

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Hongos endófitos de *Cissus trifoliata* y sus metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas y citotóxicas.**

**Por  
Mitzi García Bernal**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN  
CIENCIAS con orientación en farmacia**

**Folio: FARM-93765-MRCC-22/05**

**Enero 2025**

**Hongos endófitos de *Cissus trifoliata* y sus metabolitos secundarios con  
propiedades antibacterianas y citotóxicas**

Aprobación de Tesis:



---

Dra. María del Rayo Camacho Corona  
Presidente



---

Dr. Edgar Abraham García Zepeda  
Secretario



---

Dr. Luis Fernando Méndez López  
Vocal



---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

**Hongos endófitos de *Cissus trifoliata* y sus metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas y citotóxicas**

Revisión de Tesis:



---

Dra. María del Rosario González González  
Comité Tutorial



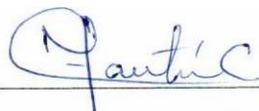
---

Dr. Edgar Abraham García Zepeda  
Comité Tutorial



---

Dr. Luis Fernando Méndez López  
Comité Tutorial



---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

# Resumen

## Propósito y método de estudio

Los hongos endófitos son hospederos de una planta capaces de producir compuestos bioactivos importantes llamados metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas, esto ha llamado la atención para su uso como fuentes alternativas en la industria farmacéutica, agroquímica y alimentaria. Además, que se ha visto que pueden compartir maquinaria celular con su hospedera para la producción de diferentes compuestos. Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad por sus diferentes propiedades curativas, como es el caso de *Cissus trifoliata* colectada en el estado de Nuevo León usada en la medicina tradicional para enfermedades gastrointestinales, infecciones cutáneas o tumores. En estudios previos se han encontrado compuestos activos contra bacterias farmacorresistentes. Este estudio tuvo como objetivo el aislamiento de hongos endófitos de *C. trifoliata* para la evaluación biológica de sus extractos obtenidos contra seis cepas de bacterias farmacorresistentes, dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis* una sensible y otra farmacorresistentes, además de cinco líneas celulares cancerígenas. Los métodos utilizados fueron la siembra de pequeñas porciones de las hojas esterilizadas de *C. trifoliata* en cajas Petri con papa dextrosa agar (PDA) y Agar agua con antibiótico y, se incubaron a luz y sombra sin agitación. Se realizaron resiembras periódicas en medio PDA del micelio de los hongos endófitos hasta obtener una cepa pura. Luego se incubaron a mediana escala utilizando medio caldo papa dextrosa (CPD) y medio de arroz (MA), obteniendo los extractos orgánicos por medio de extracción exhaustiva con solventes orgánicos y

partición líquido-líquido. Los extractos se evaluaron por la metodología de micro dilución en placa para bacterias farmacorresistentes, por la técnica de azul de alamar para *M. tuberculosis* y por la técnica de cristal violeta para la actividad citotóxica. Luego se sometió a técnicas de cromatografía en columna a uno de los extractos activos para aislar el compuesto mayoritario el cual fue caracterizado por las técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución.

### **Contribuciones y Conclusiones**

Se aislaron tres hongos endófitos de las hojas frescas de *C. trifoliata*, identificados por sus características macroscópicas y microscópicas, así como secuencia genómica. El primero identificado como *Colletotrichum siamense*., el segundo *Diaporthe* sp., y el tercero *Colletotrichum kahawae*. Cabe mencionar que este estudio representa el primero concerniente al aislamiento de hongos endófitos de *C. trifoliata*.

Se obtuvieron 18 extractos totales de diferente polaridad incluyendo AcOEt (Acetato de etilo), Hexano y CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1 (Cloroformo/metanol), a partir del CPD, micelio y MA. Los rendimientos de los extractos están en un rango 0.0267 a 4.9805 g. El extracto 12 obtenido del CPD extraído con AcOEt de *Colletotrichum kahawae* fue el que se obtuvo en menor rendimiento con 0.0267 g y el extracto 11 obtenido del Medio Arroz extraído con CHCl<sub>3</sub>/MeOH de *Diaporthe* sp. fue el extracto que se obtuvo con el mayor rendimiento con 4.9805 g.

De los 18 extractos obtenidos y evaluados contra 6 cepas de bacterias farmacorresistentes, la bacteria *Pseudomona aeruginosa* resistente a carbapenémicos se mostró sensible a todos los extractos con una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de 200 µg/mL. De *Colletotrichum kahawae*, se destaca el extracto 11 (AcOEt-CPD) con una CMI de 100 µg/mL contra *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y de *Colletotrichum siamense* el extracto 5 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH- MA (FS↑)) fue el que mostró mayor espectro entre las 6 cepas farmacorresistentes con una CMI de 200 µg/mL a excepción de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con una CMI >200 µg/mL. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, el único extracto con actividad fue el 7 (CPD-AcOEt) obtenido de *Diaporthe sp.* con una CMI de 50 µg/mL contra la cepa H37Rv.

Por otro lado, en la actividad citotóxica, el extracto 1 (AcOEt- CPD) de *Colletotrichum siamense* mostró 64.82 % de viabilidad celular contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a 50 µg/mL, y en la línea celular normal una viabilidad celular de 103.5%. En el extracto 9 (Hexano-MA) de *Diaporthe sp.*, tuvo un 53.28% de viabilidad celular en la línea de carcinoma de pulmón SKLU-1, y la viabilidad en las células normales fue de 92.79 %. Finalmente, del extracto de CPD-AcOEt de *Diaporthe sp.* activo contra *M. tuberculosis* H37Rv, se aisló y caracterizó estructuralmente el compuesto ácido 3-nitropropionico, el cual mostró una CMI de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv. Por lo que es muy probable que en el extracto existan otras moléculas más activas contra *M. tuberculosis* H37Rv.



---

Dra. María del Rayo Camacho Corona  
Asesor de Tesis



---

Dra Martha Lydia Macías Rubalcava Co-  
asesora Externa



---

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio Co-  
asesora Interna

# Agradecimientos

Los resultados obtenidos durante este trabajo no solamente reflejan el trabajo propio sino el trabajo en conjunto con profesores y alumnos, primeramente quiero agradecer el apoyo brindado y todo el conocimiento aprendido de mi asesora de tesis la Dra. María del Rayo Camacho Corona, mis co-asesoras la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, junto con mi comité tutorial: Dra. María del Rosario González González, Dr. Luis Fernando Méndez López y el Dr. Abraham García Zepeda, cada uno tuvo un papel importante tanto en la parte experimental como en la parte escrita de este proyecto.

Quiero agradecer al CONAHCYT por la beca otorgada, a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, así como los diversos laboratorios donde se cumplieron los objetivos planteados como el Laboratorio de Biotecnología I, Laboratorio de Química Farmacéutica, Laboratorio de Infectología Medica en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL, a la Dra. Elvira Garza González y a la técnico Lucy; al Instituto de Química de la UNAM, a la Dra. Adriana Romo Pérez, Dr. María del Carmen García González y al Centro de Biotecnología Genómica, del IPN en Reynosa Tamaulipas: Alma Paz-González y Mailin Stephany Porras.

A mis compañeros de laboratorio: Melissa Guevara, Gustavo Saucedo, Karen Reyes, Brisa de la Barrera, Ashley Vázquez, Evelin Butanda, Enrique Contreras, Juan Manuel Rodríguez, que hicieron mis horas de trabajo más amenas y con los que también aprendí muchas cosas, nos tocó conocernos en esta etapa de mi vida y agradezco porque no solo se quedan como compañeros de laboratorio sino se han convertido en mis amigos.

A mis padres Francisco García y Laura Bernal y a mis hermanos Laura García y Josué García que fueron los que me apoyaron en todo el tiempo que estuve realizando el proyecto, los que creyeron en mi al seguir superándome académicamente y los que siempre van a estar para mi sin importar las circunstancias.

# Tabla de Contenido

## Índice

Resumen .....	4
Agradecimientos .....	8
.....	10
Tabla de Contenido.....	10
Lista de figuras.....	14
Lista de tablas.....	17
Lista de Abreviaturas .....	19
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>22</b>
1. Enfermedades infecciosas bacterianas .....	22
2. Cáncer .....	26
3. Los productos naturales como alternativas de tratamiento .....	28
4. Definición y clasificación de hongo endófito .....	29
5. Relaciones que se establecen entre hongos endófitos y sus hospederos .....	31
6. Beneficios interacción endófito-hospedero .....	32
7. Metabolitos secundarios de hongos endófitos .....	33
8. Metabolitos secundarios de hongos endófitos con potencial farmacéutico .....	34
1. Familia Vitácea y sus estudios .....	36
2. Género <i>Cissus</i> y sus especies .....	36

<b>2. HIPOTESIS</b> .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	40
1. OBJETIVO GENERAL.....	40
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b> .....	42
1. Recolecta de material vegetal .....	42
2. Aislamiento y purificación de hongos endófitos .....	43
2.1 Conservación de hongos endófitos aislados.....	44
3. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos endófitos aislados .....	44
4. Caracterización molecular .....	45
5. Cultivo a mediana escala de hongos endófitos.....	48
5.1 Cultivo en caldo papa dextrosa (CPD) .....	48
5.2 Cultivo en Medio Arroz (MA) .....	48
6. Obtención de extractos orgánicos .....	49
7. Actividad contra bacterias resistentes .....	50
8. Actividad antimicobacteriana .....	52
9. Actividad citotóxica.....	54
10. Análisis cromatográficos .....	55
10.1 Cromatografía en Capa Delgada (TLC).....	55
10.2 Cromatografía en Columna.....	55
11. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	56

12.	Espectroscopia de Infrarrojo .....	56
13.	Punto de fusión.....	56
14.	Espectrometría de Masas .....	56
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>57</b>
1.	Aislamiento e identificación de hongos endófitos de las hojas de <i>C. trifoliata</i> .....	57
2.	Caracterización genómica .....	64
3.	Cultivo en mediana escala de hongos endófitos.....	70
4.	Obtención de extractos orgánicos .....	74
5.	Actividad antibacteriana .....	76
6.	Actividad antimicobacteriana .....	80
7.	Actividad citotóxica.....	83
8.	Análisis del extracto AcOEt-CPD de <i>Diaporthe</i> sp. por columna cromatográfica .....	86
9.	Análisis por Infrarrojo del compuesto D146-150 (ácido 3-nitropropionico) .....	89
10.	Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de D146-150 (ácido 3-nitropropionico) .....	90
11.	Análisis de Espectrometría de Masas de D146-150: (ácido 3-nitropropionico) .....	93
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>118</b>
1.	Medios de cultivo utilizados: .....	118

2. Análisis por TLC de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de <i>C. trifoliata</i> .....	120
3. Análisis por TLC de las fracciones obtenidas .....	124
4. Disposición de Residuos .....	127
5. Constancia de Congresos .....	129

## Lista de figuras

- **Figura 1.** Mapa del estado de Nuevo León, representado con una estrella el lugar de colecta
- **Figura 2.** Características macroscópicas del hongo **AA-VI C3c (N):** *Colletotrichum siamense*. A) Haz B) Envés. Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N)
- **Figura 3.** Características microscópicas del hongo **AA-VI C3c (N):** *Colletotrichum siamense* con tinción azul de lactofenol. A) Hifas B) Hifas y conidios. Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N)
- **Figura 4.** Tasa de crecimiento en (cm<sup>2</sup>/día) del hongo **AA-VI C3c (N):** *Colletotrichum siamense*. Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N)
- **Figura 5.** Características macroscópicas del hongo **AA-IV C3 (F):** *Diaporthe* sp. A) Haz B) Envés. Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F)
- **Figura 6.** Características microscópicas del hongo **AA-IV C3 (F):** *Diaporthe* sp. A) Teñido con rojo Congo B) Teñido con azul de lactofenol. Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F)
- **Figura 7.** Tasa de crecimiento en (cm<sup>2</sup>/día) del hongo **AA-IV C3 (F):** *Diaporthe* sp. Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F)

- **Figura 8.** Características macroscópicas del hongo **PDA-IV C3o (B):** *Colletotrichum kahawae*. A) Haz B) Envés. Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B)
- **Figura 9.** Características microscópicas del hongo **PDA-IV C3o (B):** *Colletotrichum kahawae*. A) Teñido con rojo Congo B) Teñido con azul de lactofenol. Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B)
- **Figura 10.** Tasa de crecimiento en (cm<sup>2</sup>/día) del hongo **PDA-IV C3o (B):** *Colletotrichum kahawae*. Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B)
- **Figura 11.** Resultados de la secuencia consenso ITS1 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del primer hongo aislado AA-VI C3c (N): *Colletotrichum siamense*
- **Figura 12.** Resultados de la secuencia consenso ITS4 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del primer hongo aislado AA-VI C3c (N): *Colletotrichum siamense*
- **Figura 13.** Resultados de la secuencia consenso ITS1 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del segundo hongo aislado AA-IVC3 (F): *Diaporthe* sp
- **Figura 14.** Resultados de la secuencia consenso ITS4 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del segundo hongo aislado AA-IVC3 (F): *Diaporthe* sp

- **Figura 15.** Resultados de la secuencia consenso ITS1 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*
- **Figura 16.** Resultados de la secuencia consenso ITS4 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*
- **Figura 17.** Cultivo en pequeña escala de *Colletotrichum siamense*, A) En medio CPD B) En medio MA, semana 3 de incubación.
- **Figura 18.** Cultivo en pequeña escala de *Diaporthe* sp, A) En medio CPD B) En medio MA, semana 3 de incubación.
- **Figura 19.** Cultivo en pequeña escala de *Colletotrichum kahawae*, A) En medio CPD B) En medio MA, semana 3 de incubación.
- **Figura 20.** Estructura de Diaportheona A y B con su respectiva CMI para *M. tuberculosis*
- **Figura 21.** Estructura del análogo metoxi 24 de Diaportheona B
- **Figura 22.** Estructura de Diaporthelactona reportada por Rai en 2023
- **Figura 23.** Estructura del ácido 3-nitropropionico.
- **Figura 24.** Espectro de infrarrojo de D-146-150: ácido 3-nitropropionico
- **Figura 25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de D146-150: ácido 3-nitropropionico.
- **Figura 26.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de D146-150: ácido 3-nitropropionico

- **Figura 27.** Espectro de masas de alta resolución de la muestra D146-150: ácido 3-nitropropionico

## Lista de tablas

- **Tabla 1.** Clasificación de hongos endófitos
- **Tabla 2.** Metabolitos secundarios de hongos endófitos y sus diferentes actividades biológicas.
- **Tabla 3.** Actividades biológicas de diferentes extractos de *C. trifoliata* (*C. incisa*)
- **Tabla 4.** Metabolitos secundarios reportados en *C. trifoliata* (*C. incisa*)
- **Tabla 5.** Reactivos de PCR utilizados para la amplificación
- **Tabla 6.** Programa de temperatura y ciclos de PCR utilizadas para la amplificación de las regiones ITS
- **Tabla 7.** Características generales observadas del primer hongo aislado AA-VI C3c (N): *Colletotrichum siamense*.
- **Tabla 8.** Características generales observadas del segundo hongo aislado AA-IV C3 (F): *Diaporthe* sp.
- **Tabla 9.** Características generales observadas del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*.

- **Tabla 10.** Resultados de la base de datos de NCBI BLAST de la muestra del primer hongo aislado AA-VI C3c (N).
- **Tabla 11.** Resultados de la base de datos de NCBI BLAST de la muestra del segundo hongo aislado AA-IV C3 (F): *Diaporthe* sp.
- **Tabla 12.** Resultados de la base de datos de NCBI BLAST de la muestra del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*.
- **Tabla 13.** Rendimiento de extractos totales obtenidos de los tres hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*.
- **Tabla 14.** Actividad antibacteriana (CMI  $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*.
- **Tabla 15.** Actividad antimicobacteriana (CMI  $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*.
- **Tabla 16.** Porcentaje (%) de viabilidad celular a 50  $\mu\text{g/mL}$  de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata* evaluados.
- **Tabla 17.** Fraccionamiento del extracto de AcOEt (CPD) del hongo *Diaporthe* sp.

# Lista de Abreviaturas

3-NPA: Ácido 3-nitropropionico

*A. baumannii*: *Acinetobacter baumannii*

AA: Agar Agua

AcOEt: Acetato de Etilo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLEE:  $\beta$ -Lactamasas de espectro extendido

CCF: Cromatografía en capa fina

CFU: Unidades formadoras de colonias

CHCl<sub>3</sub>/MeOH: Cloroformo/Metanol

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

COV: Compuestos Orgánicos Volátiles

COVID-19: Coronavirus disease 2019

CPD: Caldo papa dextrosa

DMEM: Medio Eagle modificado de Gibco Dulbecco

DMEM-F12: Medio Eagle modificado de Gibco Dulbecco: mezcla de nutrientes F12

DMSO: Dimetil Sulfoxido

*E. coli: Escherichia coli*

*E. faecium: Enterococcus faecium*

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EH: Enfermedad de Huntington

IC<sub>50</sub>: Concentración Inhibitoria Media Máxima

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

IR: Infrarrojo

ITS: Espacios Transcritos Internos

*K. pneumoniae: Klebsiella pneumoniae*

MA: Medio Arroz

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de Sodio anhidro

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NMDA-R (receptor de N-metil-D-aspartato).

ODS: Objetivo de Desarrollo Sostenible

OMS: Organización Mundial de la Salud

*P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa*

PDA: Agar Papa Dextrosa

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

*S. aureus: Staphylococcus aureus*

SDS: Sulfato de dodecilo sódico

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TLC: Thin Layer Chromatography

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UV: Ultravioleta

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VPH: Virus de Papiloma Humano

# 1. INTRODUCCION

## 1. Enfermedades infecciosas bacterianas

Las infecciones causadas por microorganismos multifarmacorresistentes son responsables de una mayor mortalidad en comparación a las causadas por microorganismo susceptibles (Munita et al., 2016), esta resistencia a antibióticos provocará alrededor de 300 millones de muertes prematuras para 2050, con una pérdida de hasta 100 billones de dólares para la economía del mundo. Se reportó 1.6 millones de muertes de tuberculosis en 2021, segunda causa de muerte infecciosa después del COVID-19 (Coronavirus disease 2019) (OMS, 2023).

