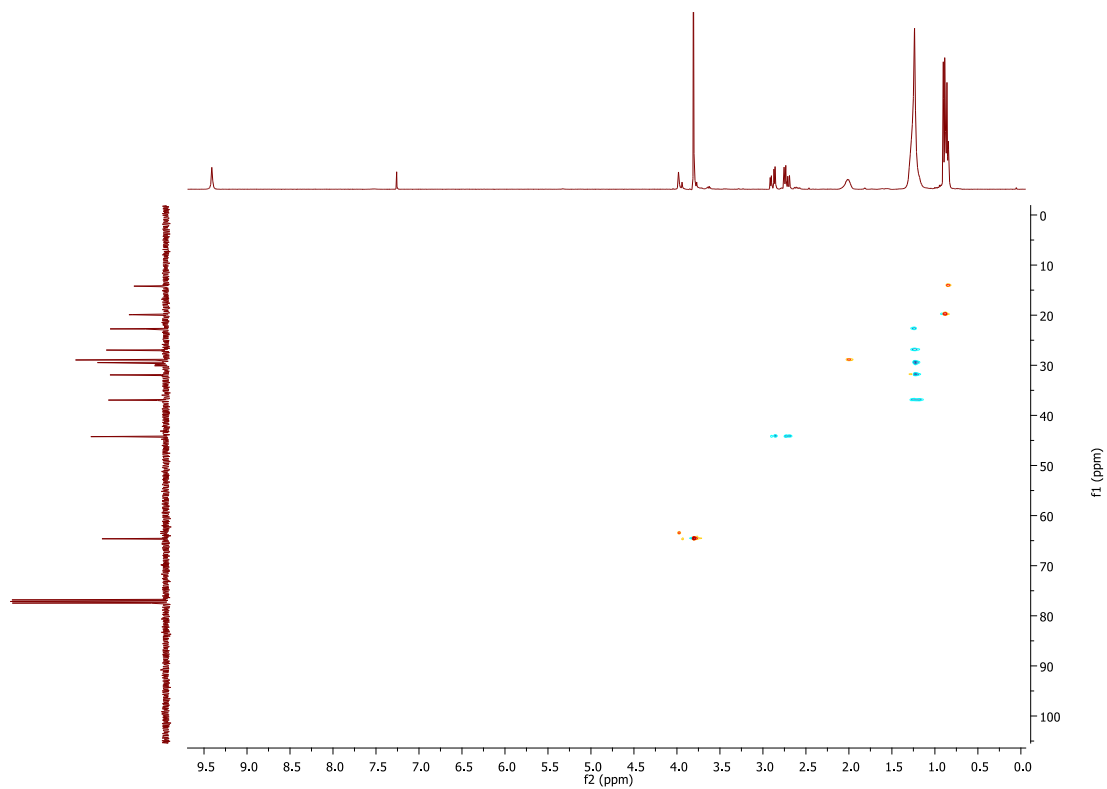
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **44**.



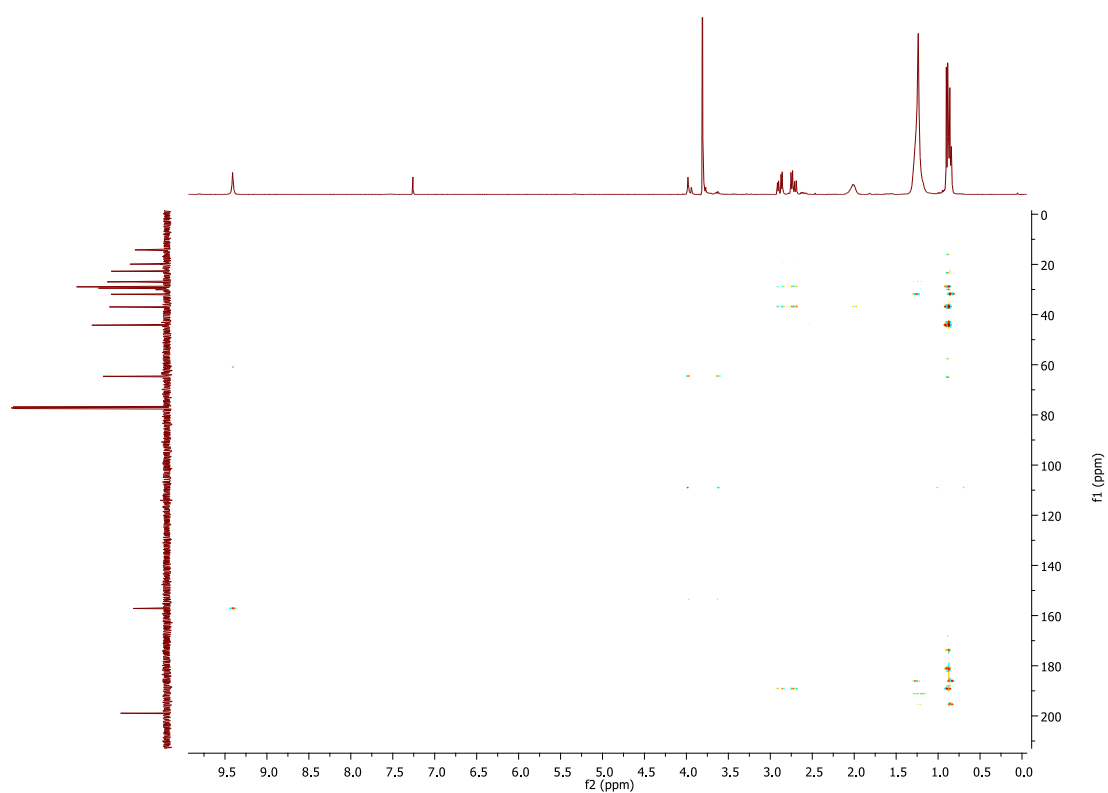
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **44**.



Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **44**.

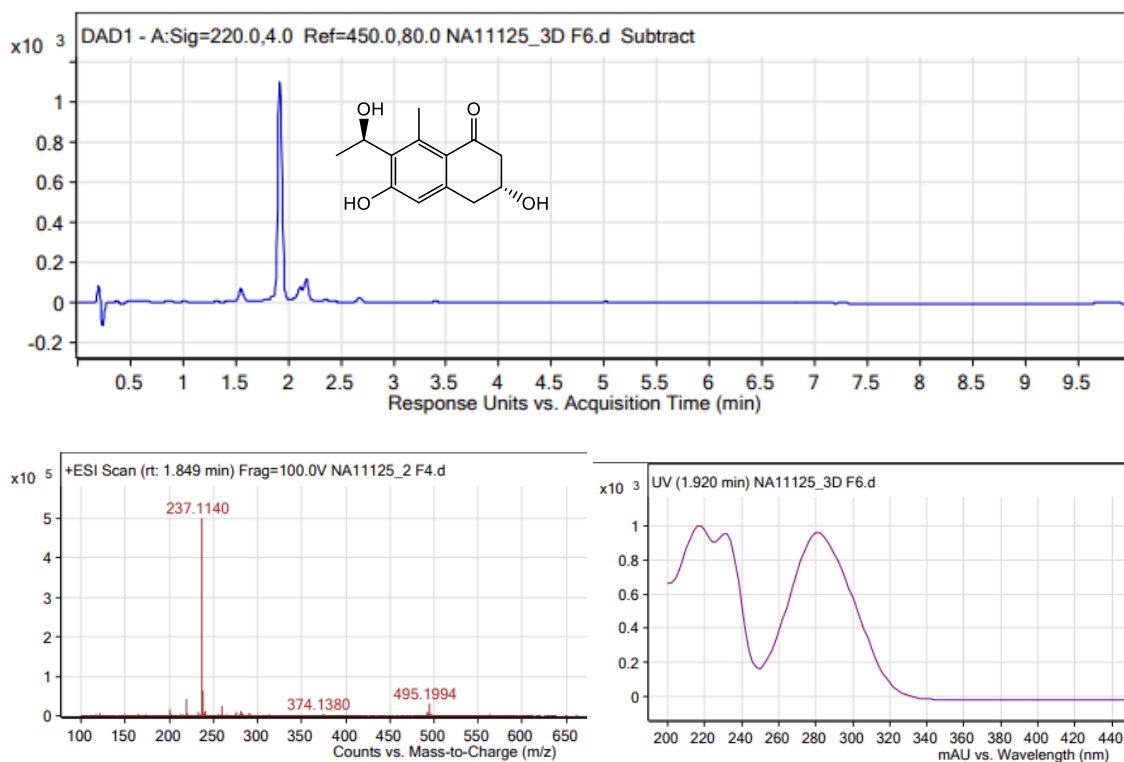


Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **44**.



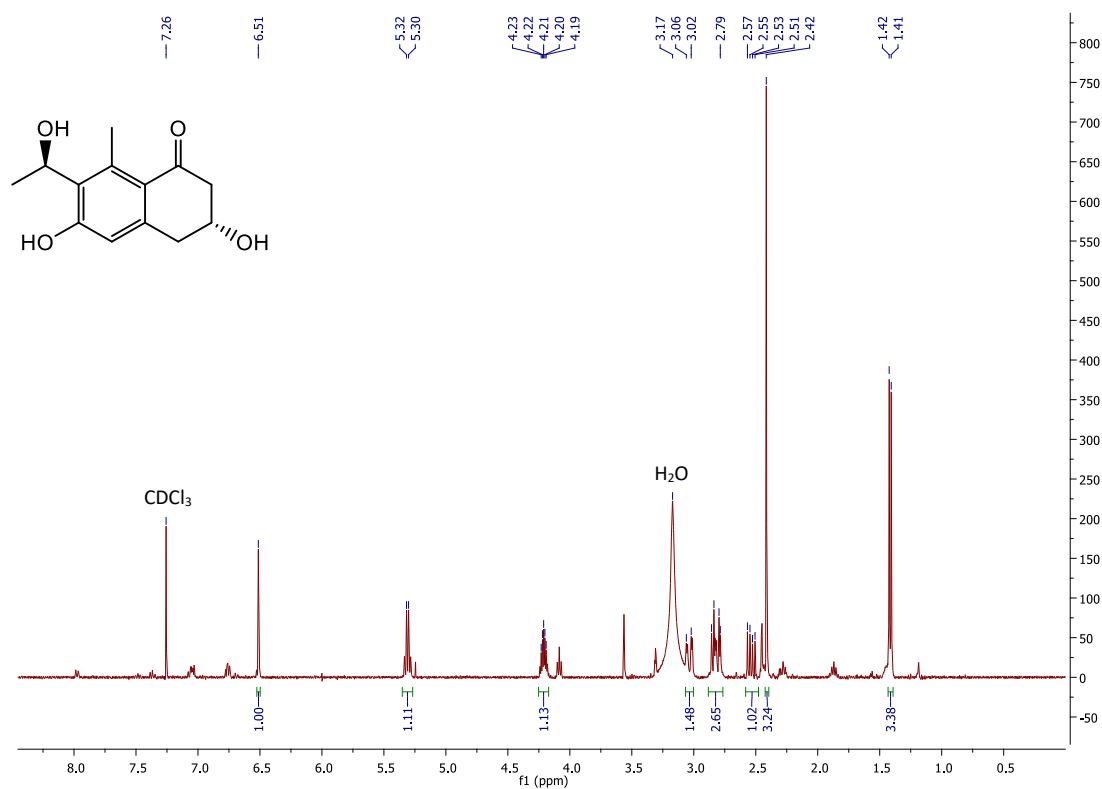
AA-AR-H-B002 (*Streptomyces griseorubiginosus*)

Compuesto 73. Sólido amorfo amarillento; $[\alpha]^{20}_D = -47.5^\circ$ (c 0.226, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 216, 232, 280 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 16; HRESIMS m/z 237.1140 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_4$, 237.1127).

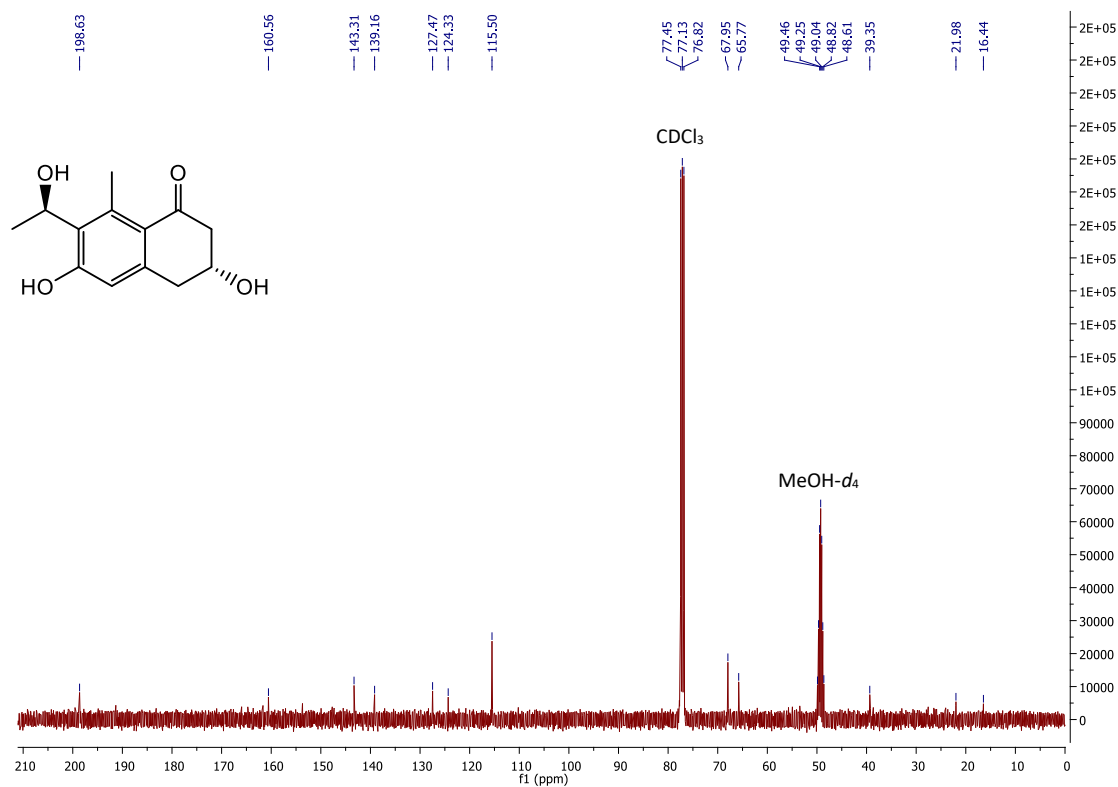


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **73** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

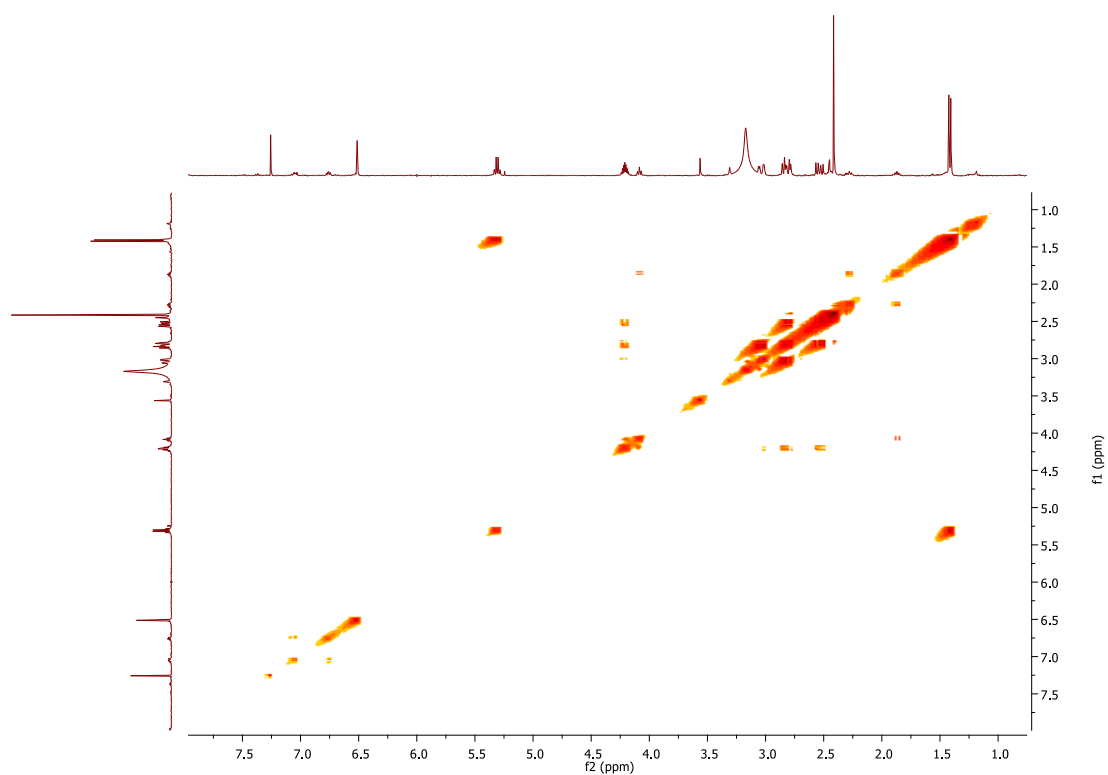
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **73**.



