**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**TESIS**

# HONGOS ENDÓFITOS DE *Larrea tridentata* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y CITOTÓXICAS

**QUE PRESENTA**

**Q.F.B. GUSTAVO SAUCEDO MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

**ENERO 2025**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

# HONGOS ENDÓFITOS DE *Larrea tridentata* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y CITOTÓXICAS

**Por**

**Q.F.B. GUSTAVO SAUCEDO MARTÍNEZ**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

**Lugar de Realización del Proyecto:**

**Laboratorios de Química Farmacéutica y Biotecnología I, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.**

**Laboratorio Microbiología Molecular, Facultad de Medicina, UANL,**

**Laboratorios 1-3 y 1-4, Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM**

**Enero, 2025**

Aprobación de la tesis: HONGOS ENDÓFITOS DE *Larrea tridentata* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y CITOTOXICAS

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Presidente

Dra. Rosario González González
Secretario

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez
Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de estudios de posgrado

Revisión y aprobación de tesis: HONGOS ENDÓFITOS DE *Larrea tridentata* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y CITOTOXICAS

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Directora de tesis

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Co-directora de tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Comité tutorial

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez
Comité tutorial

Dra. María del Rosario González González
Comité tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de estudios de posgrado

## AGRADECIMIENTOS

**CONAHCYT**
Por la beca de manutención 1231595 que percibí durante la realización de este proyecto.

**Programa de Apoyo a la Ciencia, Tecnología e Innovación ProACTI UANL**
Por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo parte del presente trabajo a través del proyecto No. 28-BQ-2023

**Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**
Por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo parte del presente trabajo a través del proyecto IN215623.

**Dra. María del Rayo Camacho Corona**
Laboratorio de Química Farmacéutica, UANL
Por la asesoría, infraestructura, paciencia y apoyo para la realización de este proyecto.

**Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava**
Departamento de Productos Naturales, UNAM
Por la asesoría a distancia y después presencial, por el material didáctico, la infraestructura, paciencia y apoyo para realizar este proyecto.

Comité tutorial
**Dr. Edgar Abraham García Zepeda**
**Dr. Adrián Martínez Meléndez**
**Dra. María del Rosario González González**
Facultad de Ciencias Químicas, UANL
Por su guía, observaciones, sugerencias y asesoría durante las reuniones tutoriales.

**Biól. Carlos Velazco**
Por colectar el material vegetal de *L. tridentata*.

**Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio**
Laboratorio de Biotecnología, UANL
Por la infraestructura para realizar el aislamiento de los hongos endófitos.

**Dra. Alma Delia Paz González, Dra. Mailin Stephany Porras García**
Centro de Biotecnología Farmacéutica, IPN
Por la identificación por secuenciación de los hongos endófitos.

**Dra. Elvira Garza González**
Laboratorio de Microbiología molecular, UANL
Por la infraestructura y el material para realizar los ensayos de actividad antibacteriana.

**Dra. Flora Cruz López**
Laboratorio de Biotecnología, UANL
Por los ensayos de actividad antimicobacteriana.

**Dra. Adriana Romo Pérez**
Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría
Por los ensayos de actividad citotóxica.

**A los técnicos académicos del Instituto de Química, UNAM:**
Dra. Beatriz Quiroz García, Dra. Martha Elena García Aguilera, Dra. Isabel Chávez, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Q. María de los Ángeles Peña, Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez, Dra. María del Carmen García González, Dr. Francisco Javier Pérez Flores y M. en C. Teresa Ramírez Apan, por la realización de los experimentos espectroscópicos y espectrométricos.

Hacer un posgrado fue una aventura que impactó en todos los ámbitos de mi vida, quiero agradecerme a mí mismo por tomar una de las decisiones más importantes (al momento) de mi vida. Porque no fue fácil volver a ser un estudiante, no fue fácil decidir un tema de investigación, ni mucho menos fue fácil irme a vivir sólo a otro lugar. Me encanta todo lo relacionado a mi tema, que son los hongos y descubrí que quiero seguir trabajando con estos organismos tan bellos y poderosos, además de dedicarme a la ciencia y su divulgación.

Quiero agradecer a mis compañeros de maestría, Abigail, Evelin, Camila y Quique, que compartimos esta aventura juntos. Les deseo siempre lo mejor, son personas con capacidades sorprendentes.

Le agradezco mucho a la Dra. Rayito, por darme la oportunidad de trabajar con este proyecto. Además, estoy muy agradecido con todos los esfuerzos que hizo ya que gracias a ella estoy aquí y pude crecer como investigador.

Agradezco a mi comité tutorial: Dr. Adrián, Dra. Rosario y Dr. Abraham, porque gracias a ellos tres pude ver TODAS las áreas de oportunidad que tenía y tengo como investigador, además de que nunca me hicieron sentir menos o incapaz de mí mismo, al contrario, sus correcciones me fueron de gran ayuda.

Estoy muy agradecido con la Dra. Pilar, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biotecnología I. En este laboratorio me desenvolví muy bien, porque había gente que ya conocía, como Edwin, con quien por casualidades de la vida volví a convivir. También a Melissa, quien conoció mis peores versiones como persona y aun así no dejó de apoyarme.

En el Laboratorio de Química Farmacéutica conocí a mucha gente que es muy importante para mí, empezando por Ashley Vázquez, mi bro, SEAMOS AMIGOS SIEMPRE. A la MC Karen Reyes, quien es una persona con la que siempre hablo de demasiados temas e incluso la veo como una hermana mayor. A Leo, gracias por todos los momentos graciosos y llenos de adrenalina jaja solo tú y yo sabemos qué onda. A Mitzi, por toda la ayuda que me brindó. A Christian y a Regina, en quien veo a dos jóvenes con un gran potencial y les admiro su

dedicación e interés por la ciencia y a todos los demás con quien llegue a convivir: Ashly Mohan, Brisa, Guevara, Gael, Dr Francisco.

Para tercer semestre empecé con los ensayos biológicos, donde tuve que ir a la Facultad de Medicina. Quiero agradecer a la Dra. Elvira, una persona que tiene mi admiración por lo sencilla que es, a pesar de su posición y sus publicaciones de alto impacto. En este laboratorio también conocí a Luis y a Alejandra, quienes son grandes amigos míos. En ellos veo personas muy trabajadoras y que se han sabido levantar de las adversidades que les puso la vida. Grandes personas ellos. También quiero agradecer a la técnica Lucy, porque ella me puso atención en las técnicas que yo hacía, además de que me sugirió y guio para hacer los ensayos de la mejor forma posible. Aquí volví a convivir con Dany con quien ya había compartido los cinco años de licenciatura, un gran sujeto. También Jona, un gran sujeto si me lo preguntan.

Para el último semestre mi vida dio un giro muy bonito cuando me fui a CDMX, a los laboratorios 1-3 y 1-4 con la Dra. Martha Macías. A usted doctora, también le quiero agradecer el hacerme sentir uno más de su equipo de trabajo, muchas gracias por todo el material y la atención que me brindó durante mi proyecto y más durante mi estancia allá en CDMX. En este laboratorio conocí a dos personas que fueron más que compañeros para mí, ellos dos me guiaron como los grandes científicos que son, además de aconsejarme en mi vida personal, ya que son personas maravillosas: Evelyn y Roger. Si no lo demostré en persona, se los digo aquí, los admiro demasiado, aproveché el convivir con ustedes dentro y fuera del lab. Fueron mi fuente de inspiración muchas veces. Espero algún día poder ser al menos una mínima parte de lo que ustedes son. Quiero agradecer también a Víctor, Lupita, Fer, Jacky y Andy, alumnos de la Dra. Martha quienes se convirtieron en mis amigos e hicieron que la convivencia sea muy amena, siempre fue un lujo platicar con ustedes, me sorprendió conocer gente tan inteligente y trabajadora, los aprecio demasiado chicos. También a Alex y a Fátima, estudiantes del Dr. Mariano, los tqm.

Quiero agradecer a la Dra. Adriana no solo por los ensayos de citotoxicidad, sino también por las pláticas que tuvimos, las veces que me escuchó y los consejos que me dio. Además, me ganó dos apuestas jajaja eso me pasa por confiar en los rayados. Aprovecho para agradecer al que fue mi roomie, el parcero Manuel, una chimba de persona que siempre estuvo dispuesto a ayudarme, aunque se llevara pesadito.

También te quiero agradecer a ti, Isa. Quizá las circunstancias en las que nos conocimos no fueron las mejores, pero vaya, que bueno que nos conocimos.

“La vida es una serie de cambios naturales y espontáneos.
No te resistas a ellos – sólo crea dolor.
Deja que la realidad sea la realidad”
**Lao-Tse**

## RESUMEN

**QFB. Gustavo Saucedo Martínez** **Fecha graduación Enero, 2025**
**Universidad Autónoma de Nuevo León**
**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título del estudio: HONGOS ENDÓFITOS DE *Larrea tridentata* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y CITOTOXICAS.**

**Número de páginas: 82**
**Área de estudio: Farmacia**

**Candidato para el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

**Propósito y método de estudio:**
Dos de los principales problemas de salud pública son el cáncer y las infecciones por bacterias resistentes a fármacos. El cáncer es un problema de salud pública que cada vez aumenta en morbi-mortalidad. La OMS (Organización Mundial de la Salud) reportó que en 2022 se presentaron 19,976,499 casos nuevos y 9,743,832 fallecimientos a causa de diferentes tipos de cáncer. Por otro lado, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) reportó que en 2019 se presentaron 5 millones de fallecimientos por infecciones de bacterias farmacorresistentes. Adicionalmente, de acuerdo con reportes de la OMS, en 2022 la tuberculosis causó 1.3 millones de fallecimientos. Debido al aumento de casos de cáncer y de resistencia bacteriana, se ha estimulado la búsqueda de nuevos fármacos para tratar estos problemas de salud.
Los hongos endófitos son una fuente prometedora en la búsqueda de nuevos fármacos, ya que producen metabolitos secundarios con la capacidad de tener actividad citotóxica y antibacteriana. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue aislar metabolitos secundarios de hongos endófitos con dichas actividades. Para la búsqueda de hongos endófitos, se seleccionó *L. tridentata* como planta hospedera, debido a su historia etnomédica, como tratamiento para el cáncer e infecciones bacterianas, además de ser una planta endémica del norte de México.
Se aislaron 4 hongos endófitos de las hojas de *L. tridentata*, los cuales fueron cultivados en dos diferentes medios de cultivo para obtener extractos acuosos y orgánicos. Estos fueron evaluados contra siete cepas de bacterias resistentes: *Enterococcus faecium* (resistente a vancomicina), *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina), *Klebsiella pneumoniae* (una cepa resistente a carbapenémicos y una con presencia de metalo-β-lactamasas de Nueva Delhi o NDM+), *Acinetobacter baumannii* (resistente a carbapenémicos), *Pseudomonas aeruginosa* (resistente a carbapenémicos) y *Escherichia coli* (productora de β-lactamasas de espectro extendido); contra una cepa de *Mycobacterium*

*tuberculosis* sensible a fármacos (H37Rv) y una resistente a fármacos (MDR G117); y contra cinco líneas celulares cancerígenas: PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), HCT-15 (cáncer colorrectal), U-251 (glioma de cerebro) y SK-LU-1 (cáncer de pulmón), además de evaluar su actividad con dos líneas celulares no cancerígenas HaCaT (queratinocitos) y COS-7 (fibroblastos de riñón de mono verde africano), esto para observar su selectividad sobre células cancerígenas. Posteriormente, los extractos más activos fueron fraccionados por diversas técnicas cromatográficas.

**Contribuciones y conclusiones**

Se aislaron 4 hongos endófitos que no habían sido reportados para *L. tridentata: Biscogniauxia atropunctata, Nigrospora macarangae*., *Aspergillus niger* y *Nigrospora oryzae*. Tres extractos de *N. macarangae* tuvieron actividad contra la cepa no farmacorresitente de *M. tuberculosis* H37Rv a concentraciones entre 25-200 µg/mL. Tres extractos del hongo *B. atropunctata* redujeron selectivamente la viabilidad celular de la línea U-251 en valores de 48-54%, utilizando una concentración de 50 µg/mL de muestra. Se aisló y caracterizó estructuralmente la (-)-5-metilmelleina, la cual estuvo presente en dos extractos de arroz de *B. atropunctata*, pero no demostró actividad citotóxica comparable con el control positivo de Etopósido.

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Directora de tesis

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Co-directora de tesis

## TABLA DE CONTENIDO


**1. INTRODUCCIÓN ..... 1**

**1.1. Definición de hongo endófito** ..... 1

**1.2. Clasificación de hongos endófitos** ..... 1

**1.3. Relación hongo – planta** ..... 2

**1.4. Actividad farmacológica de hongos endófitos** ..... 3

**1.5. Cáncer y resistencia bacteriana** ..... 4

**1.6. Género *Biscogniauxia* y sus metabolitos secundarios** ..... 6

**1.7. Criterios para la búsqueda de hongos endófitos** ..... 7

**2. ANTECEDENTES ..... 9**

**2.1. Hongos endófitos de *L. tridentata*** ..... 9

**3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS ..... 11**

**3.1. Hipótesis** ..... 11

**3.2. Objetivo general** ..... 11

**3.3. Objetivos específicos** ..... 11

**4. MATERIALES Y METODOS ..... 12**

**4.1. Aislar e identificar hongos endófitos de las hojas de *L. tridentata*** ..... 12

**4.1.1. Recolección hojas *L. tridentata*** ..... 12

**4.1.2. Aislamiento de hongos endófitos** ..... 12

**4.1.3. Crioconservación** ..... 13

**4.1.4. Caracterización de hongos endófitos** ..... 13

**4.2. Cultivo a mediana escala de los hongos endófitos puros y obtención de extractos orgánicos y fracciones primarias del micelio y medio de cultivo** ..... 17

**4.3. Evaluación de los extractos y fracciones fúngicas contra bacterias farmacorresistentes y células cancerígenas.** ..... 19

**4.3.1. Actividad antibacteriana** ..... 19

**4.3.2. Actividad antimicobacteriana** ..... 20

**4.3.3. Actividad citotóxica** ..... 23

**4.4. Cultivo a mayor escala del hongo endófito *B. atropunctata*.** ..... 24

**4.4.1. Actividad citotóxica de extractos de *B. atropunctata*** ..... 25

**4.5. Aislamiento y purificación de al menos un metabolito secundario mayoritario de los extractos activos y caracterizarlos estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.** ..... 26

**4.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** ..... 26

**4.5.2. Fraccionamiento de l HELT 1 por cromatografía en columna flash** 27

**4.5.3. Aislamiento de (-)-5-metilmelleina** ..... 28

**4.5.4. Caracterización estructural de (-)-5-metilmelleina por técnicas espectroscópicas y espectrométricas** ..... 28

**4.6. Disposición de residuos** ..... 29

**5. RESULTADOS Y DISCUSION .....30**

**5.1. Aislar e identificar hongos endófitos de las hojas de *L. tridentata*.** ..... 30

**5.1.1. Identificación por características morfológicas** ..... 30

**5.2. Cultivo a mediana escala de los hongos endófitos puros para obtener extractos orgánicos y fracciones primarias del micelio y de medio de cultivo.** ..... 40

**5.3. Evaluación de los extractos y fracciones fúngicas contra bacterias farmacorresistentes y células cancerígenas** ..... 41

**5.3.1. Actividad antibacteriana** ..... 41

**5.3.2. Actividad antimicobacteriana** ..... 46

**5.3.3. Actividad citotóxica** ..... 48

**5.4. Cultivo a mayor escala del hongo endófito *B. atropunctata*.** ..... 50

**5.4.1. Actividad citotóxica de extractos de *B. atropunctata*** ..... 50

**5.5. Aislamiento y purificación de al menos un metabolito secundario mayoritario de los extractos activos y caracterizarlo estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas** ..... 52

**5.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** ..... 52

**5.5.2. Fraccionamiento I HELT 1** ..... 53

**5.5.3. Aislamiento de 5-metilmelleina** ..... 57

**5.5.4. Caracterización estructural de (-)-5-metilmelleina por técnicas espectroscópicas y espectrométricas** ..... 58

**6. CONCLUSIONES ..... 70**

**PERSPECTIVAS ..... 71**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 72**

**Apéndice A ..... 83**

**Apéndice B ..... 85**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Paclitaxel ..... 4
Figura 2. Camptotecina ..... 4
Figura 3. Dihidroauroglaucina ..... 4
Figura 4. Isotetrahidroauroglaucina ..... 4
Figura 5. Reticulol ..... 7
Figura 6. (3*R*)-melleina ..... 7
Figura 7. (3*R*)-6-hidroximelleina ..... 7
Figura 8. Biscogniazafilona A ..... 7
Figura 9. Biscogniazafilona B ..... 7
Figura 10. Ácido *meso* dihidroguaiaretico ..... 8
Figura 11. Ácido nordihidroguaiaretico ..... 8
Figura 12. Eniatinas ..... 9
Figura 13. 3α-hidroxilucilacteno ..... 9
Figura 14. Obtención de extractos y fracciones de MA y micelio de los hongos *B. atropunctata* y *A. niger* ..... 18
Figura 15. Reducción de resazurina. ..... 22
Figura 16. Cromatograma de I HELT 1 a 254 nm. ..... 53
Figura 17. Cromatograma de I HELT 1 a 270 nm. ..... 53
Figura 18. Perfil UV del fraccionamiento de I HELT 1 por cromatografía en columna flash ..... 54
Figura 19. Cromatograma de I HELT 1-F.2 a 254 nm. ..... 55
Figura 20. Cromatograma de I HELT 1-F.2 a 254 nm para el aislamiento de su compuesto mayoritario. ..... 56
Figura 21. Cromatograma de I HELT 1-F.2-3 a 254 nm. ..... 57
Figura 22. Cromatograma del sólido precipitado del extracto hexánico de MA de *B. atropunctata* a 254 nm. ..... 58
Figura 23. (-)-5-metilmelleina aislada y caracterizada estructuralmente de *B. atropunctata* ..... 58
Figura 24. Espectro de infrarrojo de la (-)-5-metilmelleina ..... 62
Figura 25. Espectro de masas por técnica DART de (-)-5-metilmelleina ..... 63

Figura 26. Espectro de RMN $^{1}H$ (700 MHz, $CDCl_3$) de la (-)-5-metilmelleina.... 64
Figura 27. Espectro de RMN $^{13}C$ (700 MHz, $CDCl_3$) de la (-)-5-metilmelleina. . 65
Figura 28. Espectro RMN de $^{1}H$ bidimensional HSQC (700 MHz, $CDCl_3$) de la (-)-5-metilmelleina. ..... 66
Figura 29. Espectro de RMN de $^{1}H$ bidimensional NOESY (700 MHz, CDCl3) de la (-) 5-metilmelleina. ..... 67
Figura 30. Estereoisómeros de la 5-metilmelleina ..... 68

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de hongos endófitos de acuerdo con Rodriguez y colaboradores (2009) ..... 2
Tabla 2. Reactivos utilizados para PCR ..... 15
Tabla 3. Programa de ciclos utilizados para PCR en la amplificación ..... 16
Tabla 4. Características morfológicas del hongo endófito *Biscogniauxia atropunctata* aislado de las hojas de L. tridentata ..... 30
Tabla 5. Características morfológicas del hongo endófito *Nigrospora macarangae* aislado de las hojas de *L. tridentata* ..... 32
Tabla 6. Características morfológicas del hongo endófito *Aspergillus niger* aislado de las hojas de *L. tridentata* ..... 34
Tabla 7. Características morfológicas del hongo endófito *Nigrospora oryzae* aislado de las hojas de *L. tridentata* ..... 36
Tabla 8. Cantidad y pureza de ADN de cada hongo endófito ..... 38
Tabla 9. Alineamientos con mayor similitud para cada hongo endófito ..... 39
Tabla 10. Rendimiento de extractos o fracciones reunidas después del análisis por CCF. ..... 40
Tabla 11. Actividad antibacteriana (CMI µg/mL) de los extractos o fracciones obtenidos de los hongos endófitos aislados de *L. tridentata* ..... 42
Tabla 12. Actividad antimicobacteriana (CMI en µg/mL) de los extractos o fracciones de hongos endófitos aislados de *L. tridentata*. ..... 46
Tabla 13. Actividad antimicobacteriana (CMI en µg/mL) de controles positivos empleados en el ensayo. ..... 47
Tabla 14. Porcentaje de viabilidad celular producido por extractos o fracciones obtenidos de hongos endófitos aislados de L. tridentata a 50 µg/mL. ..... 48
Tabla 15. Rendimiento de extractos de B. atropunctata ..... 50
Tabla 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular producido por extractos de B. atropunctata a 25 µg/mL ..... 51
Tabla 17. Fraccionamiento de I HELT 1 mediante cromatografía flash ..... 54
Tabla 18. Fraccionamiento secundario de I HELT 1-F.2 ..... 57
Tabla 19. Correlaciones directas observadas mediante la técnica HSQC. ..... 61

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad celular producido por (-)-5-metilmelleina a diferentes concentraciones. ..... 69

## ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| °C | Grados Celsius |
| AA | Agar agua |
| Å | Ángstrom |
| AcOEt | acetato de etilo |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| aq | acuoso |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AU | Unidades de absorbancia |
| $CH_2Cl_2$ | Diclorometano |
| $cm^2$ | Centímetros cuadrados |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CPD | Caldo papa dextrosa |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| DMEM/F-12 | Medio de Eagle modificado por Dulbecco con medio F-12 de Ham en relación 1:1 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FTIR-ATR | Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier con accesorio de reflectancia total atenuada |
| g | gramos |
| g/mol | gramos por mol |
| $H_2SO_4$ | Ácido sulfúrico |
| Hex | Hexano |
| $IC_{50}$ | Concentración inhibitoria media |
| ITS | Espaciador transcrito interno por sus cifras en inglés |
| L | Litros |
| m.s.n.m | Metros sobre el nivel del mar |
| MA | Medio arroz |
| MDR | Multifármacorresistente |
| MeCN | Acetonitrilo |

| | |
|---|---|
| MeOH | Metanol |
| mg/L | Miligramos por litro |
| MH | Mueller-Hinton |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| ng/mL | Nanogramos por mililitro |
| $Na_2SO_4$ | Sulfato de sodio |
| NDM+ | Metalobetalactamasas de Nueva Delhi |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés |
| PDA | Agar Papa Dextrosa por sus siglas en inglés |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SFB | Suero fetal bovino |
| µM | Micromolar |
| U/mL | Unidades por mililitro |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltios |
| µg/L | Microgramos por litro |
| > | Mayor que |
| < | Menor que |
| ≤ | Menor o igual que |
| ≥ | Mayor o igual que |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Definición de hongo endófito

Los hongos endófitos son aquellos microorganismos que colonizan las plantas de manera inter e intracelular, sin causar efectos patógenos en la planta hospedera. De esta relación, generalmente ambos organismos se benefician ya que la planta brinda nutrientes y protección mecánica al hongo endófito, mientras que algunos retribuyen a la planta hospedera con su crecimiento y desarrollo. Además, producen metabolitos secundarios para protección contra herbívoros y patógenos (Hridoy et al., 2022; Wen et al., 2022).

La relación entre el hongo endófito y la planta puede variar desde el mutualismo hasta la patogénesis, siendo mediada por el antagonismo balanceado. Este equilibrio ocurre durante la mayor parte del ciclo de relación, ya que los hongos regulan sus factores de virulencia y a la vez que las plantas regulan sus mecanismos de defensa, generando los beneficios para ambos sin que se produzcan daños significativos. Sin embargo, algunos hongos se presentan como patógenos latentes, ya que expresan su patogenicidad cuando la planta envejece o está bajo estrés (Schulz et al., 2015; Tan & Zou, 2001).

Los hongos endófitos son de interés para la investigación científica, ya que han sido poco caracterizados, lo que presenta grandes oportunidades de descubrir nuevas especies. Además, su capacidad de producir metabolitos secundarios con uso en la medicina los convierte en candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos (Strobel et al., 2004; Yadav & Meena, 2021).

## 1.2. Clasificación de hongos endófitos

Existe una alta diversidad geográfica y filogenética de los hongos endófitos, cuyas diferencias radican en el tipo de planta y tejido que colonizan, su mecanismo de transmisión y beneficios que traen a la planta (Massimo et al., 2015; Prajapati et al., 2021; Rustamova et al., 2022). Con base en estas diferencias, Rodríguez y colaboradores (2009) categorizan los hongos endófitos principalmente en clavicipitáceos (Clavicipitaceae) y no clavicipitáceos (este a su

vez se divide en 3 clases), por lo que estableció la siguiente clasificación (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de hongos endófitos de acuerdo con Rodriguez y colaboradores (2009)

| Criterio | Clavicipitáceos | No clavicipitáceos | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Clase 1** | **Clase 2** | **Clase 3** | **Clase 4** (También conocidos como Endófitos de septo oscuro) |
| Plantas colonizadas | Pastos y plantas vasculares | Plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas | | |
| Rango del hospedero | Reducido | Amplio | | |
| Tejido colonizado | Tallo y rizoma | Hojas, tallo, raíz y rizoma | Tallo, hojas, flores y frutas | Raíz |
| Transmisión* | Vertical y horizontal | Vertical y horizontal | Horizontal | Horizontal |
| Beneficio para la planta | Incremento biomasa, tolerancia a sequía, reducen consumo por herbívoros (depende del hospedero) | Tolerancia a estrés abiótico adaptada del hábitat. Inducción hormonas y protección patógenos. | Mejoran crecimiento, tolerancia sequía, tolerancia a enfermedades. | Mejoran crecimiento, tolerancia sequía, inhiben crecimiento de patógenos. |

*La transmisión vertical es mediante semillas infectadas y vía horizontal es mediante rizomas de otras plantas o esporas a través del medio ambiente.