En los últimos tiempos se han encontrado mayores niveles de resistencia a diversas generaciones de antibióticos y estas ponen en riesgo la salud pública, llegando a ser preocupantes en países tanto de ingresos bajos como altos, en hombre y mujeres, sin importar la raza, edad o condición social, encontrándose como una problemática global. Tomando en cuenta lo anterior la OMS (Organización mundial de la salud) publicó un listado de microorganismos patógenos prioritarios para tener en cuenta para la innovación de nuevos antibióticos (OMS, 2017), la lista se presenta a continuación y a partir de la misma se priorizan los estudios en estas bacterias:

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos: causa infecciones en ambientes hospitalarios, asociado a infecciones en pulmones, sangre e infecciones posquirúrgicas.

- *Pseudomona aeruginosa* resistente a carbapenémicos: Asociado a infecciones en sangre, pulmones, vías urinarias y heridas quirúrgicas, con elevada mortalidad, genera resistencia a todos los antibióticos, incluyendo nuevas moléculas
- Enterobacterias resistentes a carbapenémicos y productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido BLEEs: son los más frecuentes aislados en Latinoamérica, se tiene resistencia emergente y combinaciones de diversas enzimas, estas se asocian con elevada mortalidad. Entre estas bacterias se encuentran *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* asociadas a elevada mortalidad.

#### Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, produce infecciones como endocarditis, infecciones urinarias e intrabdominales asociadas a peritonitis terciarias, puede causar brotes hospitalarios
- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y con sensibilidad disminuida a la vancomicina, asociada a infecciones de la piel y tejidos blandos, osteomielitis, neumonías adquiridas en comunidad y en el hospital, puede causar infecciones refractarias al tratamiento de alta mortalidad.
- *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina, se asocia a ulcera gástrica, gastritis crónica, linfoma tipo MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue) y cáncer gástrico.
- *Campylobacter spp* resistente a fluoroquinolonas, se relaciona con diarrea del viajero y causa infecciones gastrointestinales invasivas, además de la resistencia creciente a los antibióticos, su diagnóstico es complejo, pues necesita requerimientos específicos para cultivo.

- *Salmonella spp* resistente a fluoroquinolonas, se asocia con diversas infecciones desde leves a severas y relacionadas con mascotas (tortugas) y alimentos contaminados (cárnicos, aguas y lácteos). La resistencia en las Salmonellas no tifoideas va en aumento en Latinoamérica.

- *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas, es el agente causal de la gonorrea, una de las cuatro principales infecciones de transmisión sexual en el mundo. La resistencia en este microorganismo va en aumento con reportes de resistencia a ceftriaxona en Europa y Asia Pacífico.

### Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae* con susceptibilidad disminuida a la penicilina, asociado a infecciones como otitis media aguda, sinusitis, neumonía y meningitis adquirida en la comunidad. En Colombia se han reportado casos de resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos en pacientes pediátricos de la Costa Caribe.

- *Haemophilus influenzae* resistente a la ampicilina, se relaciona con infecciones adquiridas en comunidad como otitis media aguda, sinusitis, meningitis y neumonías.

- *Shigella spp* resistente a fluoroquinolonas, causa infecciones gastrointestinales invasivas y se asocia a alta mortalidad, principalmente en población pediátrica. La resistencia a ciprofloxacina viene en aumento, en especial para las especies *S. flexneri* y *S. sonnei*.

- *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo aerobio que se distingue por una envoltura rica en lípidos, este microorganismo causa una infección crónica llamada tuberculosis, a menudo con periodo latente asintomático después de la infección, y

afecta con mayor frecuencia a los pulmones, los síntomas incluyen tos crónica, fiebre, pérdida de peso y dolor torácico (OMS 2021).

A nivel mundial, en 2023, se estima que se produjeron 1.09 millones de muertes entre personas VIH negativas y unas 161 000 muertes entre personas con VIH, el total combinado ronda los 1.25 millones (OMS, 2024). En México para el año 2020 se registraron 2,154 defunciones por tuberculosis, y en 2022 se registraron 28 mil nuevos casos (Secretaría de salud, 2023). La tuberculosis multifarmacorresistente es una forma de tuberculosis causada por bacterias que no responden a la isoniacida y la rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces. La forma multifarmacorresistente se puede tratar y curar con medicamentos de segunda línea. Sin embargo, las opciones de tratamiento de segunda línea requieren tratamiento de larga duración (OMS ,2024).

Esta resistencia amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de una variedad cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos. De manera adicional, cambian con el tiempo y ya no responden a los medicamentos, lo que hace que las infecciones sean más difíciles de tratar y aumenta el riesgo de propagación, enfermedades graves y muerte. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el cuerpo, lo que aumenta el riesgo de propagación a otras personas.

Existen diversos mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos como lo son: la eliminación activa de los antibióticos por bombas de

eflujo de membrana, mutación, alteración de la diana del antibiótico, inactivación, degradación y modificación de los antibióticos mediante enzimas (Darby et al., 2022; Aghamohammad & Rohani, 2022). Al conocer esto se tiene una preocupación mayor por la capacidad de las bacterias para eliminar el antibiótico y permanecer en el cuerpo humano, prevalece la infección en el paciente. Por lo que la OMS ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública, y enfatiza que haya desarrollo e innovación de nuevos antibióticos (OMS, 2021). Por otro lado, acabar con la epidemia de tuberculosis para 2030 es uno de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) relacionados con la salud (OMS, 2023).

## 2. Cáncer

El cáncer registró un total de 19 millones de nuevos casos alrededor del mundo en 2022 y el número de muertes ascendió a más de 9 millones. Algunos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer es la obesidad, tabaco, consumo de alcohol, radiación UV (Ultravioleta), además que se ha visto que infecciones crónicas también pueden influir. En 2018 aproximadamente el 13% de diagnóstico de cáncer se atribuyeron a infecciones carcinogénicas como *Helicobacter pylori*, virus del papiloma humano (VPH), virus de hepatitis B y C (Ferlay, et al. 2021; Ferlay, et al, 2024; De Martel, et al., 2019). En México el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que se registraron 847 716 defunciones: 10.6 % fue por tumores malignos (89 574). La tasa de defunciones por esta causa aumentó de forma constante, al pasar de 62.04 defunciones por cada 100 mil personas en 2012, a 68.92 en 2022 (INEGI, 2024). Para el 2022 hablando de cánceres más comunes, se registró que en mujeres el cáncer de mama es el número uno (con el

23.8% de los casos totales) y el cáncer de pulmón en número dos (9.4% de los casos totales), en hombres el número uno es el cáncer de pulmón (15.2% de los casos totales) y el número dos es el cáncer de próstata (14.2% de los casos totales) (Ferlay et al., 2024).

Las terapias tradicionales contra el cáncer incluyen cirugía, la quimioterapia, y la radioterapia. Sin embargo, la reducción de la eficacia en la administración de fármacos durante la quimioterapia se debe a diferentes mecanismos de resistencia a fármacos: bombas de eflujo de fármacos, factores genéticos como las mutaciones o alteraciones epigenéticas, factores de crecimiento, y la disminución de la capacidad de reparación del ADN (Ácido Desoxirribonucleico), causando la dificultad de tratar los tumores cancerígenos (Bukowski et al., 2020). Además de tener resistencia a fármacos al momento de estar en el tratamiento de quimioterapia los efectos secundarios van desde vómito, náusea, anemia, caída del pelo (alopecia), cambios en la piel y en las uñas, diarrea, dolor, edemas, inflamación de órganos, infección y neutropenia (NCI, 2021).

Algunas alternativas de tratamiento, basándose en el reconocimiento del sistema inmunitario para proteger al cuerpo de amenazas como las células cancerosas, se desarrollan estrategias de inmunoterapia para que sean un tipo potente de terapia contra el cáncer; el trasplante de médula ósea se usa con éxito para tratar pacientes con cánceres hematológicos; las células madre se integran con medicamentos, enzimas, genes, virus oncológicos contra el cáncer para su administración dirigida a tumores y metástasis (Yin,2021).

### 3. Los productos naturales como alternativas de tratamiento

En los últimos años, el aumento de resistencia a fármacos y sobre todo a antibióticos, así como el surgimiento de nuevas enfermedades, hace ineficaz el tratamiento, lo cual conlleva al uso de medicina tradicional para tratar diversas afecciones. Una planta medicinal es aquella que posee en alguna de sus partes (tallos, hojas, raíces, frutos, etc.) principios activos que, al ser administrados en una dosis correcta, pueden producir un efecto terapéutico en diversas enfermedades. En la actualidad se conocen aproximadamente 26,000 especies vegetales, de las cuales el 10% es considerado medicinal (Sánchez-Aguirre, et al., 2021). México es considerado como el segundo país en el mundo con mayor número de plantas medicinales registradas, evidencia suficiente para decir y estudiar el potencial de nuevos tratamientos que se basan en la medicina tradicional (Sánchez-Aguirre, et al., 2021).

Los productos naturales han jugado un papel clave en la producción de agentes medicinales. Las plantas han sido una fuente de productos naturales desde hace siglos. En estas plantas medicinales habita un depósito microbiano con un inmenso potencial de nuevas sustancias químicas conocidos como organismos endófitos (bacterias y hongos) (Tyagi, 2021). El interés por las bacterias y hongos endófitos va en aumento, ya que son un buen reservorio de metabolitos bioactivos. Hasta ahora, muchos agentes citotóxicos, incluido el paclitaxel (Taxol), se han aislado de hongos endófitos. En este sentido los metabolitos secundarios con propiedades citotóxicas tienen el potencial de ser explorados como fármacos contra el cáncer (Hridoy et al., 2022).

Zhao y colaboradores en el 2023, resumió los estudios realizados del hongo endófito *Alternaria* sp. en un periodo de 2014 a 2022, teniendo que el hongo *Alternaria* sp. uno de los géneros más comunes de endófito son fuente de diferentes tipos de metabolitos secundarios como los policétidos, terpenoides, quinonas con actividad biológica, como antibacterianos, antitumoral, antioxidante, inhibidor de enzimas, fitotóxico entre otros. Prajapati en 2021 reportó una clasificación del estudio de diferentes hongos aislados tanto de plantas terrestres como marinas. En este artículo menciona que los ascomicetos es el filo más estudiado de los hongos endófitos, también que el mayor porcentaje de compuestos citotóxicos encontrados son policétidos y terpenoides. El taxol es uno de los quimioterapéuticos más usados inicialmente obtenido de la planta *Taxus* spp., sin embargo, se han encontrado que diversos hongos endófitos la producen y se utilizan para la producción en mayor cantidad de taxol se utilizan los géneros: que se destacan son: *Alternaria*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Taxomyces andreanae*, entre otros. (Barrales-Cureño, H., & de la Rosa Montoya, R., 2014). Así como la podofilotoxina obtenida de *Podophylum peltatum* y producida en mayor cantidad por el hongo endófito *Phialocephala fortinii*. (Aly, et al., 2013)

#### 4. Definición y clasificación de hongos endófitos

El concepto de “endófito” se define literalmente dentro de la planta por su etimología (*endon*: dentro y *phyton*: planta) (Schultz & Boyle, 2006). Los organismos endófitos representan una asociación endosimbiótica de una población ya sean bacterias, hongos u organismos eucariotas unicelulares asociados con las plantas intra o extracelularmente

(Aamir, 2020). Específicamente, los hongos endófitos viven toda su vida o gran parte de ella dentro de los tejidos de las plantas sin causar un daño a la misma, una característica de estos microorganismos es que se han adaptado a vivir en estructuras como hojas, tallo, corteza, y raíces (Lowenfels & Lewis, 2021).

La clasificación de los hongos endófitos es muy diversa debido a diferentes factores alrededor de los mismos. Una clasificación puede ser basada en su modo de transmisión, tipo de hospedero que podrían ocupar, modo de reproducción, fuente de nutrición y expresión de síntomas en las plantas hospedantes, morfología general y partes colonizadas de las plantas (Purahong y Hyde, 2010). Se estableció una clasificación de acuerdo con la filogenia del hongo (evolución, parentesco, taxonomía, hospedantes vegetales y función ecológica) en dos grandes grupos: Clavicipitáceos y No Clavicipitáceos (NC), su huésped son los pastos y las plantas vasculares y no vasculares, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2009). Estos a su vez se dividen en clase 1, 2, 3 y 4 siendo los NC los que se clasifican en 3 grupos. En Tabla 1 se resume la clasificación y las características, en función del rango de hospedero, el tejido colonizado, su transmisión y la función biológica ecológica. Si la transmisión del hongo ocurre de manera vertical, es por medio de las semillas y de manera horizontal se adquiere por el ambiente. (Rodríguez *et al.*, 2009; Sánchez-Fernández, 2013).

**Tabla 1.** Clasificación de Hongos endófitos

	Clavicipitáceos	No Clavicipitáceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
<b>Criterio</b>				
<b>Rango de hospedero</b>	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
<b>Tejido colonizado</b>	Tallo y rizomas	Hoja, tallo y rizomas	Frutos, flores, hojas, corteza y tallos	Raíces
<b>Colonización en planta</b>	Extensa	Extensa	Limitada	Extensiva
<b>Biodiversidad en planta</b>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
<b>Transmisión</b>	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
<b>Beneficios/Función ecológica</b>	Incrementan la biomasa de la planta, tolerancia a sequía y producción de metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a estrés biótico y abiótico y protegen contra hongos patógenos por acción de metabolitos secundarios	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra herbívoros y modificación de la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros
<b>Géneros</b>	<i>Balansia, Epichloë/Neotyphodium, Cordyceps, Claviceps</i>	Ascomicetos y menormente basidiomicetos: <i>Phoma, Curvularia, Fusarium, Colletotrichum, Cryptosporiopsis</i>	Ascomicetos y en menor proporción basidiomicetos: <i>Xylaria, Colletotrichum, Phomopsis, Nodulisporium, Guignardia, Acremonium, Aspergillus, Fusarium</i>	Endófitos de septo oscuro (DSE): <i>Chloridium, Leptodontium, Phialocephala, Phialophora</i>

## 5. Relaciones que se establecen entre hongos endófitos y sus hospederos

Existen diversos factores que rigen las interacciones o relaciones que establece la planta con sus hongos endófitos (planta-endófitos), algunos son, el modo de transmisión, patrón

de infección, edad de la planta, condiciones ambientales y antecedentes genéticos. Una distinción entre la relación hacia el hospedero es mediante el modo de transmisión, si sucede de manera vertical (sistémica) es decir colonizan internamente a las semillas, son más propensos a ser mutualistas, en cambio si su transmisión es horizontal (no-sistémica) por medio de esporas, tienden a ser más antagonicos para el hospedero (Aly *et al.*, 2011). En estas diferentes relaciones, los hongos endófitos producen factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos entre otros, y en el caso de la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas, todas ellas mediadas por diversos factores del medio ambiente y el ciclo de vida de ambos organismos. Estas afirmaciones implican a la hipótesis del antagonismo balanceado que menciona que la coexistencia de planta-endófito se basa en tener equilibrio entre la virulencia del hongo y las defensas de la planta (el hongo realiza una infección y la planta limita el desarrollo de invasores), para permanecer en una colonización asintomática (Sánchez- Fernández, 2013; Schulz & Boyle, 2005). Se ha demostrado que dependiente del área geográfica la comunidad de hongos endófitos difiere entre ellas, esto al actuar como “filtro ecológico” para los endófitos en la selección de aquellos que se puedan adaptar mejor a las condiciones locales, además, algunos endófitos muestran especificidad de huésped o con genotipos específicos de estos mismos (De Carvalho Ribeiro, et al., 2012)

## 6. Beneficios interacción endófito-hospedero

Los hongos endófitos pueden tomar un papel mutualista, principalmente toman nutrientes de su hospedero, pero pueden dar un beneficio a la misma planta, en la protección contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia

de metales), esto por medio de tres mecanismos: 1) Directos: producción de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno producidos por el hongo endófito, relacionado con el aumento en la producción de biomasa, expansión del desarrollo del sistema radicular, altura de la planta, reproducción de peso y rendimiento, debido a estos beneficios se pueden denominar como biofertilizantes. 2) Indirectos: inducción o incremento de expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos del hospedero, y 3) Ecológicos: por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y depredación (Sánchez-Fernández, 2013; Bamisile *et al.*, 2018; Baron N. & Rigobelo E., 2021)

## 7. Metabolitos secundarios de hongos endófitos

Varios estudios han demostrado que los hongos endófitos son capaces de producir compuestos bioactivos importantes (metabolitos secundarios), aumentando así el potencial uso de sus metabolitos secundarios como fuentes alternativas en la industria farmacéutica, agroquímica y alimentaria, entre otras. Algunos endófitos tienen la capacidad de proporcionar directamente a sus anfitriones metabolitos secundarios bioactivos, contribuyendo así a su defensa, o pueden trasladar los genes responsables al genoma huésped o viceversa (Aly *et al.*, 2011). Estos compuestos son de bajo peso molecular, se definen como sustancias naturales orgánicas producidas por microorganismos que poseen actividad en bajas concentraciones frente a otros microorganismos, incluyendo bacterias y hongos. Se ha demostrado que los compuestos antibacterianos producidos por endófitos ocupan un amplio espectro de clases estructurales, tales como alcaloides, péptidos, esteroides, terpenoides, fenoles, quininas,

y flavonoides, compuestos clorados y compuestos orgánicos volátiles (COV), de estos últimos se tienen que se producen más de 300, gracias a los hongos endófitos (Card et al., 2016; Lugtenberg et al. 2016; Latz et al. 2018; Kaddes et al. 2019) (Manganyi & Ateba, 2020). Otra importante función de estos metabolitos es que influyen en el crecimiento y desarrollo de especies que crecen alrededor de su hospedero evitando la competencia por nutrientes y espacio (Sánchez-Fernández, 2013). Diferentes estudios de metabolitos secundarios han mostrado tener actividad antimicrobiana y actividad antitumoral, así como actividad anti-enzimática, inhibición de formación de biopelículas, inhibición del crecimiento del fitoplancton entre muchas otras actividades (Zheng, et al., 2021).