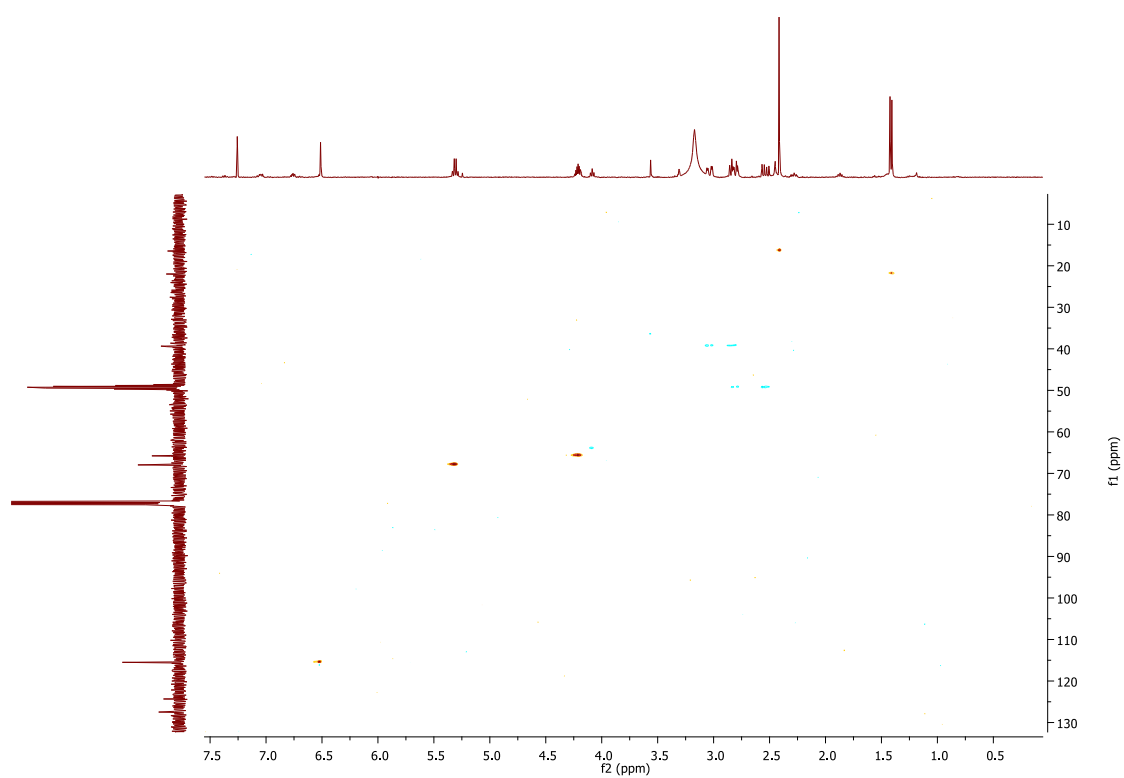
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **73**.



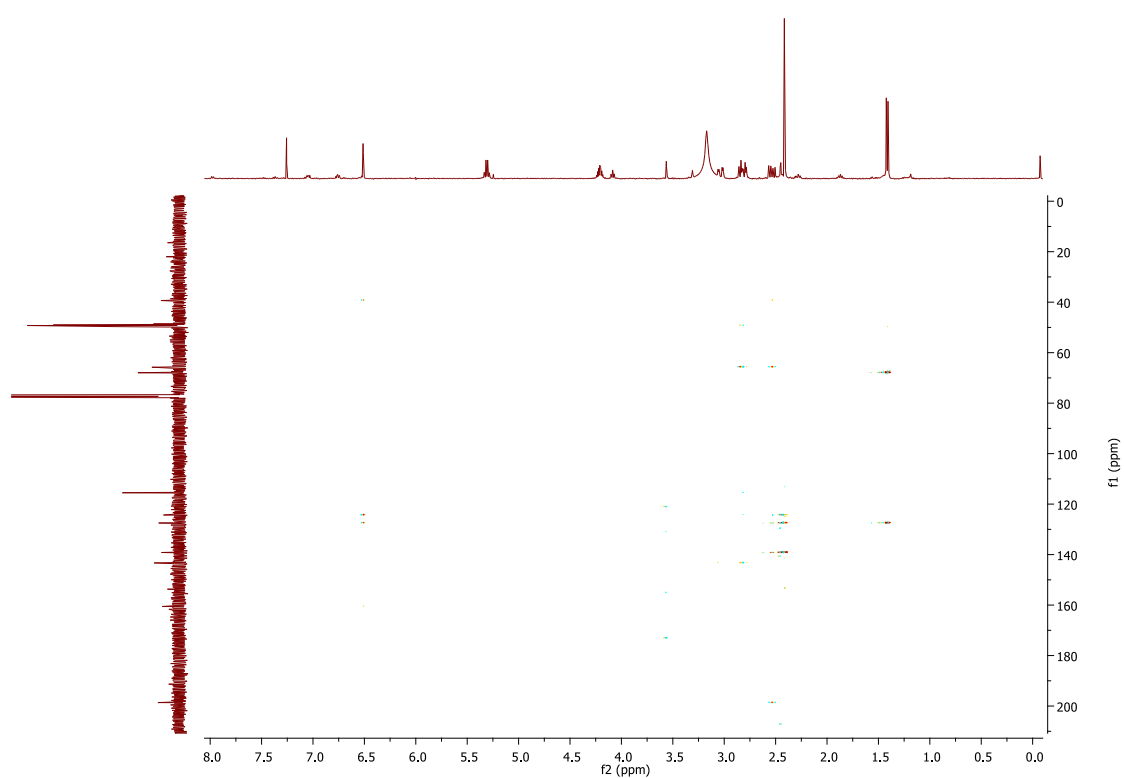
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **73**.



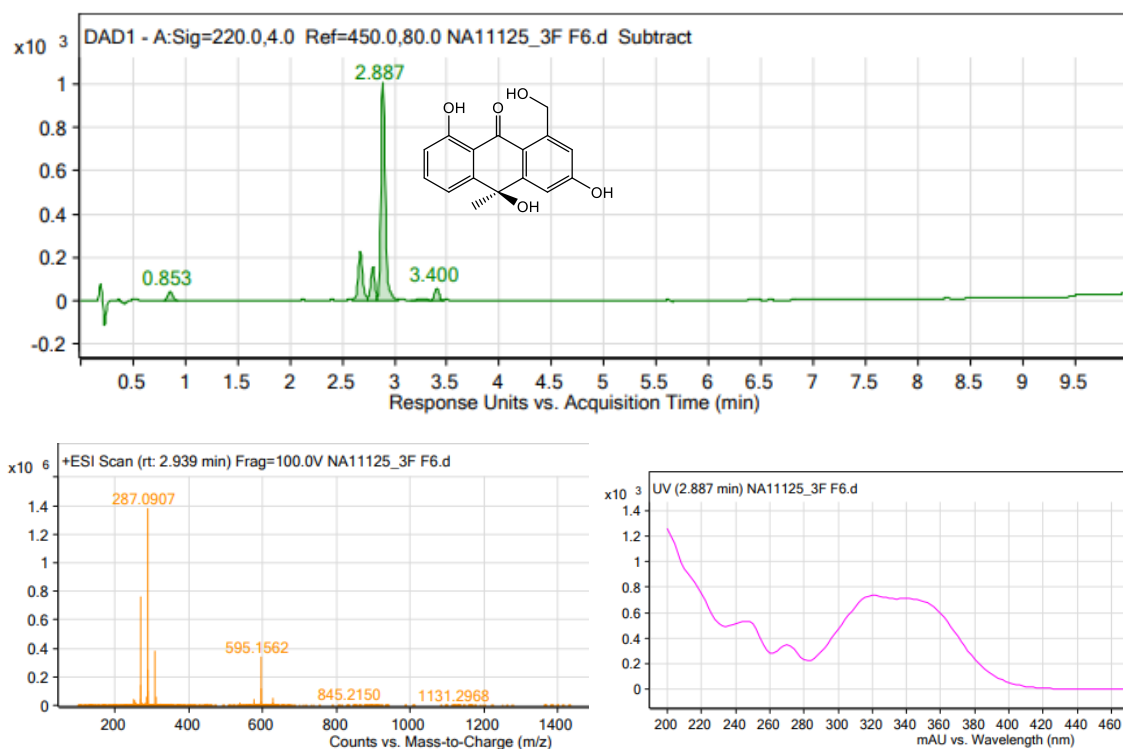
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **73**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **73**.

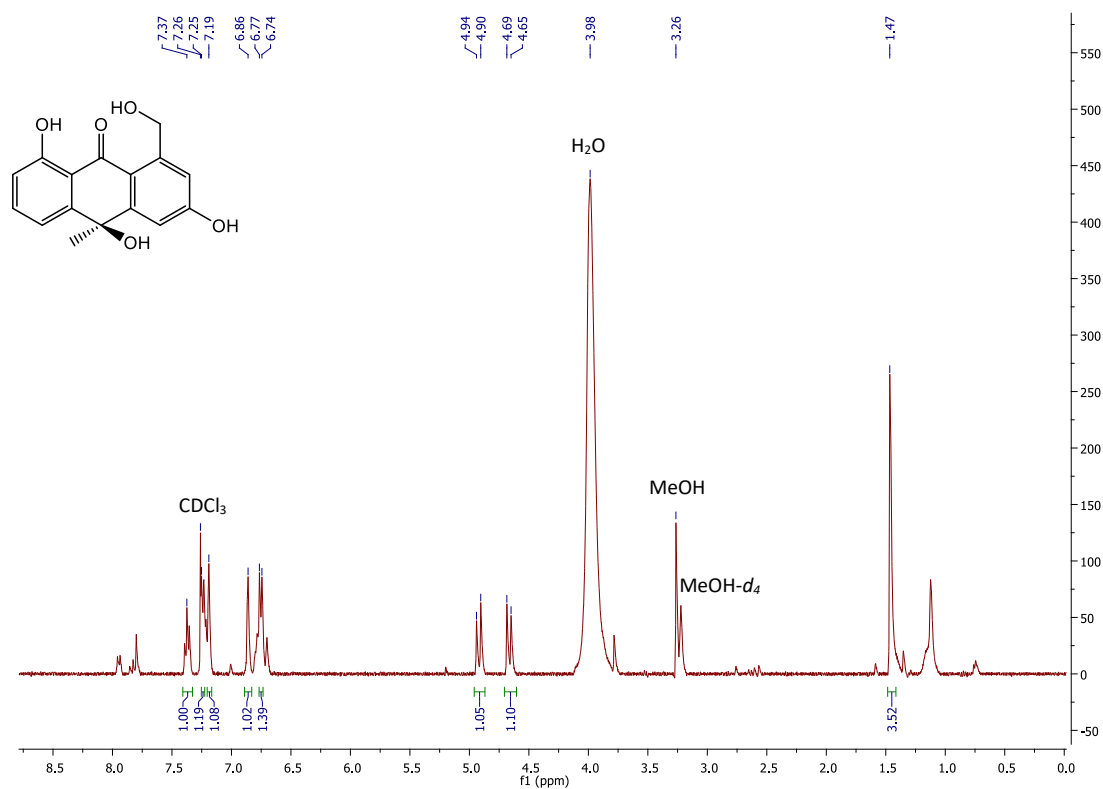


Compuesto 74. Sólido amorfo amarillento; $[\alpha]^{20}_D = -133.9^\circ$ (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 210, 244, 270, 320, 340 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 17; HRESIMS m/z 287.0907 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5$, 287.0919).

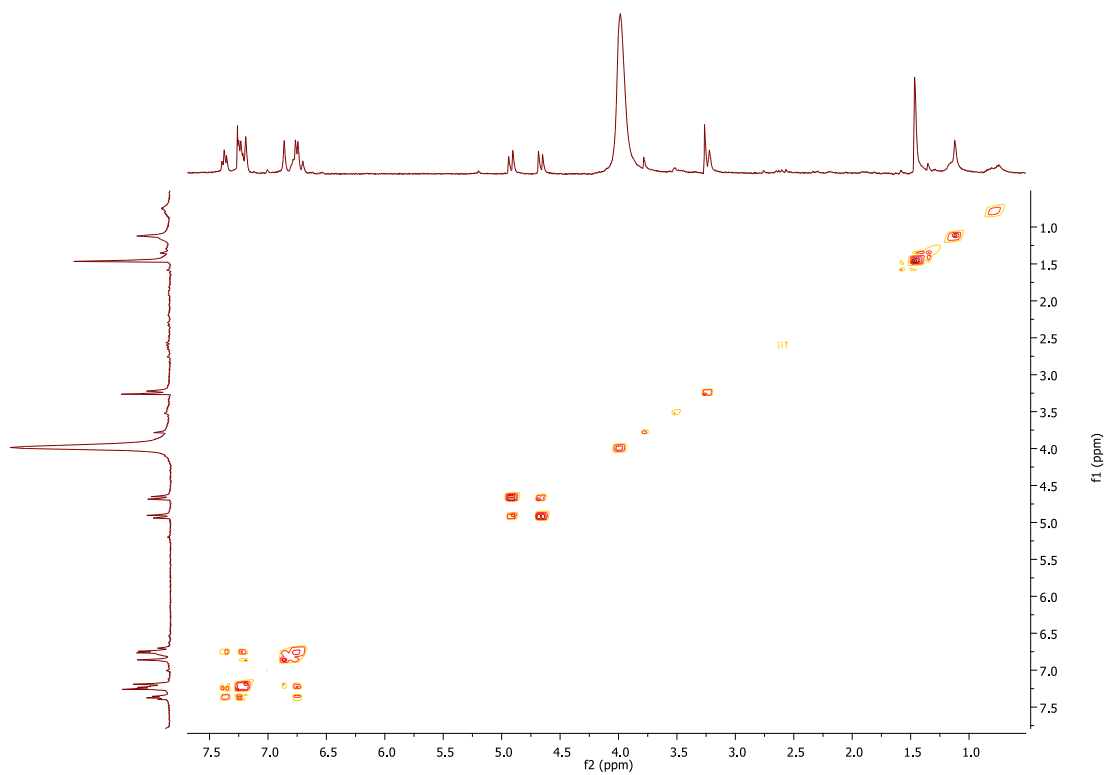


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **74** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

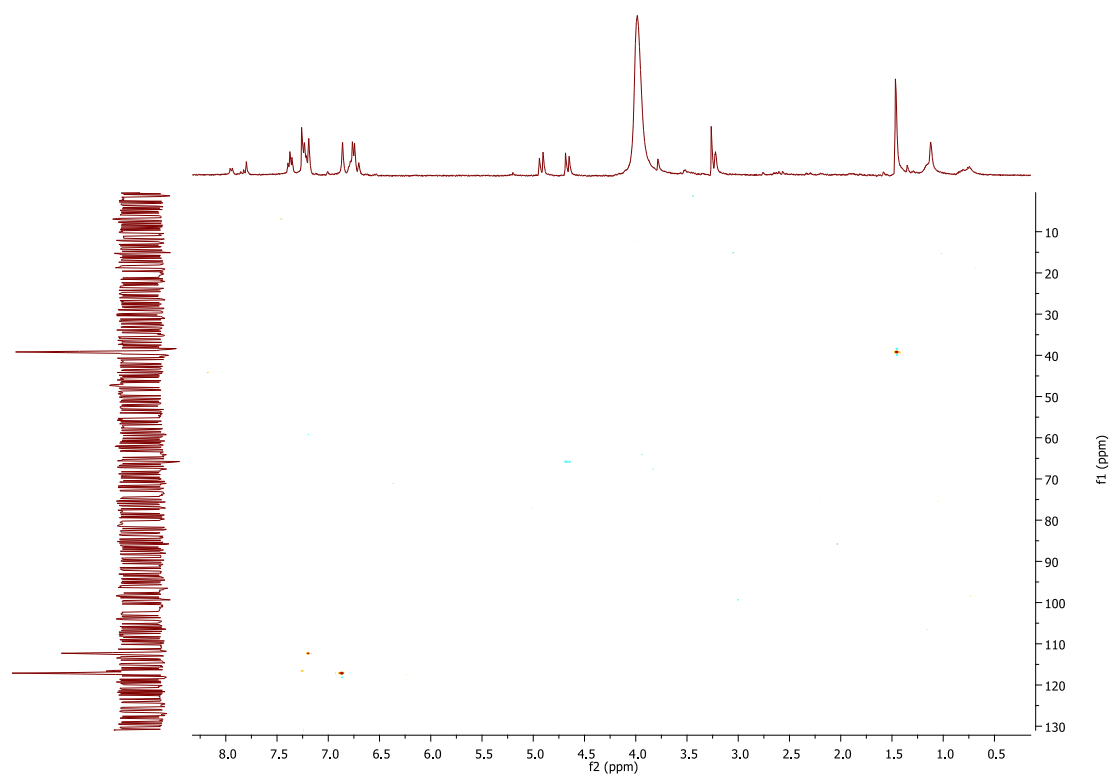
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **74**.