### 1.3. Relación hongo – planta

De acuerdo con Gao y colaboradores (2010), los mecanismos por los cuales interaccionan los hongos endófitos y las plantas hospederas para la producción de metabolitos y protección de la planta son:

- Directo: Las enzimas y los metabolitos de interés son producidos por el hongo.
    - Por ejemplo, compuestos volátiles y no volátiles, con capacidad de inhibir el crecimiento microbiano y de patógenos, representados por antibióticos de naturaleza terpénica, alcaloides o polipéptidos (Prajapati et al., 2021; Strobel et al., 2011).
- Indirecto: El hongo induce un incremento en la expresión de mecanismos de defensa de la planta.
    - Los factores bióticos, como patógenos y abióticos como sequías, frío y estrés osmótico inducen cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas. En estos casos, la presencia de hongos endófitos

puede activar las defensas de la planta como un patógeno, estimulando su producción de metabolitos secundarios.

- Ecológicos: El hongo ocupa el nicho de la planta y reduce los nutrientes disponibles para patógenos, lo cual dificulta la infestación por parte de estos.

### 1.4. Actividad farmacológica de hongos endófitos

El mecanismo directo de interacción es de gran interés para el área farmacéutica, ya que se ha demostrado que algunos hongos endófitos producen metabolitos secundarios que tienen la capacidad de inhibir una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y protozoarios que afectan a los seres humanos. También se ha reportado que presentan actividad farmacológica como antidiabéticos, antioxidantes y citotóxicos (Strobel et al., 2004; Wen et al., 2022).

Un ejemplo es el paclitaxel (Figura 1), el cual es un compuesto citotóxico usado para cáncer de mama, que se obtenía principalmente del “tejo del Pacífico” (*Taxus brevifolia*). Sin embargo, Stierle y colaboradores (1993) describieron una cepa de hongo endófito aislada del floema de *T. brevifolia*, la cual es *Taxomyces andreanae*, que produce paclitaxel. No obstante, no es la única cepa endófita productora de este fármaco; Li y colaboradores (2017) también reportaron una cepa de *Aspergillus niger* subsp. *taxi*, la cual produce varios taxanos, incluido el paclitaxel.

Por otro lado, Ran y colaboradores (2017) reportaron una cepa de *Fusarium solani*, endófito del floema de *Camptotheca acuminata*, la cual es capaz de producir camptotecina (Figura 2), un fármaco con actividad citotóxica. Esta información, sugiere que los hongos endófitos pueden ser productores de metabolitos secundarios con actividad citotóxica que anteriormente se atribuían únicamente a las plantas.

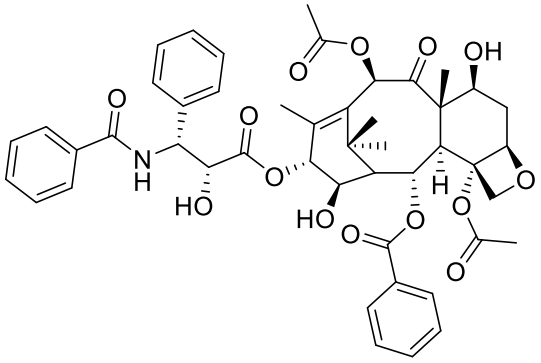



Figura 1. Paclitaxel

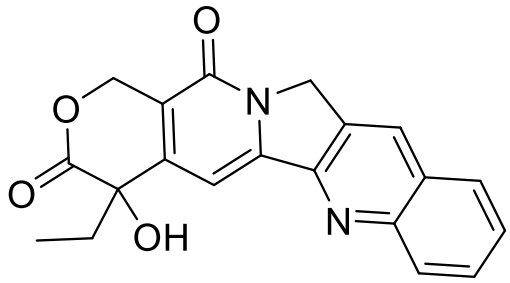



Figura 2. Camptotecina

Los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos no se limitan solo a presentar actividad citotóxica, ya que Elkady y colaboradores (2022) reportaron una cepa de *Aspergillus niger* endófito de *Opuntia ficus-indica* (nopal) del cual aislaron metabolitos como la dihidroauroglaucina (Figura 3) y la isotetrahidroauroglaucina (Figura 4), que inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente a fármacos, comparable con los controles positivos utilizados, que eran vancomicina, linezolid y colistina, según correspondía.

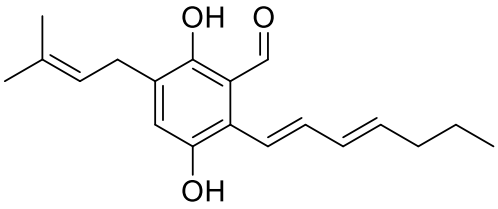



Figura 3. Dihidroauroglaucina

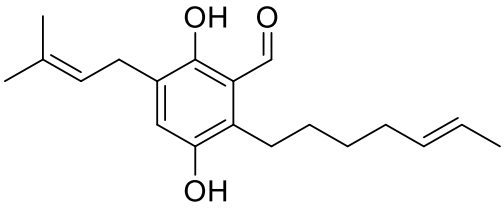



Figura 4. Isotetrahidroauroglaucina

### 1.5. Cáncer y resistencia bacteriana

La OMS (2024) reportó que en 2022 se presentaron 19,976,499 casos nuevos de cáncer, de los cuales el cáncer de pulmón, de mama, colorrectal y de próstata son los de mayor morbilidad. También se reportaron 9,743,832 defunciones,

siendo el cáncer de pulmón el de mayor número de casos. Por otra parte, la terapia tradicional para el cáncer es muy poco selectiva para distinguir entre células cancerígenas y células sanas, lo que produce efectos secundarios (Europapress, 2017). Con base en esta información, se ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos citotóxicos selectivos para las células cancerígenas (Reyes Álvarez et al., 2019).

Respecto a la resistencia bacteriana, la OMS (2020) la catalogó como una de las mayores amenazas a la salud, debido a que provocan infecciones difíciles de tratar, generando cada vez mayor morbi-mortalidad. Estos casos están representados principalmente por las infecciones asociadas a la salud, donde es común que se presenten bacterias multirresistentes debido al uso irracional de antibióticos (Angels, 2018). Estas infecciones son atribuidas principalmente al denominado grupo “ESKAPE”, el cual es un acrónimo para las siguientes bacterias (Guevara Díaz et al., 2021):

- *Enterococcus faecium*
- *S. aureus*
- *K. pneumoniae*
- *Acinetobacter baumannii*
- *P. aeruginosa*
- *Enterobacter* spp

La resistencia bacteriana no se limita al ambiente hospitalario. Por ejemplo, la tuberculosis, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, ha sido un problema de salud pública considerado prioritario a tratar desde hace más de 25 años. Actualmente, 10 millones de personas por año en el mundo contraen la enfermedad y aproximadamente 1.5 millones de personas mueren en el mismo período de tiempo (Furin et al., 2019; Organización Panamericana de la Salud, 2024). Además, se ha visto un aumento en el número de casos de *M. tuberculosis* multirresistente a fármacos, causado principalmente por falta de apego al tratamiento, el cual es complejo (necesitando 4-5 fármacos) y prolongado (de 6-9 meses) (Camacho-Corona et al., 2008). Si bien, lo ideal es racionalizar el uso

de los antibióticos ya disponibles, según lo establecido en el “Acuerdo por el que se determinan los lineamientos a los que estará sujeta la venta y dispensación de antibióticos” (Diario Oficial de la Federación, 2010), se ha intensificado la búsqueda de nuevas opciones para el tratamiento antimicrobiano (Angels, 2018).

### 1.6. Género *Biscogniauxia* y sus metabolitos secundarios

Los hongos de género *Biscogniauxia* pertenecen a la familia Xylariaceae y se caracterizan por ser endófitos de plantas y arbustos leñosos de manera indefinida (Moreno-Rico et al., 2010; Purbaya et al., 2023). Existe un creciente interés por los metabolitos secundarios de este género, ya que son capaces de producir compuestos con actividad antifúngica, antimicobacteriana, citotóxica y antioxidante (Purbaya et al., 2023).

Entre los metabolitos producidos por hongos del género *Biscogniauxia* destacan las melleinas. Estas son moléculas derivadas de isocumarinas y poseen diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, el reticulol (Figura 5), aislado de *B. capnodes*, endófito de *Averrhoa carambola*, exhibe actividad citotóxica contra la línea celular B16F10 (melanoma) (Sritharan et al., 2019). Otro ejemplo es la (3*R*)-melleina (Figura 6) y la (3*R*)-6-hidroximelleina (Figura 7), aisladas de *B. rosacearum*, endófito de *Vitis vinifera* L., las cuales destacan por su actividad fitotóxica (Masi et al., 2021).

Otro grupo de metabolitos relevantes son las azafilonas, por ejemplo, las biscogniazafilonas A y B (Figuras 8 y 9), aisladas de *B. formosana*, endófito de *Cinnamomum* sp., tienen actividad antimicobacteriana contra la cepa sensible a fármacos *M. tuberculosis* H37Rv (Cheng et al., 2012).

Estas moléculas demuestran la importancia del género *Biscogniauxia* como una fuente potencial para obtener metabolitos secundarios con actividades antimicrobianas y citotóxicas.

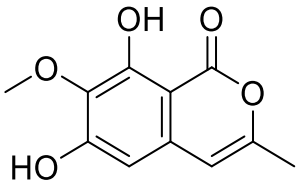



Figura 5. Reticulol

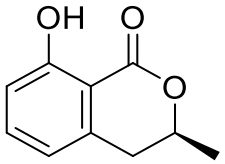



Figura 6. (3*R*)-melleina

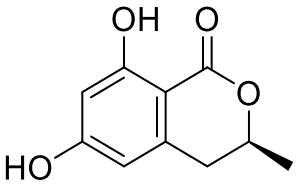



Figura 7. (3*R*)-6-hidroximelleina

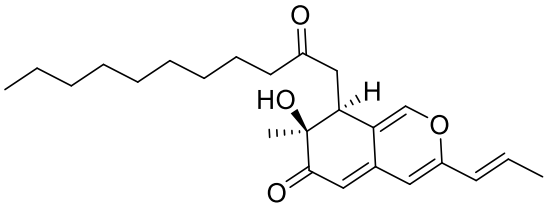



Figura 8. Biscogniazafilona A

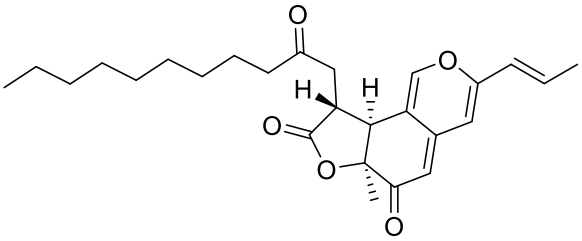



Figura 9. Biscogniazafilona B

### 1.7. Criterios para la búsqueda de hongos endófitos

Strobel y colaboradores (2004) propusieron cuatro criterios fundamentales para seleccionar plantas hospederas en la búsqueda de hongos endófitos. Estos criterios son: (1) que las plantas presenten estrategias interesantes de supervivencia; (2) que posean historia etnobotánica significativa; (3) que sean especies endémicas; y (4) que crezcan en áreas caracterizadas por una alta biodiversidad.

La planta seleccionada para este estudio: *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae), cumple con todos los criterios. Esta planta es endémica del norte de México, por lo que crece en ambientes hostiles como lo son los climas áridos. Además, se ha reportado su resistencia a infecciones y plagas (Morales-Ubaldo et al., 2021). También destaca por sus aplicaciones en la historia etnobotánica, teniendo actividad antioxidante, hipoglucemiante y antiviral (Morales-Ubaldo et al., 2022). Asimismo, de *L. tridentata* se han aislado metabolitos como el ácido *meso* dihidroguaiaretico (Figura 10) y el ácido nordihidroguaiaretico (Figura 11), los

cuales tienen actividad antibacteriana y citotóxica (Lira-Saldivar, 2003; Núñez-Mojica et al., 2021), convirtiéndola en una elección adecuada para este estudio.

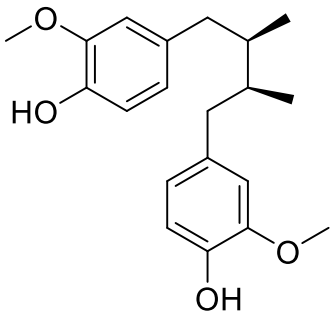



Figura 10. Ácido *meso* dihidroguaiaretico

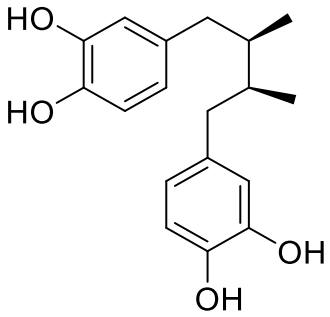



Figura 11. Ácido nordihidroguaiaretico

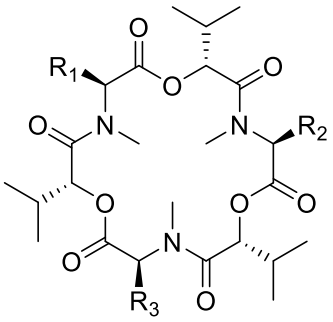
# 2. ANTECEDENTES

## 2.1. Hongos endófitos de *L. tridentata*

Para *L. tridentata* se ha reportado la presencia de *Fusarium acuminatum* como endófito en raíz. De dicha especie se describió el aislamiento de las eniatinas A y B (Figura 12), las cuales exhibieron actividad citotóxica. Además, se aisló el 3α-hidroxilucilacteno (Figura 13), el cual fue un metabolito novedoso pero carente de actividad citotóxica (Bashyal et al., 2006).

Por otro lado, Strobel y colaboradores (2011) reportaron un hongo de género *Phoma* sp. como endófito en raíz de *L. tridentata*. Si bien, este caso fue con aplicación en el campo de la agricultura, este hongo fue capaz de producir bio-combustibles e inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Massimo y colaboradores (2015) realizaron un estudio dedicado a buscar hongos endófitos en tejidos aéreos de plantas desérticas, entre ellas *L. tridentata*. En su estudio reportan las mejores condiciones ambientales para aislar hongos endófitos en esta planta, de la cual pudieron caracterizar hongos de los géneros: *Phoma* spp., *Aureobasidium* spp., *Preussia* spp. *Botryosphaeria* spp, *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.




Eniatina A: R1, R2 y R3: Secbutil
Eniatina B: R1, R2 y R3: Iso-propil
Figura 12. Eniatinas

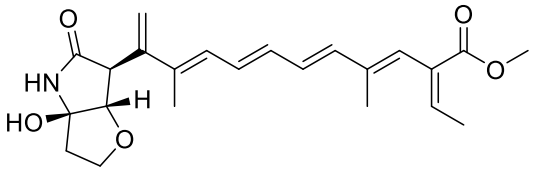



Figura 13. 3α-hidroxilucilacteno

Estos antecedentes demuestran que *L. tridentata* es una planta que alberga diferentes hongos endófitos, los cuales producen metabolitos secundarios con actividad citotóxica y antimicrobiana.

# 3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

## 3.1. Hipótesis

Los hongos endófitos de *L. tridentata* producen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y/o citotóxica comparable con fármacos de uso clínico.

## 3.2. Objetivo general

Obtener metabolitos secundarios de hongos endófitos de *L. tridentata* y evaluar su actividad contra bacterias farmacorresistentes, así como sobre células cancerígenas.

## 3.3. Objetivos específicos

**3.3.1.** Aislar e identificar hongos endófitos de las hojas de *L. tridentata*.

**3.3.2.** Cultivo a mediana escala los hongos endófitos puros para obtener extractos orgánicos y fracciones primarias del micelio y medio de cultivo.

**3.3.3.** Evaluación de los extractos y fracciones fúngicas contra bacterias farmacorresistentes y células cancerígenas.

**3.3.4.** Cultivo a mayor escala del hongo endófito *B. atropunctata*.

**3.3.5.** Aislamiento y purificación de al menos un metabolito secundario mayoritario de los extractos activos y caracterizarlo estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

# 4. MATERIALES Y METODOS

## 4.1. Aislar e identificar hongos endófitos de las hojas de *L. tridentata*

### 4.1.1. Recolección hojas *L. tridentata*

Para el aislamiento de hongos endófitos, se recolectaron hojas sanas de la parte media de *L. tridentata* bajo la supervisión del Biólogo Carlos Velazco. El muestreo se realizó en Mina, Nuevo León (26.0002461, -100.5588018, 592 m. s. n. m.) el 21 de Octubre de 2022 a las 11 am.

### 4.1.2. Aislamiento de hongos endófitos

Las hojas fueron lavadas con agua corriente y agua destilada, para posteriormente ser desinfectadas superficialmente. El material vegetal se sumergió un minuto en etanol al 70% y 30 segundos en hipoclorito de sodio al 4.3%, lavando con agua destilada estéril entre cada desinfectante y secándolas con papel absorbente estéril. Posteriormente, se realizó una incisión en la parte central de las hojas con un bisturí esterilizado, para obtener porciones de 5 x 5 mm, estas fueron sembradas por cuadrantes de cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) o agar agua (AA) suplementados con cloranfenicol 500 mg/L para inhibir el crecimiento de bacterias endófitas. En total se utilizaron cinco cajas con medio PDA y cinco cajas con medio AA. Además, se realizó un control de esterilidad imprimiendo una hoja (con el mismo procedimiento de esterilización) por 30 segundos en el centro de una caja de PDA. Esto con el objetivo de demostrar que los microorganismos epífitos fueron eliminados (Massimo et al., 2015; Sánchez-Fernández, 2016).

Las cajas de Petri fueron selladas con parafilm y se incubaron a temperatura ambiental y con fotoperíodos de luz: oscuridad (12:12 h). Se observó y registró el crecimiento diario en las cajas, tomando inóculos del borde del micelio, para ser inoculados en otra caja de PDA sin antibiótico. Este proceso se repitió hasta observar una colonia de características uniformes (dos Reis et al., 2022).

### 4.1.3. Crioconservación

Los hongos aislados fueron conservados en tubos de vidrio con caldo papa dextrosa (CPD por sus siglas) con 30 % de glicerol a -20 °C en el Laboratorio de Biotecnología I, Facultad de Ciencias Químicas de la UANL (Sánchez-Fernández, 2016).

### 4.1.4. Caracterización de hongos endófitos

#### 4.1.4.1. Identificación por características morfológicas

Para registrar las características macroscópicas, cada hongo endófito aislado fue inoculado por triplicado en el centro de una caja de Petri con medio PDA. Se utilizó un sacabocados para preparar inóculos de 5 mm de diámetro. Las condiciones de incubación fueron temperatura ambiental y con fotoperíodos luz: oscuridad (12:12 h) (Sánchez-Fernández, 2016). Las características macroscópicas se observaron diariamente, tanto en el anverso como en el reverso del micelio, registrando color, textura, consistencia de la superficie y la presencia de pigmentos y/o exudado. Además, se midió su tasa de crecimiento expresada en $cm^2$/día (Ibarra-Martínez, 2015; Sánchez-Fernández, 2016).

Las características microscópicas fueron observadas mediante microcultivos. Estos se realizaron en cubos de 1 $cm^2$ de PDA cortados con un bisturí esterilizado, los cuales fueron colocados sobre un portaobjetos para ser inoculados con cada endófito usando un asa bacteriológica. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos arriba del cubo y se incubó dentro de una caja de Petri. El portaobjetos se mantuvo apoyado en dos palillos de madera estériles. Para mantener la humedad, se colocó un algodón estéril impregnando con agua desionizada estéril y se incubo a temperatura ambiente hasta que fue evidente el crecimiento del micelio. Para observar las características microscópicas los cubreobjetos fueron retirados y colocados sobre otro portaobjetos nuevo, el cual tenía una gota de azul de lactofenol o rojo Congo y se observó en microscópico óptico a 40x y 100x (Estrada-Salazar & Ramírez-Galeano, 2019).

#### 4.1.4.2. Identificación de hongos endófitos por secuenciación

##### 4.1.4.2.1. Extracción ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico

La extracción de ADN se realizó con el Kit Promega, Wizard (Isolating Genomic DNA from Yeast) con las modificaciones propuestas por de la Cruz-Izquierdo y colaboradores (2021): los hongos fueron inoculados en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de CPD de siete a diez días, a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz: oscuridad (12:12 h). Posteriormente, se tomó 1 mL del medio de cultivo en microtubos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La biomasa obtenida se maceró con nitrógeno líquido y se recolectó en un microtubo de 1.5 mL. Se añadieron 293 µL de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 50 mM y se incubó por 60 min a 37 ºC. Luego, se dejó enfriar 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos, descartando el sobrenadante. A la pastilla de micelio obtenida se le adicionaron 300 µL de Nuclei Lysis Solution y se mezcló suavemente. Posteriormente, se agregaron 100 µL de Protein Precipitation Solution, se mezcló en vortex durante 30 segundos y fue incubado en hielo por 5 minutos. La mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm por 3 min. El sobrenadante fue transferido a un microtubo que contenía 300 µL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y fue centrifugado a 13,000 rpm por 2 min. El sobrenadante fue decantado y se adicionaron 300 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos. El etanol fue aspirado y el precipitado se secó a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 20 µL de DNA Rehydratation Solution. Posteriormente, las muestras se cuantificaron en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific™ Nanodrop™ 2000/2000C). La presencia e integridad del ADN genómico fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### 4.1.4.2.2. Amplificación de las regiones ITS *(regiones espaciadoras transcritas internas por sus siglas en inglés)*

La identificación molecular se llevó a cabo por la amplificación de secuencias altamente conservadas del ADN, en este caso fue la región ITS del gen 5.8s ribosomal mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés) punto final con un termociclador REF A24812 (Applied biosystems by life techonologies).

Para realizar la amplificación de los ITS se utilizó el cebador sentido ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) y el cebador anti-sentido ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´), con las cantidades de reactivos y bajo las condiciones de PCR mostradas en las Tablas 2 y 3. La visualización de los fragmentos de ADN obtenidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, dispuestos en una cámara de electroforesis con un buffer de corrida (TBE 0.5 X). Se utilizaron 5 µL del producto de PCR con 1.5 µL de SYBR Green® 00X y para comparar el tamaño de banda de la reacción, se usaron 3 µL de marcador molecular (Ladder® 100 pb) con 1.5 µL de SYBR Green® 10X. La electroforesis se corrió a 100 V por 100 minutos. Finalmente, el gel de agarosa se visualizó en un fotodocumentador con luz UV con el programa Kodak Molecular Imaging®. El tamaño de la banda que se reporta es de aproximadamente 600 pares de bases (de la Cruz-Izquierdo et al., 2021; dos Reis et al., 2022).

Tabla 2. Reactivos utilizados para PCR

| Reactivo | Cantidad |
|---|---|
| Go Taq Green Master Mix | 12.5 µL |
| Primer ITS 1 | 1 µL |
| Primer ITS 4 | 1 µL |
| Agua MiliQ estéril | Cuanto baste para 25 µL |
| ADN | 50 ng |

Tabla 3. Programa de ciclos utilizados para PCR en la amplificación

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---|---|---|---|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 min | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 s | 35 |
| Alineamiento | 58 °C | 30 s | 35 |
| Extensión | 72 °C | 1 min | 35 |
| Extensión final | 72 °C | 5 min | 1 |

#### 4.1.4.2.3. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con EXOSAP. A cada 10 µL del producto se le añadieron 4 µL de "ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent" llevando a cabo la reacción en un microtubo de 0.2 mL. El proceso de purificación se realizó en un termociclador REF A24812 (Applied biosystems by life technologies) bajo las siguientes condiciones; un ciclo a 37 ºC durante 15 min y a 80 ºC por 15 min. Las muestras se cuantificaron en el equipo Thermo Scientific™ Nanodrop™ 2000/2000C Spectrophotometers. Finalmente, la secuenciación de las muestras purificadas fue subrogado a la empresa Eurofins GTM Operon LLC (Louisvile KY, EE. UU.).

#### 4.1.4.2.4. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

Una vez obtenidas las secuencias se pasaron a formato fasta usando el programa MEGA. Seguidamente, se analizaron las secuencias nucleotídicas sentido y antisentido de cada producto de PCR empleando la herramienta de alineación local BLAST-N del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica por sus siglas en inglés). El alineamiento local permitió determinar el género y especie de cada hongo secuenciado. Se consideraron los alineamientos con mejor puntaje (mayor porcentaje de identidad) para la determinación de género y especie, esto se realizó en conjunto con las características morfológicas.

## 4.2. Cultivo a mediana escala de los hongos endófitos puros y obtención de extractos orgánicos y fracciones primarias del micelio y medio de cultivo

Cada hongo endófito aislado fue inoculado en una caja de Petri con PDA y se dejó crecer siete días. Posteriormente, se tomaron de 10 a 12 fragmentos con sacabocados de 1 $cm^2$ para ser inoculados en dos diferentes medios: 1 L de CPD y 300 g de medio arroz (MA). Ambos medios se prepararon en matraces Fernbach de 2.8 L y se incubaron en condiciones estáticas. La incubación duró de 4-6 semanas dependiendo de su tasa de crecimiento y con fotoperiodos de luz: oscuridad (12:12 h). (Macías-Rubalcava et al., 2014; Sánchez-Fernández, 2016).