## 8. Metabolitos secundarios de hongos endófitos con potencial farmacéutico

De los metabolitos aislados de hongos, el mayor grupo son los terpenos con un 26% y le siguen las cetonas con el 22%, estos metabolitos han sido aislados de varios hongos en diferentes tejidos de diferentes plantas. Sus estructuras varían mucho, lo que lleva a sus múltiples actividades biológicas, desde actividad antimicrobiana, antitumoral, inhibición del crecimiento de fitoplancton, etc., (Zheng, 2021). En la Tabla 2 se enlistan algunos metabolitos con potencial farmacéutico.

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios de hongos endófitos y sus diferentes actividades biológicas.

Metabolito	Hongo endófito	Planta hospedera	Actividad biológica	Referencia
<b>10-oxo-10H-fenaleno [1,2,3]</b> <b>ácidos cromeno-2-carboxílicos y ácidos xanaltericos</b>	<i>Alternaria</i> sp.	Mangle ( <i>Sonneratia alba</i> collected)	Propiedad antibacteriana contra <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kjer et al., 2009
<b>Lolitrem B/ Alcaloide indolterpénico</b>	<i>Neotyphodium lolii</i> (Clavicipitaceae).	<i>Lolium perenne</i> (Poaceae).	Neurotóxico. Inhibidor de los canales de calcio activados por potasio	Imlach et al., 2009
<b>Roritoxina E/ Macrólido tipo tricoteceno.</b>	<i>Myrothecium roridum</i>	<i>Artemisia annua</i> (Asteraceae).	Citotóxico, en líneas celulares de carcinoma gástrico y hepatocarcinoma	Koolen et al., 2012
<b>Cloropupekeanina/ Dímero policétido prenilado</b>	<i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae).	Árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.	Antiviral. Inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1).	Liu et al., 2008
<b>Bispirrocidina/ Alcaloide dímero de la pirrolidina.</b>	<i>Neonectria ramulariae</i> Wollenw KS-246 (Nectriaceae).	Árbol no identificado.	Antioxidante. Inhibe la peroxidación del ácido linoleico.	Shiono et al., 2011
<b>Pulularina A/ Depsipéptido</b>	<i>Pullularia</i> sp. BCC 8613 (Dothioraceae).	<i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae)	Antiplasmódico. Contra <i>Plasmodium falciparum</i> K1. Antiviral., contra el virus del herpes simple (HSV-1).	Isaka et al., 2007

## ANTECEDENTES

### 1. Familia Vitácea y sus estudios

Estudios relacionados con hongos endófitos son muy pocos, sin embargo, se destacan algunos estudios que van desde la Familia Vitaceae hasta algunas especies distintas del género *Cissus* en las cuales es importante mencionar los siguientes: en el año 2010 González & Tello, estudiaron a *Vitis vinífera* y aislaron de ella cuatro géneros diferentes de hongos endófitos: *Acremonium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, la mayoría de las cepas aisladas fueron en hojas y ramas. De la misma planta Huang y colaboradores en 2018, aislaron *Colletotrichum* sp., *Trichothecium* sp. y *Alternaria* sp. En el año 2019 Li y colaboradores a partir de hojas de *Vitis amurensis* aislaron a *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Phoma* sp. y *Albifimbria verrucaria* e investigaron su actividad de biocontrol contra *B. cinérea* un hongo patógeno que afecta a la uva. En el año 2021 Tian y colaboradores, a partir de *Vitis quinquangularis* aislaron el hongo *Alternaria* sp., y pudieron obtener un metabolito secundario llamado Alterperilenol, que es una naftoquinona que mostró porcentaje de inhibición en líneas celulares de fibrosarcoma (HT-1080) y carcinoma de pulmón (NCI-H1299) de 98% y 96.20% respectivamente, a una concentración de 20  $\mu$ M.

### 2. Género *Cissus* y sus especies

El género *Cissus* consta de unas 350 especies, forma parte de la familia Vitácea en la que destaca la uva (*Vitis vinifera*) (Fernández & Banu, 2012). Dentro de este género algunas de las especies que se utilizan en el área de la medicina tradicional son: *C.*

*araloides* como agente antimicrobiano (Assob et al., 2011), *C. hypoglauca* para dolor de garganta (Lassack & McCarthy, 1997), *C. rotundifolia* es utilizada en África y Sudamérica como antiparasitario y antidiabético (Onyechi et al., 1998; Alzoreky & Nakamura, 2003). *C. verticillata* se usa en Trinidad y Tobago (caribe) como antidiabético y para el tratamiento del colesterol (Lans, 2006), *C. quadrangularis* se emplea en India y Sri Lanka para curar fracturas e incrementar la fuerza de los huesos (Udupa & Prasad, 1962; Udupa & Prasad, 1964) y *C. sycoides* se usa en Brasil (Sud-América) como antidiabético, diurético y antiinflamatorio (Salgado et al., 2009), siendo esta dos últimas especies las más estudiadas por sus propiedades curativas (Fernandes, 2012)

*C. trifoliata* (sinónimo: *C. incisa*) se le conoce como la hierba de buey, posee las siguientes características morfológicas: es una enredadera común con hojas carnosas que generalmente tienen 3 lóbulos y dientes toscos, pero de forma extremadamente variable, tiene raíces tuberosas, una base leñosa y una estructura carnosa en la parte superior. Tiene racimos de pequeñas bayas que se vuelven negras cuando maduran. Las hojas desprenden un fuerte olor cuando se trituran (PlantDataBase; USDA, 2022). Su distribución es muy amplia desde Norte América Estados Unidos estados de Arizona, Georgia, Missouri, en México en los estados de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Puebla, Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Quintana Roo y Yucatán. En Sud-América: Venezuela, Colombia y Ecuador. En otros países, Bahamas, Cuba, Haití, Jamaica y Puerto Rico (Standley, 1967). Se utiliza en la medicina tradicional Maya en el estado de Yucatán para enfermedades gastrointestinales, infecciones cutáneas, abscesos y tumores, se prepara macerando con sal y se aplica en el área afectada (Alvarado-Vázquez, et al. 2010;

Heinrich et al., 1998). En el estado Noroeste de México, Nuevo León, se emplea para tratar infecciones cutáneas e inflamación (Estrada-Castillón et al., 2012). Estos son algunos usos reportados de *C. trifoliata*, sin embargo, el estudio de los componentes o extractos de esta especie son escasos, y solo se han reportado los siguientes estudios resumidos en las Tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Actividades biológicas de diferentes extractos de *C. trifoliata* (*C. incisa*)

Parte usada de la planta	Solvente de Extracción	Actividad Antibacteriana (MIC >500 µg/mL)	Actividad citotóxica (IC <sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL)	Referencia
Tallo	Hexano	-	Cáncer de hígado: HepG2 (26 ± 2 µg/mL) Hep3B (24 ± 2 µg/mL) Cáncer de mama: MCF7 (30 ± 3 µg/mL)	(Méndez-López, 2020)
Tallo	Cloroformo/Metanol CHCl <sub>3</sub> /MeOH	-	-	(Méndez-López, 2020)
Tallo	Acuoso	-	Cáncer de mama: MCF7 (30 ± 2 µg/mL)	(Méndez-López, 2020)
Hoja	Hexano	-	Cáncer de hígado: Hep3B (27 ± 3 µg/mL) HepG2 (30 ± 6 µg/mL)	(Nocedo-Mena, 2021)
Hoja	Cloroformo/metanol CHCl <sub>3</sub> /MeOH	-	Hep3B (31 ± 2 µg/mL) HepG2 (39 ± 3 µg/mL)	(Nocedo-Mena, 2021A)
Hoja	Acuoso	-	-	(Nocedo-Mena, 2021)

**Tabla 4.** Metabolitos secundarios aislados en *C. trifoliata* (*C. incisa*)

Parte usada: Hojas	Compuesto	Referencias
Esfingolípidos	2-(20 -hydroxydecanoyl amino)-1,3,4- hexadecanotriol-8-ene	Nocado-Mena, 2020
Terpenos		
Aromáticos polifenólicos		
Cerebrósidos		
Terpenos	Fitol y $\alpha$ - amirina	Nocado-Mena, 2019
Ceramidas		Nocado-Mena, 2021
<b>Parte usada: Ramas</b>		
Terpenos		Méndez-López, 2020
Aromáticos		

Otras especies del género *Cissus* se han estudiado, tal es el caso de *C. repanda* en el año 2004 Wiyakrutta y colaboradores, evaluaron los extractos de 92 aislamientos inhibieron a *M. tuberculosis* con una CMI de 0.0625–200  $\mu\text{g/mL}$  usando el ensayo en microplaca de azul de alamar. Suradkar et al., 2017, estudiaron los hongos endófitos de *C. quadrangularis*, y lograron aislar *Arthrumium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Stachybotrys*, *Pestalotiopsis*. En el año 2021 Singh, aisló de la raíz de *C. quadrangularis* L. el hongo *F. proliferatum*, del cual se obtuvo el extracto de acetato de etilo y se evaluó biológicamente obteniendo que tenía actividad contra *S. aureus* (CMI = 70  $\mu\text{g/mL}$ ), *E. coli* (CMI = 15.33  $\mu\text{g/mL}$ ), *K. pneumoniae* (CMI = 38.67  $\mu\text{g/mL}$ ) y contra *P. aeruginosa* no mostro actividad alguna. De acuerdo con lo expuesto anteriormente se proponen la siguiente hipótesis y objetivos:

## 2. HIPOTESIS

Se obtendrán hongos endófitos de las hojas de *C. trifoliata* que producirán metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y/o citotóxica.

## 3. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar hongos endófitos de las hojas de *C. trifoliata*, preparar sus extractos, determinar su actividad antibacteriana y citotóxica. Seleccionar uno de los extractos activos para realizar un estudio químico y aislar y caracterizar estructuralmente al menos un metabolito secundario y evaluarlo biológicamente.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1 Recolectar el material vegetal en el municipio de Rayones, Nuevo León.
- 2.2 Aislar y purificar los hongos endófitos de *C. trifoliata*.
- 2.3 Caracterizar macroscópica, microscópica y molecularmente los hongos endófitos aislados.
- 2.4 Cultivar a pequeña escala el mayor número de aislamientos puros de hongos endófitos,

- 2.5 Obtener los extractos orgánicos.
- 2.6 Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos crudos.
- 2.7 Evaluar la actividad citotóxica de los extractos crudos.
- 2.8 Seleccionar al menos uno de los extractos más activas.
- 2.9 Cultivar a mediana escala el endófito seleccionado y obtener el extracto orgánico bioactivo.
- 2.10 Verificar la actividad biológica del extracto orgánico bioactivo.
- 2.11 Aislar, caracterizar estructuralmente y evaluar biológicamente al menos un metabolito secundario del extracto activo seleccionado.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 1. Recolecta de material vegetal

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en el municipio de Los Rayones (25° 01' 24" N 100° 03' 44" O 819msnm), Nuevo León, el domingo 3 de Julio de 2022 alrededor de las 10 am por el biólogo Mauricio González Ferrara (Figura 1). Se recolectaron las hojas sanas de la parte media de la planta herbácea *C. trifoliata*, aunado al criterio ecológico de plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad (Yu *et al.*, 2010). Las hojas se conservaron en bolsa de plástico en refrigeración durante 24 h antes de ser usadas para aislar los hongos endófitos.



**Figura 1.** Mapa del estado de Nuevo León, representado con una estrella el lugar de colecta.

## 2. Aislamiento y purificación de hongos endófitos

El material vegetal se lavó con agua purificada y agua destilada estéril. Posteriormente, se esterilizó superficialmente con etanol al 75% por 60 s y Clorox al 65% (equivalente a 3.4% de NaClO) por 30 s, y se lavó con agua destilada estéril entre los tratamientos y finalmente se lavó tres veces con agua destilada estéril. Las hojas estériles se secaron con papel adsorbente estéril. A continuación, de la parte central de una hoja se cortaron segmentos de 0.5 x 0.5 cm y se colocó un segmento en cada cuadrante previamente indicado en cajas Petri de 100 x 15 mm conteniendo medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA). De igual manera se colocó un segmento de la misma hoja en cada uno de los cuatro cuadrantes en cajas Petri de 100 x 15 mm en Agar-Agua (AA) al 2%. A los medios anteriormente mencionados se les adiciono antibiótico (cloranfenicol 500 mg/L) cabe mencionar que se utilizaron 12 hojas de *C. trifoliata* para el aislamiento de los hongos endófitos. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad natural (12:12 h) de manera estática, cada colonia distinta que emergió de los segmentos de hojas se transfirió a cajas Petri con PDA sin antibiótico (Rodríguez 1994; Schulz & Boyle 2005; Macías-Rubalcava *et al.*, 2014). Se realizaron tres o cuatro resiembras de las colonias homogéneas, de las cuales se observaron las características macroscópicas por el frente y envés de la caja Petri, como color, textura, exudados coloridos, etc. Cuando la colonia se observaba homogénea se dejaba crecer hasta completar el diámetro de la caja Petri entonces se tomó con un sacabocado tres o cuatro porciones que se resembraron en el centro de cajas Petri para determinar velocidad de crecimiento. También de la misma caja llena se realizan tinciones de impronta y de microcultivo

coloreando las preparaciones con rojo Congo o azul de lactofenol para determinar características microscópicas.

## 2.1 Conservación de hongos endófitos aislados

Los hongos aislados se resembraron en PDA sin antibiótico hasta obtener las colonias puras. Las colonias fúngicas puras se conservaron en tubos inclinados con PDA a temperatura ambiente y en tubos con AA al 0.2% a 4 °C en el Laboratorio de Biotecnología I. Los tres hongos aislados se conservaron en caldo papa-dextrosa (CPD) con glicerol al 30% a – 80 °C en el Laboratorio de Biotecnología I.

## 3. Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos endófitos aislados

Las características macroscópicas del micelio se registraron cada dos días, registrando su textura, consistencia, superficie, color del micelio en su cara superior e inferior, tipo de crecimiento, producción de exudado y la difusión de metabolitos secundarios coloridos en el medio de cultivo (Sánchez-Fernández, 2016). Las características microscópicas de los hongos se registraron mediante la obtención y el análisis de preparaciones microscópicas del micelio fresco. Los microcultivos se prepararon de la siguiente manera: se cortó un cuadrado de PDA de 1 mm por lado, dentro de una caja Petri y sobre dos palillos estériles se colocó un portaobjetos con el cuadro de agar en el centro. Luego se inoculó el hongo en las cuatro esquinas del agar, para que el hongo creciera en diferentes direcciones. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 3 y 5 días, para evitar que se secase el cuadro de PDA se agregó un

algodón estéril empapado en glicerol con un poco de agua. Una vez transcurrido el tiempo se separó el cubreobjetos y en un portaobjetos limpio se colocó una gota de azul de lactofenol y en otro una gota de rojo Congo y se colocó el cubreobjetos, para observarse a microscopio. Las preparaciones microscópicas se realizaron por la técnica impronta de micelio usando cinta adhesiva, se tomó la cinta y se colocó sobre el micelio del hongo procurando que en la cinta se pegue el micelio, se colocó en un portaobjetos con una gota de colorante rojo Congo y en otro portaobjetos otra cinta con micelio con colorante azul de lactofenol dejando el micelio expuesto a los colorantes. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (MOTIC® modelo BA410) con los objetivos de 10x y 100x y se tomaron diversas fotografías, registrándose así, las características de las hifas y la formación de estructuras (Leslie & Summerell, 2008; Sánchez-Fernández, 2016).

#### 4. Caracterización molecular

**Método de extracción de ADN genómico de hongos.** Inicialmente, los hongos se cultivaron en caldo papa dextrosa (PDA), a las hifas del hongo se les extrajo el ADN (ácido desoxirribonucleico) usando el Kit Promega, Wizard® (Isolating Genomic DNA from Yeast, con modificaciones). Se describe la metodología brevemente, un mL del medio se recolectó en microtubos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue descartado. La biomasa obtenida se macero adicionando nitrógeno líquido y se recolectó en un microtubo de 1.5 mL. Luego se agregó 293 µL de EDTA al 50 mM, se incubó 60 min a 37 °C, se dejó enfriar 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min, el sobrenadante se descartó. A la pastilla de

micelio obtenida se adiciono 300  $\mu$ L de Nuclei Lysis Solution, se mezcló suavemente, también se agregó 100  $\mu$ L de Protein Precipitation Solution, se mezcló en vortex durante 30s, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugo a 13,000 rpm por 3 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo que contenía 300  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. El sobrenadante se decantó y se adicionó 300  $\mu$ L de etanol al 70% a temperatura ambiente, nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min, el etanol se aspiró y el precipitado se dejó secar. Finalmente, el DNA se resuspendió en 20  $\mu$ L de DNA Rehydration Solution. La presencia e integridad del DNA genómico se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**Amplificación de las regiones ITS de hongos.** La identificación molecular se llevó a cabo por la amplificación de los espacios transcritos internos (ITS) mediante PCR punto final (Polymerase Chain Reaction). Para realizar la amplificación de los ITS se utilizaron los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), con las concentraciones de reactivos y bajo las condiciones de PCR mostradas en las Tablas 5 y 6 (Souza et al., 2017). La visualización de los fragmentos de DNA obtenidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Tablas 5 y 6).

**Tabla 5.** Reactivos de PCR utilizados para la amplificación

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Go Taq Green Master Mix	12.5
H <sub>2</sub> O milliQ estéril	cbp 25
DNA	50 ng*

Volumen total2	25
----------------	----

\* cbp: cuanto basta para. Nota: GoTaq® Green Máster Mix (M712) PROMEGA.