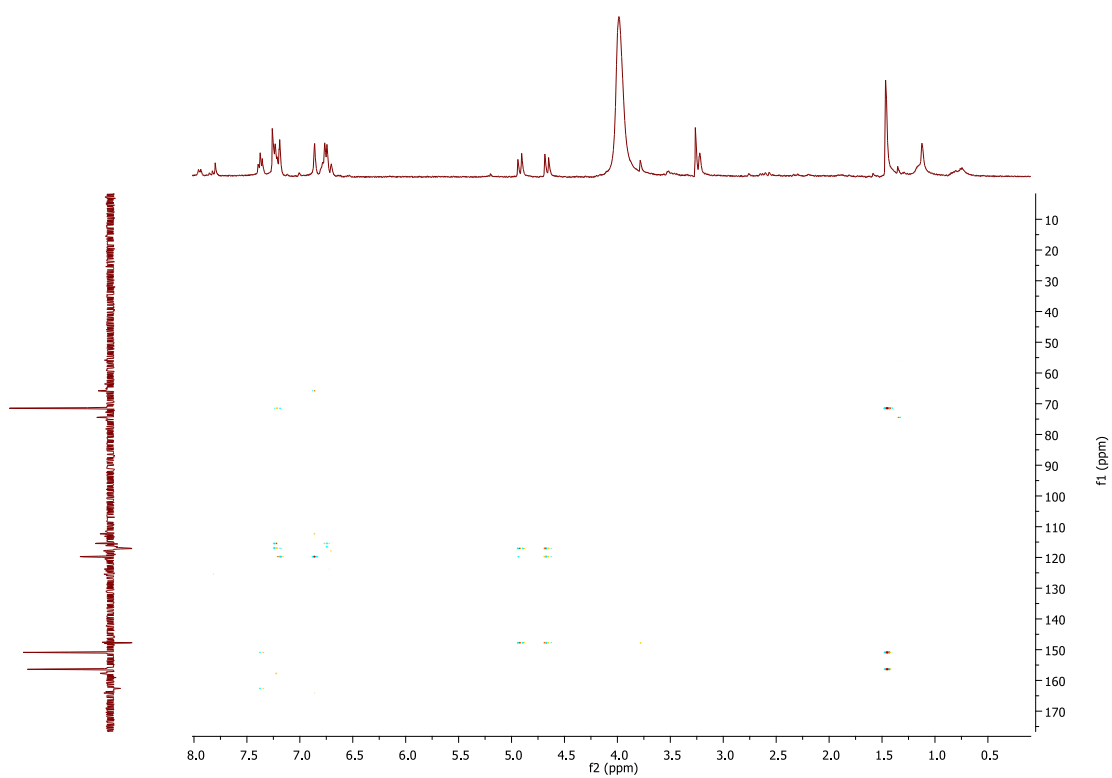
Espectro $^1\text{H-}^1\text{H}$ gCOSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **74**.



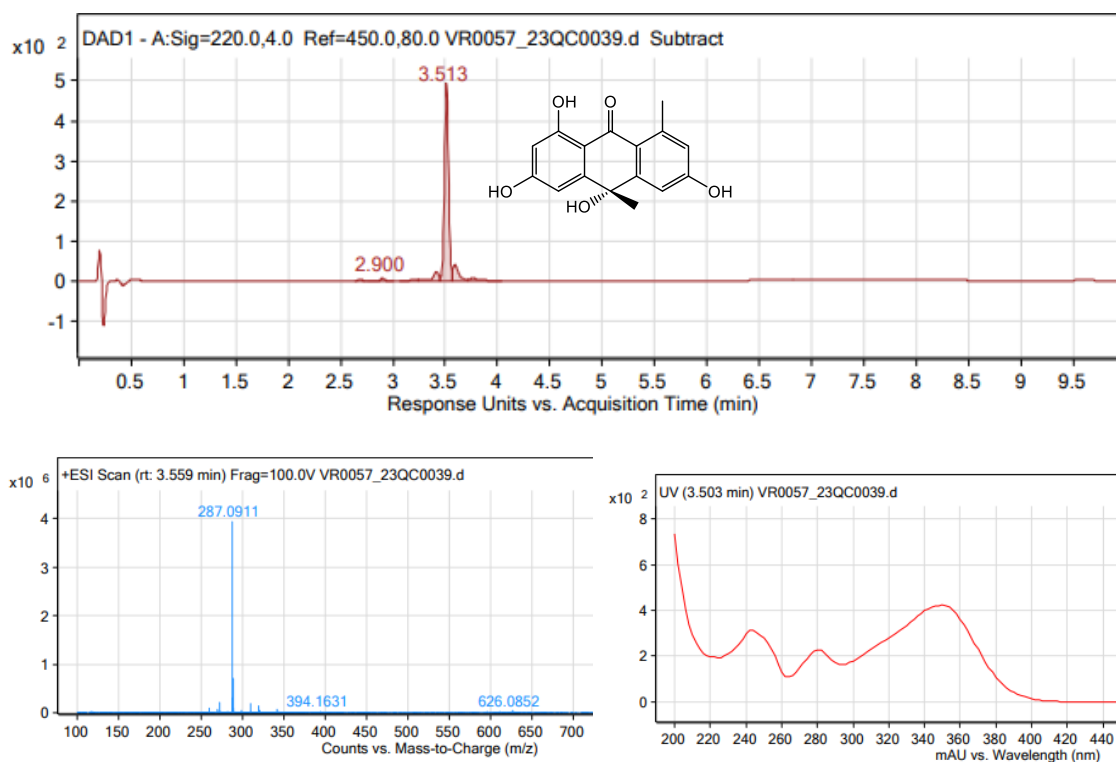
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **74**.



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$) del compuesto **74**.

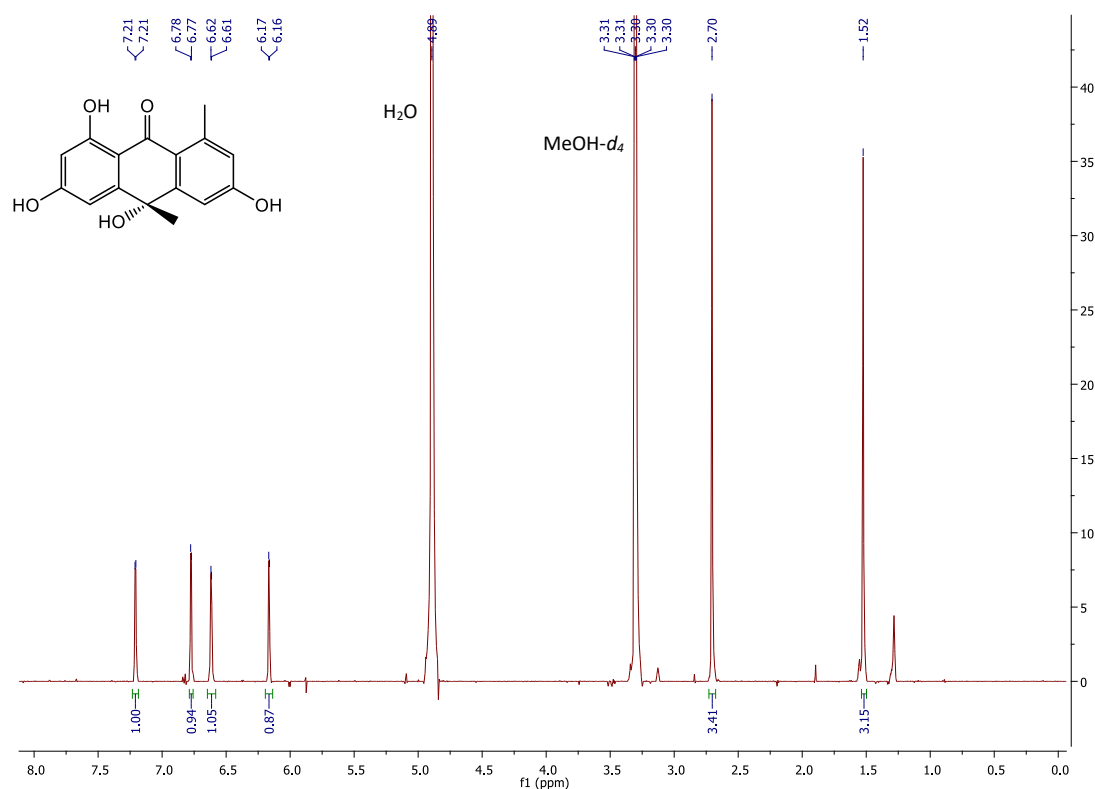


Compuesto 75. Sólido amorfo amarillento; $[\alpha]^{20}_D = +2.2^\circ$ (c 0.136, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 210, 242, 280, 350 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 17; HRESIMS m/z 287.0911 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5$, 287.0919).

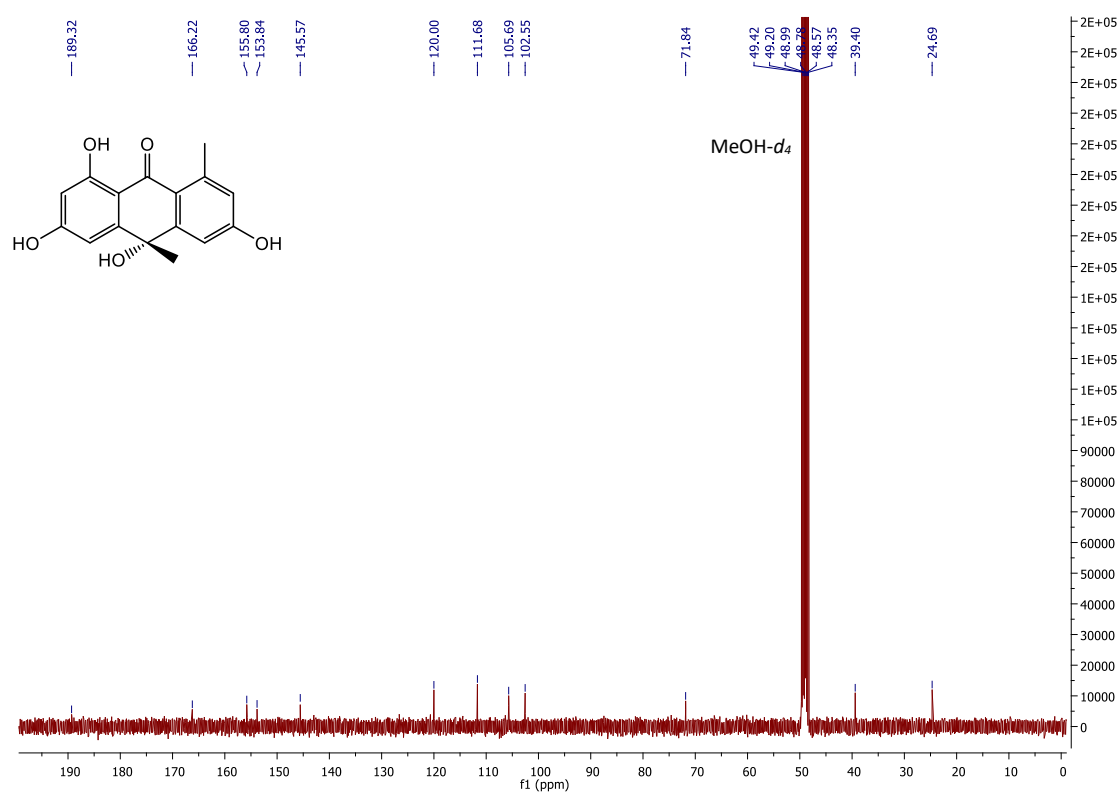


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **75** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

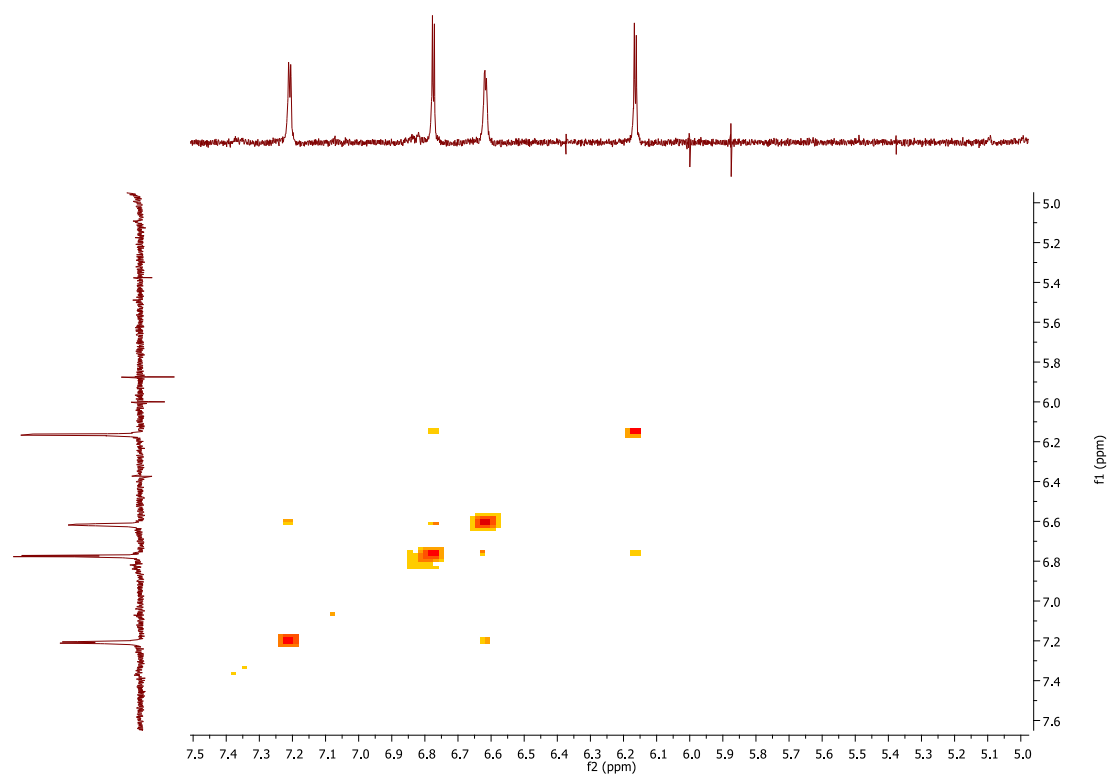
Espectro ^1H RMN (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **75**.



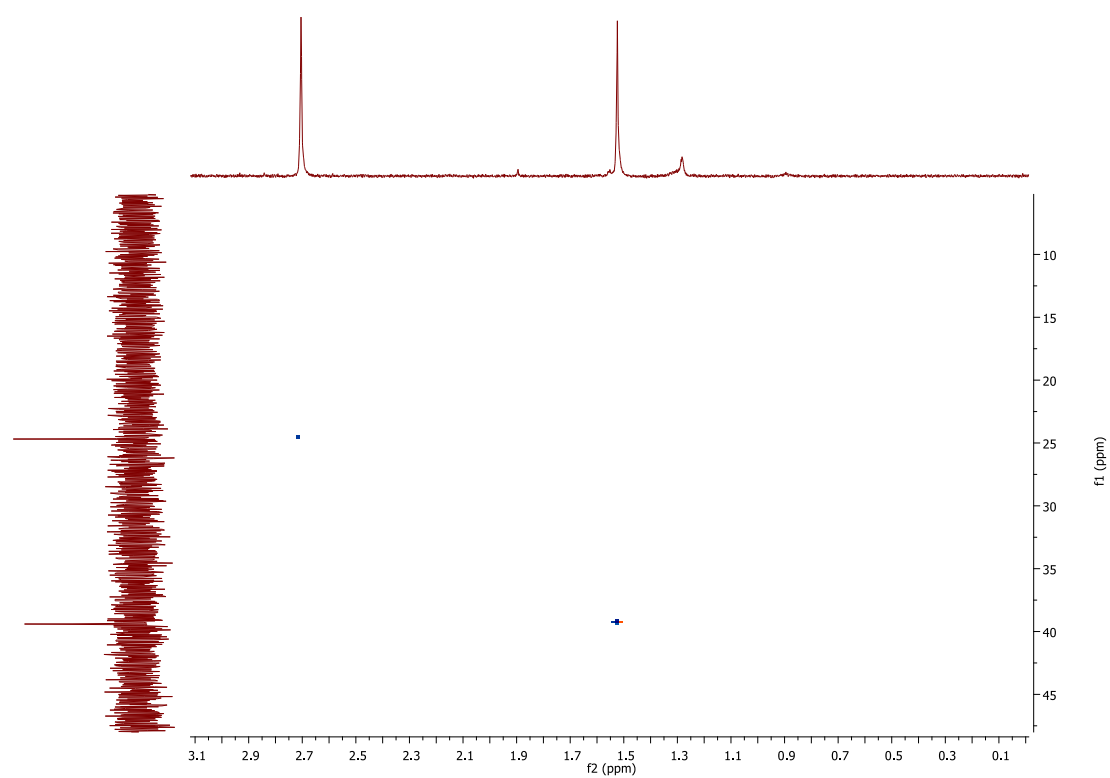
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **75**.



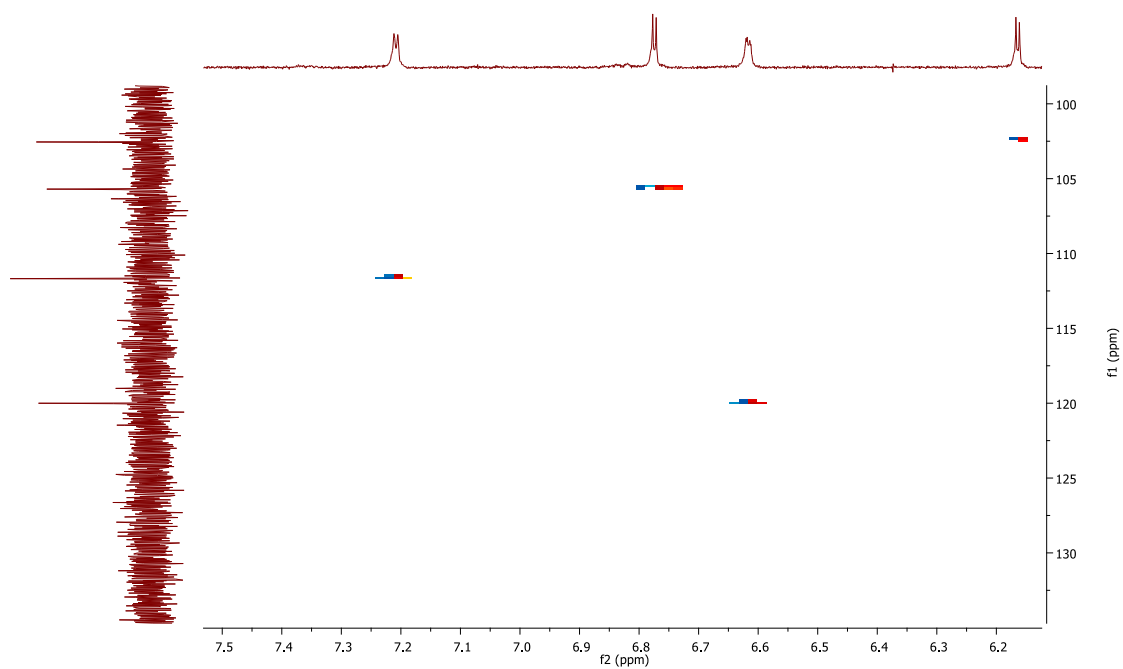
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **75**.