Los extractos se obtuvieron de dos formas: los hongos *Biscogniauxia atropunctata* y *A. niger* fueron procesados como se presenta en la Figura 14. Los cultivos de MA fueron triturados con una varilla de vidrio y se realizó una extracción orgánica por maceración con una mezcla de $CH_2Cl_2$ (diclorometano) y MeOH (metanol) en relación 1:1. El extracto fue filtrado y se concentró con un rotavapor hasta eliminar el disolvente. El producto resultante fue un residuo acuoso, este fue fraccionado por partición líquido-líquido, primero con Hex (hexano) y posteriormente con AcOEt (acetato de etilo), obteniendo dos fracciones orgánicas, concentradas con un rotavapor y una fracción acuosa, la cual fue liofilizada.

Para los cultivos con CPD, primero se realizó una separación mecánica del medio de cultivo y el micelio. Al medio de cultivo se le realizó una partición líquido-líquido con AcOEt. La fase orgánica se secó con $Na_2SO_4$ anhidro, para posteriormente ser concentrada con un rotavapor hasta sequedad. El micelio fue macerado con una mezcla $CH_2Cl_2$ 1:1 MeOH y se concentró con rotavapor hasta eliminar el disolvente. El producto fue un residuo acuoso, este fue fraccionado por partición líquido-líquido primero con Hex y posteriormente con AcOEt, resultando en

obteniendo dos fracciones orgánicas y una fracción acuosa, la cual fue liofilizada (Macías-Rubalcava et al., 2014; Sánchez-Fernandez, 2016).

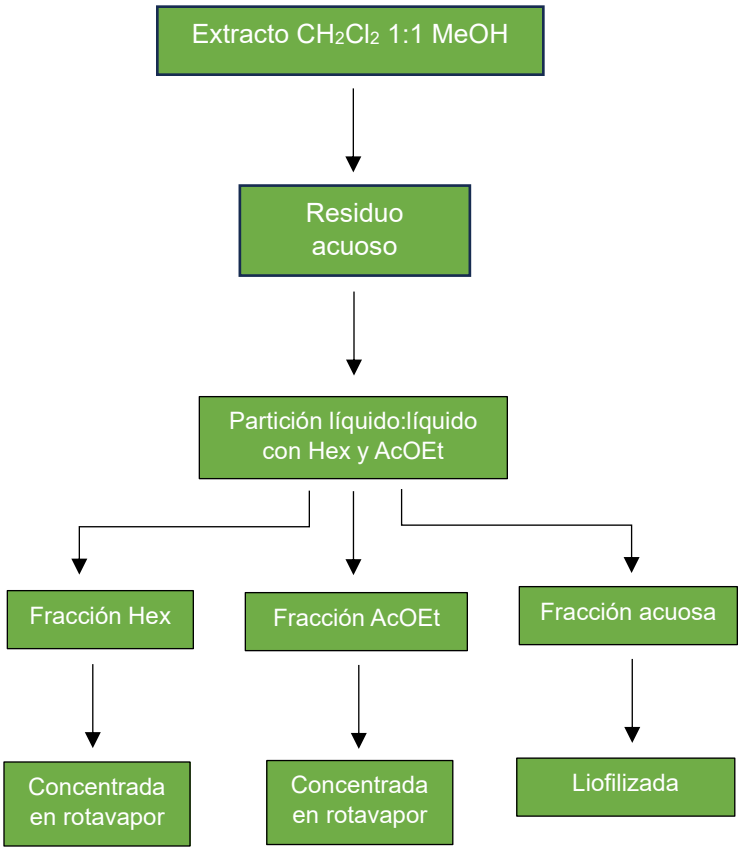



Figura 14. Obtención de extractos y fracciones de MA y micelio de los hongos *B. atropunctata* y *A. niger*

La otra manera de obtener los extractos fue para los hongos *Nigrospora macarangae* y *N. oryzae*: los cultivos de MA fueron triturados con una varilla de vidrio para facilitar su manejo. Los extractos fueron obtenidos por maceración, la cual se realizó con solventes orgánicos en un orden secuencial, empezando con Hex, seguido de $CH_2Cl_2$ y finalmente con AcOEt. Para los cultivos de CPD, primero se realizó una separación mecánica del medio de cultivo y el micelio. Al medio de cultivo se le realizó una partición líquido-líquido con AcOEt, la fase orgánica se secó con $Na_2SO_4$ anhidro. Al micelio se le realizaron maceraciones

con el mismo orden secuencial, empezando con Hex, seguido de $CH_2Cl_2$ y finalmente con AcOEt. Todos los extractos obtenidos se destilaron a sequedad con un rotavapor (Macías-Rubalcava et al., 2014; Sánchez-Fernández, 2016).

Los extractos y fracciones fueron analizados por CCF (cromatografía en capa fina) para unirlos con base en su similitud cromatográfica. Las placas fueron reveladas con luz UV (ultravioleta) de longitud de onda corta (254 nm) y longitud de onda larga (365 nm), además de usar una solución de $H_2SO_4$ (ácido sulfúrico) al 10% calentándose a 90 °C por dos minutos. Todos los extractos y fracciones obtenidas se utilizaron para cumplir el objetivo 3.

## 4.3. Evaluación de los extractos y fracciones fúngicas contra bacterias farmacorresistentes y células cancerígenas.

### 4.3.1. Actividad antibacteriana

La metodología fue realizada siguiendo lo establecido por Zgoda & Porter (2001), empleando microplacas de 96 pocillos y se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *E. faecium* (resistente a vancomicina), *S. aureus* (resistente a meticilina), *K. pneumoniae* (una cepa resistente a carbapenémicos y una cepa NDM+), *A. baumannii* (resistente a carbapenémicos), *P. aeruginosa* (resistente a carbapenémicos) y *E. coli* (productora de beta-lactamasas de espectro extendido). Las cepas son aislamientos clínicos y fueron donadas por el laboratorio de Microbiología molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

Las cepas fueron incubadas previo al ensayo en agar-sangre a 37 °C entre 18 y 24 h. Después del tiempo de incubación, se tomaron de 3 a 5 colonias para posteriormente realizar una suspensión de 5 mL de solución salina a escala McFarland 0.5 ($1.5 \times 10^8$ células) con un nefelómetro (BD PhoenixSpec™). Se tomaron 10 µL de esta suspensión bacteriana y se diluyeron en 10 mL de medio caldo MH (Mueller-Hinton).

Las soluciones que se utilizaron en el ensayo se prepararon reconstituyendo 4 mg de extracto o fracción en 500 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) para obtener una solución madre a una concentración de 8 mg/mL. Esta fue diluida en una relación

de 1:10 con caldo MH para obtener una solución a 800 µg/mL (denominada solución 4x de extracto o fracción).

Al momento de realizar el ensayo, se añadieron 100 µL de caldo MH en cada pocillo de la placa. Posteriormente, en los pocillos de la fila A se añadieron 100 µL de la solución 4x de extracto o fracción (por duplicado). Se tomaron 100 µL de cada pocillo de la fila A para realizar diluciones 1:2 en la fila B. Esto se hizo transfiriendo 100 µL de cada pocillo de la fila A a su respectivo pocillo de la fila B y se mezcló. Luego, se tomaron 100 µL del pocillo de la fila B y se transfirieron a su respectivo pocillo de la fila C, mezclando en el pocillo. Este proceso se repitió sucesivamente hasta llegar a la fila G, descartando los últimos 100 µL. Esto resultó en un rango de concentraciones de 200 a 3.125 µg/mL para cada extracto o fracción. Posteriormente se añadieron 100 µL del inóculo preparado y estandarizado a escala McFarland a cada pocillo, excepto a los pocillos de la fila H, que fueron utilizados como control de esterilidad. La placa fue incubada a 37 °C entre 18 y 24 horas.

Después del tiempo de incubación, la CMI (concentración mínima inhibitoria) se observó a simple vista, identificando la mayor concentración en la que los pocillos se mantuvieron transparentes. Si se presentó turbidez o sedimento bacteriano indica que el crecimiento no fue inhibido.

Además, se emplearon dos controles procesados de igual forma que los extractos y fracciones: un control positivo de levofloxacino que tuvo un rango de concentraciones de 50 a 0.781 µg/mL; y un control negativo de DMSO en concentraciones de 2.5 a 0.039%.

### 4.3.2. Actividad antimicobacteriana

La metodología fue realizada siguiendo las modificaciones de Favela-Hernández y colaboradores (2012) al método establecido por Franzblau y colaboradores (1998). Los ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos y se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *M. tuberculosis* H37Rv (sensible a estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) y *M.*

*tuberculosis* MDR G117 (resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol). Las cepas fueron donadas por el laboratorio de Microbiología molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

Las cepas se incubaron en medio Lowenstein-Jensen a 37 °C de 3 a 4 semanas. Después se tomaron inóculos y se sembraron en medio Middlebrook 7H9 con 0.2% glicerol y 10% OADC (suplemento de ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasas por sus siglas en inglés) por dos semanas a 37 °C. Al finalizar el periodo, se preparó un inóculo a escala McFarland 1 ($3 \times 10^8$ células) en caldo Middlebrook 7H9, el cual fue diluido en una relación 1:20.

Las soluciones que se utilizaron en el ensayo se prepararon reconstituyendo 8 mg de extracto o fracción en 400 µL de DMSO, para obtener una solución madre a una concentración de 20 mg/mL. Esta fue diluida en una relación de 1:25 con caldo Middlebrook 7H9 para obtener una solución a 800 µg/mL (denominada solución 4x de extracto o fracción).

Al momento de realizar el ensayo en la microplaca, a los pocillos de la fila A, columna 1, 12 y pocillos H2, H3, H10 y H11 se les añadió 100 µL de agua desionizada estéril. A los demás pocillos se les añadió 100 µL de medio Middlebrook 7H9. A los pocillos de la fila B con medio, se les agregó 100 µL de nuestra solución 4x de extracto o fracción. Se tomaron 100 µL de cada pocillo de la fila B para realizar diluciones 1:2 en la fila B. Esto se hizo transfiriendo 100 µL de cada pocillo de la fila B a su respectivo pocillo de la fila C y se mezcló. Luego, se tomaron 100 µL del pocillo de la fila D y se transfirieron a su respectivo pocillo de la fila D, mezclando en el pocillo. Este proceso se repitió sucesivamente hasta llegar a la fila G y se descartaron los últimos 100 µL.

Luego, a todos los pocillos con medio Middlebrook 7H9 se le añadieron 100 µL del inoculo preparado y estandarizado a escala McFarland. A los pocillos H4 y H5 se les añadió 200 µL de inóculo estandarizado, a los pocillos H6 y H7 se les añadió 20 µL de inóculo + 180 µL de medio, a los pocillos H8 y H9 se les añadió 2 µL de inóculo + 198 µL de medio, como control de crecimiento. La placa fue incubada a 37 °C durante 5 días.

Después de este periodo de incubación, a los pocillos de la fila H con inóculo (H4 a H9) se les añadió 20 µL de Azul Alamar (o resazurina) y 12 µL de Tween 80 a 10%. Posteriormente, la placa fue incubada de nuevo a 37 °C por 24 h más. Un vire a color rosa (causado por la reducción de resazurina a resorufina) indica crecimiento de micobacterias (Figura 15). Por lo tanto, se aplicó la misma cantidad de Azul Alamar y Tween 80 a 10% a los demás pocillos con inóculo micobacteriano y se incubó la placa por 24 h más en las mismas condiciones. Un pocillo de color azul indica la inhibición del crecimiento. Este proceso fue para determinar la CMI, identificando la mayor concentración en la que se presentaron pocillos de color azul o inhibición de crecimiento.

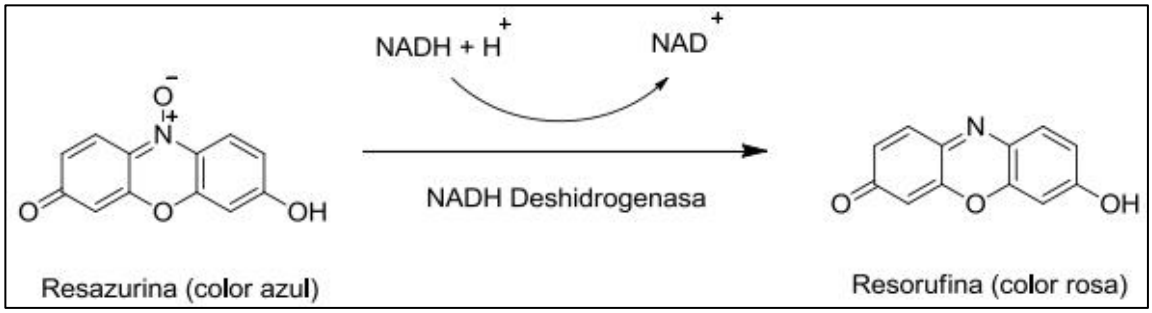



Figura 15. Reducción de resazurina.

NADH (dinucléotido de nicotinamida y adenina en su forma reducida). NAD+ (dinucléotido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada).

Se emplearon 4 controles positivos en el ensayo, los cuales fueron tratados de igual forma a los extractos y fracciones. Los controles positivos son fármacos utilizados para tratar tuberculosis, teniendo los siguientes rangos de concentraciones para la cepa sensible: rifampicina 1 µg/mL a 0.030 µg/mL, isoniazida 10 µg/mL a 0.312 µg/mL, etambutol 50 µg/mL a 1.562 µg/mL y levofloxacino 1 µg/mL a 0.030 µg/mL; para la cepa resistente se utilizaron los siguientes rangos de concentraciones: rifampacina 10 µg/mL a 0.312 µg/mL, isoniazida 10 µg/mL a 0.312 µg/mL, etambutol 50 µg/mL a 1.562 µg/mL y levofloxacino 10 µg/mL a 0.312 µg/mL. El control negativo del ensayo utilizado fue una solución de DMSO grado reactivo diluido en relación 1:25.

### 4.3.3. Actividad citotóxica

Para evaluar la actividad citotóxica (viabilidad celular) se siguió la metodología reportada por Feoktistova y colaboradores (2016). Los ensayos fueron realizados en microplacas de 96 pocillos y se emplearon las siguientes líneas celulares: PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), HCT-15 (cáncer colorrectal), U-251 (cáncer de cerebro), SK-LU-1 (cáncer de pulmón); y la línea celular no cancerígena HaCaT (queratinocitos).

Las líneas celulares se incubaron previo a los ensayos en medio DMEM/F-12, (medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con medio F-12 de Ham), añadiendo 10% SFB (suero fetal bovino), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0.25 µg/mL anfotericina B, hasta alcanzar una confluencia de entre 70 y 80 % (Straube et al., 2023).

Posteriormente, al cultivo se le añadió 1 mL de tripsina 0.5% para realizar una suspensión de células que se incubó durante cinco minutos a 37 °C y 5 % $CO_2$. Después de este periodo de tiempo, se lavó la suspensión con SFB para eliminar la tripsina. Se añadieron 3 mL de medio DMEM/F-12 y se disgregaron las células mediante un raspado. Se colocó la suspensión en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos a 25 °C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 10%. Finalmente, la cantidad de células se midió en 10 µL de medio con una cámara de Neubauer en un invertoscopio.

A cada pocillo de la microplaca se le añadió 200 µL de medio DMEM-F12. Posteriormente, se inocularon $5x10^3$ células en cada pocillo. Después de 24 horas, las células se trataron con extractos o fracciones por cuadruplicado y a una concentración de 50 µg/mL. La placa fue incubada por 48 horas a 37 °C y 5% de $CO_2$. Después del periodo del tratamiento, a cada pocillo se le retiró el medio y las células se lavaron con buffer de fosfatos. Las células viables se mantuvieron adheridas al pocillo, mientras que las no viables se retiraron. Posteriormente, las células se tiñeron con 50 µL de una solución de cristal violeta 0.5 % durante 30 minutos. La placa se lavó con agua corriente y se secaron al

aire. Después, el tinte unido se solubilizó mediante la adición de 200 µL de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1%. Las placas se agitaron durante 5 minutos previo al análisis.

Se emplearon tres controles: un control de células no tratadas (células + medio); un control negativo de DMSO al 0.0005 %; y un control positivo de etopósido a diferentes concentraciones (150, 100, 25, 12.5 y 6.25 µM).

La viabilidad celular de los pocillos se obtuvo midiendo la absorbancia, la cual fue medida con un lector de imágenes Cytation 5 (BIOTek Instruments, Inc.) a λ = 570 nm. Se estableció como 100% de viabilidad la absorbancia promedio producida de las células no tratadas. El porcentaje de viabilidad de las células producido por los extractos o fracciones se calculó a partir de la siguiente manera:

$$\%\ viabilidad = \frac{Absorbancia\ de\ células\ tratas}{Absorbancia\ de\ células\ no\ tratadas}\ x\ 100$$

Se realizaron tres ensayos independientes de esta actividad. Los resultados fueron analizados bajo una prueba t para muestras independientes y se obtuvieron en el programa GraphPad Prism versión 8.0.2.

### 4.4. Cultivo a mayor escala del hongo endófito *B. atropunctata*.

Debido a su actividad citotóxica y con la finalidad de aislar al menos un metabolito secundario, el hongo *B. atropunctata* fue cultivado a mayor escala en cuatro matraces Fernbach de 2.8 L con 300 g de MA, para obtener dos extractos orgánicos: uno de Hex y uno de AcOEt. Los extractos fueron analizados por CCF para unirlos con base en su similitud cromatográfica. Las placas fueron reveladas con luz UV de longitud de onda corta y longitud de onda larga, además de una solución de $H_2SO_4$ al 10% calentándose a 90 °C por dos minutos. La actividad citotóxica de este extracto fue obtenida siguiendo los lineamientos del punto 4.4.1.

### 4.4.1. Actividad citotóxica de extractos de *B. atropunctata*

Para evaluar la actividad citotóxica (inhibición de crecimiento) de los extractos orgánicos de *B. atropunctata* obtenidos a mayor escala, se siguieron las modificaciones de Vichai & Kirtikara (2006) al método de Skehan y colaboradores (1990). Los ensayos fueron realizados en microplacas de 96 pocillos y se emplearon las siguientes líneas celulares: PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), HCT-15 (cáncer colorrectal), U-251 (cáncer de cerebro), SK-LU-1 (cáncer de pulmón); y la línea celular no cancerígena COS-7 (fibroblastos de riñón de mono verde africano).

Las líneas celulares se incubaron previamente a los ensayos en medio DMEM/F-12, (medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con medio F-12 de Ham), añadiendo 10% SFB (suero fetal bovino), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0.25 µg/mL anfotericina B, hasta alcanzar una confluencia de entre 70 y 80 % (Straube et al., 2023).

Posteriormente, se añadió 1 mL de tripsina 0.5% al cultivo para realizar una suspensión de células que se incubó durante 5 minutos a 37 °C y 5 % $CO_2$. Después de este periodo de tiempo, se lavó la suspensión con SFB para eliminar la tripsina. Se añadieron 3 mL de medio DMEM/F-12 y se disgregaron las células mediante un raspado. Se colocó la suspensión en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos a 25 °C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 10%. Finalmente, se midió la cantidad de células por 10 µL con una cámara de Neubauer en un invertoscopio.

A cada pocillo de la microplaca se le añadieron 200 µL de medio DMEM-F12. Posteriormente, se inocularon $5x10^3$ células en cada pocillo. Después de 24 horas, las células se trataron con extractos por cuadruplicado y a una concentración de 25 µg/mL. Se incubaron por 48 horas a 37 °C y 5 % $CO_2$. Después del periodo de tratamiento, a cada pocillo se le añadieron 100 µL de ácido tricloroacético al 10% peso/volumen para fijarlas y se incubó a 4 °C por una hora. Posterior a este periodo, la microplaca de 96 pocillos fue lavada con agua

y secada a temperatura ambiente. Cuando la placa estuvo seca, a todos los pocillos se le añadieron 100 µL de sulforrodamida B al 0.057% peso/volumen y se incubó a temperatura ambiente por 30 min para, después, lavar cada pocillo con ácido acético 1% volumen/volumen y se secó a temperatura ambiente con ayuda de un secador. Finalmente, a cada pocillo se le añadieron 200 µL de una solución Tris 10 mM (pH 10.5) y se agitó por cinco minutos para posteriormente medir la absorbancia de los pocillos con un lector de imágenes Cytation 5 (BIOTek Instruments, Inc.) a λ = 510 nm. La absorbancia promedio del control de células no tratadas (células + medio) se estableció como 0% de inhibición de crecimiento.

El porcentaje de inhibición de crecimiento de las células producido por los extractos se calculó a partir de la siguiente manera:

$$\%\ viabilidad = \frac{Absorbancia\ de\ células\ tratas}{Absorbancia\ de\ células\ no\ tratadas}\ x\ 100$$

$$\%\ inhibición = \ 100\% - \%\ viabilidad$$

## 4.5. Aislamiento y purificación de al menos un metabolito secundario mayoritario de los extractos activos y caracterizarlos estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

### 4.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El perfil cromatográfico de la muestra I HELT 1 (fracción Hex-AcOEt de MA de *B. atropunctata*) fue obtenido analizando la muestra a una concentración de 5 mg/mL en HPLC analítico (Waters e2695 Separations Module). La elución fue realizada en una columna C-18 (Xterra 4.6 mm * 250 mm, tamaño de partícula 5 µm) con inyecciones de 20 µL. Como fase móvil, se utilizó agua (con 0.1 % ác. fórmico) 95:5 MeCN (acetonitrilo) en modo isocrático durante 5 minutos, seguido de un gradiente a 100 % MeCN en 25 minutos y finalmente, una fase isocrática al 100 % MeCN por 10 minutos. El flujo se estableció a 1.0 mL/min. El detector utilizado fue un Waters PDA 2298 (fotodiodos por sus siglas en inglés).

### 4.5.2. Fraccionamiento de l HELT 1 por cromatografía en columna flash

El extracto l HELT 1 (500 mg) fue sometido a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna flash utilizando un equipo Büchi Pure C-810. Se empleó sílica gel como fase estacionaria (24 g) y los siguientes gradientes de fase móvil: Hex 8:2 AcOEt durante tres volúmenes de columna; después Hex 2:1 AcOEt durante cinco volúmenes de columna; posteriormente Hex 1:1 AcOEt durante tres volúmenes de columna; y finalmente se aumentó la fase móvil a AcOEt 100 % durante tres volúmenes de columna y se realizó un lavado con MeOH por tres volúmenes de columna. El flujo se estableció a 20.0 mL/min.

Cada fracción (25 mL) fue concentrada con un rotavapor y posteriormente analizada por CCF para reunir aquellas con perfiles cromatográficos similares. Las placas fueron reveladas con luz UV de longitud de onda corta y onda larga, además de usar una solución de $H_2SO_4$ al 10% calentándose a 90 °C por dos minutos. Las fracciones resultantes fueron analizadas por HPLC siguiendo las condiciones establecidas en el punto 4.5.1.

#### 4.5.2.1. Fraccionamiento secundario de l HELT 1-F.2

La fracción denominada l HELT 1-F.2 (30mg), obtenida por cromatografía en columna flash de la muestra l HELT 1, fue sometida a un fraccionamiento secundario mediante HPLC analítico (Waters e2695 Separations Module). La elución fue realizada en una columna C-18 (Xterra 4.6 mm * 250 mm, tamaño departícula 5 µm) inyectando 30 µL de una solución a una concentración de 20 mg/mL. Como fase móvil se utilizó agua (con 0.1 % ác. fórmico) 40:60 MeCN en modo isocrático durante 5 minutos, seguido de un gradiente a 100 % MeCN en dos minutos y finalmente una fase isocrático al 100 % MeCN por 16 minutos. El flujo se estableció a 1.0 mL/min. Se utilizó un detector Waters PDA 2298.

Para recolectar el compuesto correspondiente a la señal más intensa en esta fracción, se empleó un recolector de fracciones (Waters Fraction Collector II).

La fracción 3 obtenida de este fraccionamiento secundario fue analizada de igual forma por HPLC analítico, inyectando 20 µL de una solución a 1 mg/mL con las mismas condiciones descritas para su obtención.

### 4.5.3. Aislamiento de (-)-5-metilmelleina

El perfil cromatográfico de sólidos que precipitaron en la muestra BA-MA-H (extracto hexánico de arroz de *B. atropunctata*) se obtuvo utilizando el método descrito en el punto 4.5.2.1. con las siguientes modificaciones: inyecciones de 20 µL de una solución a 1 mg/mL.

El aislamiento de la (-)-5-metilmelleina se realizó empleando las mismas condiciones (equipo analítico, detector y elución), pero empleando una columna EVO C-18 (Phenomenex 10.0 mm * 250 mm, tamaño de partícula 5 µm) y utilizando un flujo de 4.6 mL/min. Se realizaron inyecciones de 100 µL de una solución a 5 mg/mL y se recolectó el compuesto correspondiente a la señal más intensa, con el equipo “Waters Fraction Collector II”.