**Tabla 6.** Programa de temperatura y ciclos de PCR utilizadas para la amplificación de las regiones ITS

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

**Purificación y secuenciación de los productos de PCR.** Los productos de PCR obtenidos de cada hongo se purificaron mediante el reactivo de limpieza de productos de PCR ExoSAP-IT™ EXOSAP-IT, donde por cada 10 µL de producto se adiciono 4 µL del reactivo ExoSAP, la reacción se llevó a cabo en microtubos de 0.2 µL. Las muestras se colocaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones de reacción; un ciclo a 37 °C durante 15 min y a 80 °C por 15min. Las muestras se cuantificaron en el equipo Thermo Scientific™ Nanodrop™ 2000/2000C Spectrophotometers y su concentración se ajustó entre 20 y 40 ng/µL, después, se enviaron a secuenciar a la empresa Eurofins GTM Operon LLC (Louisvile KY, EE. UU.).

**Alineamiento de secuencias nucleotídicas.** Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas sentido y antisentido de cada producto de PCR secuenciado, a partir de ellas se construyó una secuencia consenso usando el programa SeqMan-Pro, las secuencias consenso en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y mediante su alineamiento local se determinó el género y especie de cada hongo secuenciado.

## 5. Cultivo a mediana escala de hongos endófitos

### 5.1 Cultivo en caldo papa dextrosa (CPD)

El cultivo a mediana escala de cada hongo aislado se realizó utilizando un matraz Fernbach con capacidad de 2.8 L para cada uno de los hongos, y como medio de cultivo CPD. A cada matraz se le adicionó 1000 mL de CPD y se inoculó con 10 cortes de 1 cm<sup>2</sup> del micelio del hongo seleccionado, previamente incubado por 7 días en cajas estériles de 100 x 15 mm Papa Dextrosa Agar (PDA). Los cultivos se incubaron estáticamente a temperatura ambiente durante 6 semanas, con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h (Sánchez Fernández, 2010). Ver anexos la preparación del medio de cultivo CPD.

### 5.2 Cultivo en Medio Arroz (MA)

El cultivo a mediana escala también se realizó utilizando un matraz Fernbach con capacidad de 2.8 L para cada hongo aislado, y como medio de cultivo MA. A cada matraz se le adicionó el MA y se inocularon con 10 cortes de 1 cm<sup>2</sup> del micelio del hongo seleccionado, previamente incubado por 7 días en cajas estériles de 100 x 15 mm de diámetro con PDA. Los cultivos se incubaron estáticamente a temperatura ambiente durante 6 semanas, con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h (Sánchez Fernández, 2010). Ver anexos la preparación del MA.

## 6. Obtención de extractos orgánicos

Una vez transcurrido el periodo de incubación de seis semanas de los cultivos sólidos y líquidos se realizaron preparaciones microscópicas para verificar la pureza de los cultivos, se realizó una tinción de Gram y se observó bajo el microscopio para descartar contaminación bacteriana. Posteriormente, en el caso de los cultivos en medio CPD se separó el medio de cultivo del micelio mediante filtración simple a través de gasa y a través de papel filtro Whatman 42. Los extractos del micelio se obtuvieron mediante un proceso de maceración exhaustiva cortando el micelio en trozos pequeños y posteriormente usando sonicación con cloroformo/metanol ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1). Por otro lado, los extractos de medio de cultivo se obtuvieron por partición líquido-líquido usando Acetato de Etilo ( $\text{AcOEt}$ ). Las fases orgánicas obtenidas de las extracciones por partición líquido-líquido se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente, este agente desecante se retiró por decantación o filtración y el extracto se destiló en un rotavapor al vacío a  $40^\circ\text{C}$ . Los extractos libres de solventes se pesaron y se determinó el rendimiento, luego se guardaron en viales cerrados y se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$ . Los extractos del medio de cultivo y micelio se analizarán por cromatografía en capa fina (CCF) (Macías-Rubalcava *et al.* 2014; Sandoval-Espinosa 2014).

En el caso del cultivo de MA se disgregó el arroz con varilla de vidrio para tener más área de contacto con el solvente. Luego se procedió a realizar una extracción continua por maceración, para la obtención de extractos sucesivos: primero se agregó Hexano se dejó macerar a temperatura ambiente, después de 48 h se filtró a través de gasa y luego a través de papel filtro Whatman 42. Se dejó secar el arroz y se agregó  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1

y se dejó reposar 48 h y después se filtró a través de gasa y a través de papel filtro Whatman 42, repitiendo la extracción nuevamente con CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1 y repitiendo el proceso. A los extractos obtenidos se les adicionó sulfato de sodio anhidro y luego este se separó por filtración. Luego los extractos se destilaron por separado en un rotavapor al vacío a 40 °C. Los extractos libres de solventes se pesaron y se determinó el rendimiento, luego se guardaron en viales cerrados y se mantuvieron a -20 °C. (Macías-Rubalcava *et al.* 2014; Sandoval-Espinosa 2014).

## 7. Actividad contra bacterias resistentes

La actividad de los extractos, control del medio de cultivo, control negativo Dimetilsulfoxido (DMSO) y control positivo (Levofloxacino) se determinó por duplicado por el método de microdilución en microplacas de 96 pocillos (Zgoda & Porter, 2001). Los extractos orgánicos y los controles se disolvieron en DMSO para preparar una solución stock. Las soluciones de trabajo 4x se diluyeron en caldo Mueller-Hinton (Difco, Detroit, MI, EE. UU.), para lograr concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.56 µg/mL para extractos. Los controles de medio de cultivo, control positivo y negativo se evaluaron a las siguientes concentraciones: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 µg/mL. El rango de concentraciones de DMSO usado en el ensayo fue del 6% al 0.09% (v/v). Las cepas que se utilizaron fueron 6: dos gram positivas: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (19-2095), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (10-984) y, cuatro gram negativas farmacorresistentes, *Pseudomona aeruginosa* resistente a carbapenemicos (13-1391), *Escherichia coli* productora de BLEE (14-2081), *Klebsiella pneumoniae* NMD-+1 (14-3335) resistente a carbapenemicos y *Acinetobacter baumannii*

resistente a carbapenémicos (12-666). Cada cepa se inoculó por estría cruzada en placas preparadas con agar sangre al 5% e incubadas durante 24 h a 37 °C. Se seleccionaron de una a tres colonias de la placa de agar sangre y se transfirieron a un tubo con 5 mL de solución salina estéril. La suspensión se ajustó utilizando un densitómetro al estándar 0.5 MacFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC). Luego, se transfirieron 10  $\mu$ l de esta suspensión a 11 ml de caldo Mueller Hinton para lograr  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. Se añadió 100  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Además, 100  $\mu$ L de cada solución a evaluar se agregaron a los pocillos de la línea A por duplicado. Luego, se realizó una dilución seriada (1:2) a través de la placa hasta la línea G y se descartaron los últimos 100  $\mu$ l al final de todas las diluciones. Luego, se agregaron 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC) a todos los pozos excepto la línea H que era el control de esterilidad. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. Después de la incubación, se evaluó la turbidez o deposición de fondo visualmente para determinar la viabilidad del microorganismo. Los valores de MIC se determinaron como la concentración más baja a la que las muestras evaluadas que inhiben el crecimiento de microorganismos. Según el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico, los extractos con valor de CMI  $\geq 200$   $\mu$ g/ml se consideró negativo para la actividad antibacteriana (Murray *et al.*, 1999). Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Infectología medica en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.

## 8. Actividad antimicobacteriana

Se utilizó el método azul de Alamar (Franzblau et al., 1998) aplicando las modificaciones descritas por Favela-Hernández et al., 2012. Las cepas probadas fueron la cepa ATTC 27294 sensible H37Rv (sensible a estreptomicina, rifampicina, isoniazida, etambutol y pirazinamida) y la Cepa G117, (resistente a rifampicina, isoniazida y etambutol). Las cepas de *M. tuberculosis* fueron almacenadas y manipuladas en el Laboratorio de Infectología medica en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, Nuevo León, México.

**Preparación del inóculo bacteriano:** Las cepas de *M. tuberculosis* se cultivaron en medio Lowenstein-Jensen y se incubaron durante tres a cuatro semanas a 37 °C. Después del tiempo de incubación, se transfirió una colonia del medio Lowenstein Jensen a un tubo que contenía 5 mL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con 10 % de OADC (oleico, albúmina, dextrosa, catalasa), luego el tubo se incubó durante 14 días a 37 °C para obtener el inóculo líquido. Después del tiempo de incubación, el inóculo líquido debe tener una turbidez igual al estándar 1.0 McFarland para transferir adicionalmente 1 volumen del inóculo líquido a 19 volúmenes de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con 10 % de OADC, para obtener el inóculo de ensayo. Se prepararon stocks de las muestras a evaluar en DMSO y de estas soluciones se prepararon las soluciones de trabajo 4x.

**Ensayo biológico:** En una placa estéril de 96 pocillos con tapa se llenaron los pocillos de la línea A y los pocillos H1, H2, H3, H10, H11 y H12 con 200 µL de agua desionizada

estéril. Luego se agregaron a todos los demás 100  $\mu$ L de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con 10% de OADC a los pozos de la línea B a la línea G, y a los pozos H4 y H5. Los pocillos H6 y H7 se llenaron con 180  $\mu$ L de caldo y los pocillos H8 y H9 con 200  $\mu$ L respectivamente. El siguiente paso consistió en la adición de 100  $\mu$ L de las soluciones de trabajo 4x de las muestras a evaluar en la línea B, cada concentración se evaluó por duplicado (las concentraciones a evaluar fueron de 50 a 1.5625  $\mu$ g/mL). Una vez agregadas las soluciones de trabajo 4x, se realizaron diluciones seriadas (1:2) transfiriendo 100  $\mu$ L de cada pocillo de la línea B a la línea C, mezclando en la línea C y repitiendo el procedimiento hasta llegar a la línea G y desechando los últimos 100  $\mu$ L de esta línea. Después de la dilución en serie, se agregaron 100  $\mu$ L de inóculo de ensayo a los pocillos en las líneas B a G y en los pocillos H4 y H5 (100  $\mu$ L) y H6 y H7 (20  $\mu$ L). Luego la placa se selló con su tapa y se incubó adicionalmente durante 5 días a 37°C. Después del tiempo de incubación, se agregaron 12  $\mu$ L de Tween 80 (10 %) y 20  $\mu$ L de resazurina a los pocillos H4, H5, H6, H7, H8 y H9 (controles de crecimiento bacteriano), luego se selló la placa y se incubó 24 h a 37°C. Después del tiempo de incubación, los pocillos H4 y H5 mostraron un color rosado (crecimiento bacteriano abundante), los pocillos H6 y H7 mostraron un color violeta (crecimiento bacteriano deficiente) y los pocillos H8 y H9 mostraron un color azul (ausencia de crecimiento bacteriano), lo que indica que el crecimiento bacteriano fue apropiado para agregar Tween 80 y Resazurina a todos los pocillos en las líneas B a G para sellar aún más la placa e incubar 24 h a 37°C. Después del tiempo de incubación, se evaluó visualmente la concentración mínima inhibidora (CMI) para cada extracto probado, observándose como inhibición del crecimiento bacteriano los pocillos de color azul, mientras que el crecimiento bacteriano

se observó en los pocillos de color rosa. La CMI para cada extracto se determinó como la concentración más baja en la que se observó inhibición del crecimiento bacteriano.

## 9. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica se realizó en las líneas celulares de cáncer humano PC3 (próstata), MCF7 (mama), U251 (glioblastoma), HCT-15 (colorrectal), SKLU-1 (pulmón), y HaCaT: Células epiteliales humanas normales, obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.) (Basu *et al.*, 2006). Se cultivaron células PC3 en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), y el resto en medio DMEM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.), suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB, Invitrogen) y con glutamina 2 mM. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Metodología de Cristal Violeta.** Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en 200  $\mu$ L de medio DMEM-F12. Después de 24 horas de pre- incubación, las células se trataron con los extractos por 48 horas a una concentración de 50  $\mu$ g/mL para el rastreo de actividad citotóxica. Las células control tratadas con el mismo volumen del vehículo (dimetilsulfóxido) se utilizó para normalizar cada condición de cada una de las muestras. Después de las 48 horas de tratamiento, se retiró el medio de cada pocillo y las células se lavaron con PBS. Después, las células se tiñeron con una solución de Cristal violeta (50  $\mu$ L) durante 30 minutos, se lavaron con agua corriente y se secaron al aire. Después, el tinte unido se solubilizó mediante la adición de una solución de sulfato de dodecilo sódico (SDS) al 1% (200  $\mu$ l). Las placas se colocaron en un agitador durante 5 minutos antes del análisis. Las densidades ópticas

se determinaron con un lector de imágenes Cytation 5 (BIOTek Instruments, Inc.) a  $\lambda = 570$  nm. El porcentaje de viabilidad de las células del cultivo se calculó a partir de la siguiente manera: % de viabilidad = (Densidad óptica de las células tratadas/Densidad óptica de las células no tratadas) x 100 (Feoktistova, *et al.*, 2016).

## 10. Análisis cromatográficos

### 10.1 Cromatografía en Capa Delgada (TLC)

Los extractos y la molécula pura se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de aluminio SIGMA-ALDRICH® recubiertas de gel de sílice con indicador de fluorescencia F<sub>254</sub>, y como fase móvil una serie de solventes de diferente polaridad para ver el perfil cromatográfico de cada extracto y la pureza del compuesto aislado.

### 10.2 Cromatografía en Columna

Uno de los extractos bioactivos se analizó por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice SIGMA-ALDRICH® de alta pureza, con tamaño de poro de 60Å, mala de 70-230 y 63-20  $\mu\text{m}$  y como fase móvil una gradiente de hexano/acetato de etilo. Las fracciones fueron analizadas por TLC y las fracciones con perfiles cromatográficos similares se unieron para enriquecer los compuestos, con esta técnica se logró aislar y purificar un compuesto.

## 11. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La estructura química de los sólidos se analizó mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Realizado en equipo BRUKER NMR 400 MHz utilizando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Para el procesamiento de los datos espectrales se utilizó el software MestReNova versión 12.0.2.

## 12. Espectroscopia de Infrarrojo

El compuesto aislado se analizó mediante Infrarrojo (ATR-FTIR), realizado con el equipo Spectrum-One spectrophotometer.

## 13. Espectrometría de Masas

Se realizó la espectrometría de masas en el instituto de química de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se realizó con modo de ionización ESI+.

## 14. Punto de fusión

Para la obtención del punto de fusión se utilizó el aparato Fisher-Johns® Melting Point Apparatus, calentado el dispositivo y observando a través de la lupa el rango de temperatura desde el inicio al final de la fusión del cristal.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Aislamiento e identificación de hongos endófitos de las hojas de *C. trifoliata*

Se lograron aislar tres hongos endófitos con diferentes características macroscópicas y microscópicas las cuales se describen en las Tablas 7, 8 y 9. En la Tabla 7 se observan las características del primer hongo, el cual fue aislado el 6 septiembre del 2022, se le dio la clave de **AA-VI C3c (N)** porque se aisló de agar-agua (AA) del cuadrante tres (C3) de la parte central (c) y tuvo como característica distintiva micelio de color negro (N) en el anverso. De acuerdo con las características previamente descritas y la secuenciación genómica que se describirá en la siguiente sección como el hongo endófito el cual se identificó como *Colletotrichum siamense* (Qiao, et al., 2021 & Weir, et al., 2012).

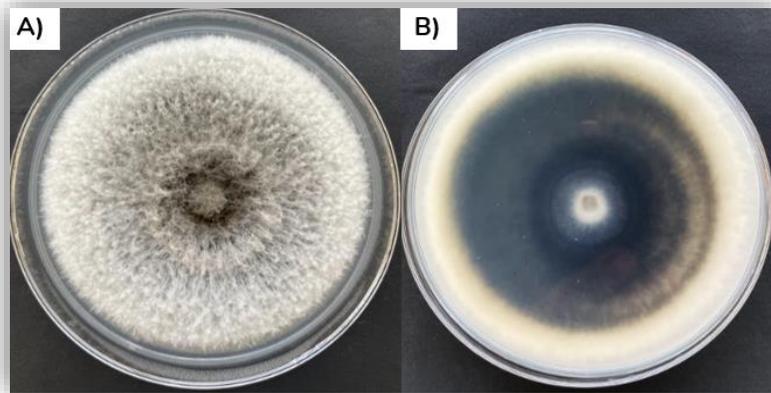
**Tabla 7.** Características generales observadas del primer hongo aislado AA-VI C3c (N):

*Colletotrichum siamense*

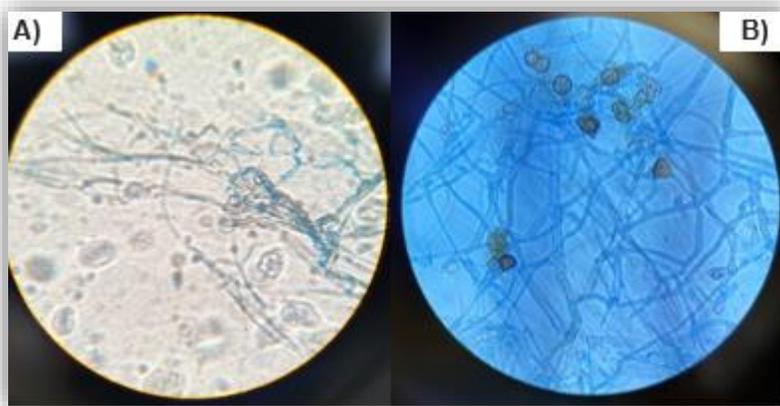
Hongo	<b>AA-VI C3c (N) <i>Colletotrichum siamense</i></b>
<b>Características Macroscópicas</b>	A) Crecimiento radial uniforme, elevada, apariencia algodonosa, hifas color grisáceo con hifas blancas en la periferia B) al anverso se observa un color oscuro en el centro (Figura 2)
<b>Características Microscópicas</b>	Hifas delgadas, septadas, conidios oscuros y simples teñidas con azul de lactofenol 40x (Figura 3)

<b>Tasa de crecimiento</b>	7.48 cm <sup>2</sup> / día (Figura 4)
----------------------------	---------------------------------------

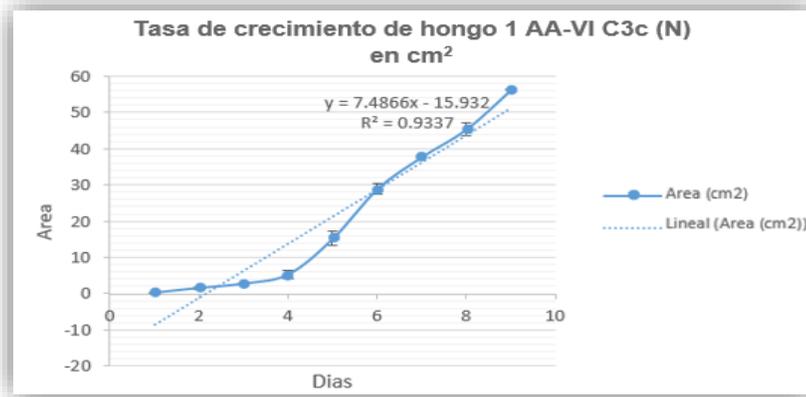
Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N).