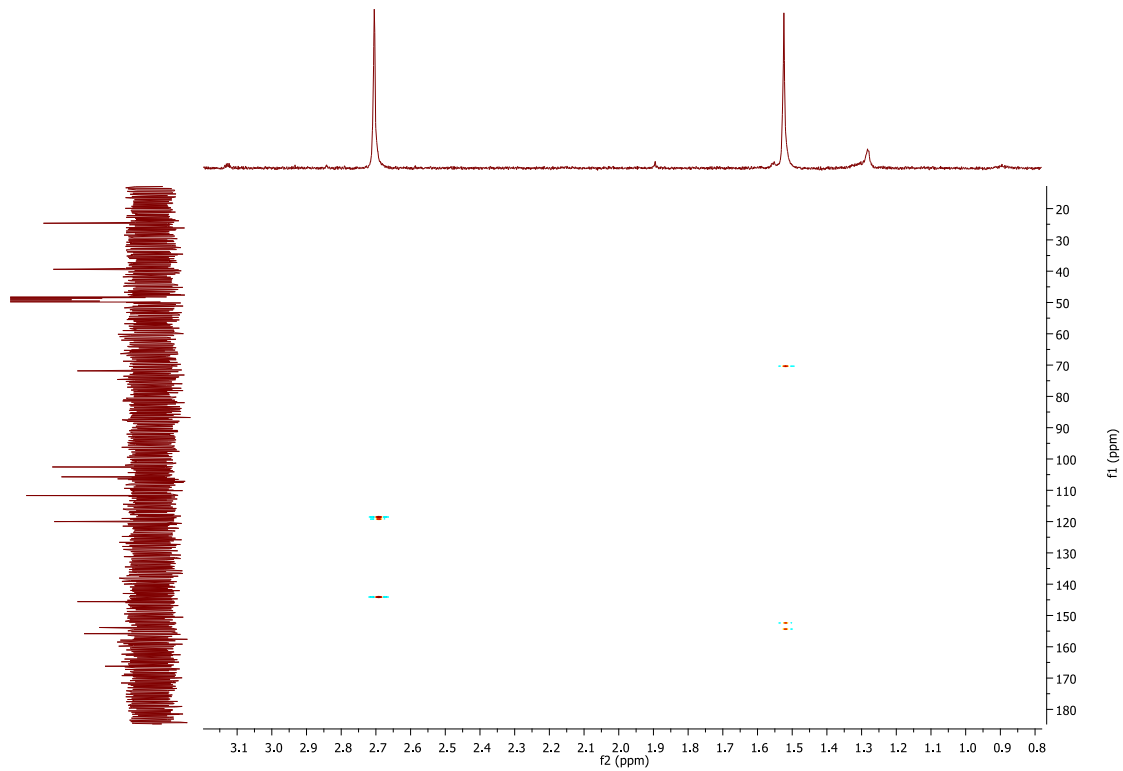
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) del compuesto **75**. (ampliación 1)



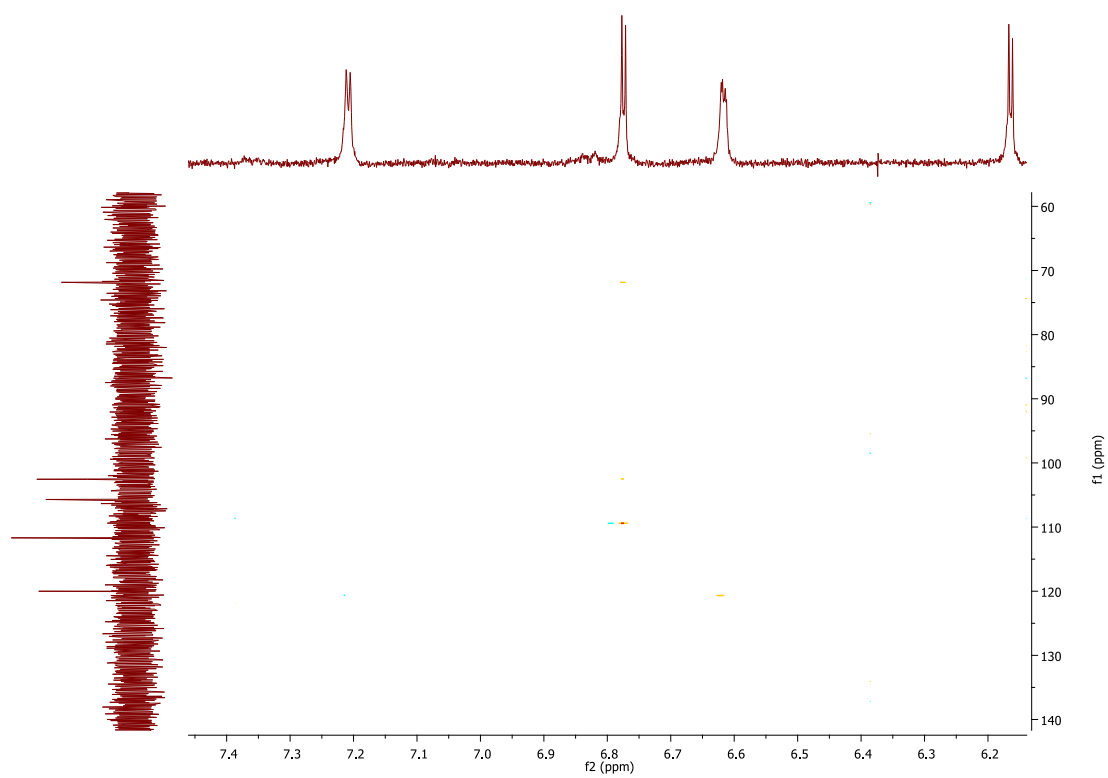
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, MeOH- d_4) del compuesto **75**. (ampliación 2)



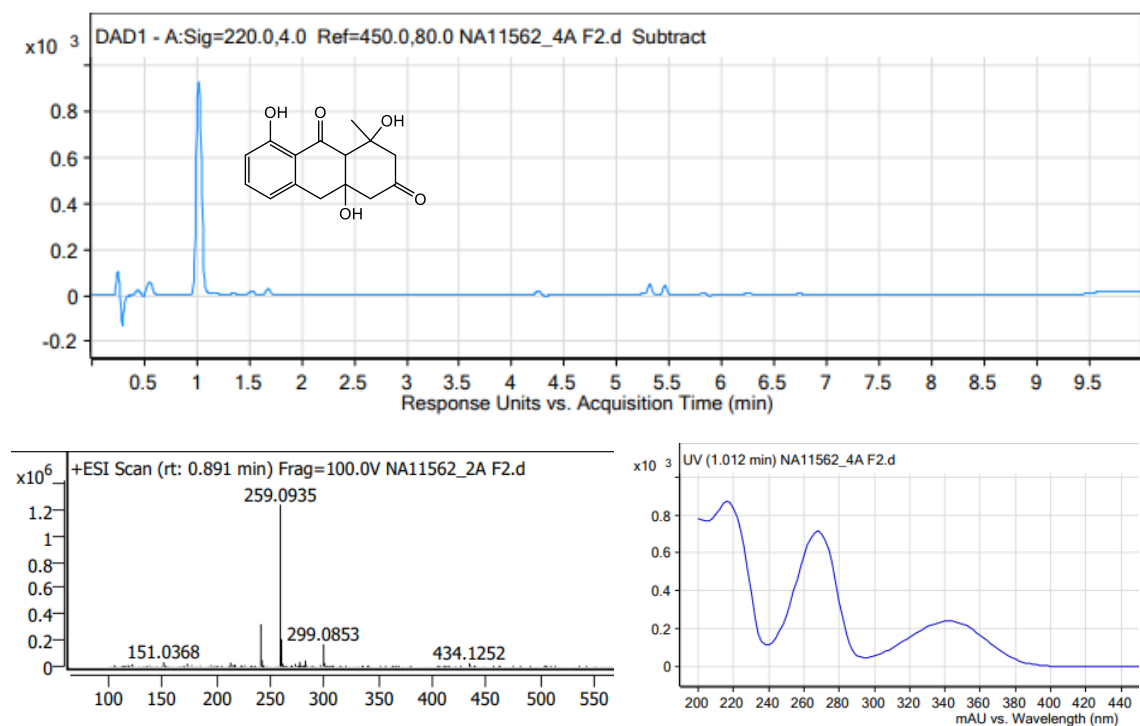
Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, MeOH- d_4) del compuesto **75**. (ampliación 1)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, MeOH- d_4) del compuesto **75**. (ampliación 2)

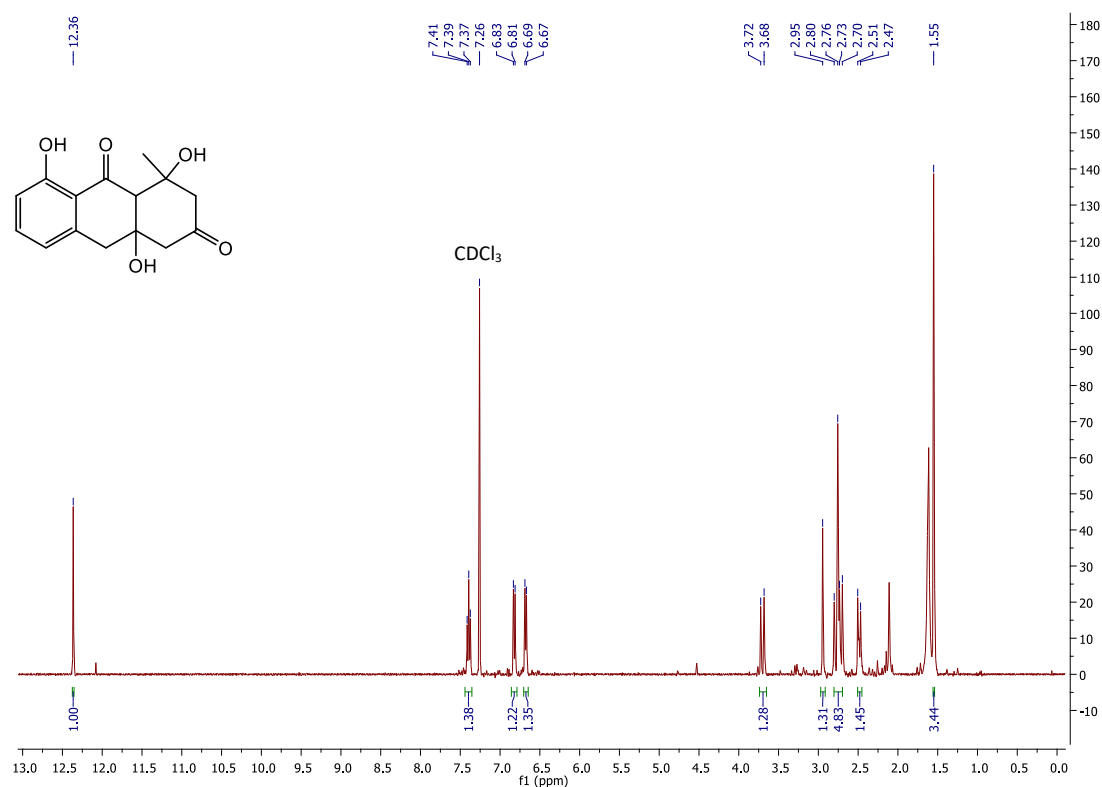


Compuesto 76. Sólido amorfo marrón oscuro; UV (MeOH) λ_{max} 218, 268, 344 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 18; HRESIMS m/z 299.0853 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$, 299.0895).

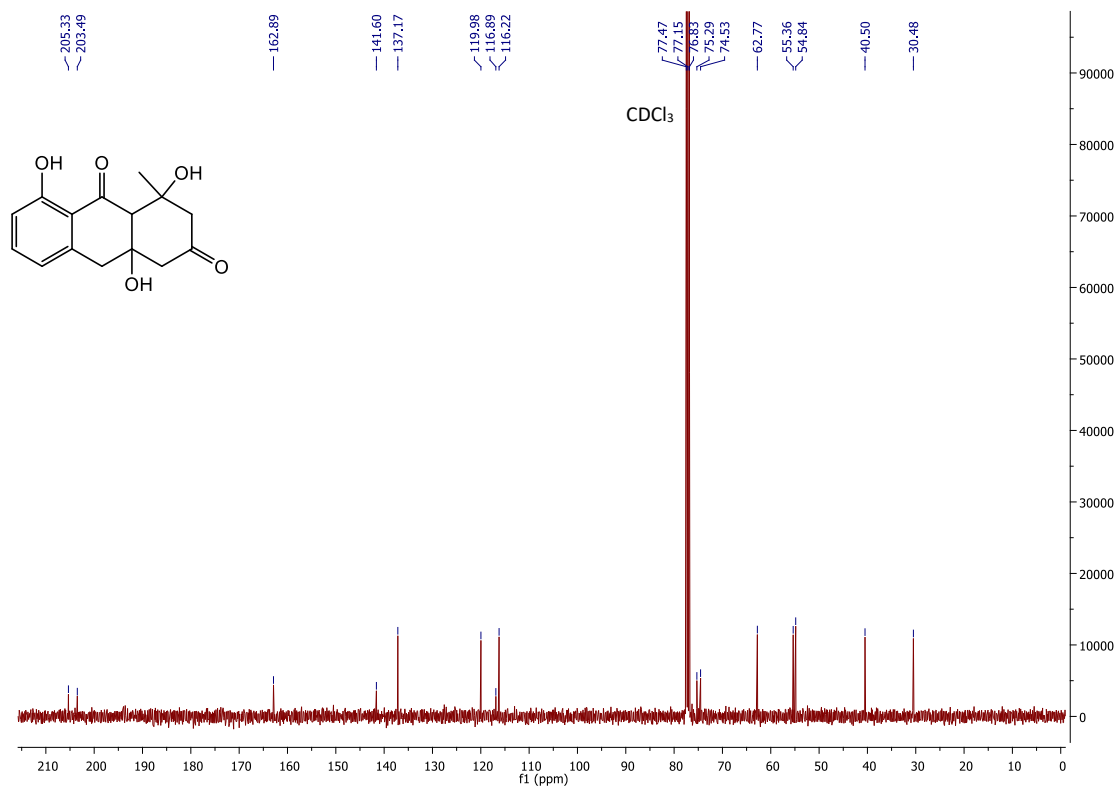


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **76** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

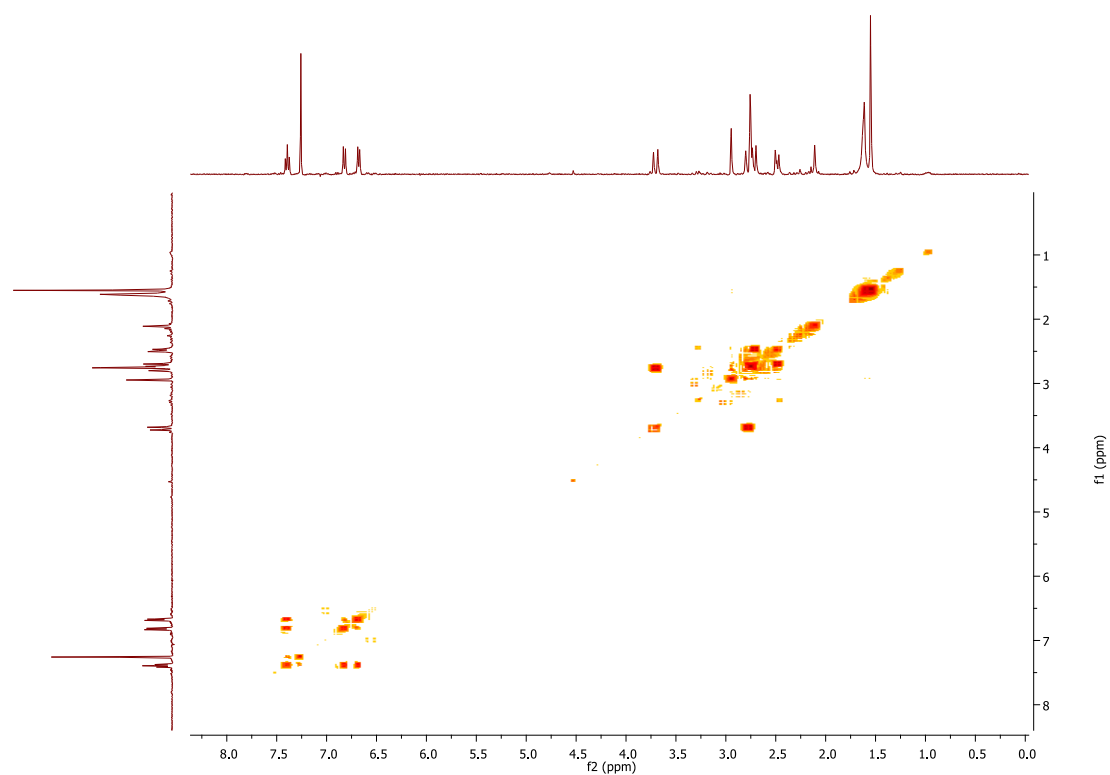
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **76**.