### 4.5.4. Caracterización estructural de (-)-5-metilmelleina por técnicas espectroscópicas y espectrométricas

La rotación óptica de la (-)-5-metilmelleina asilada fue analizada en polarímetro Perkin Elmer Model 343. La muestra fue solubilizada en $CH_2Cl_2$ a una concentración de 5.6 mg/5 mL, se utilizó una celda de un decímetro de longitud y se configuró un tiempo de integración de cinco segundos.

Los grupos funcionales de la (-)-5-metilmelleina se analizaron mediante espectroscopia de infrarrojo con FTIR (transformada de Fourier por sus siglas en inglés) en modo ATR (reflectancia total atenuada por sus siglas en inglés) empleando un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum One y 3 mg de muestra.

El ion molecular y la masa de la (-)-5-metilmelleina se determinaron mediante espectrometría de masas con modo de ionización DART+ (Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization). El análisis se realizó en un espectrómetro JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC utilizando 3 mg de muestra.

La caracterización estructural se efectuó por RMN (resonancia magnética nuclear). Los espectros de $^{1}H$ y $^{13}C$ se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 400 MHz, mientras que los espectros de RMN de dos dimensiones se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III HD de 700 MHz con criosonda TCI 700 H-C / N-D de 5 mm. Se emplearon 6 mg de muestra solubilizada en $CDCl_3$ (cloroformo deuterado) y se utilizó TMS (tetrametilsilano) como estándar interno. Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa MestreNova 14.2

Los modelos en tres dimensiones de los estereoisómeros (3*R*)-5-metilmelleina y (3*S*)-5-metilmelleina fueron diseñados con el programa ChemDraw Professional 16.0.

#### 4.5.4.1. Actividad citotóxica de (-)-5-metilmelleina

La actividad citotóxica de la (-)-5-metilmelleina fue obtenida siguiendo la metodología establecida en el punto 4.3.3., pero utilizando un rango de concentraciones de 0 a 400 µM. Se evaluó contra las líneas MCF-7 y U-251, debido a que este metabolito secundario estaba presente en extractos que inhibieron estas líneas celulares. Se realizó una curva dosis-respuesta para calcular el $IC_{50}$ (concentración inhibitoria media) con la ecuación de la recta. Los resultados fueron comparados con los resultados de $IC_{50}$ del etopósido obtenido experimentalmente en el punto 4.3.3. bajo una prueba t para muestras independientes y se obtuvieron en el programa GraphPad Prism versión 8.0.2.

### 4.6. Disposición de residuos

La disposición de residuos se realizó con base a lo establecido por: Facultad de Ciencias Químicas UANL; Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica IPN; Facultad de Medicina UANL; Instituto de Química UNAM. También siguiendo lo establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

# 5. RESULTADOS Y DISCUSION

## 5.1. Aislar e identificar hongos endófitos de las hojas de *L. tridentata*.

### 5.1.1. Identificación por características morfológicas

De las hojas de *L. tridentata* se aislaron y caracterizaron cuatro diferentes morfotipos de hongos, los cuales se describen en las Tablas 4 a 7.

Tabla 4. Características morfológicas del hongo endófito *Biscogniauxia atropunctata* aislado de las hojas de *L. tridentata*

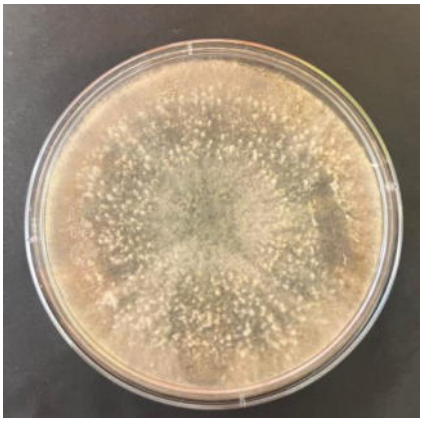
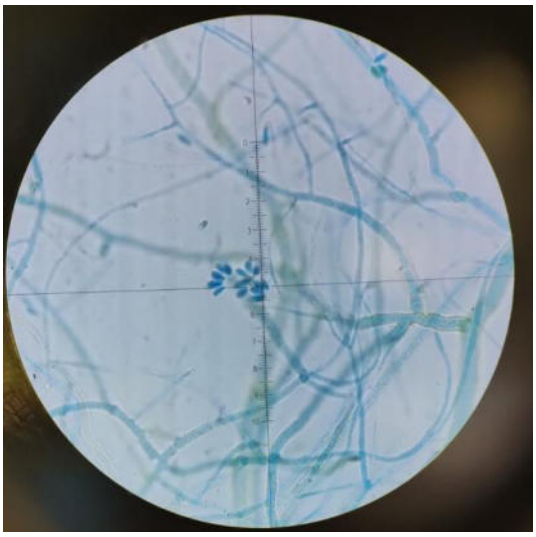
| **Hongo** | **Características macroscópicas** |
|---|---|
| PDA I C3 C |  a) b) a) Anverso: Algodonoso, color beige con tonos verdes. b) Reverso: Tonalidad amarilla con pigmento negro. |
| **Tasa de crecimiento** | |
| 9.73 $cm^2$/día | |

Tabla 4. Características morfológicas del hongo endófito *Biscogniauxia atropunctata* aislado de las hojas de *L. tridentata* – Continuación

| **Características microscópicas** |
| --- |
|  <br>a) Hifas hialinas septadas, fiálides solitarias con unión a conidios. Conidios hialinos unicelulares. Teñido con azul de lactofenol a 40x. |
| <br>b) Hifas hialinas septadas, fiálides solitarias con unión a conidios. Conidios hialinos unicelulares. Teñido con rojo Congo a 40x. |

Las características observadas tienen similitud con lo reportado por Sánchez-Fernández y colaboradores (2016) para una cepa del género *Nodulisporium* sp., el cual es anamorfo del género *Hypoxylon* sp. o *Biscogniauxia* sp (Spatafora, 1998).

Tabla 5. Características morfológicas del hongo endófito *Nigrospora macarangae* aislado de las hojas de *L. tridentata*.

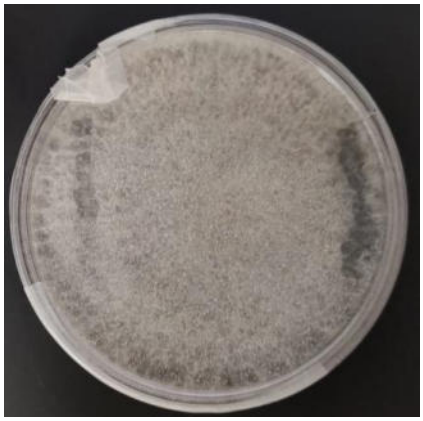
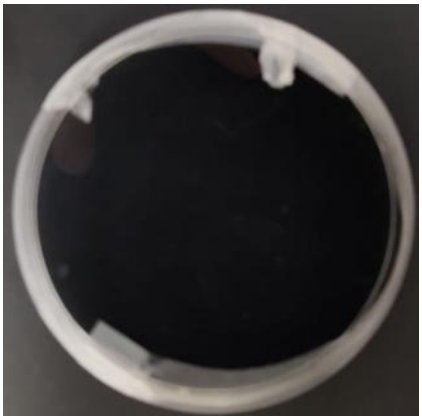
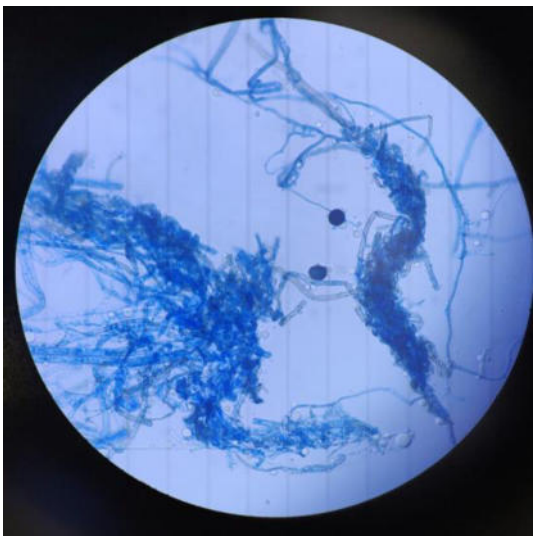
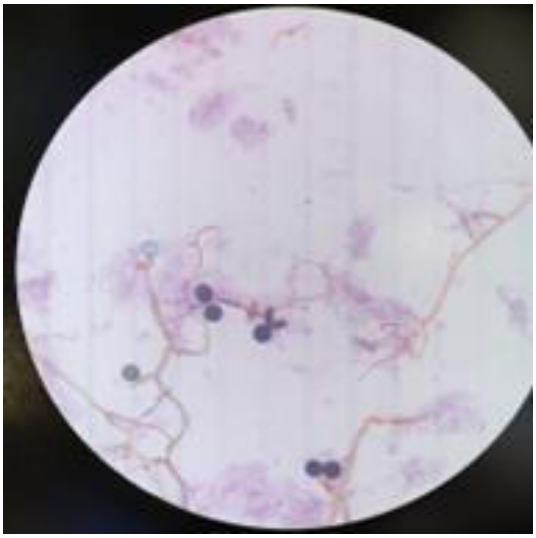
| **Hongo** | **Características macroscópicas** |
|---|---|
| PDA II C2 C |   a) b) a) Anverso: Micelio blanco que torna a negro. b) Reverso: Similar al anverso, formación de pigmento negro. |
| **Tasa de crecimiento** | |
| 7.2 $cm^2$/día | |

Tabla 5. Características morfológicas del hongo endófito *Nigrospora macarangae* aislado de las hojas de *L. tridentata* – Continuación

| **Características microscópicas** |
| --- |
|  <br>a) Hifas hialinas septadas. Presenta peritecios de color negro. Teñido con azul de lactofenol a 40x. |
|  <br>b) Hifas hialinas septadas. Presenta peritecios de color negro. Teñido con rojo Congo a 40x. |

Las características tienen similitud a lo reportado por Pitt & Hocking (2009) para el género *Nigrospora* sp.

Tabla 6. Características morfológicas del hongo endófito *Aspergillus niger* aislado de las hojas de *L. tridentata*

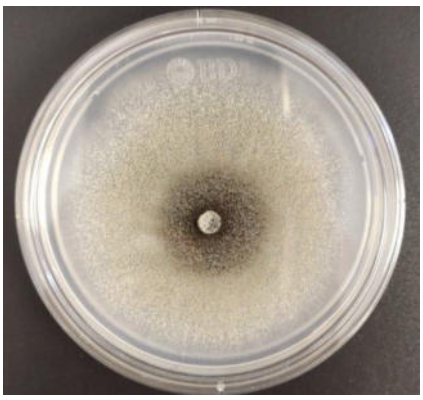
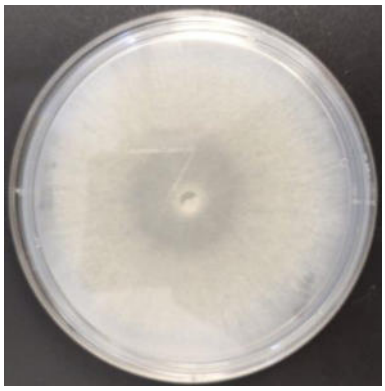
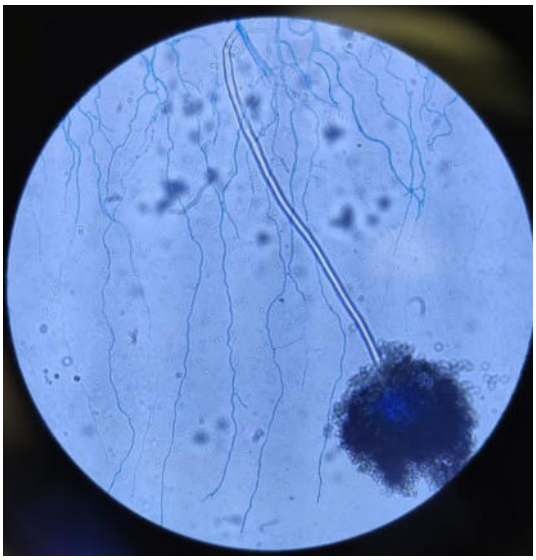
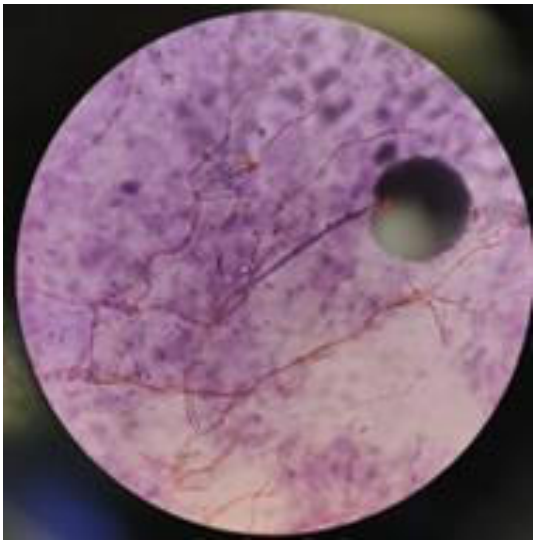
<table>
<tr><th>Hongo</th><th>Características macroscópicas</th></tr>
<tr><td>PDA III C3 C</td><td rowspan="3">   <br>a) b)<br>a) Anverso: Color verde olivo y negro, crecimiento radial. Polvoriento y seco.<br>Reverso: Similar al anverso con tonalidad amarilla.</td></tr>
<tr><td>Tasa de crecimiento</td></tr>
<tr><td>7.4 $cm^2$/día</td></tr>
</table>

Tabla 6. Características morfológicas del hongo endófito *Aspergillus niger* aislado de las hojas de *L. tridentata* – Continuación

| **Características microscópicas** |
| --- |
|  <br>a) Hifas hialinas septadas, conidióforo emergente con métula, fiálide y conidios unicelulares. Teñido con azul de lactofenol a 40x. |
|  <br>b) Hifas hialinas septadas, conidióforo emergente con métula, fiálide y conidios unicelulares. Teñido con rojo Congo a 40x. |

Las características tienen similitud a lo reportado por Pitt & Hocking (2009) para el hongo *Aspergillus niger*.

Tabla 7. Características morfológicas del hongo endófito *Nigrospora oryzae* aislado de las hojas de *L. tridentata*

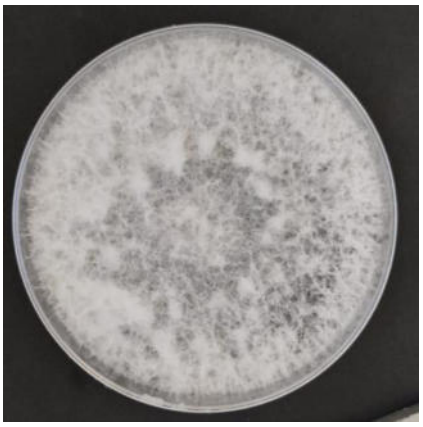
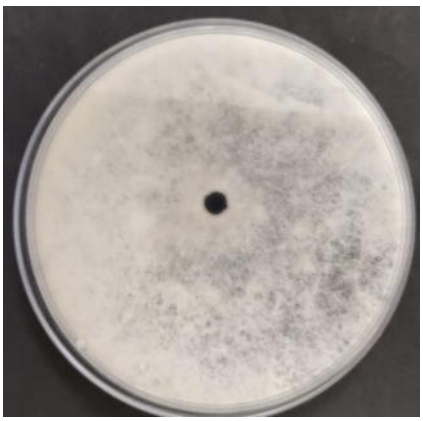
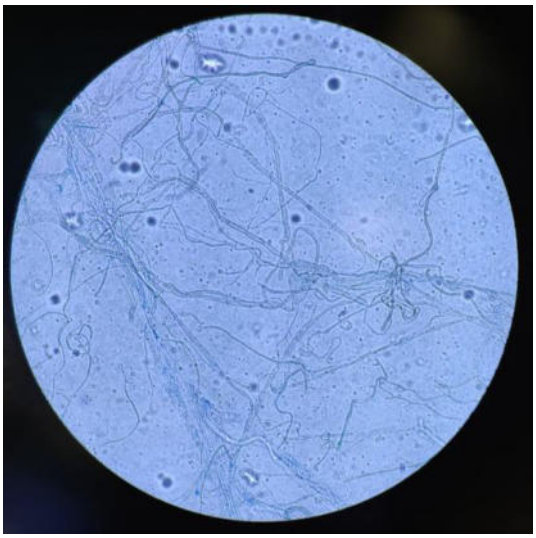
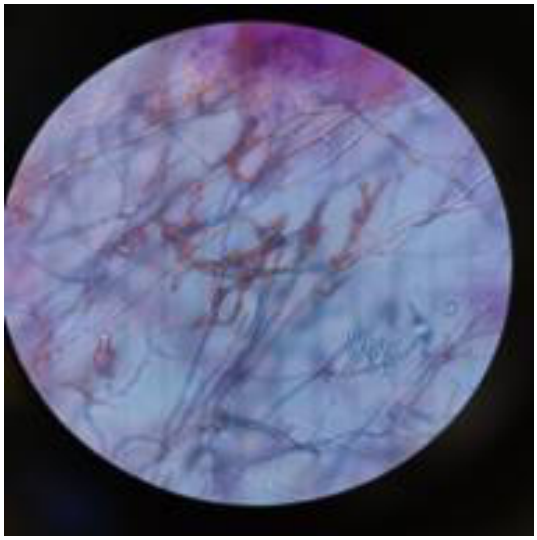
| **Hongo** | **Características macroscópicas** |
|---|---|
| PDA IV C4 C |   a) b) |
| **Tasa de crecimiento** | |
| 10.49 $cm^2$/día | a) Anverso: Plumoso, crecimiento irregular, coloración blanca, con el tiempo se torna gris<br>b) Reverso: Similar al anverso. |

Tabla 7. Características morfológicas del hongo endófito *Nigrospora oryzae* aislado de las hojas de L. tridentata – *Continuación*

| **Características microscópicas** |
| --- |
|  <br>a) Hifas hialinas septadas. Bajo estas condiciones no se han observado estructuras reproductivas. Teñido con azul de lactofenol a 40x. |
|  <br>b) Hifas hialinas septadas. Bajo estas condiciones no se han observado estructuras reproductivas. Teñido con rojo Congo a 40x. |

Este hongo no presenta conidióforos o estructuras reproductivas bajo las condiciones de cultivo utilizadas, por lo que no fue posible identificarlo por características morfológicas.

### 5.1.2. Identificación de hongos endófitos por secuenciación

#### 5.1.2.1. Extracción ADN (ácido desoxirribonucleico)

Al cuantificar el ADN con el equipo Nanodrop se obtuvieron los siguientes cocientes de cantidad y pureza presentados en la Tabla 8.

Tabla 8. Cantidad y pureza de ADN de cada hongo endófito

| Muestra | [ng/mL] | Cociente $\frac{Absorbancia_{260}}{Absorbancia_{280}}$ | Cociente $\frac{Absorbancia_{260}}{Absorbancia_{230}}$ |
|---|---|---|---|
| PDA I C3 C | 142.80 | 1.95 | 1.48 |
| PDA II C2 C | 1,536.50 | 2.02 | 1.63 |
| PDA III C3 C | 1,586.00 | 2.04 | 1.77 |
| PDA IV C4 C | 202.00 | 2.01 | 1.58 |

Como se puede observar, en general los cocientes de 260/280 de todas las muestras se encuentran entre 1.90 y 2.05, siendo relaciones aceptables para demostrar la pureza de ADN, aunque pueden tener ligeras contaminaciones con RNA, ya que idealmente se espera un cociente de 1.80 (Bruijns et al., 2022).

Por su parte, los cocientes de 260/230 presentan relaciones menores a 1.80, lo cual sugiere contaminaciones en la extracción de ADN, atribuibles a contaminación por el material inorgánico o el kit de extracción (Koetsier et al., 2019). Esto demostró que la purificación de los productos de PCR previo a su secuenciación es necesaria.

#### 5.1.2.2. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

En la Tabla 9 se presentan los alineamientos con mayor similitud para cada hongo.

Tabla 9. Alineamientos con mayor similitud para cada hongo endófito

| Hongo endófito | Especie propuesta | Número de acceso | Porcentaje de identidad (%) |
|---|---|---|---|
| PDA I C3 C | *Biscogniuaxia atropunctata* | AF201705.1 | 99.44 |
| PDA II C2 C | *Nigrospora macarangae* | NR_174838.1 | 99.80 |
| PDA III C3 C | *Aspergillus niger* | KJ881376.1 | 99.02 |
| PDA IV C4 | *Nigrospora oryzae* | KT966519.1 | 99.19 |

Los resultados de identificación por secuenciación presentados en la Tabla 9 fueron homologados con las características morfológicas, coincidiendo para cada hongo.

De las hojas de *L. tridentata* se aislaron cuatro hongos endófitos, los cuales fueron: *B. atropunctata*, *N. macarangae*, *A. niger* y *N. oryzae.* Cada hongo fue identificado mediante sus características morfológicas y confirmado por la secuenciación del ITS de su gen 5.8s ribosomal, ya que esta región es altamente conservada, además de ser única de cada especie fúngica. Debido a esto, es considerada un “código de barras” en la identificación taxonómica de hongos (dos Reis et al., 2022). Al momento de realización de este trabajo ninguna de estas especies ha sido reportadas como endófitas de *L. tridentata* (Bashyal et al., 2006;Strobel, et al. 2011; Massimo, et al. 2015).

Los hongos del género *Biscogniauxia* spp. son conocidos por colonizar plantas leñosas y tener una relación de antagonismo balanceado con las plantas hospederas, ya que son endófitos por un tiempo indefinido hasta que la planta hospedera se enfrenta a una situación de estrés (heridas mecánicas, temperaturas bajas y sequías), aquí el hongo se comporta como patógeno. *B. atropunctata* crece de manera óptima a 35 °C y puede crecer incluso a 40 °C, temperaturas a las cuales se ve expuesta *L. tridentata* (Moreno-Rico et al., 2010; Olson, 2017).

Por su parte, los hongos de género *Aspergillus* sp. han sido reportados por Prajapati y colaboradores (2021) como uno de los géneros con mayor incidencia a presentarse como endófitos. Diversos hongos del género *Aspergillus* spp. ya han sido reportados como endófitos de *L. tridentata* (Massimo, et al. 2015). Esta es la primera vez que se reporta *A. niger* como endófito de esta planta. Además, esta especie fúngica es xerófila (Pitt & Hocking, 2009), lo que le daría la capacidad de crecer en ambientes áridos como lo es al que está expuesta *L. tridentata*.

Los hongos de género *Nigrospora* sp. han sido reportados previamente como endófitos de diferentes plantas (Prajapati et al., 2021). Pero esta es la primera vez que se reportan cepas de *N. macarangae* y *N. oryzae* como endófitos en *L. Tridentata*. Por su parte, *N. oryzae* no pudo ser identificado por sus características morfológicas, ya que no se observaron estructuras reproductivas, la cual es una característica que se presenta en más del 50% de los hongos endófitos (Mérillon et al., 2019).

## 5.2. Cultivo a mediana escala de los hongos endófitos puros para obtener extractos orgánicos y fracciones primarias del micelio y de medio de cultivo.

En la Tabla 10 se muestran los extractos/fracciones que se unieron por ser cromatográficamente similares por CCF.

Tabla 10. Rendimiento de extractos o fracciones reunidas después del análisis por CCF.

| Hongo | Medio | Extracto/Fracción | Rendimiento (g/300g arroz o g/1L CPD) | Clave |
|---|---|---|---|---|
| *Biscogniauxia atropunctata* | MA | Extracto orgánico (Hex-AcOEt) | 1.740 | I HELT 1 |
| | | Fracción aq. (acuosa) | 21.430 | I HELT 2 |
| | CPD | AcOEt | 0.149 | I HELT 3 |
| | | Micelio – Extracto orgánico (Hex-AcOEt) | 0.084 | I HELT 4 |
| | | Micelio – Fracción aq. | 1.780 | I HELT 5 |

Tabla 10. Rendimiento de extractos o fracciones reunidas después del análisis por CCF. – Continuación

| Hongo | Medio | Extracto/Fracción | Rendimiento (g/300g arroz o g/1L CPD) | Clave |
|---|---|---|---|---|
| *Nigrospora macarangae* | MA | Hex | 0.258 | II HELT 1 |
| | | $CH_2Cl_2$-AcOEt | 4.100 | II HELT 2 |
| | CPD | AcOEt | 0.251 | II HELT 3 |
| | | Micelio – Hex | 0.096 | II HELT 4 |
| | | Micelio – $CH_2Cl_2$-AcOEt | 0.668 | II HELT 5 |
| *Aspergillus niger* | MA | Extracto orgánico (Hex) | 0.226 | III HELT 1 |
| | | Extracto orgánico (AcOEt) | 0.530 | III HELT 2 |
| | | Fracción aq. | 13.900 | III HELT 3 |
| | CPD | AcOEt | 0.508 | III HELT 4 |
| | | Micelio – Extracto Hex. | 0.013 | III HELT 5 |
| | | Micelio – Extracto AcOEt | 0.554 | III HELT 6 |
| | | Micelio - Fracción aq. | 0.512 | III HELT 7 |
| *Nigrospora oryzae* | MA | Hex | 0.298 | IV HELT 1 |
| | | $CH_2Cl_2$-AcOEt | 1.960 | IV HELT 2 |
| | CPD | AcOEt | 0.042 | IV HELT 3 |
| | | Micelio – Hex | 0.008 | IV HELT 4 |
| | | Micelio - $CH_2Cl_2$-AcOEt | 0.051 | IV HELT 5 |

## 5.3. Evaluación de los extractos y fracciones fúngicas contra bacterias farmacorresistentes y células cancerígenas

### 5.3.1. Actividad antibacteriana

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos/fracciones.