**Figura 2.** Características macroscópicas del hongo **AA-VI C3c (N):** *Colletotrichum siamense*. A) Haz B) Envés. Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N).



**Figura 3.** Características microscópicas del hongo **AA-VI C3c (N):** *Colletotrichum siamense* con tinción azul de lactofenol. A) Hifas B) Hifas y conidios. Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N).



**Figura 4.** Tasa de crecimiento en (cm²/día) del hongo **AA-VI C3c (N):** *Colletotrichum siamense*. Agar-Agua (AA), cuadrante tres (C3), de la parte central (c) y característica distintiva (Negro, N).

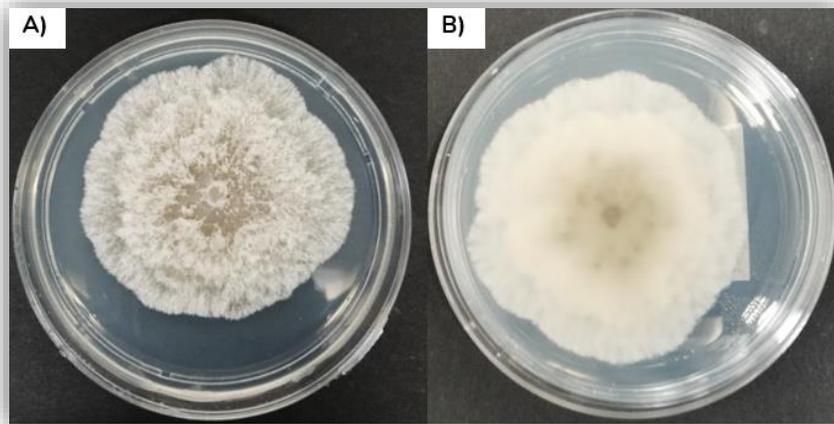
En la Tabla 8 se observan las características del segundo hongo, el cual fue aislado el 14 de septiembre de 2022, se le dio la clave de **AA-IV C3 (F)** porque se aisló de Agar-Agua (AA) del cuadrante 3 (C3) y su característica distintiva micelio en forma de flor (F). Este hongo se identificó por sus características macroscópicas, microscópicas y moleculares como del género *Diaporthe* sp. (Yang, et al., 2018).

**Tabla 8.** Características generales observadas del segundo hongo aislado AA-IV C3

(F): *Diaporthe* sp.

Hongo	2º AA-IV C3 (F) <i>Diaporthe</i> sp
<b>Características Macroscópicas</b>	A) Crecimiento radial con bordes irregulares, de apariencia plumosa color crema B) en el anverso de observa color más oscuro en el centro (Figura 5)
<b>Características Microscópicas</b>	Hifas delgadas, septadas, teñidas rojo Congo (A) y azul de lactofenol (B) respectivamente a 40x. (Figura 6)
<b>Tasa de crecimiento</b>	3.71 cm <sup>2</sup> /día (Figura 7)

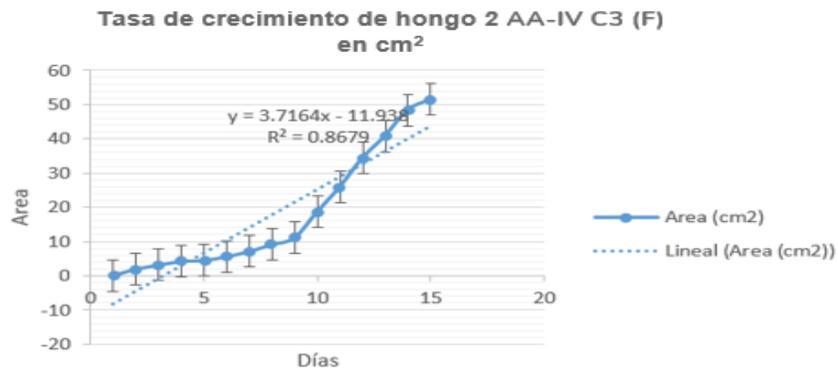
Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F)



**Figura 5.** Características macroscópicas del hongo **AA-IV C3 (F):** *Diaporthe* sp. A) Haz B) Envés. Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F).



**Figura 6.** Características microscópicas del hongo **AA-IV C3 (F):** *Diaporthe* sp. A) Teñido con rojo congo B) Teñido con azul de lactofenol. Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F).



**Figura 7.** Tasa de crecimiento en (cm<sup>2</sup>/día) del hongo **AA-IV C3 (F):** *Diaporthe* sp. Agar-Agua (AA), cuadrante 3 (C3) y característica distintiva (Flor, F).

En la Tabla 9 se observan las características del tercer hongo, aislado el 28 de agosto de 2022, el cual se le dio la clave de **PDA-IV C3o (B)** porque se aisló de Agar Papa Dextrosa (PDA) del cuadrante 3 (C3) de la periferia (o) y su característica distintiva micelio de color blanco (B). De acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas, así como la secuenciación molecular se identificó el hongo como *Colletotrichum kahawae* (Qiao, et al., 2021 & Weir, et al., 2012).

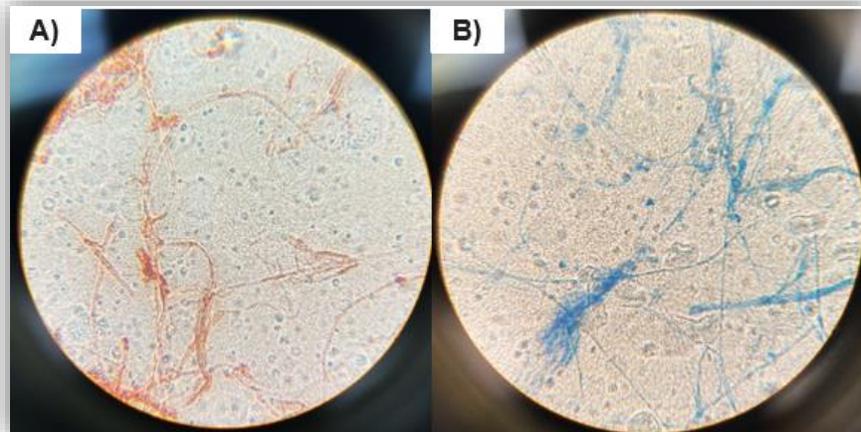
**Tabla 9.** Características generales observadas del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*.

Hongo	<b>3º PDA-IV C3o (B) <i>Colletotrichum kahawae</i></b>
<b>Características Macroscópicas</b>	A) Crecimiento radial uniforme, elevada, de apariencia algodonosa. Hifas color blanco ligeramente grisáceo B) en el anverso se observa en el centro color grisáceo. (Figura 8)
<b>Características Microscópicas</b>	Hifas delgadas, septadas, Teñidas rojo Congo (A) y Azul de lactofenol (B) respectivamente 40x (Figura 9)
<b>Tasa de crecimiento</b>	9.04 cm <sup>2</sup> /día (Figura 10)

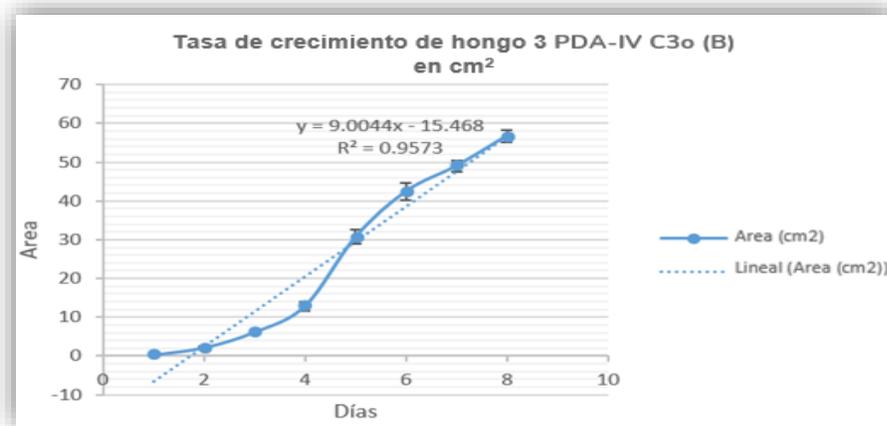
Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B).



**Figura 8.** Características macroscópicas del hongo **PDA-IV C3o (B):** *Colletotrichum kahawae*. A) Haz B) Envés. Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B).



**Figura 9.** Características microscópicas del hongo **PDA-IV C3o (B):** *Colletotrichum kahawae*. A) Teñido con rojo Congo B) Teñido con azul de lactofenol. Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B).



**Figura 10.** Tasa de crecimiento en (cm<sup>2</sup>/día) del hongo **PDA-IV C3o (B)**. Agar Papa Dextrosa (PDA), cuadrante 3 (C3), de la periferia (o) y característica distintiva (Blanco, B).

## 2. Caracterización genómica

De acuerdo con datos obtenidos de la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que a su vez toma la información del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y mediante su alineamiento local se determinó el género y especie tomando en cuenta el query coverage (longitud de la secuencia objetivo que coincide con las secuencias alineadas) y porcentaje de identidad. Los resultados de los aislados AA-VI C3c (N), AA-IV C3 (F) y PDA-C3o (B) fueron los siguientes: El primer resultado para la región ITS1 arrojó dos resultados muy similares: *Colletotrichum siamense*, con un 100% de query coverage y 100% de identidad y su número de acceso respectivo OR272065.1 y a *Colletotrichum aenigma* con un 100% de query coverage y 100% de identidad y su número de acceso respectivo OR879313.1 en este caso se toma en cuenta el Accesion length (cantidad de nucleótidos identificados por el número de

acceso) es 540 y 546 respectivamente al solo tener una diferencia de 6 nucleótidos se toma en cuenta que son 2 codones más en el segundo resultado lo cual conlleva a que posiblemente codifique a una proteína diferente (Biela, 2023) y por lo cual es una especie diferente, para la región ITS4 arrojó *Colletotrichum siamense cepa LF760* con un 99% de query coverage y 99.80% de identidad y su número de acceso respectivo KP703407.1 (Tabla 10, Figura 11 y 12), teniendo en cuenta los resultados anteriores se toma como la especie *C. siamense* en el caso de este hongo por los resultados en conjunto de las dos secuencias utilizadas para la caracterización. Sin embargo, al ser parte del complejo de *Colletotrichum gloeosporioides* las especies *C. siamense* y *C. aenigma* están muy relacionados filogenéticamente entre sí, se ha observado que solamente con la región ITS no es posible identificar las diferentes especies del complejo, esto refleja el bajo número de cambios de base en todo complejo, la variación es tal que dentro o entre especies significa que algunas especies no se puede distinguir (Weir,2012).

**Tabla 10.** Resultados de la base de datos de NCBI BLAST de la muestra del primer hongo aislado AA-VI C3c (N).

<b>Aislado</b>	<b>Región ITS</b>	<b>Hongo</b>	<b>Identidad</b>	<b>Número de acceso</b>
AA-VI C3c (N)	ITS1	<i>Colletotrichum siamense cepa ZHKUCC</i>	100 %	OR272065.1
	ITS4	<i>Colletotrichum siamense cepa LF760</i>	99.80%	KP703407.1

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. JWC-2023e strain ZHKUCC 23-0841 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; inter...	Colletotrichum sp...	942	942	100%	0.0	100.00%	540	OR285939.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense strain ZHKUCC 23-0832 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal...	Colletotrichum si...	942	942	100%	0.0	100.00%	540	OR272065.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate PapF2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Colletotrichum sp...	942	942	100%	0.0	100.00%	561	OR739405.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate PapF small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Colletotrichum sp...	942	942	100%	0.0	100.00%	577	OR739404.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate 22AGGT5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Colletotrichum si...	942	942	100%	0.0	100.00%	532	OR910650.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate HBZXFH-SD7 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Colletotrichum sp...	942	942	100%	0.0	100.00%	557	OR898386.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate EL-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Colletotrichum si...	942	942	100%	0.0	100.00%	535	OR888762.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum aenigma culture KACC.410583 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RN...	Colletotrichum a...	942	942	100%	0.0	100.00%	546	OR879313.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate ZSP-CA-9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Colletotrichum sp...	942	942	100%	0.0	100.00%	558	OR857522.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate ZSP-CA-6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Colletotrichum sp...	942	942	100%	0.0	100.00%	559	OR857520.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate GsYcCG22-1-11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Colletotrichum si...	942	942	100%	0.0	100.00%	583	OR841004.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate GwYcCG22-2-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Colletotrichum si...	942	942	100%	0.0	100.00%	583	OR840976.1

**Figura 11.** Resultados de la secuencia consenso ITS1 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del primer hongo aislado AA-VI C3c (N): *Colletotrichum siamense*.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense strain LF760 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 5...	Colletotrichum si...	937	937	99%	0.0	99.80%	515	KP703407.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. QZ-2022g voucher GUCC 12049 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum sp...	937	937	99%	0.0	99.61%	563	OP722995.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum ligustri voucher GUCC 12111 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Colletotrichum lig...	937	937	99%	0.0	99.61%	549	OP722988.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate BL-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Colletotrichum si...	937	937	99%	0.0	99.61%	588	MW186174.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense strain JX-S4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Colletotrichum si...	935	935	100%	0.0	99.42%	578	MT587807.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate BB-4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Colletotrichum sp...	935	935	100%	0.0	99.42%	581	MT584826.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. strain JNTW22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Colletotrichum sp...	935	935	100%	0.0	99.42%	548	MT577036.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense strain CA-16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Colletotrichum si...	935	935	100%	0.0	99.42%	568	MT393761.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate CA-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Colletotrichum si...	935	935	100%	0.0	99.42%	567	MT355834.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense strain WC91-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Colletotrichum si...	935	935	100%	0.0	99.42%	553	MT355834.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides isolate MR3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Colletotrichum gl...	935	935	100%	0.0	99.42%	575	MN565960.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides isolate SY1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Colletotrichum gl...	935	935	100%	0.0	99.42%	575	MN565958.1

**Figura 12.** Resultados de la secuencia consenso ITS4 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del primer hongo aislado AA-VI C3c (N): *Colletotrichum siamense*.

El segundo resultado arrojó el género *Diaporthe* sp. aislado H23 con un query coverage de 78% y con un porcentaje de identidad del 94.59% el porcentaje más alto de las secuencias alineadas y su número de acceso respectivo MZ207909.1, en el caso de la secuencia ITS4 arrojó como resultado a *Diaporthe* sp. aislado H23 query coverage de 100% y con un porcentaje de identidad del 99.62% su número de acceso respectivo MZ207909.1 (Tabla 11, Figura 13 y Figura 14), ambos resultados arrojaron la misma secuencia por lo que solo se tiene el género del hongo.

**Tabla 11.** Resultados de la base de datos de NCBI BLAST de la muestra del segundo hongo aislado AA-IV C3(F): *Diaporthe* sp.

Aislado	Región	Hongo	Identidad	Número de acceso
AA-VI C3 (F)	ITS1	<i>Diaporthe</i> sp. aislado H23	94.59 %	MZ207909.1
	ITS4	<i>Diaporthe</i> sp. aislado H23	99.62%	MZ207909.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Diaporthe sp. isolate H23 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	<a href="#">Diaporthe sp.</a>	771	771	78%	0.0	94.59%	575	<a href="#">MZ207909.1</a>
Diaporthe caryae isolate ZJUE0276 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	<a href="#">Diaporthe caryae</a>	769	769	78%	0.0	94.25%	559	<a href="#">ON035561.1</a>
Diaporthe sp. RB-2018a strain CDA 728 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	<a href="#">Diaporthe sp. RB...</a>	767	767	77%	0.0	94.57%	548	<a href="#">MG559537.1</a>
Diaporthe sp. CDA728 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal...	<a href="#">Diaporthe sp. CD...</a>	767	767	77%	0.0	94.57%	548	<a href="#">KU743473.1</a>
Diaporthe sp. RB-2018a strain CDA 730 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	<a href="#">Diaporthe sp. RB...</a>	765	765	77%	0.0	94.73%	547	<a href="#">MG559538.1</a>
Diaporthe sp. CDA730 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal...	<a href="#">Diaporthe sp. CD...</a>	765	765	77%	0.0	94.73%	547	<a href="#">KU743474.1</a>
Diaporthe sp. isolate B134.317 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	<a href="#">Diaporthe sp.</a>	761	761	80%	0.0	93.55%	570	<a href="#">MG870443.1</a>

**Figura 13.** Resultados de la secuencia consenso ITS1 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del segundo hongo aislado AA-IVC3 (F): *Diaporthe* sp.