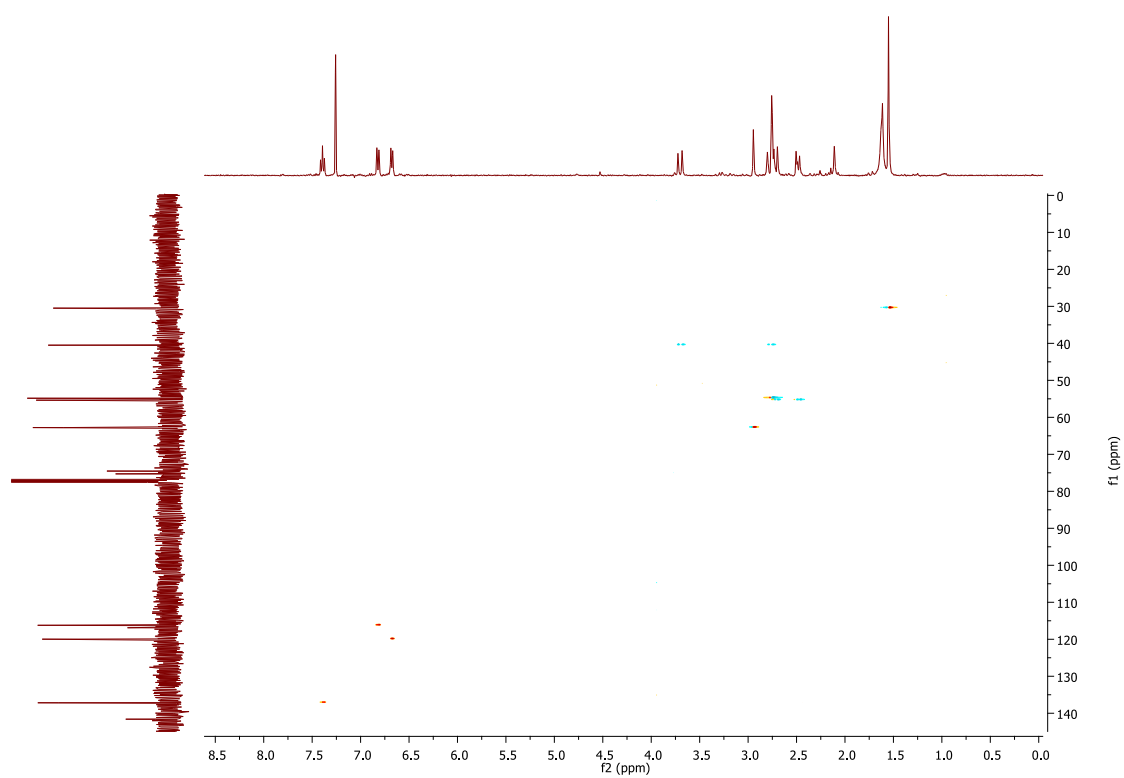
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **76**.



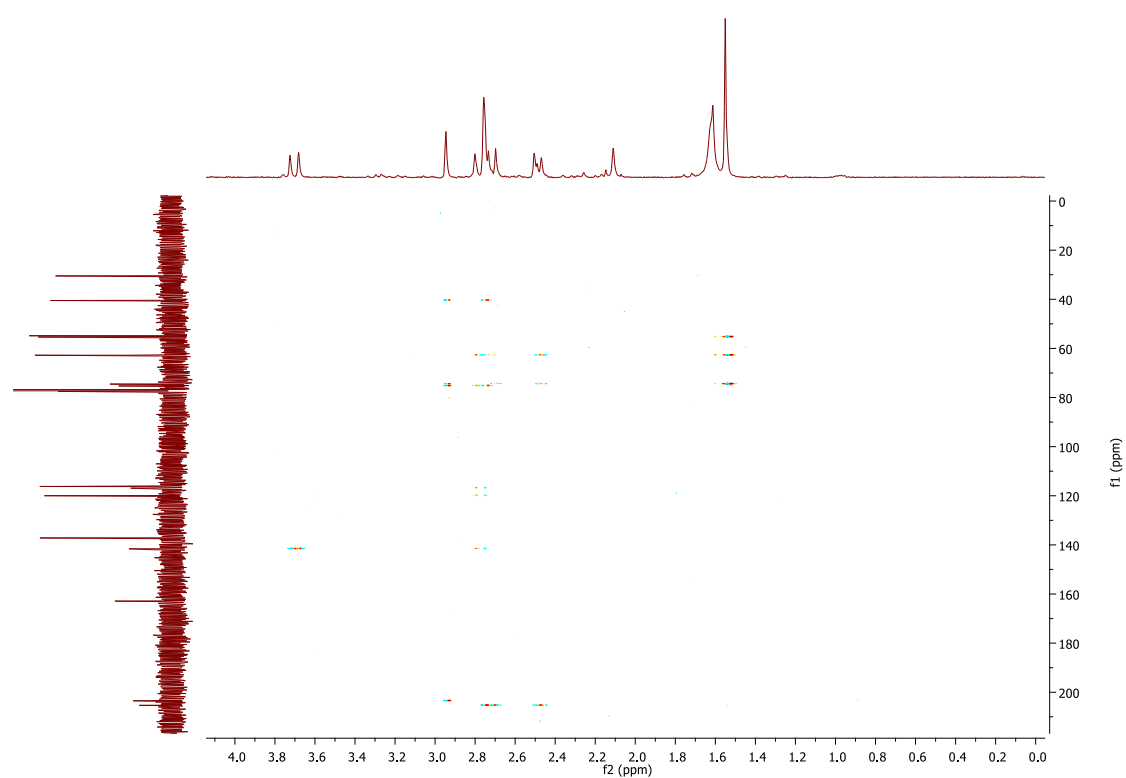
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **76**.



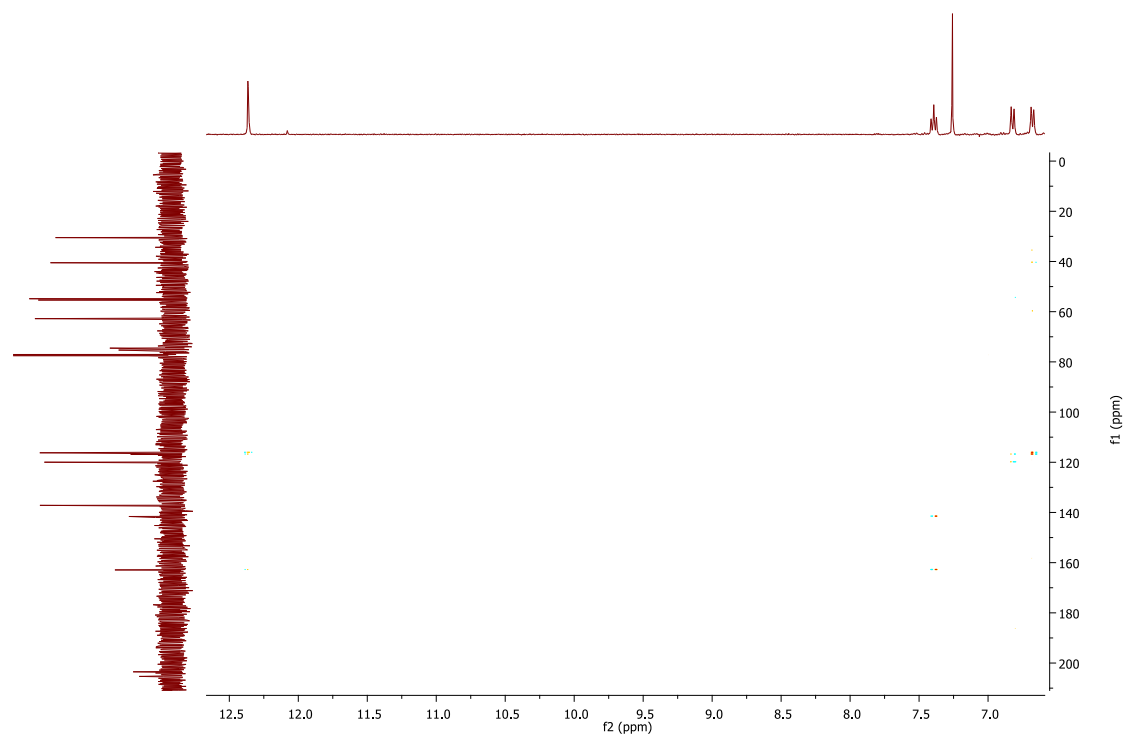
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **76**.



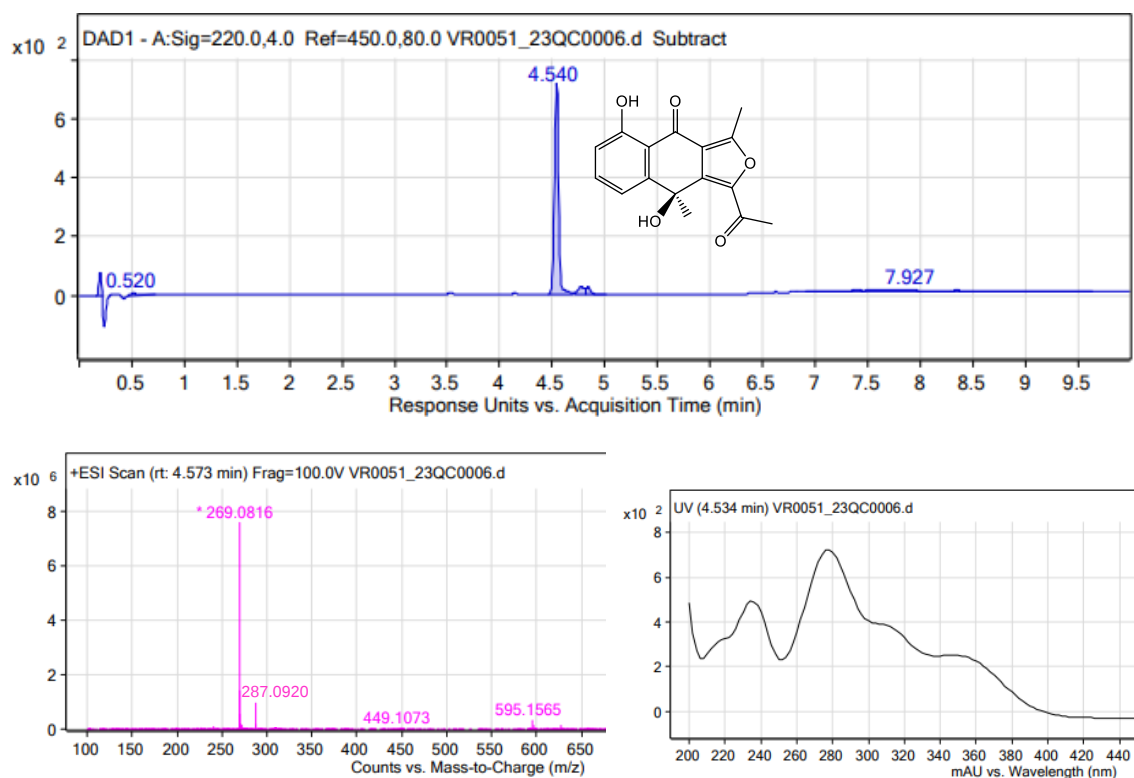
Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **76**. (ampliación 1)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **76**. (ampliación 2)

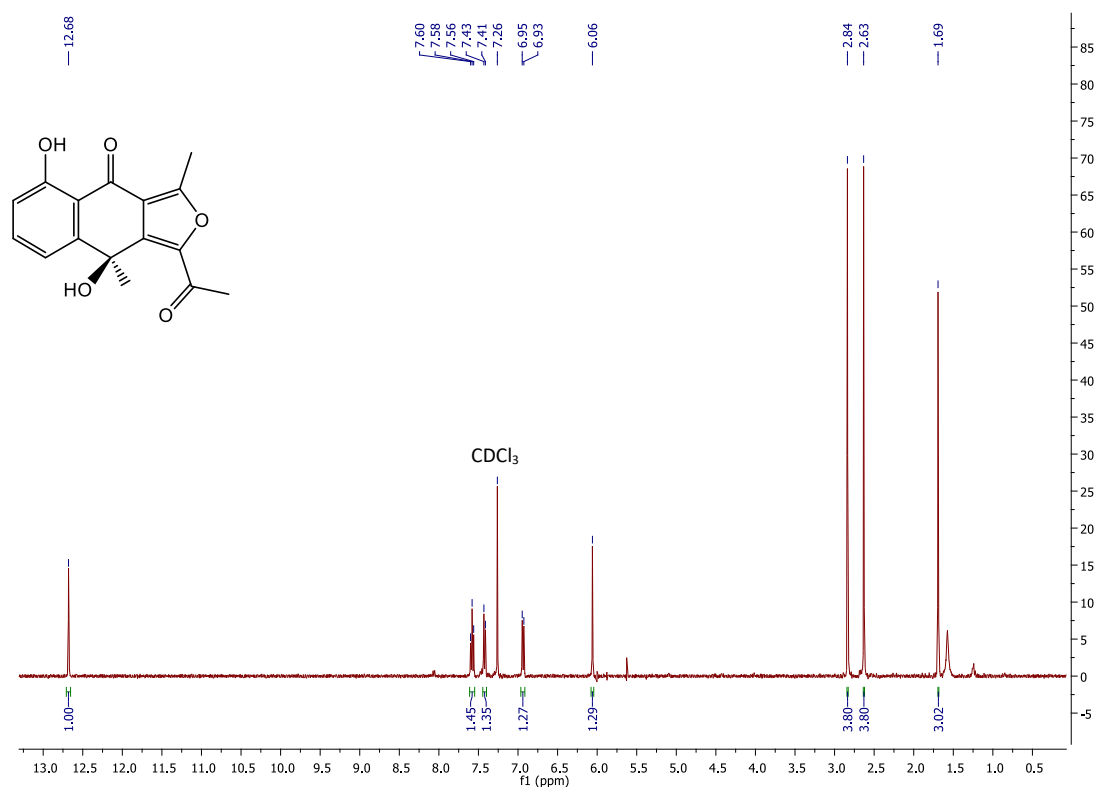


Compuesto 77. Sólido amorfo amarillento; $[\alpha]^{20}_D = +0.35^\circ$ (c 0.173, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 210, 232, 276, 344 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 19; HRESIMS m/z 287.0920 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5$, 287.0919).

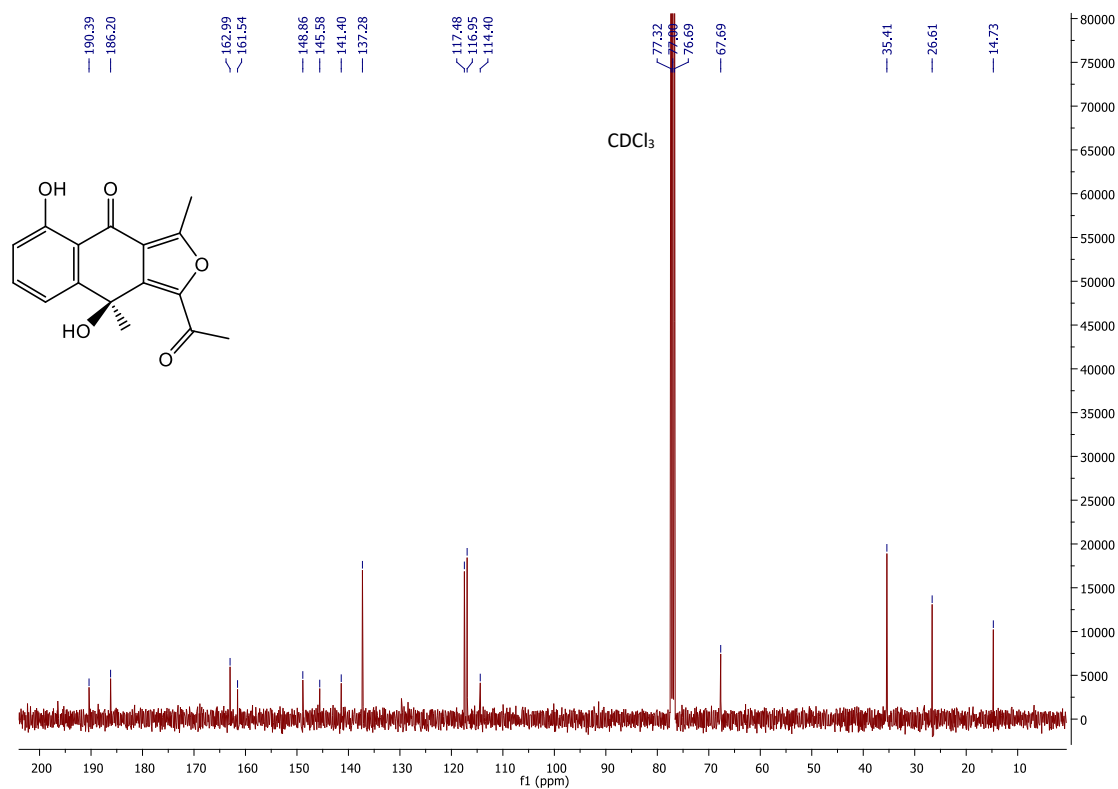


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **77** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

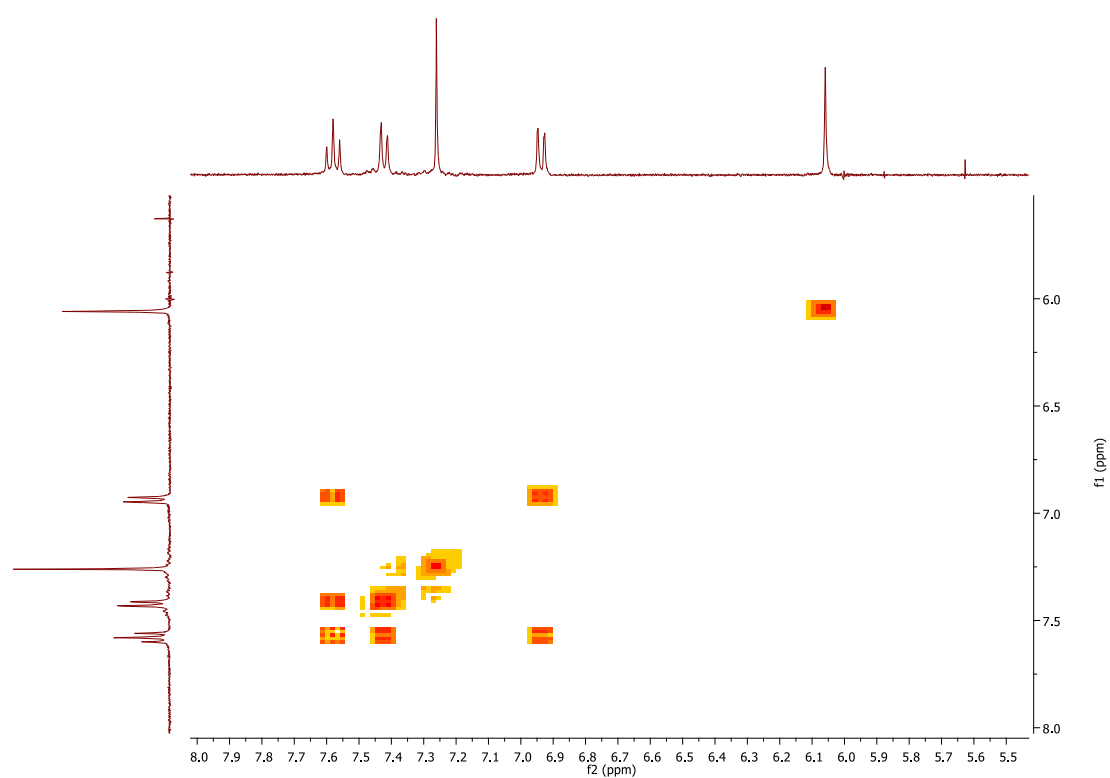
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **77**.