Tabla 11. Actividad antibacteriana (CMI µg/mL) de los extractos o fracciones obtenidos de los hongos endófitos aislados de *L. tridentata*.

| **Muestra** | ***E. faecium*** **(resistente a vancomicina)** | ***S. aureus*** **(resistente a meticilina).** | ***K. pneumoniae*** **(resistente a carbapenémicos)** | ***K. pneumoniae*** **(NDM+)** | ***A. baumannii*** **(resistente a carbapenémicos)** | ***P. aeruginosa*** **(resistente a carbapenémicos)** | ***E. coli*** **(productora de beta-lactamasas de espectro extendido)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I HELT 1 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| I HELT 2 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| I HELT 3 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| I HELT 4 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| I HELT 5 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| II HELT 1 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| II HELT 2 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| II HELT 3 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| II HELT 4 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| II HELT 5 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 1 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 2 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 3 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 4 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 5 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 6 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| III HELT 7 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |

Tabla 11. Actividad antibacteriana (CMI µg/mL) de los extractos o fracciones obtenidos de los hongos endófitos aislados de *L. tridentata* – Continuación.

| **Muestra** | ***E. faecium* (resistente a vancomicina)** | ***S. aureus* (resistente a meticilina).** | ***K. pneumoniae* (resistente a carbapenémicos)** | ***K. pneumoniae* (NDM+)** | ***A. baumannii* (resistente a carbapenémicos)** | ***P. aeruginosa* (resistente a carbapenémicos)** | ***E. coli* (productora de beta-lactamasas de espectro extendido)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IV HELT 1 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| IV HELT 2 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| IV HELT 3 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| IV HELT 4 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| IV HELT 5 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 | > 200 |
| Levofloxacino | 100 | 3.125 | 0.625 | 50 | 6.25 | 1.562 | 6.250 |

Extractos I HELT 1-5: *B. atropunctata.* Extractos II HELT 1-5: *N. macarangae.* Extractos III HELT 1-7: *A. niger.* Extractos IV HELT 1-5: *N. oryzae*

Los resultados de los ensayos de actividad antibacteriana de los extractos y fracciones obtenidas de los cuatro hongos endófitos muestran que no hubo inhibición bacteriana de ninguna de las cepas evaluadas a concentraciones ≤200 µg/mL. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales empleadas, los hongos endófitos de *L. tridentata* no producen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana detectable a las concentraciones evaluadas.

No existe evidencia concluyente en la literatura que respalde la actividad antibacteriana del género *Biscogniuaxia* contra bacterias resistentes a fármacos. Sin embargo, algunos estudios han reportado actividad antibacteriana atribuida a este género en contextos específicos. Tal es el caso de Han y colaboradores (2023), quienes observaron inhibición de crecimiento de 3 cepas bacterianas no farmacorresistentes (*S. aureus*, *E. coli* y *Streptococcus agalactie*), mediante la técnica de difusión en agar con extractos de *B. petrensis*, endófito de *Dendrobium harveyanum.* Sin embargo, la actividad de su extracto (diámetros de inhibición entre 16-19 mm) fue significativamente inferior ($p < 0.05$) a la del control positivo utilizado en su ensayo, la ampicilina (diámetros de inhibición ≥ 20 mm). Además, Lu y colaboradores (2022) evaluaron el porcentaje de inhibición en modelos de co-cultivos de hongos endófitos aislados de *Coffea arabica*, entre ellos *Biscogniauxia* sp., demostrando que este inhibió el crecimiento de la bacteria patógena *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Desafortunadamente esta metodología no permite realizar comparaciones directas con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que no proporciona un dato cuantitativo sobre la CMI. Por último, Purbaya y colaboradores (2023) realizaron una revisión sistemática al género *Biscogniauxia*, evidenciando la escasa información disponible respecto a la actividad antibacteriana de sus metabolitos secundarios contra bacterias farmacorresistentes. Esto resalta la necesidad de evaluar de manera sistemática los extractos del género *Biscogniauxia*, con la finalidad de evidenciar la capacidad de estos hongos de producir metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

Un caso similar ocurre con el hongo *A. niger*, ya que no existe evidencia concluyente que sustente la actividad antibacteriana de sus extractos contra bacterias farmacorresistentes. En algunos reportes realizaron difusión en agar, pero no se especificó si las cepas bacterianas incluían variantes resistentes (Abdel-Rahman et al., 2019). Por otro lado Elkady y colaboradores (2022), reportaron un extracto de *A. niger*, endófito de *Opuntia ficus-indica* que tuvo valores de CMI de 250 µg/mL para una cepa de *K. pneumoniae* (resistente a carbapenémicos), 500 µg/mL para cepas de *S. aureus* (resistente a meticilina) y *E. faecalis* (resistente a vancomicina) y >1,000 µg/mL para una cepa de *P. aeruginosa* (multirresistente a fármacos). Sin embargo, en este trabajo no se evaluaron concentraciones >200 µg/mL, por lo cual no se puede realizar una comparación directa.

Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de *N. oryzae* y *N. macarangae* contrastan con lo reportado por Fanele & Ndlovu (2023), quienes reportan un extracto de *N. oryzae*, endófito de *Sclerocarya birrea*, que mostró actividad a una concentración de 1 µg/mL contra una cepa resistente de *P. aeruginosa* (multifármaco resistente) y un valor de CMI de 16 µg/mL contra una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina. Este contraste puede ser atribuible a diferencias experimentales, ya que dichos autores obtuvieron sus extractos con diferentes condiciones de cultivo (matraces Erlenmeyer y caldo extracto de malta como medio de cultivo). Estos cambios sutiles son parte de la metodología “OSMAC” (One Strain, Many Compounds por sus siglas en inglés). Esta metodología promueve la producción de diferentes (y ocasionalmente novedosos) metabolitos con actividad biológica (Rodríguez Martín-Aragón et al., 2023).

Lo observado en la literatura y los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la necesidad de explorar metodologías diferentes para observar y cuantificar la actividad antibacteriana de los hongos endófitos en la búsqueda de metabolitos secundarios. Asimismo, es necesario explorar alternativas experimentales como la metodología OSMAC para favorecer la producción de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana frente a bacterias farmacorresistentes.

### 5.3.2. Actividad antimicobacteriana

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la actividad antimicobacteriana de los extractos/fracciones. Así como en la Tabla 12 se muestran los resultados de los controles positivos empleados en el ensayo.

Tabla 12. Actividad antimicobacteriana (CMI en µg/mL) de los extractos o fracciones de hongos endófitos aislados de *L. tridentata.*

| Muestra | ***M. tuberculosis*** **H37Rv (Sensible a estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida)** | ***M. tuberculosis*** **G117 (Resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol)** |
|---|---|---|
| I HELT 1 | >200 | >200 |
| I HELT 2 | >200 | >200 |
| I HELT 3 | >200 | >200 |
| I HELT 4 | >200 | >200 |
| I HELT 5 | >200 | >200 |
| II HELT 1 | >200 | >200 |
| II HELT 2 | >200 | >200 |
| **II HELT 3** | **100** | >200 |
| **II HELT 4** | **200** | >200 |
| **II HELT 5** | **25-50** | >200 |
| III HELT 1 | >200 | >200 |
| III HELT 2 | >200 | >200 |
| III HELT 3 | >200 | >200 |
| III HELT 4 | >200 | >200 |
| III HELT 5 | >200 | >200 |
| III HELT 6 | >200 | >200 |
| III HELT 7 | >200 | >200 |
| IV HELT 1 | >200 | >200 |
| IV HELT 2 | >200 | >200 |
| IV HELT 3 | >200 | >200 |
| IV HELT 4 | >200 | >200 |
| IV HELT 5 | >200 | >200 |

Se destacaron los extractos/fracciones que tuvieron una CMI ≤ 200 µg/mL
Extractos I HELT 1-5: *B. atropunctata.* Extractos II HELT 1-5: *N. macarangae.* Extractos III HELT 1-7: *A. niger.* Extractos IV HELT 1-5: *N. oryzae*

Tabla 13. Actividad antimicobacteriana (CMI en µg/mL) de controles positivos empleados en el ensayo.

| Muestra | ***M. tuberculosis*** **H37Rv (Sensible a estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida)** | ***M. tuberculosis*** **MDR G117 (Resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol)** |
|---|---|---|
| Rifampicina | 0.0625 | 2.5 |
| Isoniazida | <0.3125 | >10 |
| Etambutol | 3.125 | 3.125 |
| Levofloxacino | 0.25 | 5 |

De acuerdo con Cheng y colaboradores (2012), los hongos del género *Biscogniauxia* sp. producen azafilonas (Figuras 8 y 9) que inhiben el crecimiento de cepas sensibles de *M. tuberculosis* (CMI entre 2.5-5 µg/mL). Esto contrasta con los resultados obtenidos en el ensayo, ya que los extractos de *B. atropunctata* no tuvieron actividad antimicobacteriana a las concentraciones utilizadas en el ensayo. Cabe destacar que Cheng y colaboradores evaluaron compuestos puros, mientras que en este trabajo se evaluó a nivel de extracto, lo cual genera diferencias en los valores de inhibición.

El extracto II HELT 5 mostró actividad a una concentración de 25-50 µg/mL. Esto es similar a lo reportado por Kornsakulkarn y colaboradores (2018), quienes reportan un extracto de *Nigrospora* sp. que tuvo el mismo valor de CMI (50 µg/mL) contra una cepa atenuada de *M. tuberculosis* (H37Ra). Estos resultados demuestran que el hongo endófito, *N. macarangae*, produce metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis*.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los extractos de *A. niger* y *N. oryzae* no tuvieron actividad antimicobacteriana. Aunque no se han encontrado reportes previos de la actividad antimicobacteriana de extractos de *A. niger* o *N. oryzae*, no es posible determinar si estos hongos no producen metabolitos secundarios con actividad antimicobacteriana. Esto debido a que se pueden evaluar otras condiciones de cultivo, las cuales podrían inducir la producción de compuestos bioactivos.

### 5.3.3. Actividad citotóxica

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la actividad citotóxica (en porcentaje de viabilidad celular) de los extractos o fracciones.

Tabla 14. Porcentaje de viabilidad celular producido por extractos o fracciones obtenidos de hongos endófitos aislados de *L. tridentata* a 50 µg/mL.

| Muestra | PC-3 | MCF-7 | HCT-15 | U-251 | SK-LU-1 | HaCaT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I HELT 1 | 77.29±6.66 | 101.90±8.59 | 93.57±0.81 | **51.99±6.64** | 108.34±5.42 | **93.35±4.06** |
| I HELT 2 | 79.62±2.27 | 102.07±7.51 | 102.18±6.03 | **53.24±9.44** | 118.09±2.35 | **91.70±8.70** |
| I HELT 3 | 77.87±7.53 | 86.66±6.76 | 92.51±9.77 | **48.90±5.11** | 115.69±7.20 | **103.64±5.53** |
| I HELT 4 | 61.86±2.87 | 89.68±4.79 | 97.00±7.83 | 67.97±5.80 | 116.81±9.52 | 95.23±6.32 |
| I HELT 5 | 70.72±7.24 | 94.11±5.68 | 82.38±8.23 | 62.49±5.81 | 132.69±2.80 | 74.41±4.76 |
| II HELT 1 | 85.38±0.53 | 97.97±7.94 | 100±8.00 | 70.93±4.20 | 119.14±6.87 | 102.43±1.46 |
| II HELT 2 | 65.16±5.59 | **59.17±4.39** | 105.74±7.99 | 117.85±2.13 | 65.96±10.20 | **99.28±6.20** |
| II HELT 3 | 31.79±1.52 | 34.75±3.35 | 50.23±5.12 | 43.18±0.68 | 22.76±8.67 | 48.68±7.94 |
| II HELT 4 | 81.28±7.54 | 67.33±9.64 | 70.41±7.62 | 84.64±6.38 | 87.97±5.43 | 110.56±9.97 |
| II HELT 5 | 46.88±3.68 | 45.41±5.18 | 58.58±5.93 | 70.05±7.32 | 86.70±1.87 | 49.57±5.14 |
| III HELT 1 | 89.85±7.83 | 64.60±9.06 | 65.51±9.89 | 77.80±6.43 | 98.17±5.33 | 79.53±6.19 |
| III HELT 2 | 78.14±4.32 | 90.94±8.35 | 93.28±8.24 | 102.99±8.00 | 105.74±2.60 | 95.05±4.25 |
| III HELT 3 | 74.07±6.53 | 64.89±7.63 | 74.42±7.60 | 87.22±7.21 | 66.30±3.52 | 80.73±4.94 |
| III HELT 6 | 70.73±11.05 | 69.74±6.89 | 88.79±4.86 | 87.59±5.57 | 82.16±8.87 | 56.58±6.74 |
| III HELT 7 | 102.88±7.09 | **56.19±5.77** | 79.95±8.30 | 93.39±10.70 | 98.56±6.87 | **100.39±4.82** |
| IV HELT 1 | 88.77±5.75 | 63.46±5.14 | 88.43±1.92 | 91.66±3.22 | 91.81±5.48 | 79.93±7.27 |
| IV HELT 2 | 76.12±3.89 | 91.10±7.52 | 116.26±5.75 | 121.23±0.74 | 57.39±3.69 | 86.51±5.74 |
| IV HELT 3 | 54.43±6.96 | 76.43±3.28 | 68.44±4.24 | 67.92±4.67 | 48.60±2.06 | 57.21±5.75 |
| IV HELT 5 | 95.99±2.13 | 73.50±7.27 | 83.94±4.61 | 93.29±5.75 | 89.76±7.54 | 100.87±6.38 |
| DMSO | 96.00±6.93 | 100±0.10 | 101.39±4.60 | 100±0.10 | 97.49±2.47 | 95.72±3.71 |
| Etopósido $IC_{50}$ µg/mL | 4.88 | 31 | 2.79 | 1 | 29.59 | 33.94 |

PC-3: células de cáncer de próstata; MCF-7: células de cáncer de mama; HCT-15: células de cáncer de colon; U-251: células de glioblastoma; SK-LU-1: células de cáncer de pulmón; HaCaT: queratinocitos. Extractos I HELT 1-5: *B. atropunctata.* Extractos II HELT 1-5: *N. macarangae.* Extractos III HELT 1-3 y 6-7: *A. niger.* Extractos IV HELT 1-5: *N. oryzae*. Se presenta porcentaje promedio de la viabilidad celular ± desviación estándar. Se destacaron los resultados de extractos o fracciones que redujeron la viabilidad celular en valores menores al 60 % de líneas celulares cancerígenas y mantuvieron en valores mayores al 90 % la línea celular no cancerígena HaCaT.

Los extractos I HELT 1, I HELT 2 y I HELT 3 de *B. atropunctata* demostraron reducir la viabilidad celular de la línea cancerígena U-251 a valores cercanos al 50%, mientras que mantuvieron la viabilidad celular de la línea no cancerígena HaCaT en valores mayores al 90%. Al analizar los resultados bajo una prueba t para muestras independientes, se observó que los extractos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en su efecto sobre la línea cancerígena U-

251, sin afectar de manera significativa la viabilidad de línea no cancerígena HaCaT. Estos resultados sugieren que el hongo *B. atropunctata* produce metabolitos con actividad citotóxica.

Aunque al momento de realizar este ensayo no hay reportes de la actividad de los hongos *Biscogniauxia* spp. contra la línea U-251, estos resultados son consistentes con la literatura, ya que los hongos endófitos de género *Biscogniauxia* fueron catalogados por Jantaharn y colaboradores (2021) como una fuente potencial para el aislamiento de metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

El extracto II HELT 2 de *N. macarangae* tuvo actividad contra la línea cancerígena MCF-7, al reducir su viabilidad celular a 59%. Además, mantuvo la viabilidad celular de la línea no cancerígena HaCaT en valores cercanos al 99%. Los análisis con la prueba t para muestras independientes confirmaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en su actividad sobre la línea MCF-7. Se ha reportado que los hongos endófitos del género *Nigrospora* spp. producen compuestos que tienen actividad selectiva sobre la línea cancerígena MCF-7 (Arumugam et al., 2015; Shang et al., 2012). Debido a esto, los hongos *Nigrospora* son una fuente prometedora para el aislamiento de metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

El extracto II HELT 3 de *N. macarangae* redujo la viabilidad celular de todas las líneas cancerígenas a valores entre 22 y 50%. Sin embargo, también redujo la viabilidad celular de la línea no cancerígena HaCaT a un valor del 48%. Para ensayos de viabilidad celular, se establece que valores menores al 70% de viabilidad celular en líneas no cancerígenas indican que la muestra es altamente citotóxica (Aleksandrova et al., 2019).

El extracto III HELT 7 de *A. niger* exhibió actividad contra la línea cancerígena MCF-7, ya que redujo la viabilidad celular de esta línea a un valor del 56%. Además, mantuvo la viabilidad celular de la línea no cancerígena HaCaT en valores cercanos al 100%. Al analizar estos resultados con una prueba t de muestras independientes, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en su efecto sobre la línea cancerígena MCF-7. En la literatura se ha demostrado que los *A. niger*

endófitos mimetizan metabolitos citotóxicos de la planta hospedera con actividad sobre la línea celular MCF-7 (Li et al., 2017), pero algunos metabolitos *L. tridentata* no destacan por inhibir esta línea cancerígena (Núñez-Mojica et al., 2021).

Los extractos de *N. oryzae* no redujeron la viabilidad celular de líneas cancerígenas ni tener actividad estadísticamente significativa sobre estas, comparado con la línea no cancerígena. Los resultados concuerdan con lo reportado en la bibliografía, ya que, al momento de realizar este trabajo, no se ha destacado la actividad citotóxica de metabolitos de los hongos *N. oryzae* (Ding et al., 2016; Fernández-Pastor et al., 2021). Aunque estos resultados no sean prometedores comparados con los anteriores, se pueden evaluar otras formas de cultivo donde se induzca la producción de metabolitos de *N. oryzae* que exhiban actividad citotóxica.

### 5.4. Cultivo a mayor escala del hongo endófito *B. atropunctata*.

En la Tabla 14 se muestran los rendimientos en peso de los extractos obtenidos de *B. atropunctata* al escalar los cultivos a 4 matraces Fernbach.

Tabla 15. Rendimiento de extractos de *B. atropunctata*

| Hongo | Medio | Extracto/Fracción | Rendimiento (g/1,200 g arroz) | Clave |
|---|---|---|---|---|
| *Biscogniauxia atropunctata* | MA | Extracto Hex | 1.76 | BA-MA-H |
| | | Extracto AcOEt | 3.71 | BA-MA-A |

#### 5.4.1. Actividad citotóxica de extractos de *B. atropunctata*

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la actividad citotóxica (en porcentaje de inhibición de crecimiento celular) de los extractos de *B. atropunctata* obtenidos a mayor escala.

Tabla 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular producido por extractos de *B. atropunctata* a 25 µg/mL.

| Muestra | PC-3 | MCF-7 | HCT-15 | U-251 | SK-LU-1 | COS-7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BA-MA-H | 5.80 | 42.85 | 7.07 | 18.03 | 12.94 | 19.20 |
| BA-MA-A | 6.00 | 55.81 | 8.74 | 16.37 | 14.14 | 16.84 |

PC-3: células de cáncer de próstata; MCF-7: células de cáncer de mama; HCT-15: células de cáncer de colon; U-251: células de glioblastoma; SK-LU-1: células de cáncer de pulmón; COS-7: fibroblastos de riñón de mono verde africano; BA-MA-H: Extracto Hex de arroz; BA-MA-A: Extracto de AcOEt de arroz. Se presenta porcentaje promedio inhibición de crecimiento celular.

La muestra BA-MA-H inhibió el crecimiento celular de MCF-7 a 42.85%, mientras que la muestra BA-MA-A inhibió la misma línea cancerígena a 55.81%. De acuerdo con Vichai & Kirtikara (2006), valores cercanos o mayor al 50% de inhibición de crecimiento celular se consideran indicativos de una buena actividad citotóxica. A pesar de no existir reportes previos de la actividad de extractos o compuestos de *B. atropunctata* sobre esta línea celular, la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios de este hongo ya se había demostrado con los extractos obtenidos a menor escala.

Sin embargo, al aumentar la escala de los extractos, estos tuvieron actividad significativa sobre la línea cancerígena MCF-7, comparada con la línea no cancerígena COS-7 (Aleksandrova et al., 2019). Estos resultados contrastan con los ensayos realizados con los extractos obtenidos a menor escala, los cuales mostraron actividad contra una línea cancerígena diferente, U-251. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferentes formas de obtención de los extractos: a menor escala se maceró el medio (MA) con una mezcla polar ($CH_2Cl_2$ 1:1 MeOH), mientras que a mayor escala se emplearon solventes de menor polaridad (Hex y AcOEt). De acuerdo con Tiwari y colaboradores (2011), la polaridad de solventes influye en los metabolitos secundarios extraídos, lo que podría explicar las diferencias observadas en la actividad biológica.

El cultivo a mayor escala tuvo como objetivo obtener suficiente cantidad de extracto para facilitar el aislamiento y purificación de al menos uno de los metabolitos secundarios mayoritarios. Asimismo, se decidió modificar la composición de la mezcla de extracción, ya que, debido a observaciones experimentales realizadas

dentro del grupo de investigación, utilizar más del 10% MeOH en mezcla puede facilitar la extracción de almidones del medio de cultivo (MA) y se puede favorecer la extracción del agua del medio de arroz, lo cual dificulta la concentración de los extractos utilizando rotavapor. Lo que demuestra la importancia de ajustar las condiciones de extracción para optimizar el rendimiento y la cantidad de metabolitos secundarios aislados.

## 5.5. Aislamiento y purificación de al menos un metabolito secundario mayoritario de los extractos activos y caracterizarlo estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas

### 5.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En las Figuras 16 y 17 se muestran los perfiles cromatográficos de la muestra I HELT 1 (fracción Hex-AcOEt de MA de *B. atropunctata*) al ser analizado por HPLC a 254 y 270 nm respectivamente, las cuales corresponden a las longitudes de onda máxima de absorción de las señales. Este análisis permitió identificar la absorción de luz UV de sus componentes principales y se identificaron al menos cinco señales: un pico principal con mayor intensidad de señal en el análisis a 254 nm, con tiempo de retención de 22.20 – 22.55 minutos; un par de picos con un tiempo de retención de 31.10 – 31.80 minutos; y otro par de picos con un tiempo de retención de 34.40 – 34.94 minutos. Se consideraron estas señales como las principales debido a su mayor intensidad en comparación con los demás picos detectados.

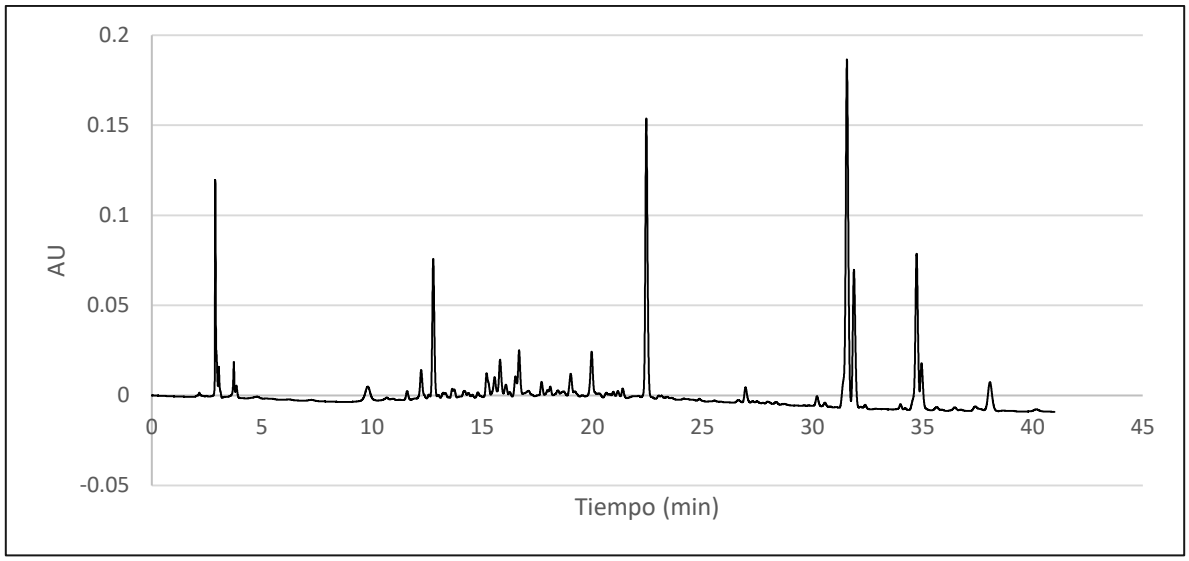



Figura 16. Cromatograma de l HELT 1 a 254 nm.