Sequences producing significant alignments										
Download Select columns Show 100										
select all 100 sequences selected										
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer										
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession		
Diaporthe sp. isolate H23 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Diaporthe sp.	948	948	100%	0.0	99.62%	575	MZ207909.1		
Diaporthe sp. RB-2018a strain CDA 730 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,...	Diaporthe sp. RB...	946	946	99%	0.0	99.81%	547	MG559538.1		
Diaporthe sp. CDA730 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal...	Diaporthe sp. CD...	946	946	99%	0.0	99.81%	547	KU743474.1		
Diaporthe sp. RB-2018a strain CDA 728 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,...	Diaporthe sp. RB...	944	944	99%	0.0	99.81%	548	MG559537.1		
Diaporthe sp. CDA728 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal...	Diaporthe sp. CD...	944	944	99%	0.0	99.81%	548	KU743473.1		
Diaporthe sp. isolate B21.452 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Diaporthe sp.	937	937	100%	0.0	99.23%	549	MG870461.1		
Diaporthe sp. isolate B54.454 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Diaporthe sp.	937	937	100%	0.0	99.23%	555	MG870463.1		
Diaporthe helianthi isolate ECU63 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Diaporthe helianthi	931	931	100%	0.0	99.04%	578	MF435111.1		
Diaporthe sp. isolate B131.453 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Diaporthe sp.	931	931	100%	0.0	99.04%	561	MG870462.1		
Diaporthe helianthi strain F97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	Diaporthe helianthi	931	931	100%	0.0	99.04%	578	KM979819.1		
Diaporthe helianthi isolate ECU68 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Diaporthe helianthi	931	931	100%	0.0	99.04%	575	MF435106.1		

**Figura 14.** Resultados de la secuencia consenso ITS4 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del segundo hongo aislado AA-IVC3 (F): *Diaporthe sp*

El tercer y último resultado de la secuencia ITS1 arrojó solamente el género *Colletotrichum sp. cepa JNTW12* con un query coverage de 100% y un porcentaje de identidad del 99.81 % y su número de acceso respectivo MT577044.1 y para la secuencia ITS4 arrojó *Colletotrichum kahawae* aislado XSD2 con query coverage de 98% con porcentaje de identidad de 98.2% y su respectivo número de acceso MW202334.1 (Tabla 12, Figura 15 y 16). Weir en 2012 menciona que algunos taxones con secuencias ITS muy similares incluyen *C. clidemiae*, *C. tropicale*, *C. siamense*; *C. fructicola* y algunos aislados de *C. siamense*; y *C. alienum*, *C. aenigma*, por los cuales se necesitan genes de proteínas específicas como un tipo de huella digital o código de barras para poder identificar y separar con éxito las diferentes especies, algunos genes utilizados previamente para hongos son: actina (ACT), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), beta-tubulina 2 (TUB2), secuencias parciales de la quitina sintasa 1 (CHS-1), calmodulina (CAL), histona H3 (HIS3), factor de alargamiento de traducción 1- $\alpha$  (TEF1),

tanto en especies de *Colletotrichum* como de *Diaporthe*.(Weir et al., 2012; Wang et al., 2016; Zhu et al., 2024).

**Tabla 12.** Resultados de la base de datos de NCBI BLAST de la muestra del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*.

Aislado	Región ITS	Hongo	Identidad	Número de acceso
PDA-IV C3o (B)	ITS1	<i>Colletotrichum sp. cepa JNTW12</i>	99.81 %	MT577044.1
	ITS4	<i>Colletotrichum kahawae aislado XSD2</i>	98.32%	MW202334.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Colletotrichum sp. strain JNTW12 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Colletotrichum sp.	948	948	100%	0.0	99.81%	549	MT577044.1
Colletotrichum sp. strain JNTW43 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Colletotrichum sp.	948	948	100%	0.0	99.81%	551	MT577041.1
Colletotrichum sp. strain JNTW11 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Colletotrichum sp.	948	948	100%	0.0	99.81%	552	MT577037.1
Colletotrichum sp. strain LWYF82 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Colletotrichum sp.	948	948	100%	0.0	99.81%	552	MT570092.1

**Figura 15.** Resultados de la secuencia consenso ITS1 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*.

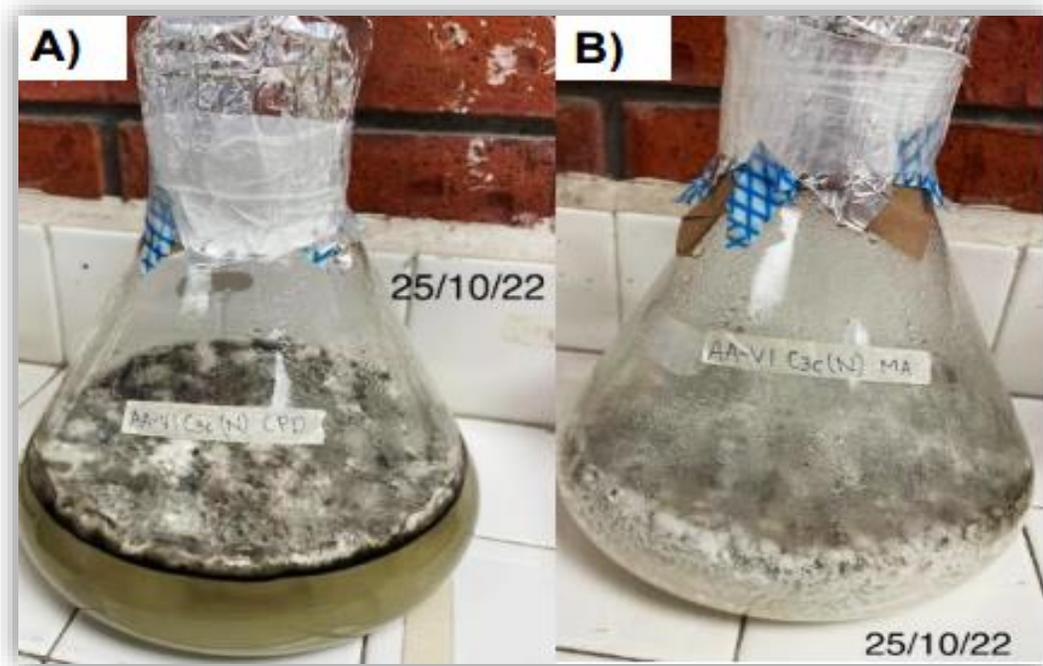
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate XSD2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Colletotrichum ka...	1038	1245	98%	0.0	98.32%	621	MW202334...
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides strain PHC 161753 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum gl...	1035	1691	98%	0.0	98.00%	1074	MH156758.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum fragariae strain BF51 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer_1_5.8...	Colletotrichum fr...	1027	1274	98%	0.0	97.67%	671	KC411911.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum siamense isolate CSSA 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Colletotrichum si...	1026	1411	97%	0.0	97.98%	1176	MW474103...
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides strain PHC 161739 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum gl...	1024	1534	98%	0.0	97.82%	859	MH156769.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides strain PHC 161774 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum gl...	1014	1627	98%	0.0	97.34%	1045	MH156760.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides isolate L7_BA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Colletotrichum gl...	1013	1265	95%	0.0	98.44%	599	KX098303.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides strain PHC 161768 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum gl...	1009	1625	99%	0.0	97.02%	1044	MH156753.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides isolate F3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Colletotrichum gl...	1007	1337	98%	0.0	97.17%	694	MK787242.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides strain PHC 161786 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Colletotrichum gl...	1007	1427	98%	0.0	97.17%	1010	MH156750.1

**Figura 16.** Resultados de la secuencia consenso ITS4 ingresada en la herramienta BLAST y su porcentaje de identidad, así como su número de acceso del tercer hongo aislado PDA-IV C3o (B): *Colletotrichum kahawae*.

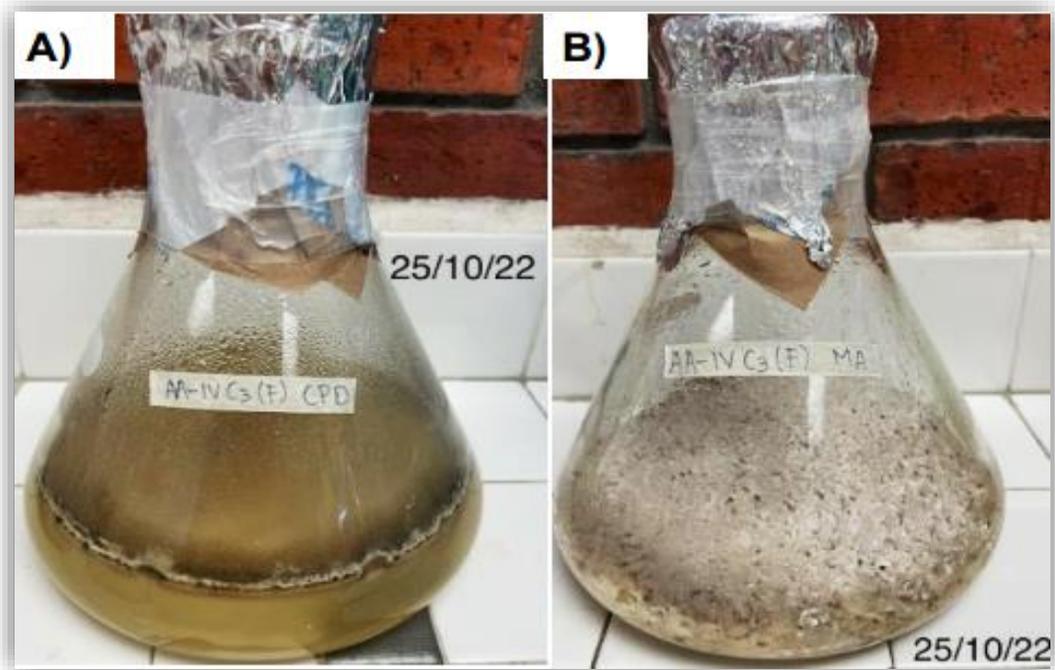
los tres hongos aislados

### 3. Cultivo en mediana escala de hongos endófitos

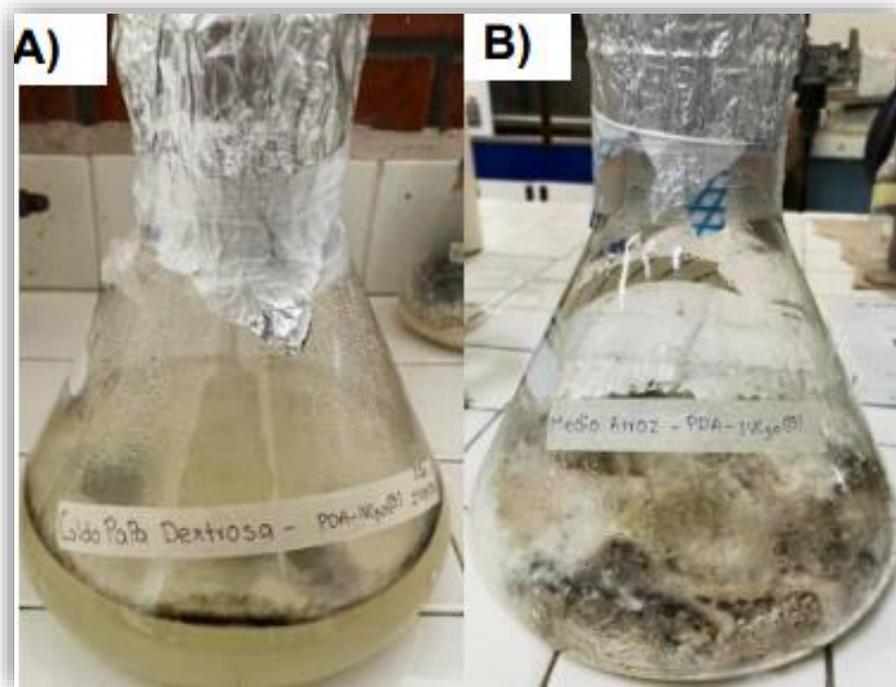
Los tres hongos endófitos aislados, se cultivaron en dos diferentes medios de crecimiento, caldo papa dextrosa y medio arroz bajo condiciones de incubación estáticas 6 semanas a temperatura ambiente con fotoperiodo luz oscuridad (12:12h). Se observa el crecimiento de los *Colletotrichum siamense*, *Diaporthe* sp. y *Colletotrichum kahawae*, en las Figuras 17, 18 y 19, respectivamente.



**Figura 17.** Cultivo en pequeña escala de *Colletotrichum siamense*, A) En medio CPD  
B) En medio MA, semana 3 de incubación.



**Figura 18.** Cultivo en pequeña escala de *Diaporthe* sp, A) En medio CPD B) En medio MA, semana 3 de incubación.



**Figura 19.** Cultivo en pequeña escala de *Colletotrichum kahawae*, A) En medio CPD B) En medio MA, semana 3 de incubación.

Se lograron aislar tres hongos endófitos de las hojas de *C. trifoliata*: el hongo endófito etiquetado como AA- VIC3c (N) y el etiquetado como PDA-IVC3o (B) se identificaron como los hongos endófitos *Colletotrichum siamense* y *C. kahawae*, de acuerdo con sus características similares entre ambos y lo reportado en la literatura. Qiao en 2021 menciona que el género *Colletotrichum* se caracteriza por colonias con margen completo, micelio aéreo de color gris medio a beige pálido en el centro, de gris claro a blanco grisáceo en el margen. Conidióforos cilíndricos, no ramificados o ramificados, rectos o flexuosos, septados, hialinos, ramificados. Células conidiógenas monofilídicas, subuladas, integradas, determinadas, terminales, hialinas. Conidias acrogénicas, oblongas, a veces ligeramente constreñidas en el medio, microgutuladas, hialinas, unicelulares, de paredes lisas. Sin embargo, no solo por las características morfológicas

es suficiente para identificar exitosamente las especies ya que estas están muy relacionadas filogenéticamente y se necesitan estudios en secuencias genómicas para separar filogenéticamente e identificar exitosamente cada especie. Weir y colaboradores en 2012 y Wang en 2016 mencionan que 22 especies entre ellas *C. gloeosporioides*, *kahawae subsp. kahawae*, *C. siamense*, *C. aenigma* entre otras forman parte del complejo de *Colletotrichum gloeosporioides* forma en conjunto un clado fuertemente sustentado en el Árbol genético ITS de *Colletotrichum*.

Las características macroscópicas y microscópicas para el hongo endófito AA-IV C3 (F) coinciden con lo reportado por Sessa y colaboradores en 2018, que reportan aislados de *Diaporthe* sp. Además, que se identificó molecularmente con un 94.59% como género *Diaporthe* sp. Este género a menudo ha sido reportado como importante patógeno de plantas, saprofitos y endófitos en una amplia gama de plantas hospedadoras, se reporta más como saprofito como en China que infectan a los árboles (Yang, et al., 2018).

#### 4. Obtención de extractos orgánicos

Los hongos se cultivaron en un medio líquido (CPD) y un medio sólido (MA). Del medio CPD se prepararon extractos de diferente polaridad tanto del caldo como del micelio, en el caso del MA se obtuvieron también extractos de diferente polaridad. De este procedimiento se obtuvieron un total de 18 extractos totales. En la Tabla 13 se puede apreciar la polaridad del extracto, de que hongo se obtuvo, medio de cultivo y su rendimiento en base a la cantidad usada de cada uno de los medios de crecimiento del hongo.

**Tabla 13.** Rendimiento de extractos totales obtenidos de los tres hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*.

Hongo	Cantidad inicial de medio	Extracto	Rendimiento (g)
<i>Colletotrichum siamense</i>	1 L de caldo papa Dextrosa	1.- AcOEt-CPD	2.3498
		2.- AcOEt- Micelio	0.2098
		3.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	0.6458
	300 gr de arroz	4.- Hexano	0.0844
		5.-CHCl <sub>3</sub> /MeOH- (FS↑)	1.2722
		6.-CHCl <sub>3</sub> /MeOH- (FI↓)	2.4334
<i>Diaporthe sp.</i>	1 L de caldo papa dextrosa	7.-AcOEt-CPD	0.1382
		8.-CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	0.4638
	300 gr de arroz	9.- Hexano	0.6171
		10.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH-(FS↑)	0.2189
		11.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH (FI↓)	4.9805
<i>Colletotrichum kahawae</i>	1 L de caldo papa dextrosa	12.- AcOEt-CPD	0.0267
		13.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	0.88
	300 gr de arroz	14.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH(FS↑)	7.69
		15.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH (FI↓)	2.6181
<b>CONTROL</b>	1L de caldo papa dextrosa	16.- AcOEt-CPD	0.0062
	1L 300 gr de arroz	17.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH (FS↑)	0.0846
		18.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH (FI↓)	1.2808

Los Extractos de CHCl<sub>3</sub>/MeOH del MA formaron dos fases y se optó por separarlas para optimizar el destilado del extracto. Fase superior (FS↑) y fase inferior (FI↓). El rendimiento de los 18 extractos crudos obtenidos de los tres hongos endófitos aislados fue en un rango de 0.0267 a 4.9805 g. El extracto 11 fue el extracto que se obtuvo con el mayor rendimiento el cual fue obtenido del MA extraído con CHCl<sub>3</sub>/MeOH del hongo *Diaporthe* sp. Mientras que el extracto 12 obtenido del CPD extraído con AcOEt del hongo *Colletotrichum kahawae* fue el que se obtuvo en menor rendimiento.

## 5. Actividad antibacteriana

Los 18 extractos obtenidos fueron evaluados contra seis aislados clínicos de bacterias resistentes, los resultados se muestran en la Tabla 14. Los resultados indican que dos extractos del hongo del género *Colletotrichum siamense*, mostraron una débil actividad antibacteriana (CMI de 200 µg/mL), estos extractos fueron el extracto 1 (AcOEt-CPD) y el extracto 5 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH- MA (FS↑)) que mostraron débil actividad contra cuatro y cinco cepas de bacterias resistentes, respectivamente. Mientras la cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos fue la bacteria más sensible a todos los extractos evaluados de este hongo (CMI 200 µg/mL). Por otro lado, todos los extractos del hongo del género *Diaporthe* sp., fueron también débilmente activos (CMI 200 µg/mL) contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Los extractos 10 y 11 obtenidos de la extracción con CHCl<sub>3</sub>/MeOH del MA tuvieron una CMI de 200 µg/mL en todas las cepas evaluadas a excepción de *S. aureus* resistente a meticilina y *E. faecium* resistente a vancomicina con una CMI >200 µg/mL. En el caso del hongo *Colletotrichum kahawae*, las bacterias *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *E. faecium* resistente a vancomicina fueron

las bacterias más sensibles para todos los extractos de este hongo teniendo una CMI de 200 µg/mL. Además, se puede observar que el extracto 13 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH-Micelio) y 14 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH-MA) fueron débilmente activos (CMI 200 µg/mL) contra cinco y cuatro bacterias resistentes de las seis bacterias resistentes ensayadas, de los resultados de este último hongo se destaca el extracto 11 (AcOEt-CPD) con una CMI de 100 µg/mL contra *E. faecium* resistente a vancomicina.