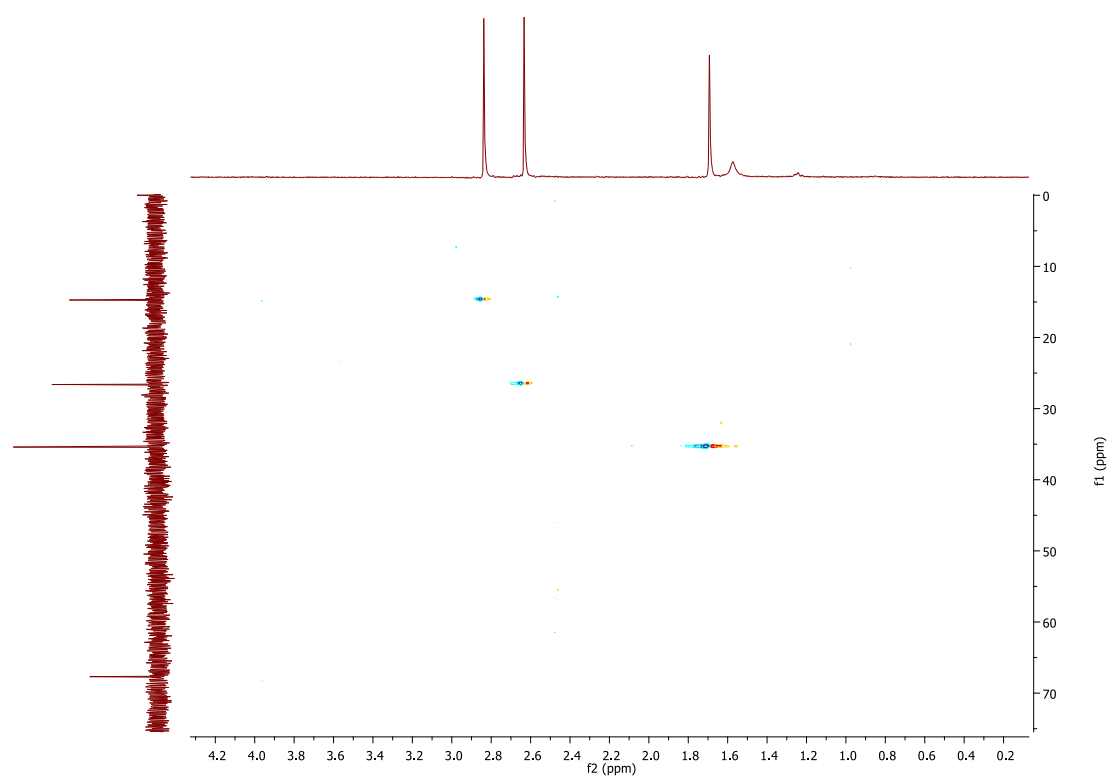
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **77**.



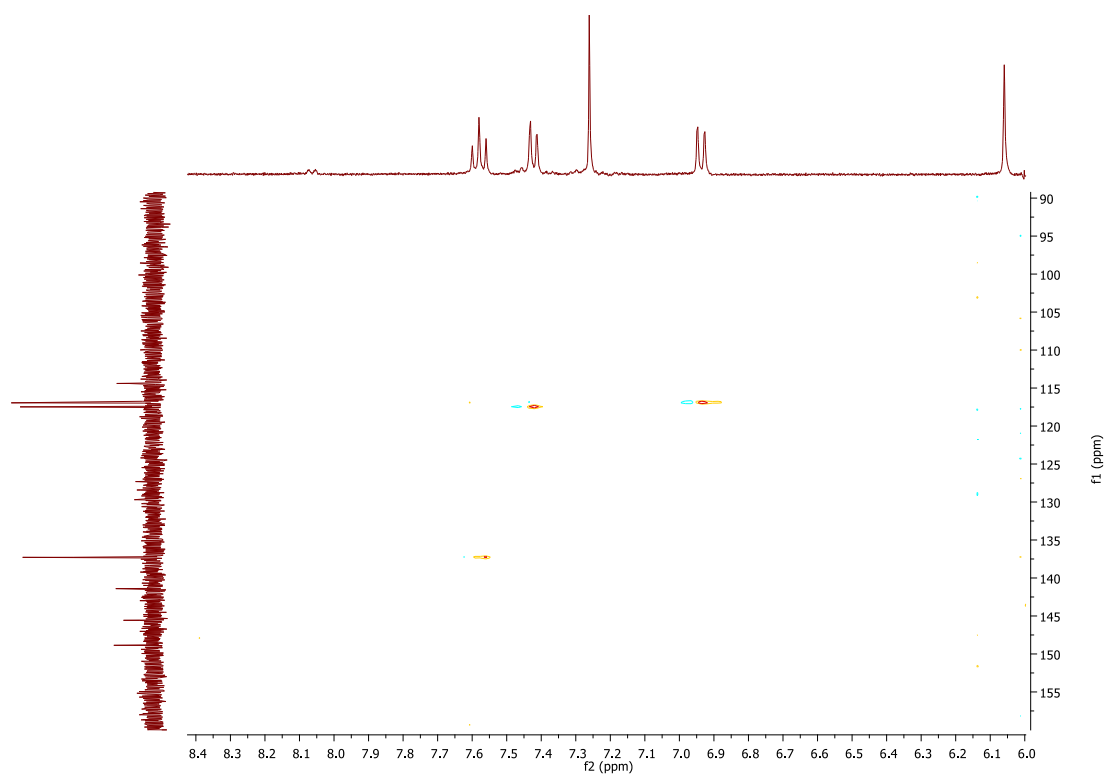
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **77**.



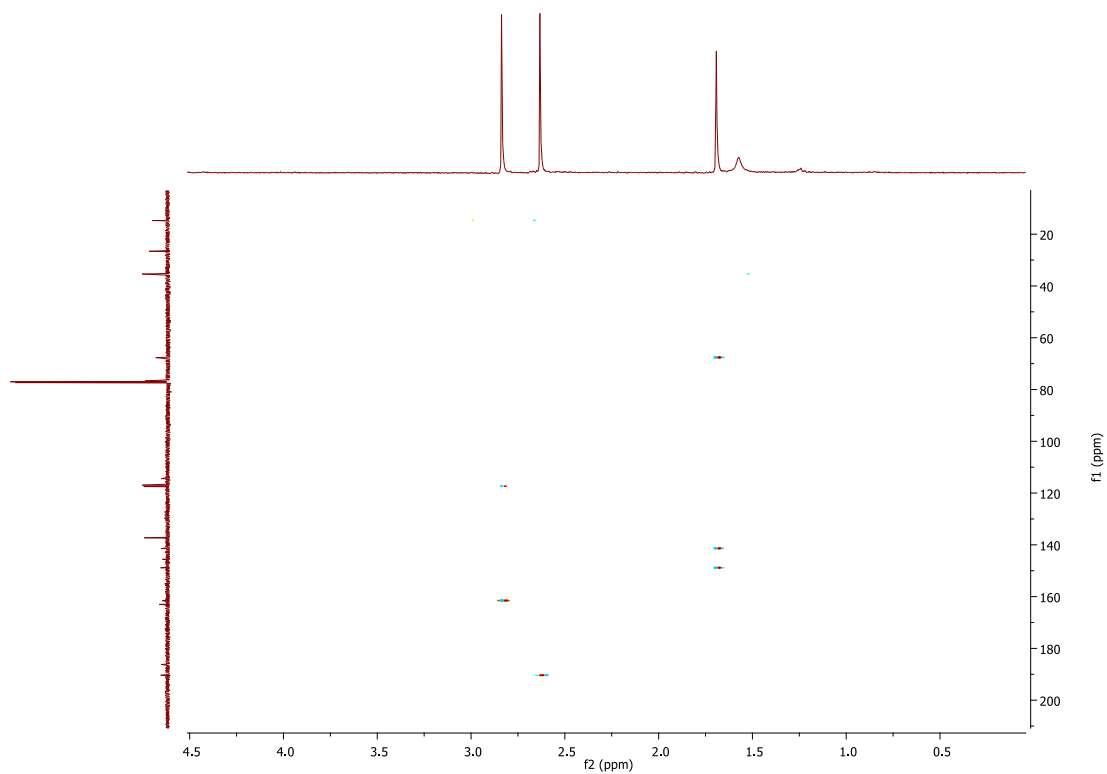
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **77**. (ampliación 1)



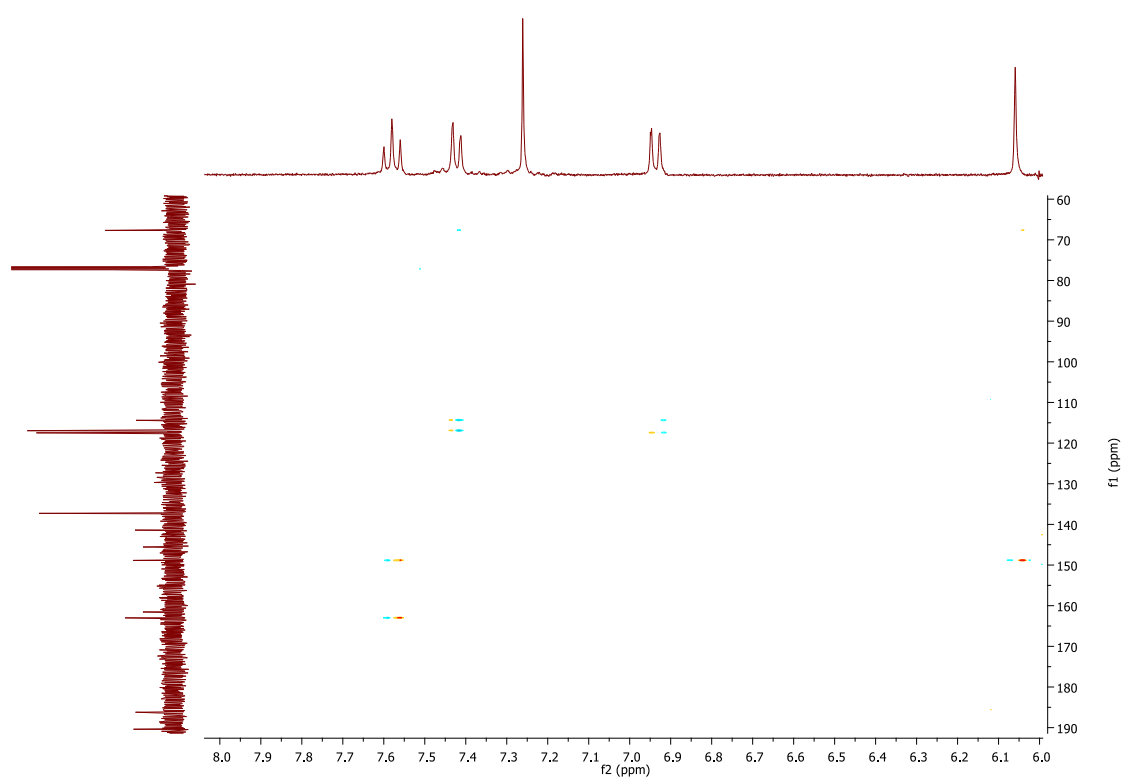
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **77**. (ampliación 2)



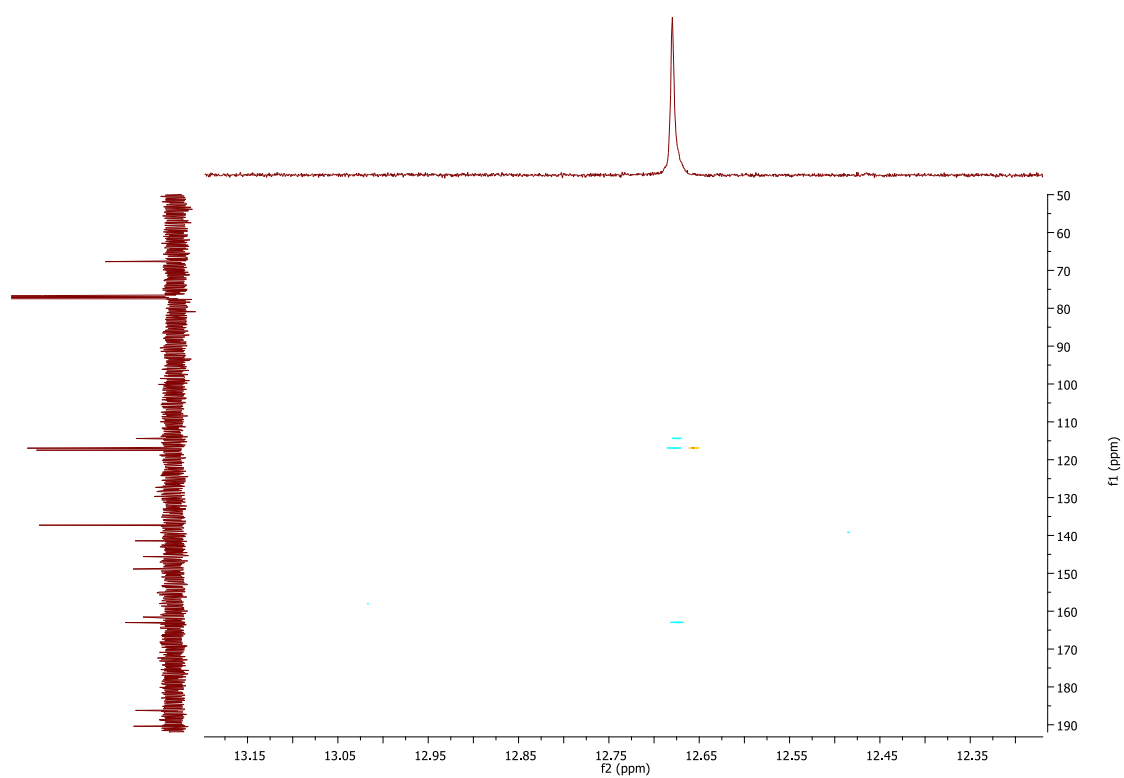
Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **77**. (ampliación 1)



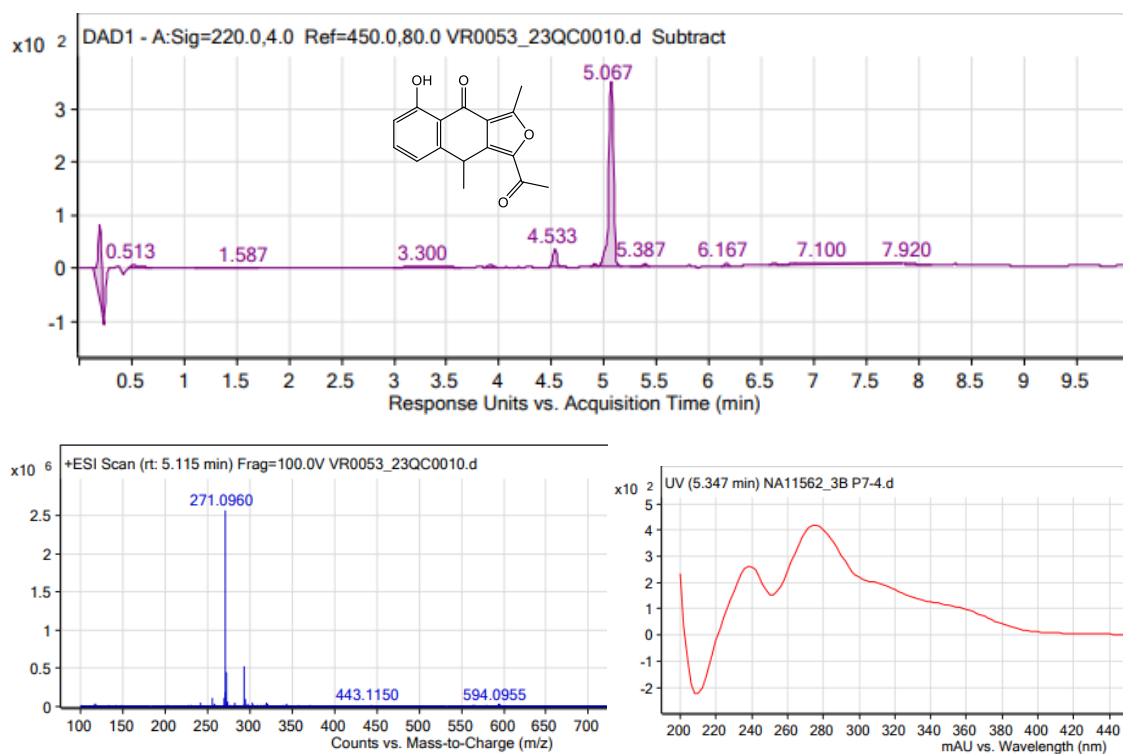
Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **77**. (ampliación 2)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **77**. (ampliación 3)