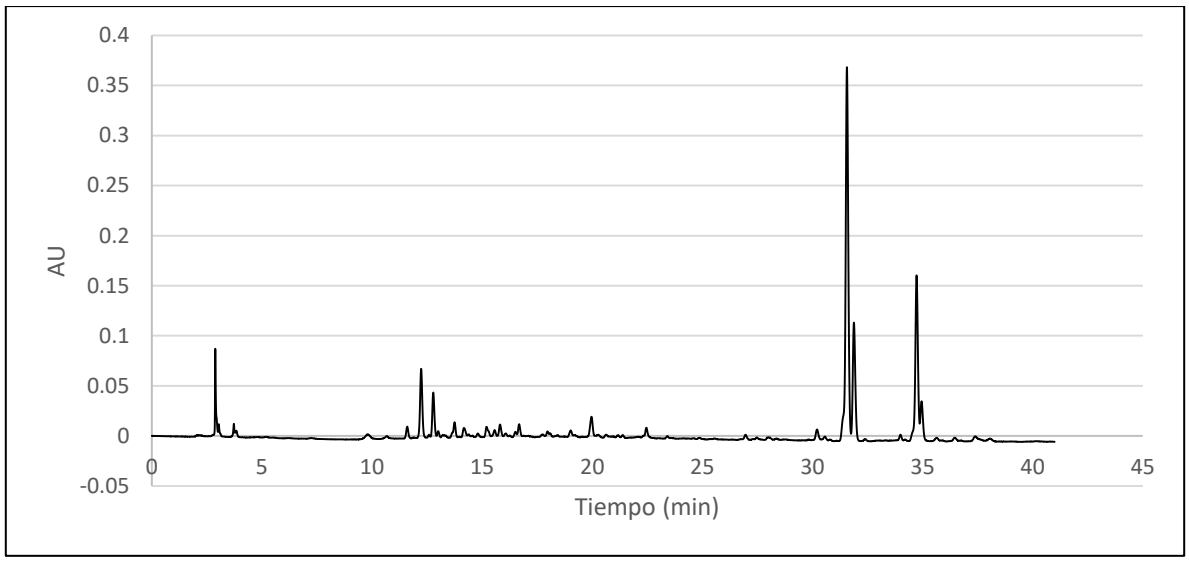



Figura 17. Cromatograma de l HELT 1 a 270 nm.

### 5.5.2. Fraccionamiento l HELT 1

La fracción l HELT 1 (fracción Hex-AcOEt de MA de *B. atropunctata*) fue fraccionada mediante cromatografía en columna flash, obteniendo un perfil UV del fraccionamiento (Figura 18). Del fraccionamiento se recuperaron las fracciones que se indican en la Tabla 16:

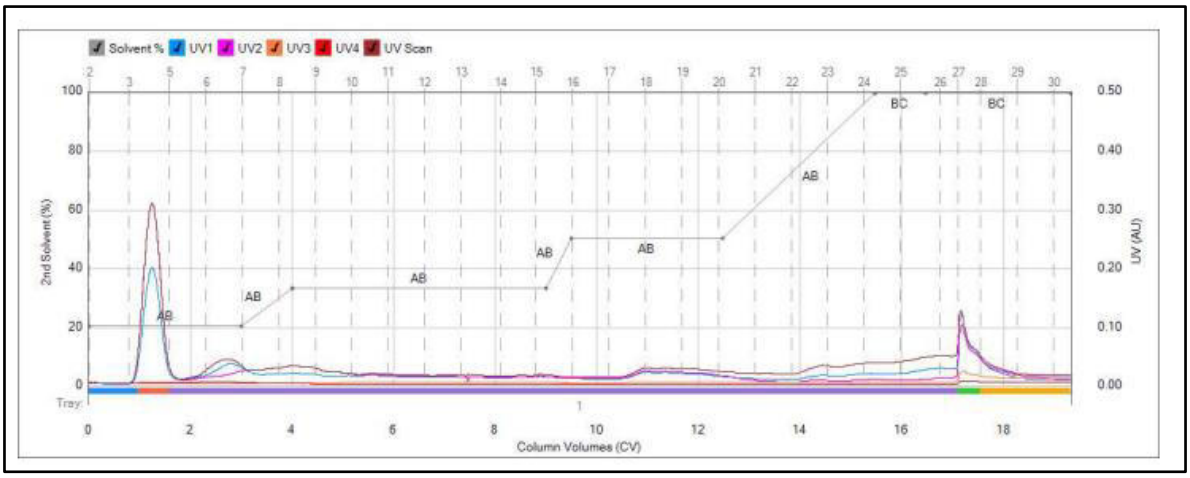



Figura 18. Perfil UV del fraccionamiento de I HELT 1 por cromatografía en columna flash

Se observa una señal intensa entre las fracciones cuatro y cinco, las cuales terminarían unidas por similitud cromatográfica en la muestra I HELT1-F.2.

Tabla 17. Fraccionamiento de I HELT 1 mediante cromatografía flash

| Fracción | Fracciones reunidas | Peso | Sistema de elución |
|---|---|---|---|
| I HELT 1-F.1 | F.1-F.3 | 164 mg | Hex 8:2 AcOEt |
| I HELT 1-F.2 | F.4-F.6 | 31 mg | |
| I HELT 1-F.3 | F.7-F.9 | 53.2 mg | Hex 8:2 AcOEt<br>Hex 2:1 AcOEt |
| I HELT 1-F.4 | F.10-F.16 | 43.6 mg | Hex 2:1 AcOEt<br>Hex 1:1 AcOEt |
| I HELT 1-F.5 | F.17-F.21 | 12.1 mg | Hex 1:1AcOEt<br>AcOEt 100 % |
| I HELT 1-F.6 | F.22 | 1 mg | AcOEt 100 % |
| I HELT 1-F.7 | F.23-F.24 | 7.9 mg | AcOEt 100 % |
| I HELT 1-F.8 | F.25 | 1.8 mg | AcOEt 100% |
| I HELT 1-F.9 | F.26-F.27 | 97.3 mg | MeOH 100% |
| I HELT 1-F.10 | F.28-F.29 | 3.3 mg | MeOH 100% |

En la fracción I HELT1-F.1 se recuperaron los compuestos que produjeron el par de señales a 34.40 – 34.94 minutos. Mientras que en la fracción I HELT1-F3. Se recuperaron los compuestos que originaban el par de señales a 31.10 – 31.80 minutos. Sin embargo, el fraccionamiento de estas muestras y la purificación de sus compuestos se descartó debido a que, en diferentes eluciones cromatográficas, no se observaban resolución entre las señales analizadas, lo que puede causar una recuperación de metabolitos coeluidos (Shimadzu Corporation, 2024)

Por otro lado, la fracción I HELT 1-F.2 contiene la señal que tiene un tiempo de retención de 22.20 – 22.55 min. En la Figura 19 se observa esta fracción al ser analizada por HPLC a 254 nm.

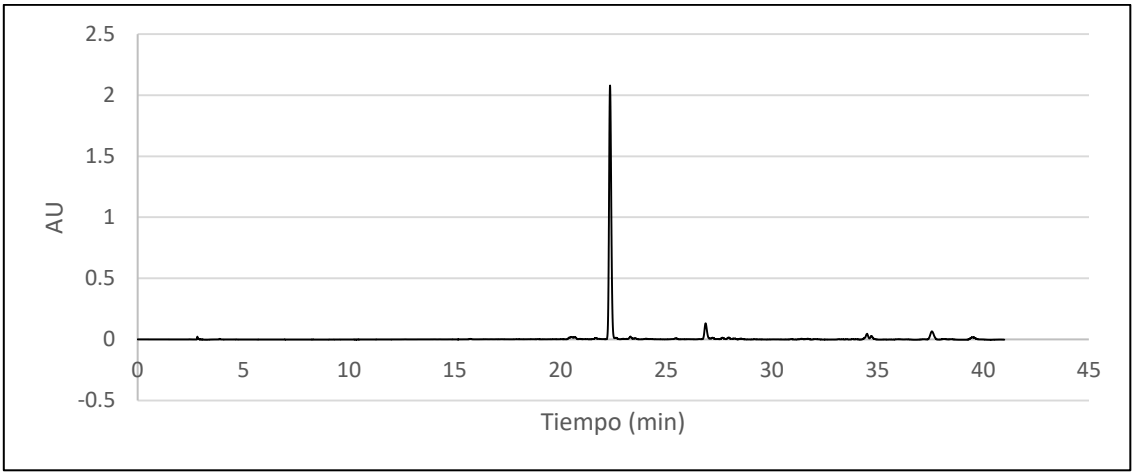



Figura 19. Cromatograma de I HELT 1-F.2 a 254 nm.

Esta señal tiene tres bandas de absorción máxima de luz UV: 210 nm, 248 nm y 322 nm, característicos de la (-)-5-metilmelleina (Okuno et al., 1986).

#### 5.5.2.1. Fraccionamiento secundario de I HELT 1-F.2

En la Figura 20 se reporta el perfil cromatográfico de la fracción I HELT 1-F.2 al ser analizada con un método optimizado. Donde se observa la señal que tiene un tiempo de retención de 22.20 – 22.55 min, pero desplazada a 5.10 – 5.30 min y manteniendo las bandas de absorción de 210 nm, 248 nm y 322 nm. De esta muestra se obtuvieron las subfracciones reportadas en la Tabla 17.

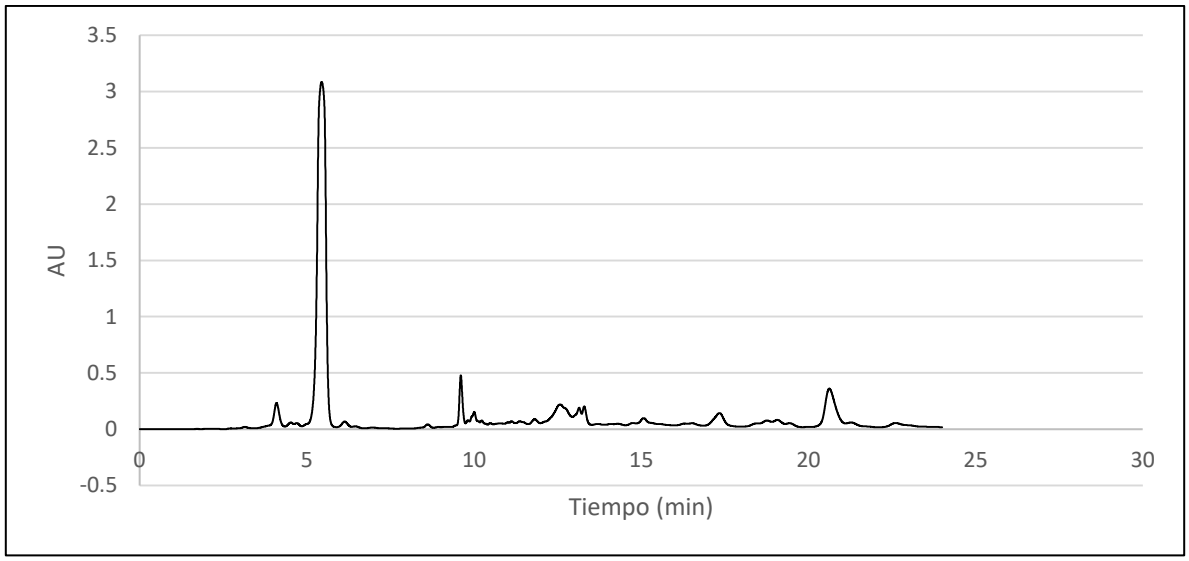



Figura 20. Cromatograma de l HELT 1-F.2 a 254 nm para el aislamiento de su compuesto mayoritario.

Tabla 18. Fraccionamiento secundario de I HELT 1-F.2

| Fracción | Tiempo de recolección (min) | Peso (mg) |
|---|---|---|
| I HELT 1-F.2-1 | 4.00-4.20 | 1.2 |
| I HELT 1-F.2-2 | 4.20-5.00 | 1.1 |
| I HELT 1-F.2-3* | 5.00-5.55 | 12 |
| I HELT 1-F.2-4 | 9.30-9.47 | 0.1 |
| I HELT 1-F.2-5 | 10.00-10.12 | 0.3 |
| I HELT 1-F.2-6 | 20.10-22.00 | 1.2 |
| I HELT 1-F.2-7 | 22.00-23.00 | 1.4 |

*Fracción con pico que genera la señal más intensa

En la Figura 21 se presenta el análisis por HPLC analítico de la muestra I HELT 1-F.2-3.

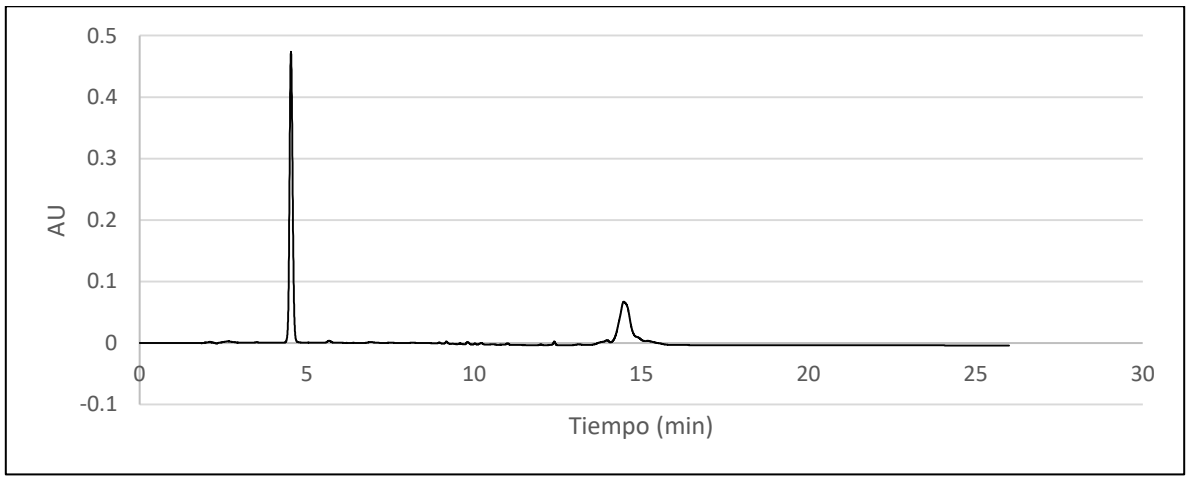



Figura 21. Cromatograma de I HELT 1-F.2-3 a 254 nm.

Para el aislamiento del compuesto que causa la señal más intensa se decidió utilizar el sólido cristalino que precipitó de la muestra BA-MA-H (extracto de Hex de MA de *B. atropunctata*), ya que compartían la misma señal.

### 5.5.3. Aislamiento de 5-metilmelleina

De la muestra BA-MA-H precipitó un sólido cristalino (48.1 mg). En la Figura 22 se observa su perfil cromatográfico por HPLC.

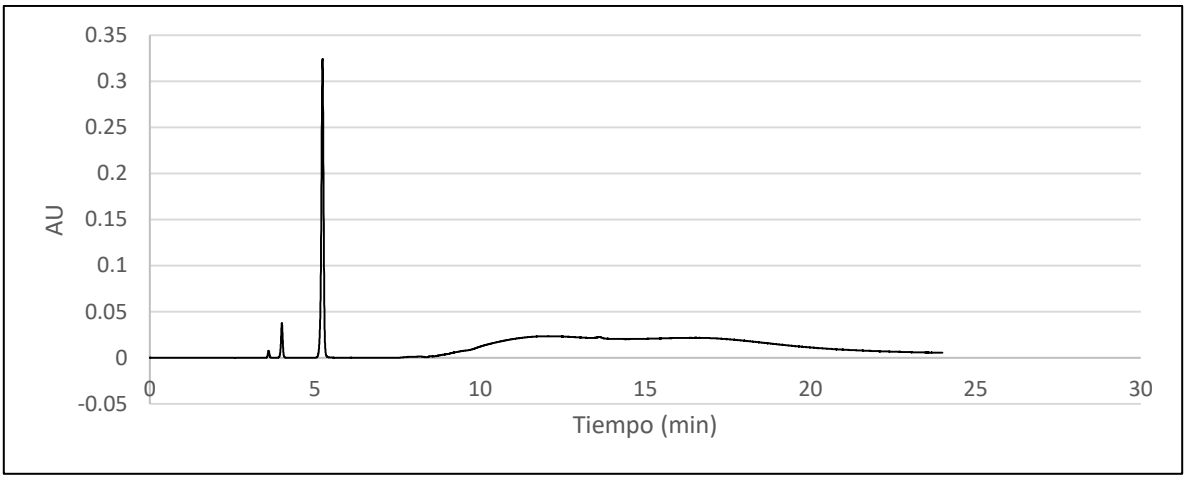



Figura 22. Cromatograma del sólido precipitado del extracto hexánico de MA de *B. atropunctata* a 254 nm.

Se fraccionaron 15 mg del sólido cristalino para recuperar la señal que tenía tiempo de retención entre 5.00 – 5.55 min. Recuperando 6.1 mg de muestra, los cuales fueron utilizados para la caracterización por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

### 5.5.4. Caracterización estructural de (-)-5-metilmelleina por técnicas espectroscópicas y espectrométricas

La molécula aislada fue identificada como (-)-5-metilmelleina (Figura 23). Esta molécula se aisló en forma de sólido cristalino incoloro, el cual es soluble en $CH_2Cl_2$. La caracterización estructural de la misma fue mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, cuyos resultados sugieren una estereoquímica relativa 3*R* en el único carbono quiral presente en este metabolito secundario.

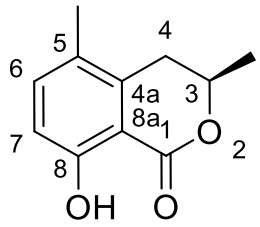



Figura 23. (-)-5-metilmelleina aislada y caracterizada estructuralmente de *B. atropunctata*

La molécula presentó una rotación óptica de $\alpha_D^{22}$= -0.111, lo cual tiene ligeras similitudes con lo reportado para el isómero *R* de la 5-metilmelleina, ya que presenta la misma desviación de la luz polarizada hacia la izquierda (configuración negativa, -) (Ballio et al., 1966; Masi et al., 2021; Okuno et al., 1986), pero se observó una diferencia significativa entre el valor experimental y las referencias (valores de α entre -105 y -119). Cabe mencionar que el isómero *S* presenta una desviación de la luz polarizada hacia la derecha (configuración positiva, +) (Jeong et al., 2022). Estos resultados sugieren que las diferencias experimentales (diferente concentración y solvente usado) tienen influencia en el valor obtenido. A pesar de esto, se guarda el mismo sentido de desviación de la luz causada por el isómero *R*.

En la Figura 24, se muestra el espectro de infrarrojo de la molécula aislada. Se observan: una banda a 1728 $cm^{-1}$ característica del estiramiento del enlace C=O de éster, una banda en 1288 $cm^{-1}$, asociada al estiramiento del enlace C-O; una banda en 3027 $cm^{-1}$ generada por la tensión del enlace =C-H aromático, las bandas a 841 $cm^{-1}$ y 620 $cm^{-1}$ ocasionadas también por la vibración fuera del plano del enlace =C-H aromático. Además, bandas a 1659 $cm^{-1}$ y 1476 $cm^{-1}$, generadas por el estiramiento del enlace C=C aromático. De acuerdo con la información analizada en el espectro de la figura 24, se sugiere que la molécula tiene un anillo aromático y un éster, ambos son grupos funcionales presentes en la (-)-5-metilmelleina. Se observa una banda a 2924 $cm^{-1}$, la cual es asociada al estiramiento de C-H alifático, la (-)-5-metilmelleina cuenta con 2 metilos (-$CH_3$); también se observa una banda a 1449 $cm^{-1}$, la cual es causada por la deformación del enlace C-H de metilenos (-$CH_2$-), también presente en la (-)-5-metilmelleina.

En la Figura 25, se muestra el espectro de masas de la molécula aislada, observando un ion molecular [M+H] de 193 m/z, estableciendo una masa de 192. Al tener una masa de número par, la molécula solo está conformada por carbonos, hidrógenos y oxígenos, no cuenta con nitrógenos en su estructura.

En la Figura 26 se muestra el espectro de RMN de $^1H$ (700 MHz, $CDCl_3$), en el cual se observan ocho señales de hidrógeno: δ (ppm) 1.58 (d, *J* = 6.33 Hz, 3H, $CH_3$-3), 2.22 (s, 3H, $CH_3$-5), 2.74 (dd, *J* = 16.57, 11.56 Hz, 1H, H4β), 2.97 (dd, *J* = 16.57,

3.3 Hz, 1H, H4α), 4.71 (dqd, *J* = 11.5, 6.3, 3.3 Hz, 1H, H3), dos protones aromáticos a 6.85 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H7) y 7.31 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H6) en disposición *orto* y 11.02 (s, 1H, OH-C8). Estas señales integran para 12 hidrógenos dentro de la molécula.

En la Figura 27 se muestra el espectro de RMN de $^{13}C$ de (-)-5-metilmelleina, donde se observan 11 señales de carbono: δ (ppm) 18.02 (Me-C5), 20.93 (Me-C3), 31.91 (C4), 75.42 (C3), 108.12 (C8a), 115.72 (C7), 124.90 (C5), 137.04 (C4a), 137.93 (C6), 160.51 (C8), 170.34 (C1).

Se observa que la señal ocasionada por OH-C8 está desplazada a un campo muy bajo, lo cual podría ser ocasionado por la formación de un puente de hidrógeno entre el fenol con el carbonilo de la (-)-5-metilmelleina. Esta interacción también explica la ausencia de la banda característica de tensión del enlace O-H en el espectro de infrarrojo. Además, las constantes de acoplamiento de H3 sugieren que tiene un ángulo diedro aproximado de 180° con H4α y un ángulo diedro aproximado de 60° con H4β y con $CH_3$-C3. Este acomodo en el espacio y las constantes de acoplamiento solo se pueden presentar en el isómero *R* (Figura 29a), ya que en el isómero *S* (Figura 29b), la señal de H3 debería tener menores constantes de acoplamiento con H4α, por el ángulo diedro teórico en este isómero (Silverstein et al., 2005).

Las señales observadas en los espectros de RMN de $^{1}H$ y $^{13}C$ se compararon con lo previamente establecido para la (-)-5-metilmelleina, teniendo similitud en la cantidad, los desplazamientos, multiplicidades y constantes de acoplamiento entre señales (Masi et al., 2021; Sritharan et al., 2019).

En la Figura 28 se presenta el espectro de RMN bidimensional HSQC (correlación cuántica única heteronuclear). Las señales observadas se utilizaron para identificar correlaciones directas entre $^{1}H$ y $^{13}C$ correspondientes a acoplamientos heteronucleares directos, estableciendo las relaciones presentadas en la Tabla 19:

Tabla 19. Correlaciones directas observadas mediante la técnica HSQC.

| **$^{1}H$ (desplazamiento en ppm)** | **$^{13}C$ (desplazamiento en ppm)** | **Correlación $^{1}H/^{13}C$** |
|---|---|---|
| 2.22 | 18.02 | $CH_3$-C5/Me-C5 |
| 1.58 | 20.93 | $CH_3$-C3/Me-C5 |
| 2.74 | 31.91 | H4β/C4 |
| 2.97 | 31.91 | H4α/C4 |
| 4.71 | 75.42 | H3/C3 |
| 6.85 | 115.72 | H7/C7 |
| 7.31 | 137.93 | H6/C6 |

Las correlaciones observadas respaldan el patrón de sustitución mostrado en la Figura 23, donde se observa que los carbonos 4a, 5, 8 y 8a no tienen una correlación directa con un hidrógeno. También es evidente que el hidrógeno del fenol (OH-C8) observado a 11.02 ppm no presenta una correlación directa con un carbono.

En la Figura 29 se presenta el espectro de RMN bidimensional NOESY (espectroscopia de efecto nuclear Overhauser). En este espectro se observa una correlación espacial entre los hidrógenos del $CH_3$-C3 con el hidrógeno del fenol (OH-C8), lo cual indica que están a una distancia menor a 5Å. Esto es más probable de ocurrir con el isómero *S* de la (-)-5-metilmelleina (Figura 29b), ya que, en este isómero, dichos átomos tienen una distancia espacial teórica de 3.90 Å. Por el contrario, en el isómero *R* (Figura 29a), estos átomos presentan una distancia espacial teórica de 6.03 Å, lo que implica que no se observaría está relación espacial (Jacobsen, 2017).

Los datos experimentales obtenidos sugieren una estereoquímica relativa *R* en el carbono quiral 3 de la 5-metilmelleina. Para determinar la estereoquímica absoluta se pueden emplear técnicas como el dicroísmo circular, ya que esta técnica aprovecha el campo magnético y eléctrico de la luz, lo cual puede brindar información acerca de la estereoquímica absoluta (Andrews & Tretton, 2020).