**Tabla 14.** Actividad antibacteriana (CMI µg/mL) de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*.

	Gram (+)		Gram (-)			
BACTERIA	SARM 19-2095 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	EFRV-10984 <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina	PARC- 13-1391 <i>Pseudomona aeruginosa</i> resistente a carbapenemicos	ECBLEE- 152624 <i>Escherichia coli</i> productora de BLEE	KPRC NMD+1 14-335 <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenemicos	ABRC- 12666 <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenemicos
EXTRACTO	<i>Colletotrichum siamense</i>					
1. AcOEt-CPD	>200	200	200	>200	200	>200
2.AcOEt-Micelio	>200	200	200	>200	>200	>200
3. CHCl <sub>3</sub> /MeOH-MA (FS↑)	>200	>200	200	>200	>200	200
4.- Hexano-Medio Arroz	>200	200	200	>200	200	200
5.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH-MA (FS↑)	>200	200	200	>200	200	200

6.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FI↓)	>200	>200	<b>200</b>	>200	<b>200</b>	>200
<i>Diaporthe sp</i>						
7.- AcOEt- CPD	>200	<b>200</b>	<b>200</b>	>200	<b>200</b>	>200
8: CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	>200	>200	<b>200</b>	>200	<b>200</b>	>200
9.- Hexano MA	>200	>200	<b>200</b>	>200	>200	<b>200</b>
10- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FS↑)	>200	>200	<b>200</b>	>200	<b>200</b>	<b>200</b>
11.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FI↓)	>200	>200	>200	>200	>200	<b>200</b>
<i>Colletotrichum kahawae</i>						
12.- AcOEt- CPD	>200	<b>100</b>	>200	>200	>200	>200
13.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	>200	<b>200</b>	>200	<b>200</b>	<b>200</b>	>200
14.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FS↑)	>200	<b>200</b>	<b>200</b>	>200	<b>200</b>	<b>200</b>
15.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FI↓)	>200	<b>200</b>	<b>200</b>	>200	>200	>200
16.- AcOEt- CPD CONTROL	>200	>200	>200	>200	>200	>200
17.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FS↑) CONTROL	>200	>200	>200	>200	>200	>200
18.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FI↓) CONTROL	>200	>200	>200	>200	>200	>200

DMSO	>200	>200	> 200	>200	>200	>200
Levofloxacino	6.25	50	0.78	12.25	50	6.25

Los resultados obtenidos de una CMI de 200 µg/mL de los 18 extractos evaluados contra las 6 cepas bacterianas resistentes se pueden comparar con estudios previamente realizados: tal es el caso de Méndez-López que en 2020 obtuvo extractos del tallo de *C. trifoliata* y evaluados contra 15 diferentes cepas bacterianas incluyendo sensibles y MDR con una CMI de ≥500 µg/mL, podemos decir que nuestros resultados son favorables al obtener una CMI menor y al tratarse de extractos totales. Aunque se obtuvieron con un valor de CMI de 200 µg/mL, podemos destacar otros estudios como el realizado por Nocado-Mena en 2020 a partir del extracto CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1 obtenido de las hojas de *C. trifoliata* aisló un ácido graso el cual mostro una CMI de 100 µg/mL contra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Podemos observar que el compuesto aislado del extracto obtuvo una CMI menos favorable para su posterior investigación. Se destaca del mismo género el trabajo realizado por Singh en 2021 que a partir de *C. quadrangularis* aisló el hongo *Fusarium proliferatum* y su extracto de AcOEt obtenido mostró una CMI 70 µg/mL contra *S. aureus* sensible, observando que el género *Cissus* es una fuente potencial de extractos o compuestos con actividad antibacteriana sobresaliente. Arivudainambi y colaboradores en 2011 evaluaron extractos del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* contra cepas farmacorresistentes de *S. aureus*, en donde obtuvieron dos resultados diferentes: una CMI de 31.25 µg/mL contra una cepa resistente a penicilina, vancomicina y metilicina, y para las cepas sensibles a vancomicina y resistentes a metilicina y penicilina una CMI de 250 µg/mL.

En 2021 Dhakshinamoorthy y colaboradores realizo la evaluación del extracto del hongo endófito *Diaporthe caatingaensis* contra 6 diferentes cepas MTCC, reportando una CMI de 12.5 µg/mL para *S. aureus*, *E. coli* y *L. lactis* y 25 µg/mL para *K. planticola*.

Cabe mencionar que los extractos evaluados con las seis bacterias farmacorresistentes mostraron cierta actividad con valores de CMI promedio de 200 µg/mL. Estos resultados coinciden con los autores anteriormente mencionados y como resultados favorables ya que se tiene como antecedente que el género *Colletotrichum* y el género *Diaporthe* son fuente potencial para la obtención de compuestos antibacterianos.

## 6. Actividad antimicobacteriana

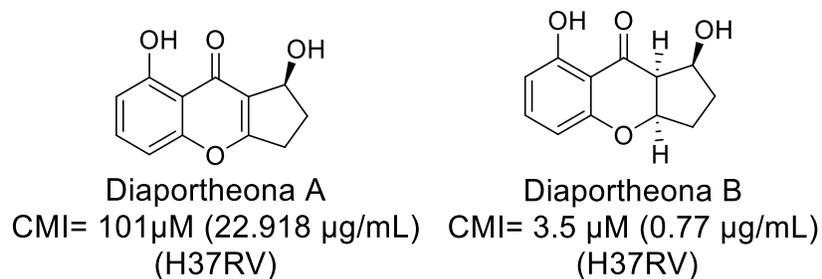
En la Tabla 15 se observan los resultados de la evaluación de los extractos obtenidos de los tres hongos contra dos cepas de *M. tuberculosis* la cepa sensible H37Rv y la cepa multirresistente G117. Los resultados indican que el extracto 7 (AcOEt- CPD) del hongo *Diaporthe* sp presento una CMI de 50 µg/mL, en dos ensayos independientes. Por lo que se decidió preparar el extracto 7 a mayor escala usando las mismas condiciones que los cultivos a mediana escala.

**Tabla 15.** Actividad antimicobacteriana *in vitro* (CMI µg/mL) de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*.

	Hongo	Cepa H37RV	Cepa G117
Extracto		CMI	CMI
1.- AcOEt- CPD		>50	>50
2.- AcOEt- Micelio		> 50	>50

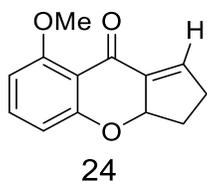
3.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	<i>Colletotrichum siamense</i>	> 50	>50
4.- Hexano-MA		> 50	> 50
5.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FS↑)		> 50	>50
6.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FI↓)		> 50	> 50
<b>7.- AcOEt- CPD</b>	<i>Diaporthe sp</i>	<b>50</b>	> 50
8.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio		> 50	> 50
9.- Hexano-MA		>50	>50
10.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FS↑)		> 50	>50
11.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FI↓)		> 50	> 50
12.- AcOEt-CPD	<i>Colletotrichum kahawae</i>	> 50	> 50
13.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio		no se disolvió (ni calentando)	no se disolvió (ni calentando)
14.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FS↑)		> 50	> 50
15.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FI↓)		> 50	>50
Rifampicina		0.0625	2.5
Isoniazida		<0.3125	>10
Etambutol		3.125	3.125
Levofloxacino		0.25	5.0

Bungihan y colaboradores en el 2011, reportaron dos benzopirranonas: Diaportheona A y B aisladas de *Diaporthe sp.* Este hongo se obtuvo de las hojas de *Pandanus amaryllifolius*. Los compuestos se evaluaron contra la cepa sensible *M. tuberculosis* H37Rv y obtuvieron una CMI de 101  $\mu$ M (22.918  $\mu$ g/mL) y 3.5  $\mu$ M (0.77  $\mu$ g/mL), respectivamente (Figura 20).



**Figura 20.** Estructura de Diaportheona A y B con su respectiva CMI para *M. tuberculosis*.

Swaroop y colaboradores en el 2012, realizaron un estudio con Diaportheona B, realizaron por primera vez la síntesis y la obtención de la configuración absoluta. En este estudio se modificó la molécula original, Diaportheona B, sus isómeros y análogos sintetizados se evaluaron para determinar su actividad antimicobacteriana en la cepa H37Rv. Los resultados indicaron, que el isómero natural (+), su enantiómero (-) mostraron una actividad muy similar (10–12.5  $\mu$ g/mL). De todos los análogos probados, el análogo metoxi 24 mostró una actividad superior (6.25  $\mu$ g/mL) en comparación con la Diaportheona B (Figura 21).



**Figura 21.** Estructura del análogo metoxi 24 de Diaportheona B

Los resultados obtenidos. son favorecedores para decir que el extracto obtenido de *Diaporthe* sp es fuente potencial de compuestos antimicobacterianos.

## 7. Actividad citotóxica

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular de los extractos obtenidos de los tres hongos contra cinco líneas celulares cancerígenas y una línea celular normal por 48 horas, a una concentración de 50 µg/mL. Los resultados de la Tabla 13 muestran el promedio de cada concentración por triplicado y fueron obtenidos de tres experimentos independientes. Se utilizó el DMSO como control negativo y como control positivo se usó podofilotoxina. Cabe mencionar que se observó que varios extractos tienen valores de viabilidad celular por arriba del 100%, lo que indica que el extracto estimula el crecimiento de la línea celular comparado con el control sin tratar. Sin embargo, también puede deberse a un fenómeno llamado hormesis en el cual bajo estímulos de estrés la célula puede proliferar más de lo normal esto ya que está en los límites de la plasticidad biológica para criterios biológicos integradores como la proliferación celular (Calabrese, *et al.*, 2023). Los resultados de la Tabla 16 indican que el extracto 1 (AcOEt- CPD) de *Colletotrichum siamense* (AA-VI C3c (N) mostró 64.82 % de viabilidad celular contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a 50 µg/mL, mientras que la línea celular normal mostro una viabilidad celular de 103.5%, indicando cierto grado de selectividad para la célula cancerígena. Mientras que el extracto 9 (Hexano-MA) del hongo del género *Diaporthe* sp., (2 AA-IV C3 (F)) tuvo un 53.28% de viabilidad celular en la línea de carcinoma de pulmón SKLU-1, mientras que la viabilidad en las células normales fue de 92.79 %, indicando cierto grado de selectividad.

**Tabla 16.** Porcentaje (%) de viabilidad celular de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata* evaluados a 50 µg/mL.

Extracto	PC-3	MCF-7	U251	HCT-15	SKLU-1	HaCaT
<i>Colletotrichum siamense</i>						
1.- AcOEt- CPD	90.01±2.03	<b>64.82±5.62</b>	71.35±8.64	94.26±4.34	86.19±8.31	<b>103.5±8.79</b>
2.-AcOEt- Micelio	83.96±4.82	65.62±2.16	76.06±8.54	104.44±2.1	92.13±5.63	83.92±5.15
3.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	78.58±8.28	52.33±8.05	75.94±3.84	90.97±5.33	76.13±8.24	70.75±1.91
4.- Hexano- MA	91.08±9.32	61.57±0.86	82.25±6.27	91.56±6.79	82.00±5.75	67.03±2.20
5.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FS↑)	115.19±9.6	113.07±2.38	104.36±7.67	97.22±7.86	75.50±5.82	119.09±9.44
6.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FI↓)	104.97±7.8	110.56±5.38	104.24±2.00	91.57±6.00	70.21±2.82	88.37±11.29
<i>Diaporthe sp</i>						
7.- AcOEt- CPD	72.59±15.6	55.88±17.1	71.10±9.6	87.16±14.0	111.24±17.9	59.69±8.4
8.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	80.46±3.5	93.78±14.0	91.90±10.7	106.32±14.3	81.28±12.2	52.46±2.63
9.- Hexano- MA	83.75±4.19	102.29±8.55	89.66±9.46	96.45±6.80	<b>53.28±4.78</b>	<b>92.79±0.21</b>
10.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FS↑)	112.32±10.9	92.71±4.06	99.81±8.0	105.41±0.83	78.42±4.68	82.15±5.68
11.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- MA (FI↓)	105.72±6.15	110.49±4.09	102.75±10.3	128.15±6.24	92.50±1.45	93.37±6.04
<i>Colletotrichum kahawae.</i>						
12.- AcOEt- CPD	69.17±4.18	84.09±0.91	71.21±0.84	81.20±3.7	84.18±8.77	68.71±4.21
13.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Micelio	82.82±9.69	114.44±2.07	93.61±3.3	75.90±6.1	94.03±3.15	57.98±1.98
14.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FS↑)	77.51±15.3	125.74±5.7	93.26±0.13	88.66±7.29	129.94±10.3	67.01±14.8
15.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FI↓)	77.98±7.25	107.32±6.33	97.14±3.23	82.72±7.96	113.57±12.3	79.88±5.62
16.- AcOEt- CPD CONTROL	78.63±5.35	112.96±12.3	82.99±2.29	87.54±15.2	92.65±12.8	84.86±3.31
17.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH- Medio Arroz (FS↑) CONTROL	87.96±3.20	110.30±9.63	78.57±1.77	86.33±14.0	112.52±6.39	84.36±1.5

18.- CHCl <sub>3</sub> /MeOH-Medio Arroz (FI.)	93.91±14.3	106.43±4.75	112.62±0.15	105.97±12.2	117.60±8.4	109.03±0.39
<b>CONTROL</b>						
<b>DMSO</b>	100.66 ± 2.42	9.48±2.38	98.41±3.18	95.50±2.06	99.59±7.53	95.71±3.26

**IC<sub>50</sub> de estándar positivo para las líneas cancerígenas**

<b>Etopósido</b>	4.88 µg/mL	31 µg/mL	1 µg/mL	2.79 µg/mL	29.59 µg/mL	33.94 µg/mL
------------------	------------	----------	---------	------------	-------------	-------------

PC-3: células de cáncer de próstata, MCF-7: células de cáncer de mama, U251: células de glioblastoma, HCT-15: células de cáncer colorrectal, SKLU-1: células de cáncer de pulmón. HaCaT: Células epiteliales humanas normales. FI (Fase superior formada del extracto), FS (Fase superior formada del extracto)

Méndez-López et al., 2020 reportó que los extractos de hexano y acuoso de las ramas de *C. trifoliata* tuvieron una alta actividad anticancerígena *in vitro* (IC<sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL) en contra células de hepatocarcinoma (Hep3B, HepG2) y cáncer de mama (MCF7). En contraste los extractos obtenidos de los hongos endófitos no se observó ninguna actividad relevante en MCF7.

Rai en 2023 reportó que el extracto de acetato de etilo de *C. gloeosporioides* mostró actividad citotóxica contra las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MCF-7 con IC<sub>50</sub> de 62.09 and 270.70 µg/mL, pero no contra las células no cancerosas HEK293T. Lin y colaboradores en 2005, lograron aislar el hongo *Diaporthe* sp. de las hojas de *Kandelia candel* y obtuvieron un nuevo compuesto llamado Diaporthelactona (Figura 22), que mostró actividad citotóxica contra 2 líneas celulares: la KB (formadora de células tumorales de la línea HeLa) y Raji (Linfoma de Burkitt humano) con IC<sub>50</sub> de 6.25 y 5.51 µg/mL, respectivamente.



**Figura 22.** Estructura de Diaporthelactona reportada por Rai en 2023.

Ambos géneros de hongos aislados *Colletotrichum* sp. y *Diaporthe* sp., se han encontrado compuestos con actividad anticancerígena, lo cual da un precedente a los resultados favorables que se obtuvieron anteriormente descritos en sus extractos.

## 8. Análisis del extracto AcOEt-CPD de *Diaporthe* sp. por columna cromatográfica

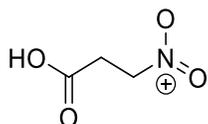
Se analizó 596.4 mg del extracto de AcOEt de CPD del hongo endófito *Diaporthe* sp mediante una columna cromatográfica, como fase estacionaria se utilizó 12 g de gel de sílice, como fase móvil un gradiente de hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol. Se empleó una relación 1:20 de la fase estacionaria, utilizando 0.6 g de del de sílice para adsorber la muestra, con un volumen muerto de 20 mL y un volumen de 5 mL de las fracciones colectadas, se colectaron un total de 620 fracciones, los resultados se resumen en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Fraccionamiento del extracto de AcOEt (CPD) del hongo *Diaporthe* sp.