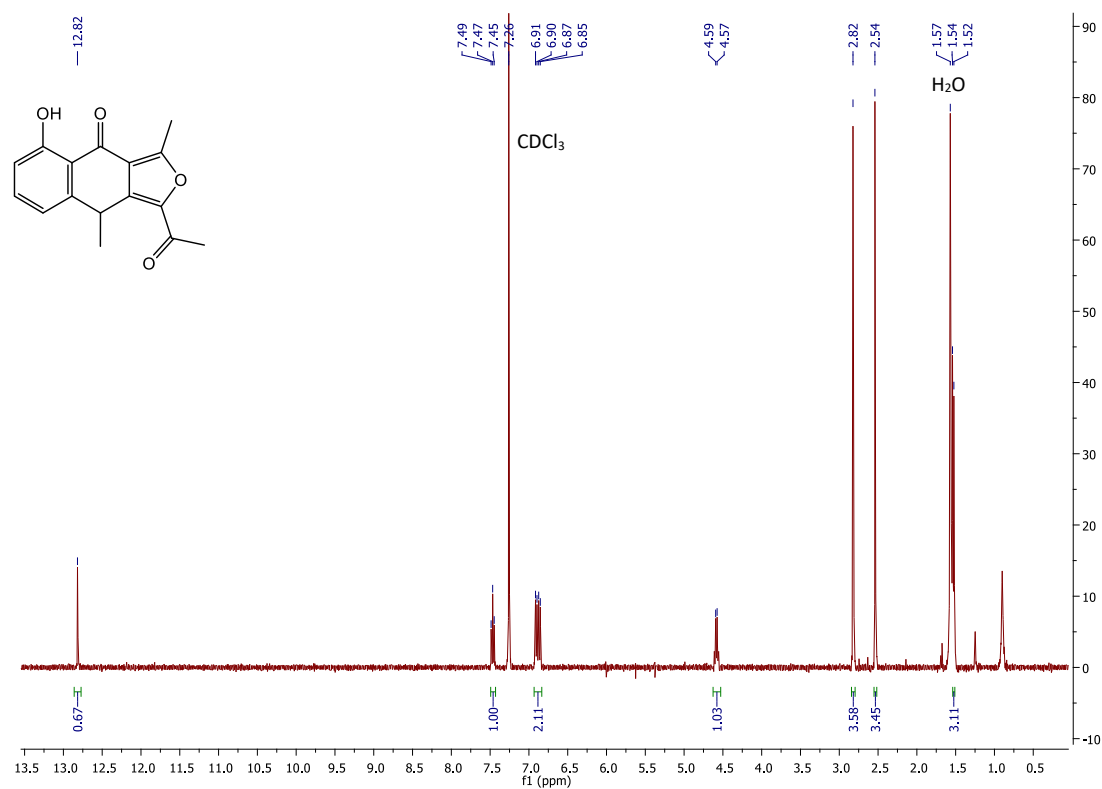


Compuesto 78. Sólido amorfo blanquecino; UV (MeOH) λ_{max} 218, 234, 274 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 19; HRESIMS m/z 271.0960 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4$, 271.0970).

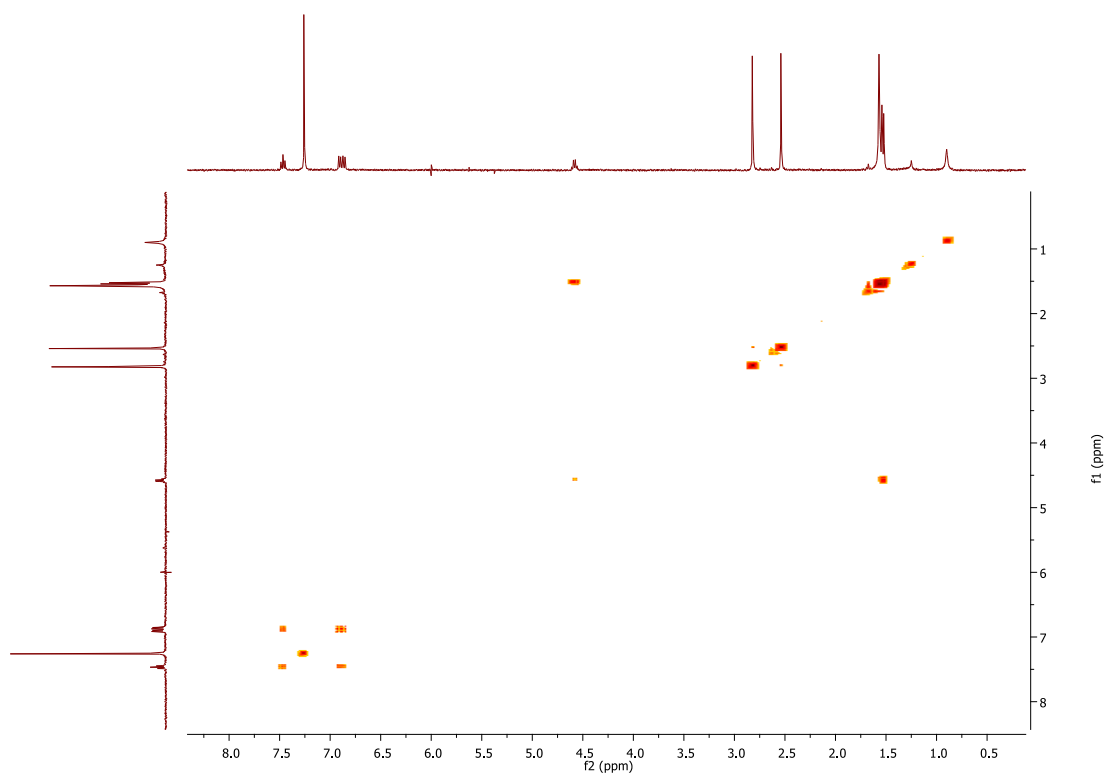


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **78** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

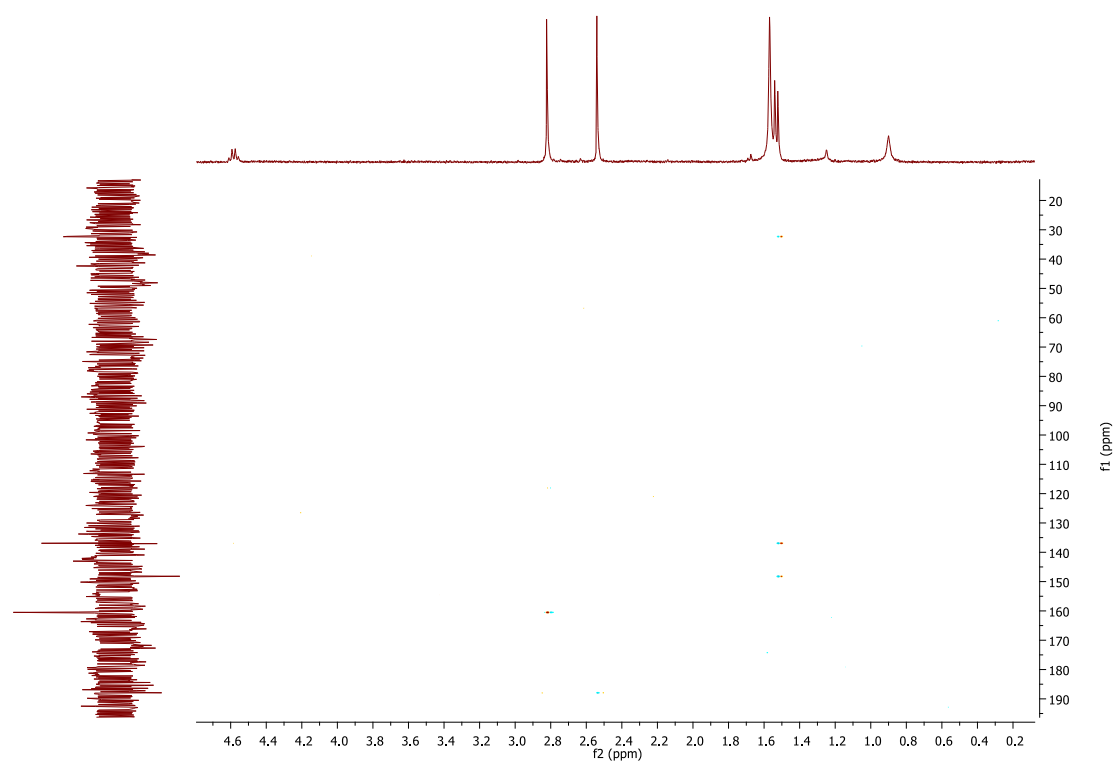
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **78**.



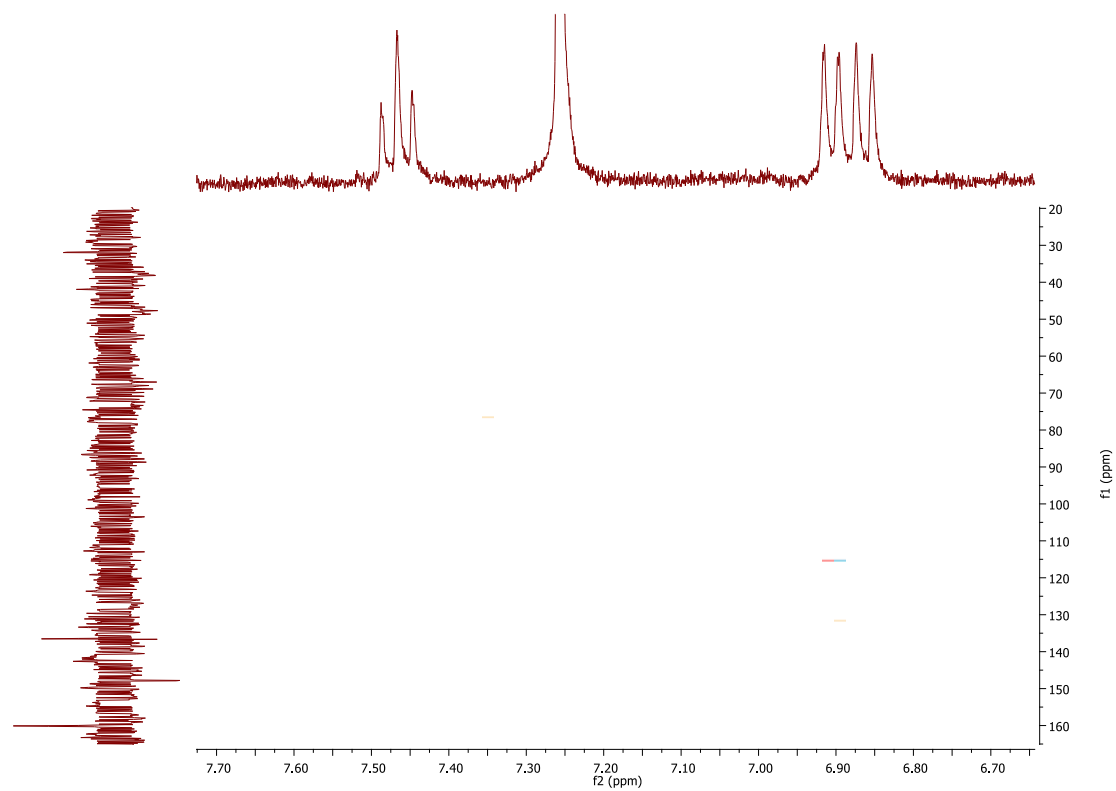
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **78**.



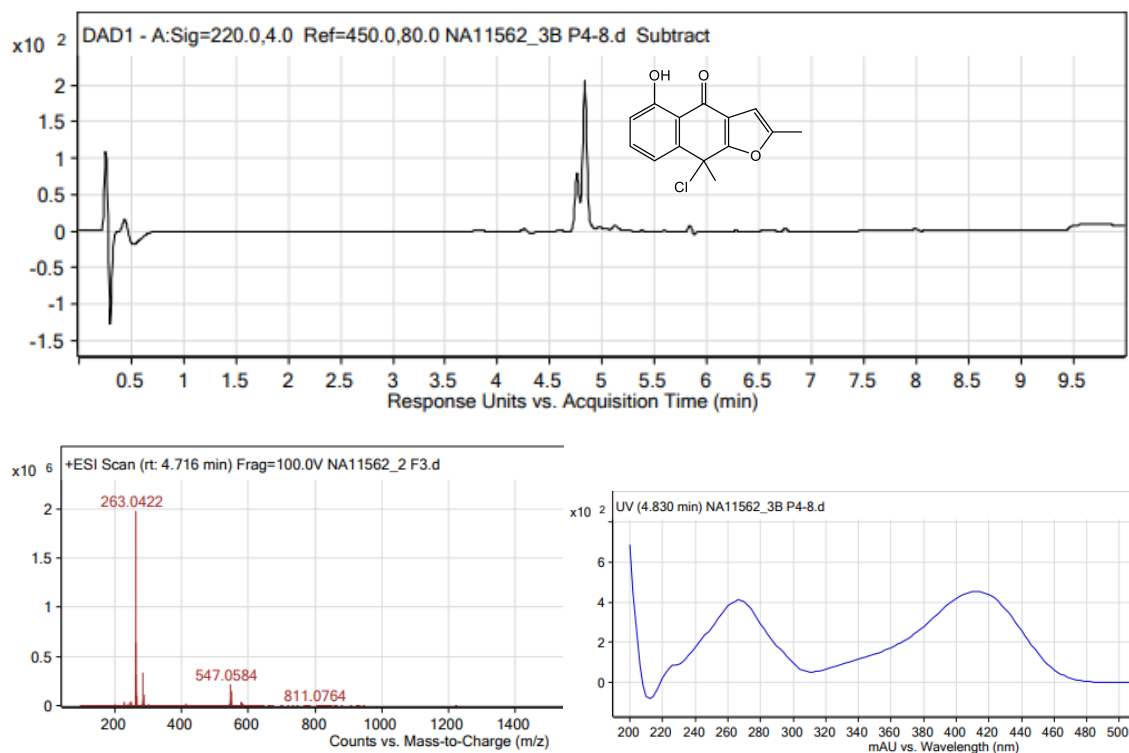
Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **78**. (ampliación 1)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **78**. (ampliación 2)

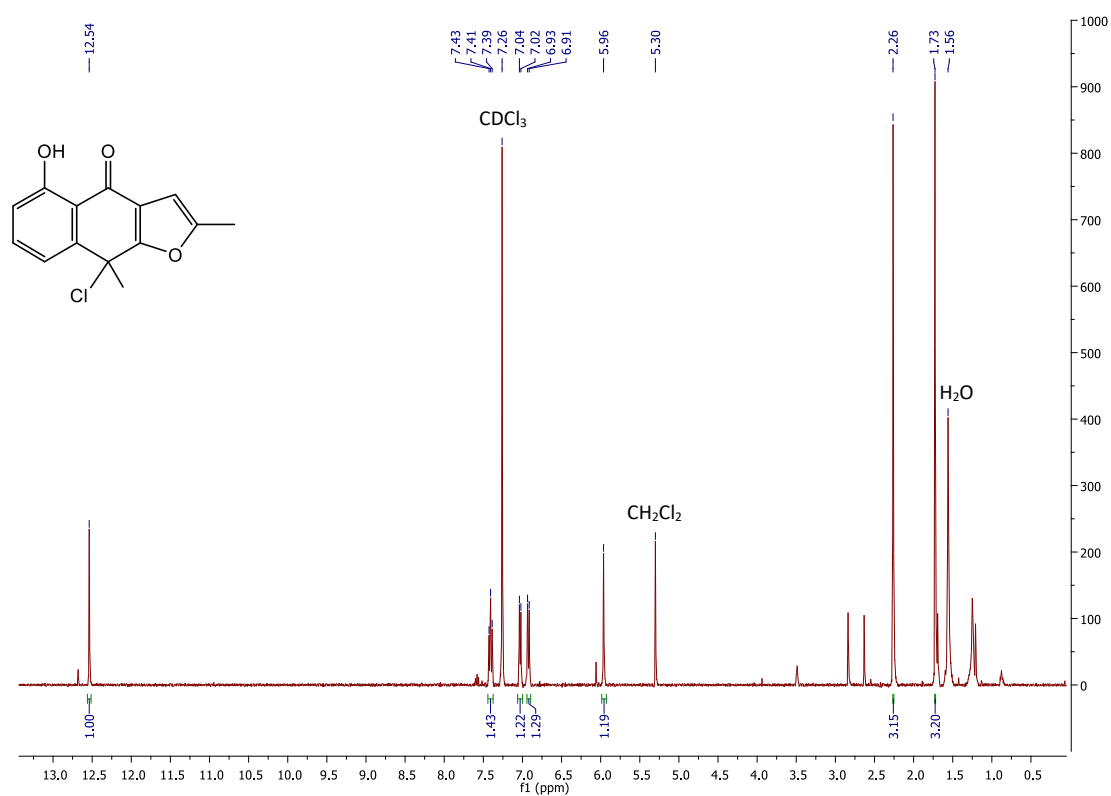


Compuesto 79. Sólido amorfo amarillo; UV (MeOH) λ_{max} 265, 410 nm; datos de RMN ^1H y ^{13}C véase tabla 20; HRESIMS m/z 263.0422 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClO}_3$, 263.0475).