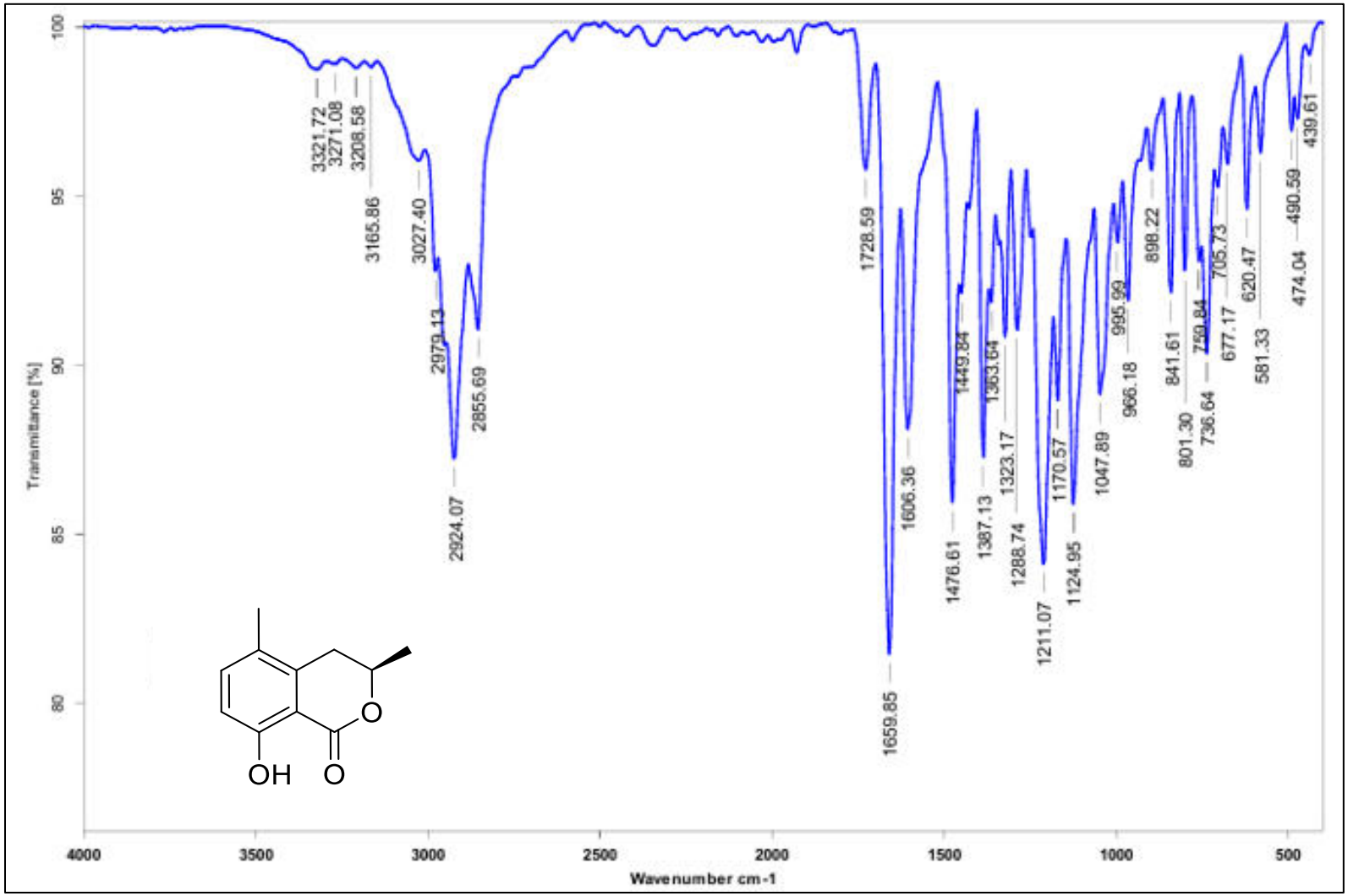



Figura 24. Espectro de infrarrojo de la (-)-5-metilmelleina

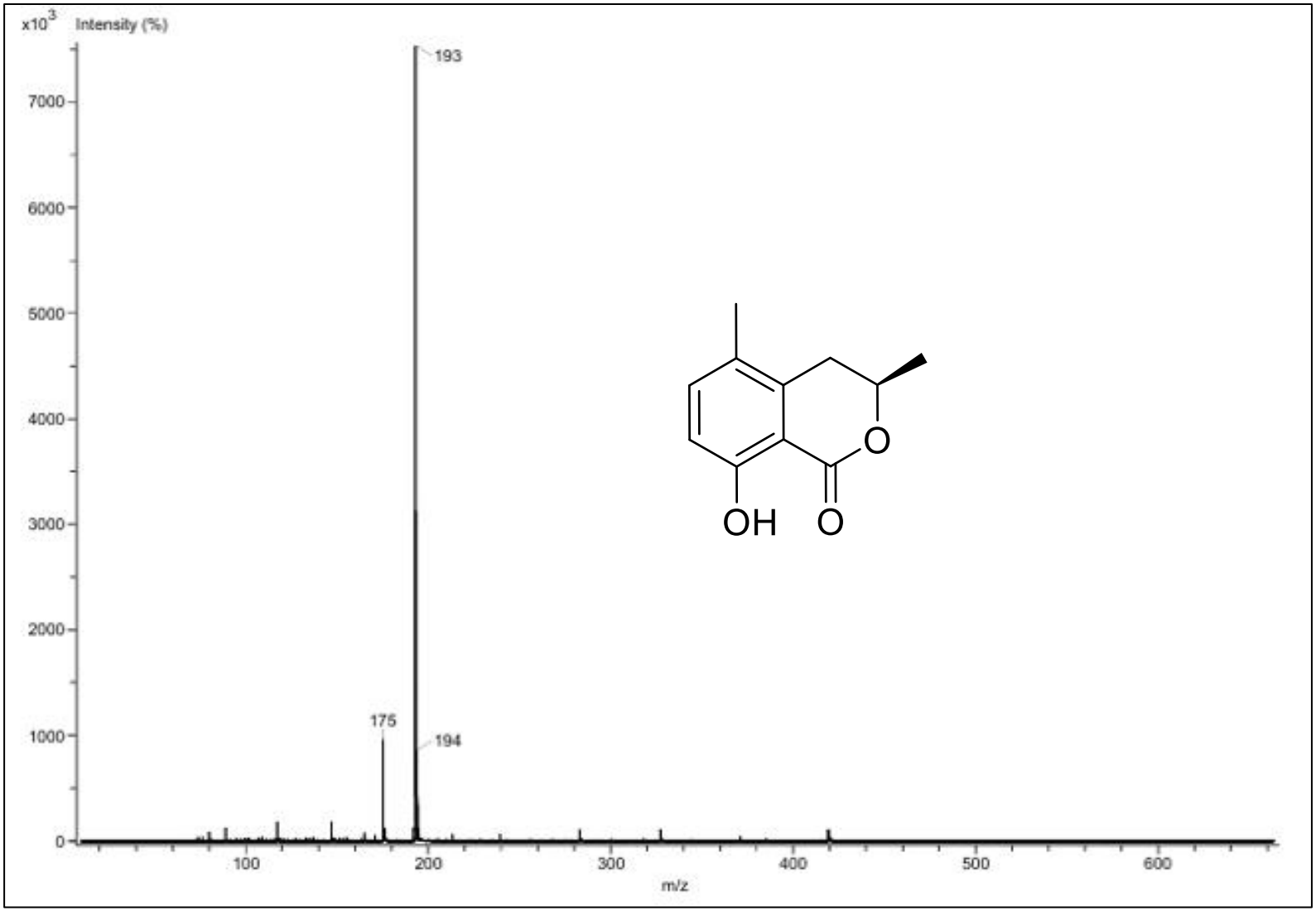



Figura 25. Espectro de masas por técnica DART de (-)-5-metilmelleina

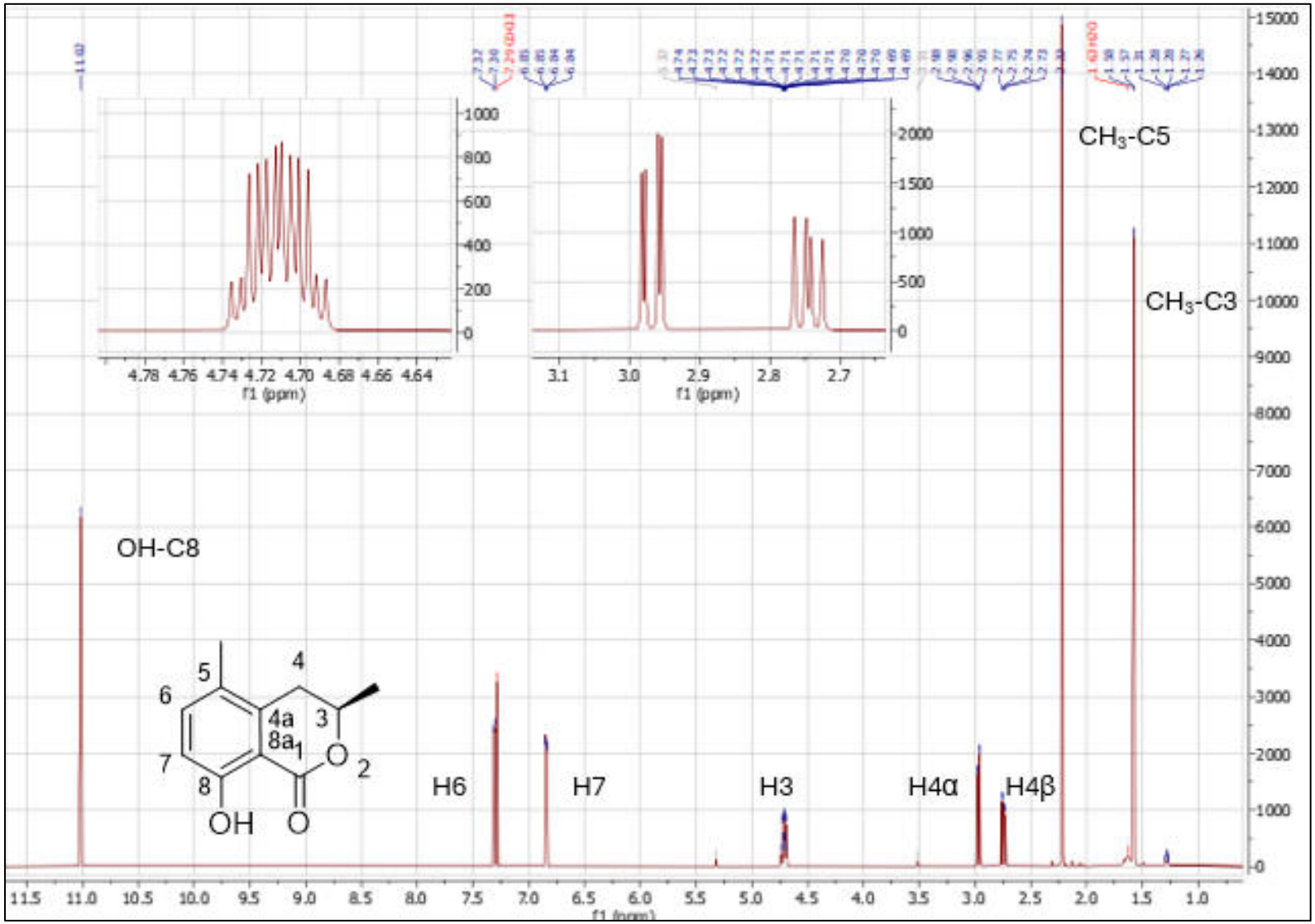



Figura 26. Espectro de RMN $^{1}H$ (700 MHz, $CDCl_3$) de la (-)-5-metilmelleina

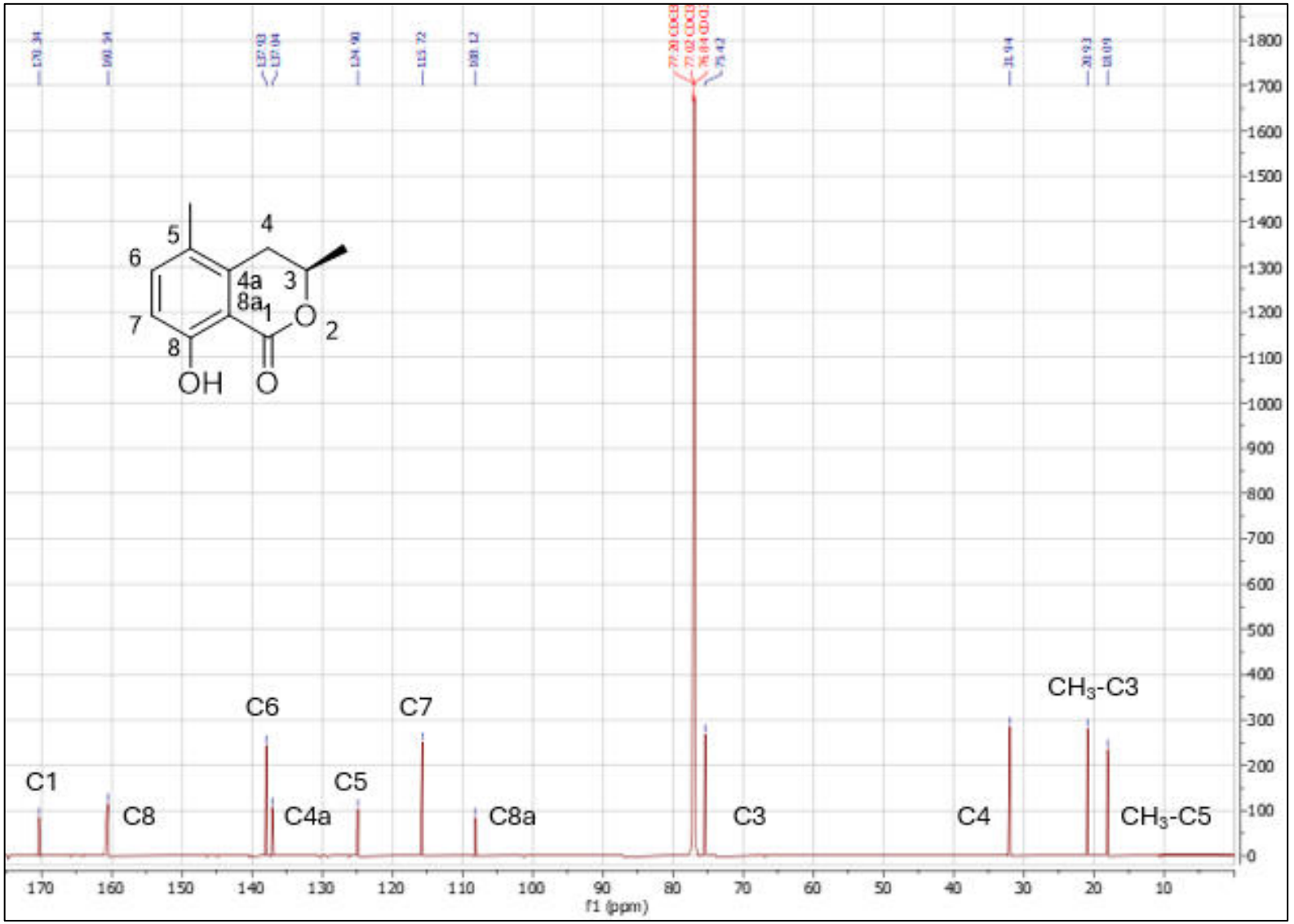



Figura 27. Espectro de RMN $^{13}C$ (700 MHz, $CDCl_3$) de la (-)-5-metilmelleina.

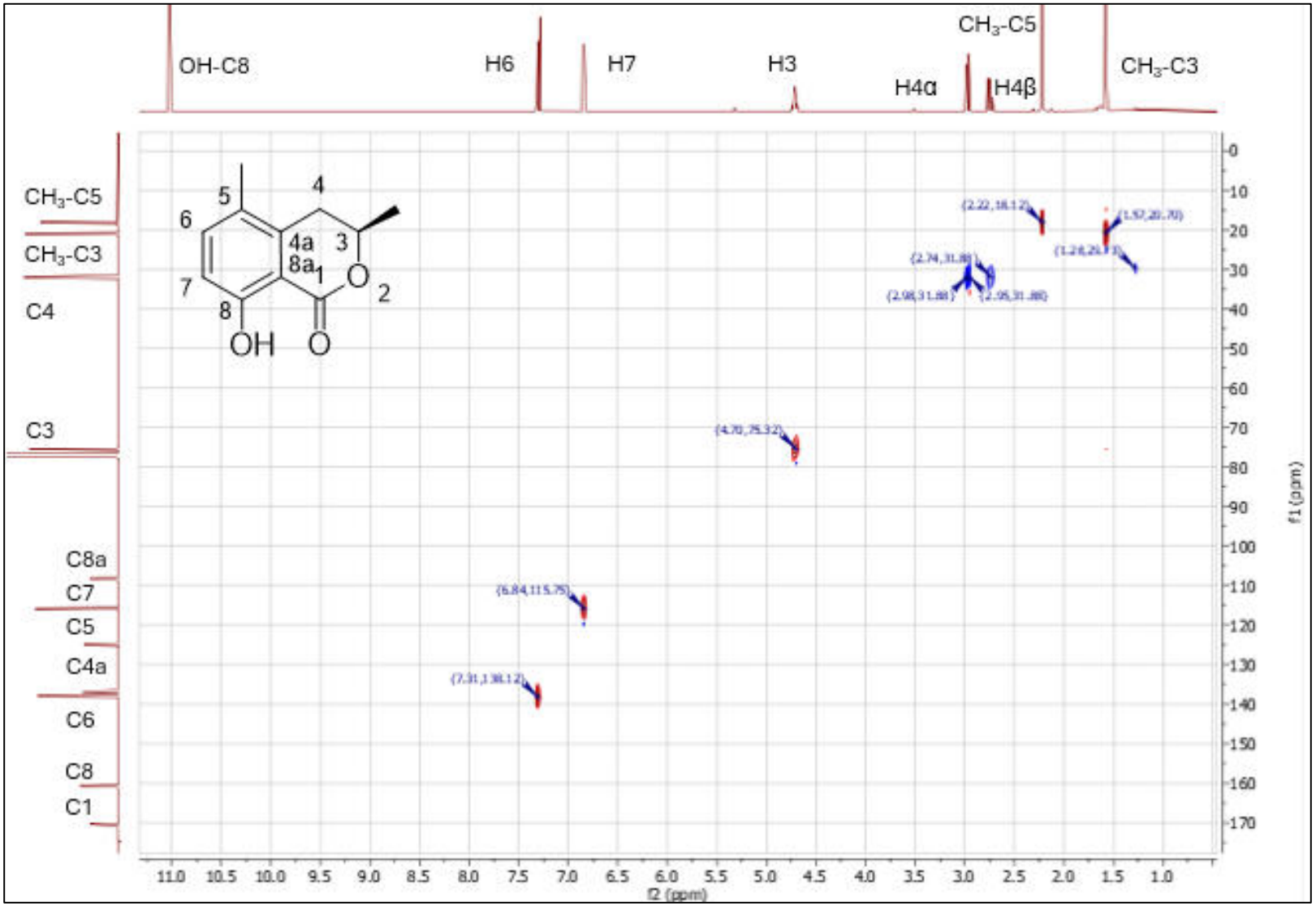



Figura 28. Espectro RMN de $^{1}H$ bidimensional HSQC (700 MHz, $CDCl_3$) de la (-)-5-metilmelleina.

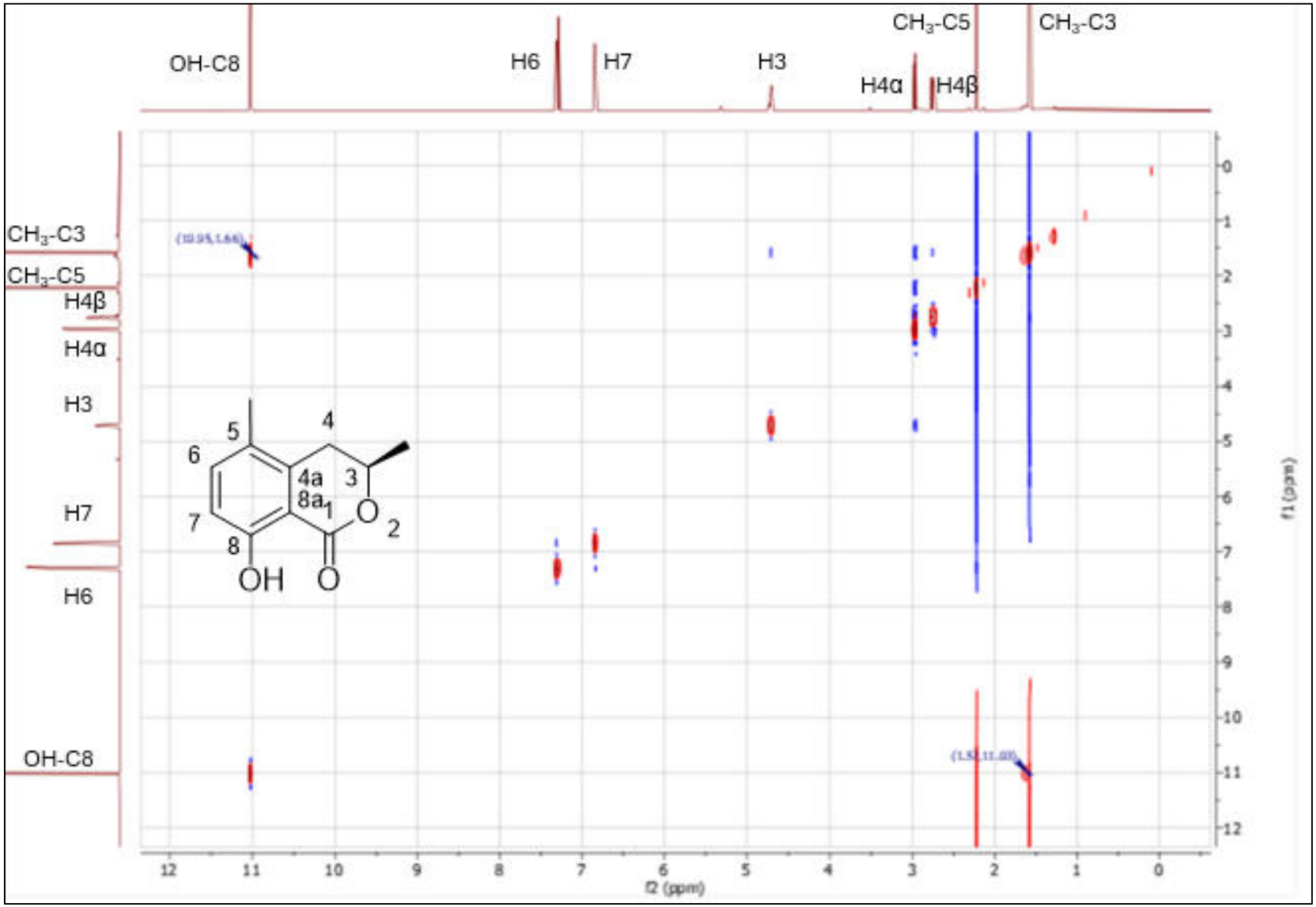
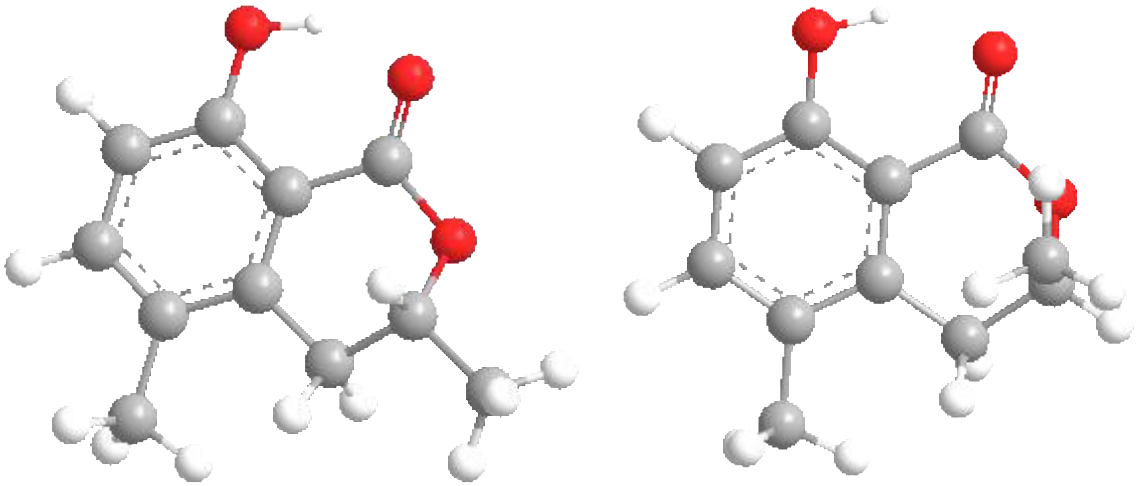



Figura 29. Espectro de RMN de $^{1}H$ bidimensional NOESY (700 MHz, CDCl3) de la (-) 5-metilmelleina.



a. Isómero R b. Isómero S

Figura 30. Estereoisómeros de la 5-metilmelleina

La (-)-5-metilmelleina ha sido reportada previamente como un metabolito producido por los hongos de género *Biscogniauxia* endófitos (Masi et al., 2021; Silva-Hughes et al., 2015), en algunos casos incluso como un metabolito secundario mayoritario (Sritharan et al., 2019). Esta molécula ha destacado por su actividad como antioxidante (Sritharan et al., 2019), interfiriendo en la formación de radicales libres, los cuales están asociados a enfermedades como el cáncer, diabetes y enfermedades coronarias (Purbaya et al., 2023). Esta molécula también presenta actividad contra hongos fitopatógenos como *Phomopsis* sp. (Silva-Hughes et al., 2015) y actividad fitotóxica contra la planta *Vitis vinifera* L. (Masi et al., 2021). Además, se ha reportado que tiene actividad como inhibidor de la mono amino oxidasa, enzima diana en el tratamiento de la depresión (Jeong et al., 2022).