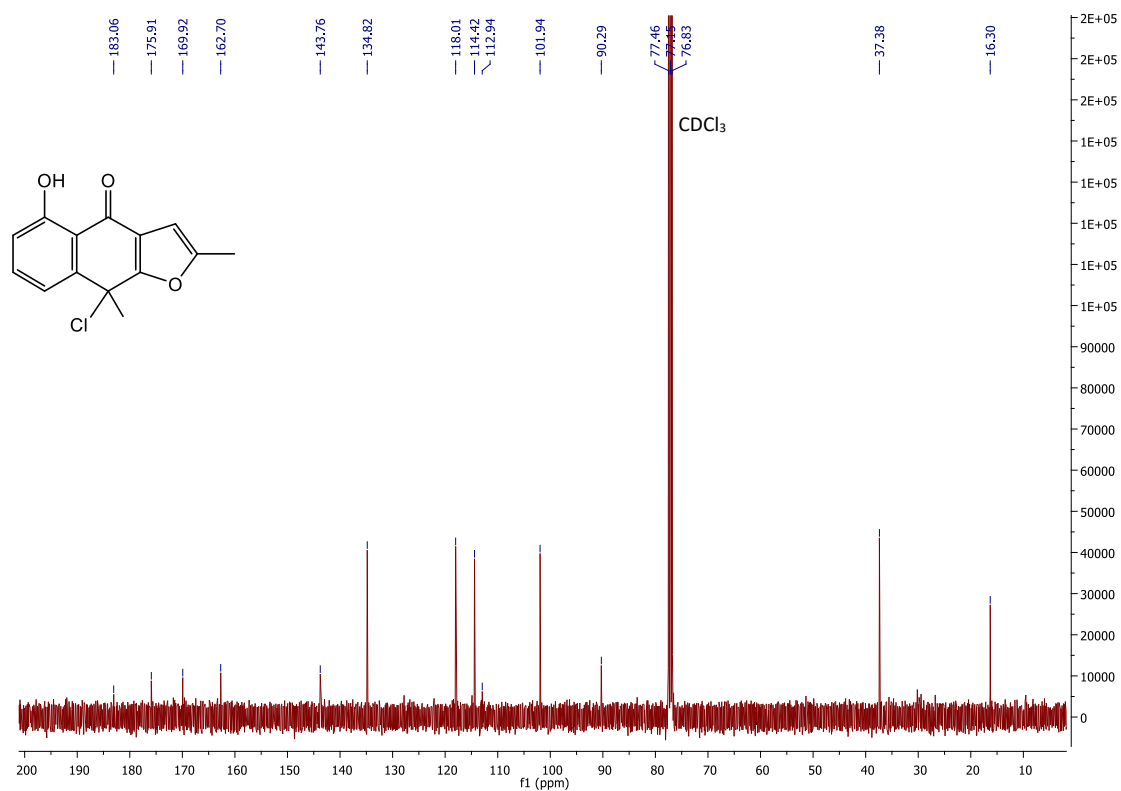


Cromatograma DAD a 220nm y espectros HRESIMS y UV del compuesto **79** aislado del actinomiceto *S. griseorubiginosus* en medio de cultivo líquido FA-1 junto con la adición del inductor químico γ -butirolactona.

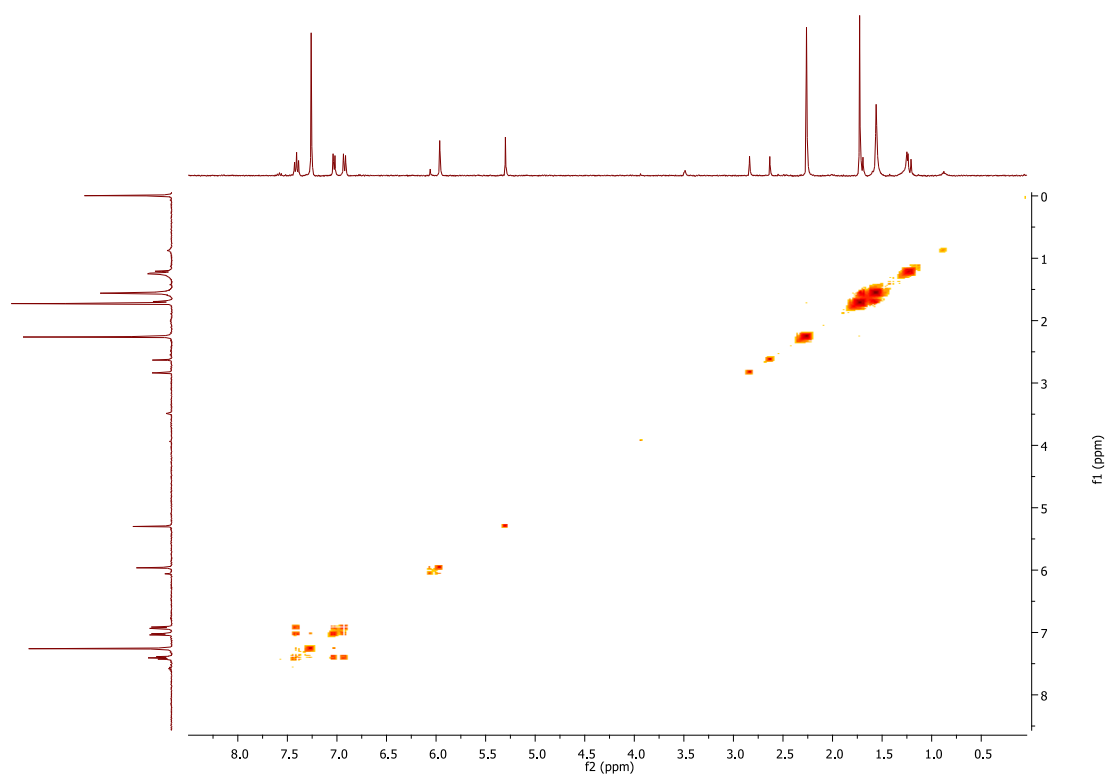
Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **79**.



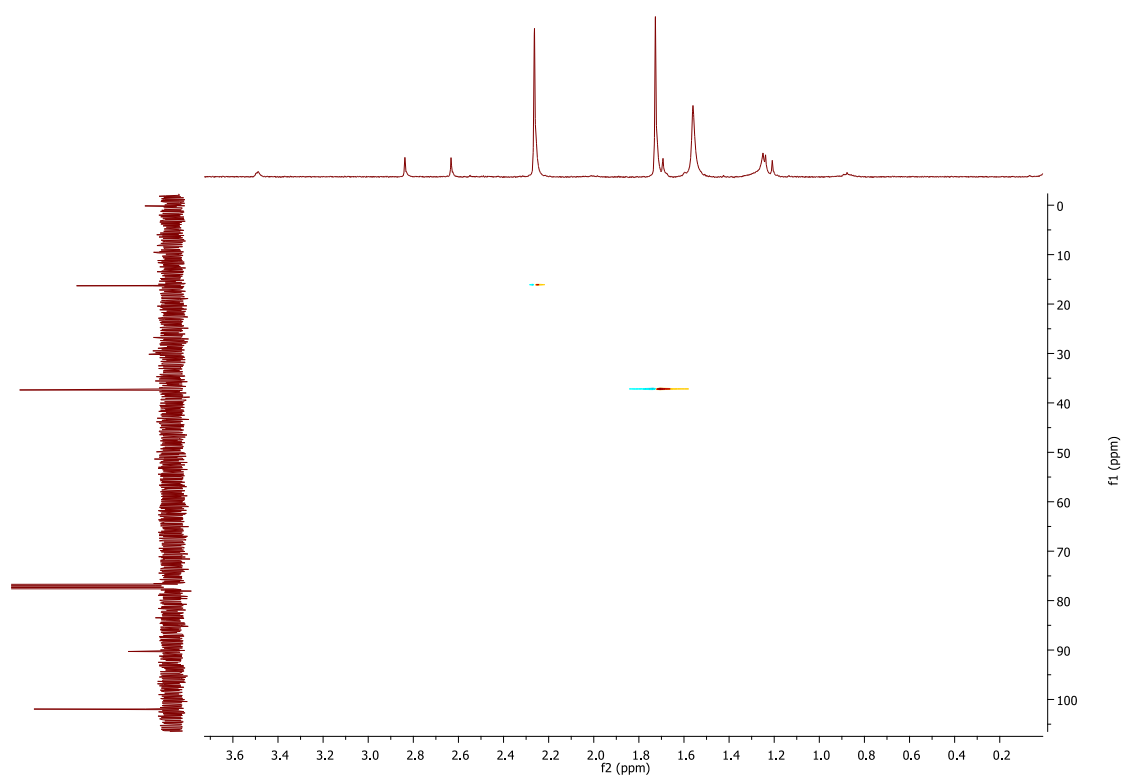
Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **79**.



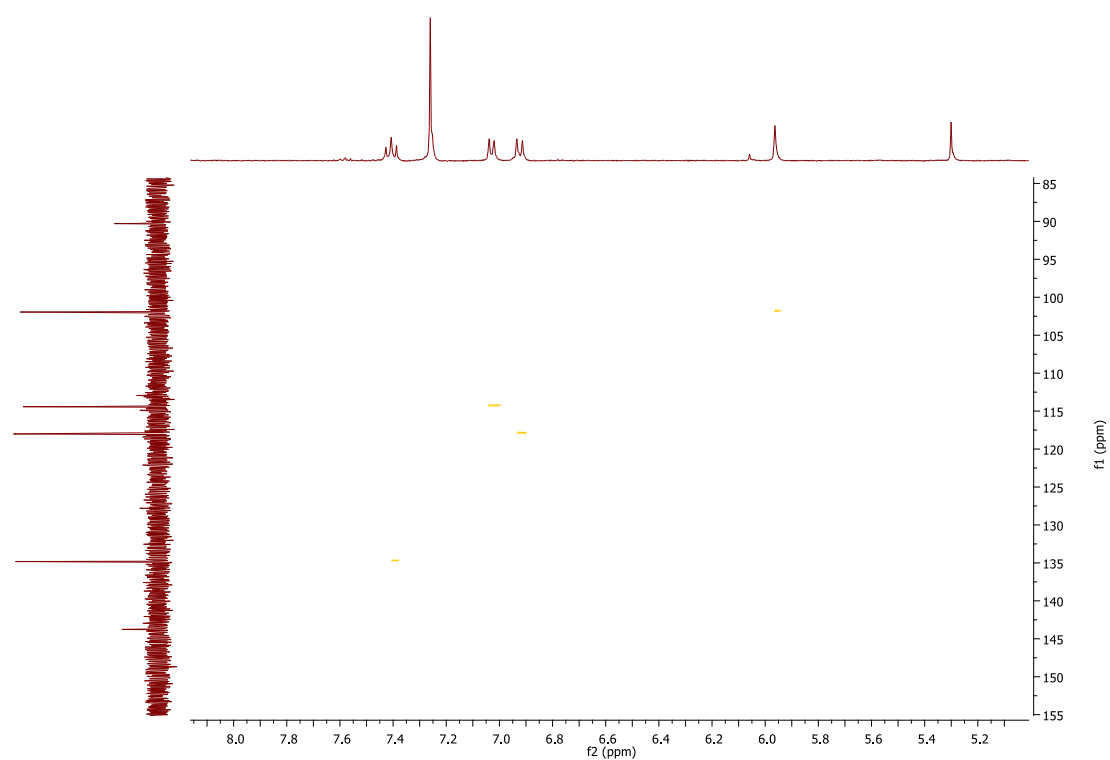
Espectro ^1H - ^1H gCOSY (400 MHz, CDCl_3) del compuesto **79**.



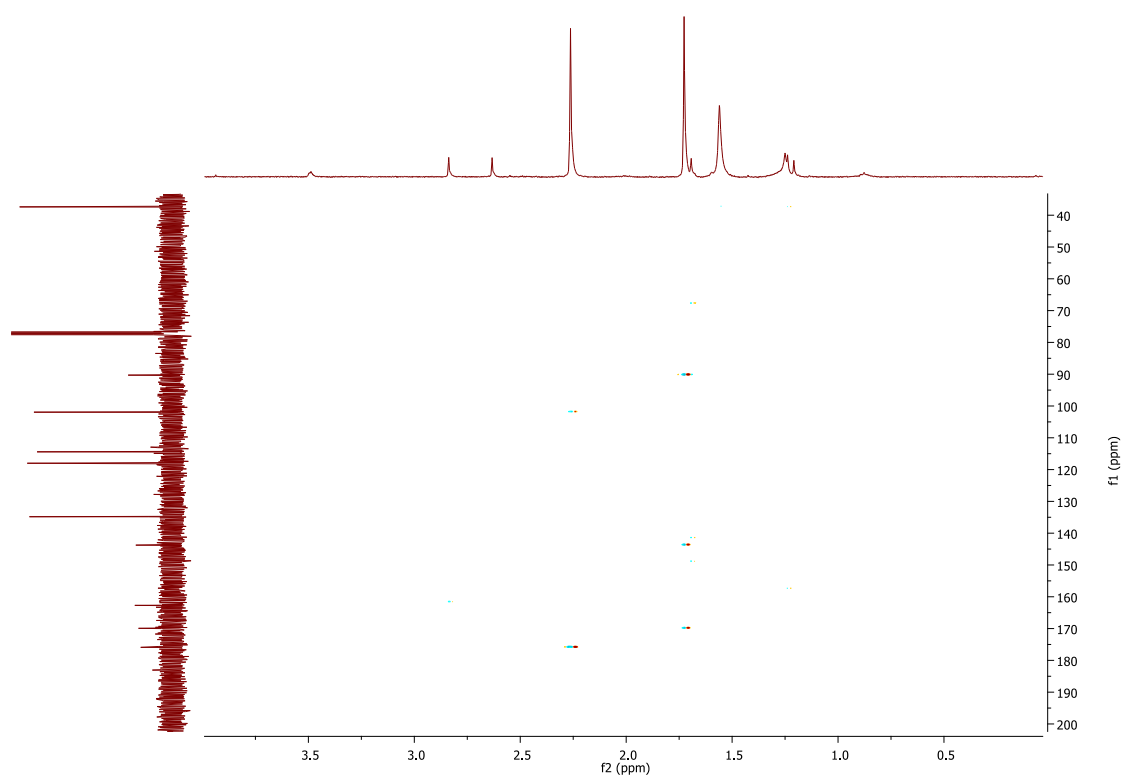
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **79**. (ampliación 1)



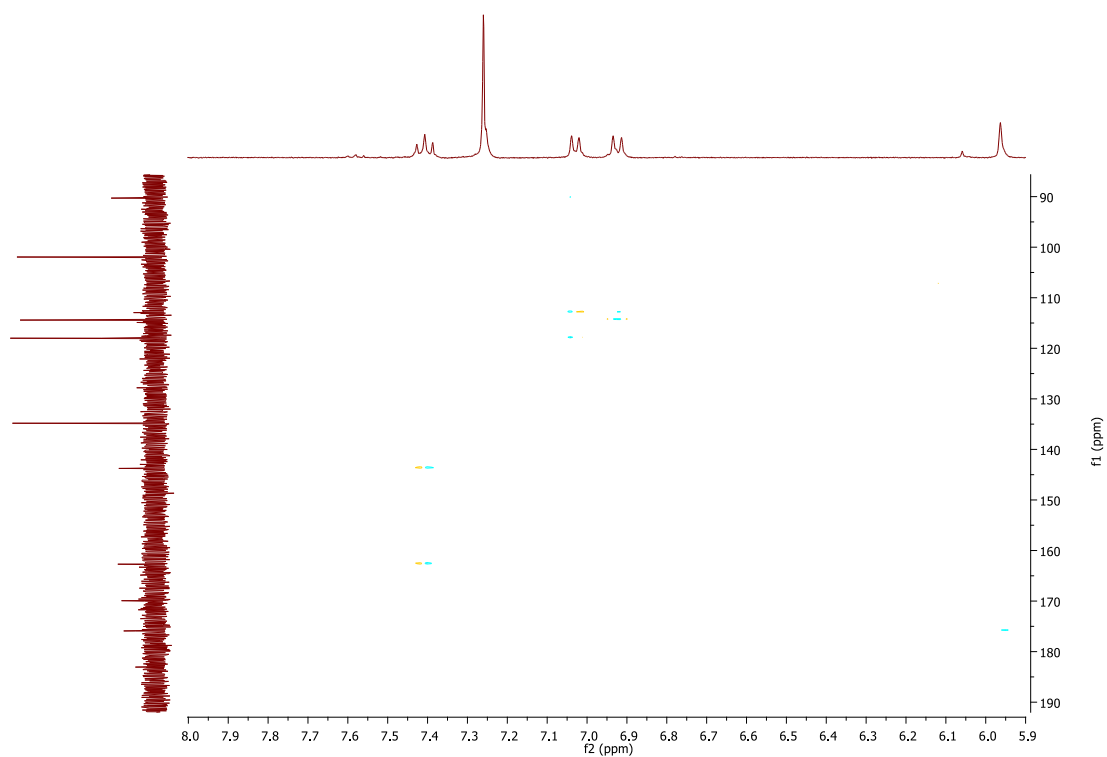
Espectro gHSQC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **79**. (ampliación 2)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl₃) del compuesto **79**. (ampliación 1)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **79**. (ampliación 2)



Espectro gHMBC (400 MHz y 100 MHz, CDCl_3) del compuesto **79**. (ampliación 3)