#### 5.5.4.1. Actividad citotóxica de (-)-5-metilmelleina

En la Tabla 18 se muestran los resultados de la actividad citotóxica (porcentaje de viabilidad celular) causado por la (-)-5-metilmelleina, al evaluarla contra las líneas celulares MCF-7 y U-251.

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad celular producido por (-)-5-metilmelleina a diferentes concentraciones.

| Concentración (µM) | % Viabilidad celular | |
|---|---|---|
| | MCF-7 | U-251 |
| 400 | 98.79 ± 6.27 | 95.15 ± 3.36 |
| 200 | 99.59 ± 5.57 | 96.40 ± 3.60 |
| 150 | 103.09 ± 4.00 | 98.71 ± 3.38 |
| 100 | 101.88 ± 5.28 | 104.16 ± 5.08 |
| 50 | 103.05 ± 4.90 | 103.18 ± 4.86 |
| 0 | 102.21 ± 7.35 | 100.65 ± 3.56 |

MCF-7: Células de cáncer de mama- U-251: Células de glioblastoma. Se presenta porcentaje promedio de la viabilidad celular ± desviación estándar.

El $IC_{50}$ de la (-)-5-metilmelleina fue >400 µM para ambas líneas celulares. Estos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0.0001$) al ser comparadas con el $IC_{50}$ del etopósido sobre estas mismas líneas celulares, demostrando que la (-)-5-metilmelleina carece de actividad citotóxica al ser comparada con el etopósido sobre estas líneas celulares. Se guarda similitud con lo reportado en la literatura, ya que Bunyapaiboonsri y colaboradores (2010) evaluaron la (-)-5-metilmelleina contra las líneas celulares: KB (carcinoma epidérmico oral humano), BC (cáncer de mama), NCI-H187 (cáncer de pulmón de células pequeñas) y Vero (fibroblastos de riñón de mono verde africano) y reportaron un $IC_{50}$ >100 µM para todas las líneas celulares, siendo significativamente diferentes a los valores de $IC_{50}$ observados en su control positivo, doxorrubicina (valores de $IC_{50}$ <1µM para todas las líneas cancerígenas). Estos resultados demuestran que la actividad citotóxica de la (-)-5-metilmelleina es menor que la ocasionada por fármacos citotóxicos de uso clínico.

Si bien, la (-)-5-metilmelleina es un metabolito secundario mayoritario en extractos que mostraron actividad citotóxica (I HELT 1 y BA-MA-H), con los resultados obtenidos, se sugiere que la actividad puede estar ligada a otro metabolito secundario o a la sinergia de varios ellos (Caesar & Cech, 2019).

# 6. CONCLUSIONES

*L. tridentata* alberga hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica y con diversas aplicaciones en la industria farmacéutica.

Los hongos endófitos de *L. tridentata* no son productores de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra *E. faceium* (resistente a vancomicina), *S. aureus* (resistente a meticilina), *K. pneumoniae* (resistente a carbapenémicos y NDM+), *A. baumannii* (resistente a carbapenémicos), *P. aeruginosa* (resistente a carbapenémicos) y *E. coli* (BLEE), ya que al evaluar extractos a concentraciones ≤200 µg/mL no se observó inhibición bacteriana.

El hongo *N. macarangae* produce metabolitos con actividad antimicobacteriana, ya que tres extractos del hongo, obtenidos del medio CPD y de su micelio, inhibieron la cepa sensible H37Rv de *M. tuberculosis* a concentraciones entre 25-200 µg/mL.

El hongo endófito *B. atropunctata* produce metabolitos con actividad citotóxica, ya que sus extractos redujeron con diferencia estadísticamente significativa las líneas cancerígena U-251 y MCF-7.

La (-)-5-metilmelleina se aisló y caracterizó estructuralmente (con estereoquímica relativa) del extracto BA-MA-H y de acuerdo con la literatura, tiene actividad antioxidante y es inhibidor de la enzima mono amino oxidasa, careciendo de actividad citotóxica comparable a la de fármacos de uso clínico por si sola.

En conclusión, los hongos endófitos de *L. tridentata* producen extractos con actividad antimicobacteriana y citotóxica, confirmando parcialmente la hipótesis planteada, ya que, al purificar un metabolito secundario específico, no se observó actividad biológica significativa. Estos resultados sugieren que la actividad biológica observada podría ser atribuible a otro metabolito secundario o depender de una sinergia entre diferentes compuestos presentes en el extracto, lo que se perdió durante la purificación.

# PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad antibacteriana con extractos de hongos endófitos de *L. tridentata* a concentraciones >200 µg/mL.
- Utilizar técnicas diferentes para determinar la actividad antibacteriana de los extractos contra las cepas bacterianas farmacorresistentes empleadas en los ensayos biológicos.
- Emplear cepas bacterianas no farmacorresistentes en los ensayos de actividad antibacteriana.
- Cultivar los hongos *B. atropunctata* y *N. macarangae* a mayor escala, esto debido a la actividad citotóxica y antimicobacteriana de sus extractos orgánicos respectivamente.
- Realizar estudio químico biodirigido de los extractos bioactivos.
- Cultivar los hongos endófitos de *L. tridentata* bajo diferentes condiciones de cultivo con el fin de aplicar la metodología OSMAC (One Strain Many Compounds).

# BIBLIOGRAFÍA


Abdel-Rahman, T., Hussein, A. S., Beshir, S., Hamed, A. R., Ali, E., & El-Tanany, S. S. (2019). Antimicrobial activity of terpenoids extracted from *Annona muricata* seeds and its endophytic *Aspergillus niger* strain SH3 either singly or in combination. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, *7*(19), 3127–3131. https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.793

Aleksandrova, O., Okolov, I., Khorolskaya, J., Mikhailova, N., Darvish, D., & Blinova, M. (2019). In vitro cytotoxicity screening as a criterionfor the rational selection of tear substitutes. In E. Salih Istifi & H. Basri Ila (Eds.), *Cytotoxicity - Definition, Identification and Cytotoxic Compounds* (1st ed., pp. 3–15). Intechopen. https://www.researchgate.net/publication/336285328

Andrews, S. S., & Tretton, J. (2020). Physical Principles of Circular Dichroism. *Journal of Chemical Education*, *97*(12), 4370–4376. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01061

Angels, E. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? *Revista Médica Herediana*, *29*(1), 3–4.

Arumugam, G. K., Srinivasan, S. K., Joshi, G., Gopal, D., & Ramalingam, K. (2015). Production and characterization of bioactive metabolites from piezotolerant deep sea fungus *Nigrospora* sp. in submerged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(1), 99–111. https://doi.org/10.1111/jam.12693

Ballio, A., Barcellona, S., & Santurbano, B. (1966). 5-Methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin. *Tetrahedron Letters*, *7*(31), 3273–3276.

Bashyal, B. P., Faeth, S. H., & Leslie Gunatilaka, A. A. (2006). 3α-Hydroxylucilactaene and Other Metabolites of an Endophytic Strain of *Fusarium acuminatum*. *Natural Products Communications*, *2*(5), 547–550.

Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. *Analytica*, *3*(3), 371–384. https://doi.org/10.3390/analytica3030025

Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Srikitikulchai, P., Srichomthong, K., & Lumyong, S. (2010). Oblongolides from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. *Journal of Natural Products*, *73*(1), 55–59. https://doi.org/10.1021/np900650c

Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. In *Natural Product Reports* (Vol. 36, Issue 6, pp. 869–888). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/c9np00011a

Camacho-Corona, M. del R., Ramírez-Cabrera, M., Gonzalez-Santiago, O., Garza-Gonzalez, E., Palacios, I. de P., & Luna-Herrera, J. (2008). Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytotherapy Research*, *22*, 82–85.

Cheng, M. J., Wu, M. Der, Yanai, H., Su, Y. S., Chen, I. S., Yuan, G. F., Hsieh, S. Y., & Chen, J. J. (2012). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. *Phytochemistry Letters*, *5*(3), 467–472. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.04.007

de la Cruz-Izquierdo, R. I., Paz-González, A. D., Reyes-Espinosa, F., Vazquez-Jimenez, L. K., Salinas-Sandoval, M., González-Domínguez, M. I., & Rivera, G. (2021). Analysis of phenanthrene degradation by Ascomycota fungi isolated from contaminated soil from Reynosa, Mexico. *Letters in Applied Microbiology*, *72*(5), 542–555. https://doi.org/10.1111/lam.13451

Diario Oficial de la Federación. (2010, May 27). *ACUERDO por el que se determinan los lineamientos a los que estará sujeta la venta y dispensación de antibióticos.* Diario Oficial de La Federación. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5144336&fecha=27/05/2010#gsc.tab=0

Ding, L. J., Yuan, W., Liao, X. J., Han, B. N., Wang, S. P., Li, Z. Y., Xu, S. H., Zhang, W., & Lin, H. W. (2016). Oryzamides A-E, Cyclodepsipeptides from the Sponge-

Derived Fungus *Nigrospora oryzae* PF18. *Journal of Natural Products*, *79*(8), 2045–2052. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00349

dos Reis, J. B. A., Lorenzi, A. S., & do Vale, H. M. M. (2022). Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips. *Archives of Microbiology*, *204*(11). https://doi.org/10.1007/s00203-022-03283-0

Elkady, W. M., Raafat, M. M., Abdel-Aziz, M. M., Al-Huqail, A. A., Ashour, M. L., & Fathallah, N. (2022). Endophytic Fungus from *Opuntia ficus-indica*: A Source of Potential Bioactive Antimicrobial Compounds against Multidrug-Resistant Bacteria. *Plants*, *11*(1070), 1–15. https://doi.org/10.3390/plants11081070

Estrada-Salazar, G., & Ramirez-Galeano, M. (2019). *Micologia general* (C. Castaño-Trujillo, Ed.; 1st ed.). Universidad Católica de Manizales .

Europapress. (2017, February 17). *Patentan compuestos con una potente actividad anticancerígena*. Salud Digestivo. https://www.saludigestivo.es/patentan-compuestos-con-una-potente-actividad-anticancerigena-en-lineas-de-celulas-tumorales-de-mama-y-colon/

Fanele, A., & Ndlovu, S. I. (2023). Endophytic fungal species *Nigrospora oryzae* and *Alternaria alternata* exhibit antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *23*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12906-023-04157-8

Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., & Camacho-Corona, M. R. (2012). Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytotherapy Research*, *26*(12), 1957–1960. https://doi.org/10.1002/ptr.4660

Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(4), 343–346. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379

Fernández-Pastor, I., González-Menéndez, V., Annang, F., Toro, C., Mackenzie, T. A., Bosch-Navarrete, C., Genilloud, O., & Reyes, F. (2021). Pipecolisporin, a novel cyclic peptide with antimalarial and antitrypanosome activities from a wheat endophytic *Nigrospora oryzae*. *Pharmaceuticals*, *14*(3). https://doi.org/10.3390/ph14030268

Franzblau, S. G., Witzig, R. S., Mclaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., & Gilman, R. H. (1998). Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, *36*(2), 362–366.

Furin, J., Cox, H., & Pai, M. (2019). Tuberculosis. *The Lancet*, *393*(10181), 1642–1656. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3

Gao, F.-K., Dai, C.-C., & Liu, X.-Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(13), 1346–1351. https://www.researchgate.net/publication/228651503

Guevara Díaz, J. A., Maldonado, M. R., Valadez Padilla, D. E., Muro Díaz, R., & Matsumoto Palomares, I. R. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, *41*(3), 111–117.

Han, L., Zheng, W., He, Z., Qian, S., Ma, X., & Kang, J. (2023). Endophytic fungus *Biscogniauxia petrensis* produces antibacterial substances. *PeerJ*, *11*(e15461), 1–13. https://doi.org/10.7717/peerj.15461

Hridoy, M., Gorapi, M. Z. H., Noor, S., Chowdhury, N. S., Rahman, M. M., Muscari, I., Masia, F., Adorisio, S., Delfino, D. V., & Mazid, M. A. (2022). Putative Anticancer Compounds from Plant-Derived Endophytic Fungi: A Review. *Molecules*, *27*(296), 1–37. https://doi.org/10.3390/molecules27010296

Ibarra-Martínez, G. (2015). *Hongos endófitos de Haematoxylon brasiletto (Fabaceae) productores de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y herbicida* [Química de Alimentos]. UNAM.

Jacobsen, N. (2017). Selective Proton Experiments: Biological Molecules. In *NMR DATA INTERPRETATION EXPLAINED* (1st ed., pp. 319–321). Wiley.

Jantaharn, P., Mongkolthanaruk, W., Suwannasai, N., Senawong, T., Tontapha, S., Amornkitbumrung, V., Boonmak, J., Youngme, S., & McCloskey, S. (2021). Anti-inflammatory and anti-proliferative activities of chemical constituents from fungus *Biscogniauxia whalleyi* SWUF13-085. *Phytochemistry*, *191*(112908), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112908

Jeong, G. S., Lee, E. Y., Kang, M. G., Nam, S. J., Park, D., & Kim, H. (2022). (S)-5-Methylmellein Isolated from an Endogenous Lichen Fungus *Rosellinia corticium* as a Potent Inhibitor of Human Monoamine Oxidase A. *Processes*, *10*(1). https://doi.org/10.3390/pr10010166

Koetsier, G., Cantor, E., & Biolabs, E. (2019). *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers*.

Kornsakulkarn, J., Choowong, W., Rachtawee, P., Boonyuen, N., Kongthong, S., Isaka, M., & Thongpanchang, C. (2018). Bioactive hydroanthraquinones from endophytic fungus *Nigrospora* sp. BCC 47789. *Phytochemistry Letters*, *24*(2018), 46–50. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.015

Li, D., Fu, D., Zhang, Y., Ma, X., Gao, L., Wang, X., Zhou, D., & Zhao, K. (2017). Isolation, purification, and identification of taxol and related taxanes from taxol-producing fungus *Aspergillus niger* subsp. *Taxi*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(8), 1379–1385. https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01018

Lira-Saldivar, R. H. (2003). Revista Mexicana de Fitopatología. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *21*(2), 214–222. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221217

Lu, L., Karunarathna, S. C., Hyde, K. D., Suwannarach, N., Elgorban, A. M., Stephenson, S. L., Al-Rejaie, S., Jayawardena, R. S., & Tibpromma, S. (2022). Endophytic Fungi Associated with Coffee Leaves in China Exhibited In Vitro Antagonism against Fungal and Bacterial Pathogens. *Journal of Fungi*, *8*(7). https://doi.org/10.3390/jof8070698

Macías-Rubalcava, M. L., Ruiz-Velasco Sobrino, M. E., Meléndez-González, C., & Hernández-Ortega, S. (2014). Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potential herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(16), 3553–3562. https://doi.org/10.1021/jf500965k

Masi, M., Bashiri, S., Cimmino, A., Bahmani, Z., Abdollahzadeh, J., & Evidente, A. (2021). Phytotoxins produced by two *Biscogniauxia rosacearum* strains, causal agents of grapevine trunk diseases, and charcoal canker of oak trees in Iran. *Toxins*, *13*(11), 1–12. https://doi.org/10.3390/toxins13110812

Massimo, N. C., Nandi Devan, M. M., Arendt, K. R., Wilch, M. H., Riddle, J. M., Furr, S. H., Steen, C., U'Ren, J. M., Sandberg, D. C., & Arnold, A. E. (2015). Fungal Endophytes in Aboveground Tissues of Desert Plants: Infrequent in Culture, but Highly Diverse and Distinctive Symbionts. *Microbial Ecology*, *70*(1), 61–76. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0563-6

Mérillon, J. M., Ramawat, K. G., & Jha, S. (2019). Diversity, Ecology, and Significance of Fungal Endophytes. In S. Jha (Ed.), *Endophytes and Secondary Metabolites* (pp. 78–80). Springer. http://www.springer.com/series/13872

Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Avila-Ramos, F., Aquino-Torres, E., Prieto-Méndez, J., Hetta, H. F., Batiha, G. E. S., & Zaragoza-Bastida, A. (2021). Bactericidal activity of *Larrea tridentata* hydroalcoholic extract against phytopathogenic bacteria. *Agronomy*, *11*(5). https://doi.org/10.3390/agronomy11050957

Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Madariaga-Navarrete, A., Higuera-Piedrahita, R. I., Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., & Zaragoza-Bastida, A. (2022). Phytochemical Compounds and Pharmacological Properties of *Larrea tridentata*. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 17). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules27175393

Moreno-Rico, O., Velásquez-Valle, R., Sánchez-Martínez, G., Siqueiros-Delgado, M. E., De, M., Cerda-Lemus, L., & Díaz-Moreno, R. (2010). Diagnóstico

fitopatógeno de las principales enfermedades en diversas especies de encinos y su distribución en la Sierra Fría de Aguascalientes, México. *Polibotánica*, *29*, 165–189.

Núñez-Mojica, G., Vázquez-Ramírez, A. L., García, A., Rivas-Galindo, V. M., Garza-González, E., Cuevas González-Bravo, G. E., Toscano, R. A., Moo-Puc, R. E., Villanueva-Toledo, J. R., Marchand, P., & Camacho-Corona, M. del R. (2021). New cyclolignans of *Larrea tridentata* and their antibacterial and cytotoxic activities. *Phytochemistry Letters*, *43*, 212–218. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.04.013

Okuno, T., Oikawa, S., Goto, T., Sawai, K., Shirahama, H., & Matsumoto, T. (1986). Structures and phytotoxicity of metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *50*(4), 997–1001. https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867484

Olson, J. (2017, February). *Biscogniauxia (Hypoxylon) Canker and Dieback of Trees*. Extension. Oklahoma State University. https://extension.okstate.edu/fact-sheets/biscogniauxia-canker-and-dieback-of-trees.html

Organización Mundial de la Salud. (2020, July 31). *Resistencia a los antibióticos*. Centro de Prensa. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos

Organización Mundial de la Salud. (2024). *Cancer today*. Global Cancer Observatory. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&types=1

Organización Panamericana de la Salud. (2024). *Tuberculosis*. Temas. https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis

Pitt, J., & Hocking, A. (2009). Genus *Aspergillus* Fr.: Fr. In *Fungi and food spoilage* (3rd ed., pp. 313–315). Springer.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Genus *Nigrospora* Zimm. In *Fungi and food spoilage* (3rd ed., pp. 131–133). Springer.

Prajapati, J., Goswami, D., & Rawal, R. M. (2021). Endophytic fungi: A treasure trove of novel anticancer compounds. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, *2*(100050), 1–34.

Purbaya, S., Harneti, D., Safriansyah, W., Rahmawati, Wulandari, A. P., Mulyani, Y., & Supratman, U. (2023). Secondary Metabolites of *Biscogniauxia*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of the Occurrence. *Toxins*, *15*(686), 1–26. https://doi.org/10.3390/toxins15120686

Ran, X., Zhang, G., Li, S., & Wang, J. (2017). Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminate*. *African Health Sciences*, *17*(2), 566–574. https://doi.org/10.4314/ahs.v17i2.34

Reyes Álvarez, K. A., Lozano Aguilar, E. J., Estrada, H. G., Linárez Alvarez, N., Torres García, O. A., & Muñoz Ramírez, A. L. (2019). Prometedor hallazgo de tres plantas con actividad anticancerígena. *SayWa*, *1*(1), 27–33.

Rodríguez Martín-Aragón, V., Trigal Martínez, M., Cuadrado, C., Daranas, A. H., Fernández Medarde, A., & Sánchez López, J. M. (2023). OSMAC Approach and Cocultivation for the Induction of Secondary Metabolism of the Fungus *Pleotrichocladium opacum*. *ACS Omega*, *8*(42), 39873–39885. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06299

Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*, *182*, 314–330. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x

Rustamova, N., Litao, N., Bozorov, K., Sayyed, R., Aisa, H., & Yili, A. (2022). PLANT-ASSOCIATED ENDOPHYTIC FUNGI: A SOURCE OF STRUCTURALLY DIVERSE AND BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, *23*(7 & 8), 1–19. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00004-2

Sánchez-Fernandez, R. E. (2016). *ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, ANTIFUNGICA Y FITÓTOXICA DE HONGOS ENDOFITOS DE Gliricidia sepium (FABACEAE): IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES Y NO VOLATILES DE Nodulisporium sp. GS4d2IIa"* [Doctorado en Ciencias Biomédicas]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sánchez-Fernández, R. E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with Pythium aphanidermatum. *Microbial Ecology*, *71*(2), 347–364. https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3

Schulz, B. J., Andrée-Busch, N., Schobert, M., Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andrée, N., & Schobert, M. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms Novel antiinfectives from fungi View project Fungal endophytes-biology and bioprospecting Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. In *CURRENT SCIENCE* (Vol. 109, Issue 1). https://www.researchgate.net/publication/281720487

Shang, Z., Li, X.-M., Li, C.-S., & Wang, B.-G. (2012). Diverse Secondary Metabolites Produced by Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. MA75 on Various Culture Media. *Chemistry & Biodiversity*, *9*, 1338–1348.

Shimadzu Corporation. (2024). *What is Multidimensional Chromatography?* About Resolution, Part 1. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/resol-1.html

Silva-Hughes, A. F., Wedge, D. E., Cantrell, C. L., Carvalho, C. R., Pan, Z., Moraes, R. M., Madoxx, V. L., & Rosa, L. H. (2015). Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, *175*, 67–77. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.007

Silverstein, R., Webster, F., & Kiemble, D. (2005). Proton magnetic resonance spectrometry. In J. Yee (Ed.), *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7th ed., pp. 170–172). John Whiley & Sons.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mcmahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107–1112. http://jnci.oxfordjournals.org/

Spatafora, J. W. (1998). A Revision of the Genus *Hypoxylon*. *Mycologia*, *90*(5), 930–935. http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/3761336

Sritharan, T., Savitri Kumar, N., Jayasinghe, L., Araya, H., & Fujimoto, Y. (2019). Isocoumarins and dihydroisocoumarins from the endophytic fungus *Biscogniauxia capnodes* isolated from the fruits of *Averrhoa carambola*. *Natural Product Communications*, *14*(5), 1–3. https://doi.org/10.1177/1934578X19851969

Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces adreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, *260*(5105), 213–216.

Straube, T., Muller, C., & Perestrelo, A. R. (2023, February 6). *How to do a Proper Cell Culture Quick Check*. Leica Microsystems. https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, *67*(2), 257–268. https://doi.org/10.1021/np030397v

Strobel, G., Singh, S. K., Riyaz-Ul-Hassan, S., Mitchell, A. M., Geary, B., & Sears, J. (2011). An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiology Letters*, *320*(2), 87–94. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02297.x

Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, *18*(4), 448–459. https://doi.org/10.1039/b100918o

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *International Pharmaceutica Sciencia*, *1*(1), 98–106.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179

Wen, J., Okyere, S. K., Wang, S., Wang, J., Xie, L., Ran, Y., & Hu, Y. (2022). Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *Journal of Fungi*, *8*(2), 1–45. https://doi.org/10.3390/jof8020205

Yadav, G., & Meena, M. (2021). Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. *Biotechnology Reports*, *30*(e00629), 1–30. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00629

Zgoda, J. R., & Porter, J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, *39*(3), 221–225. https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.221.5934

**Apéndice A**

**Preparación de medios de cultivo**

# Apéndice A

## **Preparación de medios de cultivo** (Sánchez-Fernandez, 2016)

- Agar papa dextrosa (PDA)

  Para 1000 mL se necesitan 200 g de papa pelada y cortada en cubos, 20 g de dextrosa, 15 g de agar. La papa se hirvió 20 minutos, después de este tiempo se agregó la dextrosa y el agar, al final se agregó agua destilada cuanto baste para un volumen final de 1000 mL.
- Agar agua (AA)

  Para 1000 mL se necesitan 20 g de agar en agua destilada.
- Caldo papa dextrosa (CPD)

  Para 1000 mL se necesitan 200 g de papa pelada y cortada en cubos, 20 g de dextrosa. La papa se hirvió 20 minutos, después de este tiempo se agregó la dextrosa, al final se agregó agua destilada cuanto baste para un volumen final de 1000 mL.
- Medio arroz (MA)

  Para 300 g de medio, se lavó el arroz con agua corriente, después con agua destilada. Previamente a esterilizar el medio se añaden 300 mL de agua destilada.

  Todos los medios se esterilizaron con autoclave a 121 °C por 15 minutos.

# Apéndice B
# Divulgación del proyecto

## Participación VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde

## Presentación en modalidad de cartel

## Participación 19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales

## Presentación en modalidad de cartel

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Amipronat

La Universidad Autónoma del Estado de Morelos y la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A. C.

Otorgan la presente

Constancia

**A:** Gustavo Saucedo Martínez, Martha Lydia Macías Rubalcava, Adriana Romo Pérez, Pilar Del Carmen Morales San Claudio y María del Rayo Camacho Corona

Por su valiosa participación en la modalidad **CARTEL** con el trabajo:

**"*Biscogniauxia atropunctata*: endófito de *Larrea tridentata*"**

durante la **19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales | *Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega***; que se llevó a cabo del *22 al 25 de mayo de 2024*.
Cuernavaca, Morelos, México.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo
**Presidenta de la AMIPRONAT**

Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica
**Presidenta del Comité Local Organizador**