Fracciones reunidas	Polaridad de la FM en CC	Polaridad de la FM en TLC	Rendimiento mg	Observaciones
1-30 31-47	Hexano 100% Hexano: AcOEt 95: 5	Hexano 100% Hexano: AcOEt 95:5	31.4	Oleoso verde
48-55	Hexano: AcOEt 95:5	Hexano: AcOEt 95:5	2.9	Solido blanco-amarillento
56-77 78-130	Hexano: AcOEt 95:5 Hexano: AcOEt 90:10 Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 95:5 Hexano: AcOEt 90:10 Hexano: AcOEt 85:15	19.4	Oleoso color amarillento oscuro
<b>131-135</b>	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Cristales</b> 25.9	Cristales marrón solubles en cloroformo
<b>136-140</b>	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Cristales</b> 18.7	Cristales blancos solubles en cloroformo
<b>141-145</b>	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Cristales</b> 28.3	Cristales blanco-amarillentos solubles en cloroformo
<b>146-150</b>	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Cristales</b> 26.2	Cristales blancos solubles en cloroformo
<b>151-160</b>	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Cristales</b> 32.5	Cristales blanco-amarillentos solubles en cloroformo
<b>161-163</b>	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Cristales</b> 4	cristales blancos solubles en cloroformo
164-168 169-170	Hexano: AcOEt 85:15	Hexano: AcOEt 85:15	<b>Solido</b> 4 NO SE OBSERVAN BAJO LUZ UV	Solido blanquecino
171-190	Hexano: AcOEt 80:20	Hexano: AcOEt 80:20	<b>Solido</b> 30.6	Solido amarillento
191-221 222-256 257-270	Hexano: AcOEt 80:20	Hexano: AcOEt 80:20	15.5	Aspecto oleoso color marrón
271-290 291-320 321-346	Hexano: AcOEt 75:25	Hexano: AcOEt 75:25	6	Aspecto oleoso amarillo- oscuro
347-360 361-390 391-430	Hexano: AcOEt 70:30	Hexano: AcOEt 60:40	26.7	Cristales marrones, forma de pluma
431-464	Hexano: AcOEt 65:35 Hexano: AcOEt 60:40	Hexano: AcOEt 60:40	4.5	Sólido color marrón
465-470	Hexano: AcOEt 60:40	Hexano: AcOEt 40:60	7.3	Sólido color marrón
471-487	Hexano: AcOEt 60:40	Hexano: AcOEt 50:50	7.1	Láminas color marrón, aspecto oleoso
488-502	Hexano: AcOEt 50:50	Hexano: AcOEt 50:50	10.2	Láminas color amarillo blanquecino
503-560	Hexano: AcOEt 50:50	Hexano: AcOEt 50:50	4.5	Aspecto oleoso amarillo- marrón
561-600	Hexano: AcOEt 40:60	Hexano: AcOEt 40:60	4.5	Aspecto oleoso amarillo- marrón
601-620	Hexano: AcOEt 30:70	Hexano: AcOEt 30:70	9.7	Aspecto oleoso marrón
601-620	AcOEt 100% AcOEt: MeOH 80:20	Hexano: AcOEt 10:90 AcOEt: MeOH 80:20	19.4	Aspecto oleoso color marrón
601-620	AcOEt: MeOH 50:50 MeOH 100%	AcOEt: MeOH 50:50 MeOH 100%	33.3	Aspecto oleoso marrón oscuro

Los resultados que se muestran en la Tabla 17 indican la presencia de varios cristales y sólidos. Los cristales obtenidos de las fracciones 131-163 son un solo compuesto, por lo que se decidió analizar los cristales más puros que se encontraban en la fracción 146-150, estos cristales se etiquetaron como D (*Diaporthe*) y el número de fracción 146-150 (D146-150). Estos cristales se mandaron a analizar para obtener sus espectros de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas y de estos cristales se determinó su estructura como se discute más adelante. De las fracciones 164-190 se obtuvo un sólido blanquecino, pero resultó una mezcla de compuestos por análisis de TLC, lo mismo que los sólidos de las fracciones 271-430. Por lo que en otro estudio se obtendrá más cantidad de extracto para lograr purificar estos compuestos y determinar sus estructuras químicas.

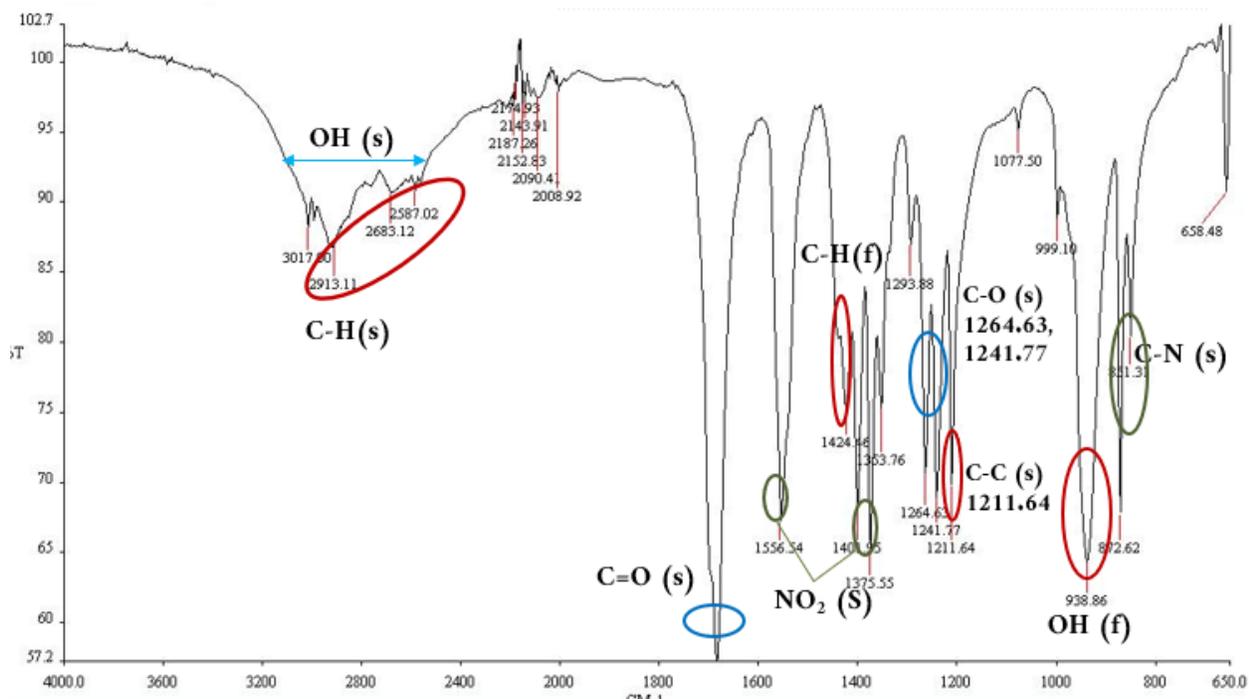
Los cristales puros obtenidos de la fracción 146-150 (D 146-150) se obtuvieron en una cantidad de 6.3 mg, tienen aspecto de cristales transparentes en forma de agujas, solubles en cloroformo y punto de fusión de 65-68 °C. Estos cristales se identificaron como el ácido 3-nitropropionico (Figura 23) de acuerdo con el análisis de sus espectros de IR, RMN y EM que se muestran a continuación.



**Figura 23.** Estructura del ácido 3-nitropropionico.

## 9. Análisis por Infrarrojo del compuesto D146-150 (ácido 3-nitropropionico)

En la Figura 24 se observa el espectro de Infrarrojo de los cristales obtenidos de la fracción D146-150, en la cual se observan las bandas características del ácido

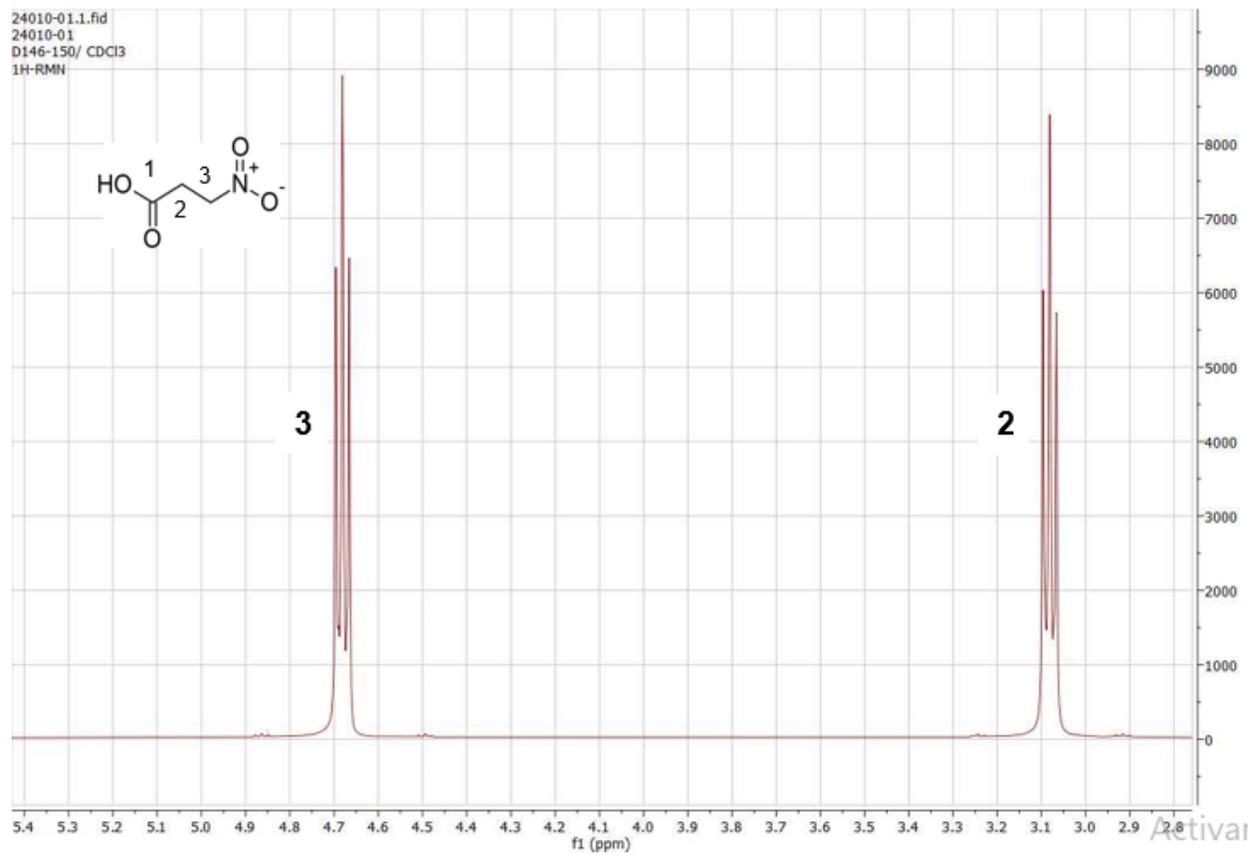


carboxílico como son el OH de estiramiento que abarca de  $3200-2400\text{ cm}^{-1}$ , el C=O de estiramiento que se observa aproximadamente a  $1680\text{ cm}^{-1}$ , C-O de estiramiento con dos bandas a  $1264.63\text{ cm}^{-1}$  y  $1241.7\text{ cm}^{-1}$  y el O-H de deformación en  $938\text{ cm}^{-1}$ . Por otro lado, se observan las dos bandas características del grupo  $\text{NO}_2$  las bandas de estiramiento en  $1556.54$  y  $1375.55\text{ cm}^{-1}$ , así como la banda de C-N de estiramiento de C-N en  $851.31\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, se observan bandas de C-H ( $\text{Sp}^3$ ) de estiramiento y de deformación en  $2913.11$ ,  $2683.12$  y  $2587.02\text{ cm}^{-1}$  y  $1424\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, además de C-C de estiramiento a  $121.64\text{ cm}^{-1}$ .

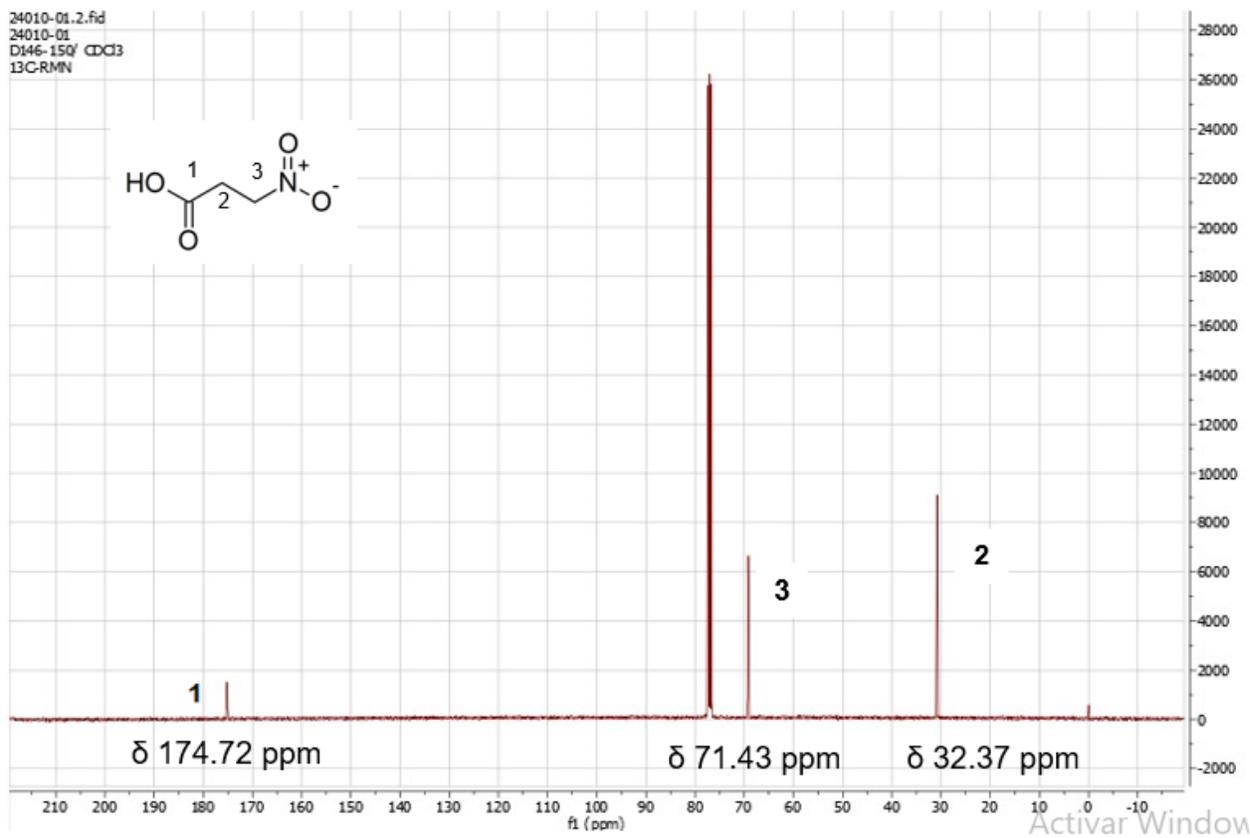
**Figura 24.** Espectro de infrarrojo de D-146-150: ácido 3-nitropropionico.

## 10. Análisis de Resonancia Magnética Nuclear de D146-150 (ácido 3-nitropropionico)

En las Figuras 25 y 26, se observan los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , respectivamente, destacando que en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  presenta dos tripletes en  $\delta$  3.08 ppm ( $J = 5.73$  Hz) y  $\delta$  4.67 ppm ( $J = 6.4$ Hz), de dos metilenos unidos cada uno a dos grupos desprotectores, uno corresponde al ácido carboxílico y el otro al grupo nitro. Mientras que en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se presentan dos carbonos de metileno en  $\delta$  71.43 ppm y 32.37 ppm, que corresponden al carbono C2 (vecino al grupo nitro) y C3 (vecino al grupo carbonilo), respectivamente, y un grupo carbonilo de ácido carboxílico (C1) en  $\delta$  174.72 ppm. Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente reportados por Gustine et al., 1974.



**Figura 25.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de D146-150: ácido 3-nitropropionico.

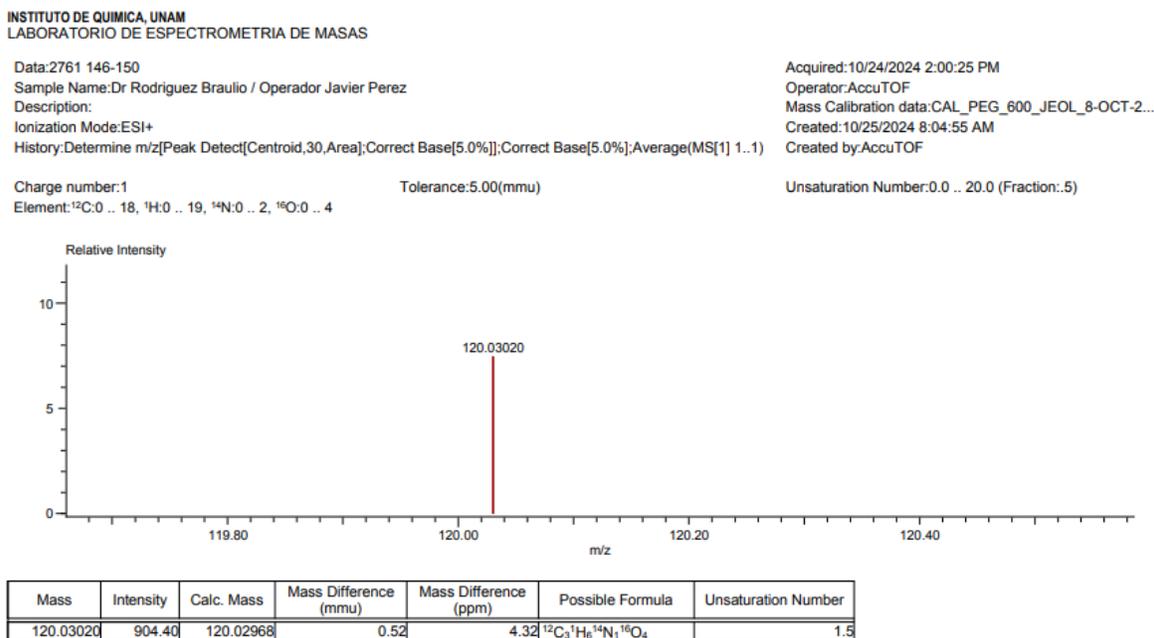


**Figura 26.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de D146-150: ácido 3-nitropropionico

## 11. Análisis de Espectrometría de Masas de D146-150:

### (ácido 3-nitropropionico)

En la figura 27 se muestra el espectro de masas de alta resolución (HRMS) del compuesto etiquetado como D-146-150, el cual se observa un pico único de relación m/z de 120.03020 (M + 1), esto comparando con 119.08 g/mol calculado por PubChem 2.2 (versión de PubChem 2021.10.14)



**Figura 27.** Espectro de masas de alta resolución de D146-150: ácido 3-nitropropionico

Esta molécula con el nombre de ácido 3-nitropropionico también conocida como ácido  $\beta$ -nitropropionico fue reportada del hongo endófito *Diaporthe citri* G-01 (Genbank: KJ934221.1), previamente aislado de hojas de la planta medicinal *Mikania glomerata* Spreng. (Asteráceas) (ver Polonio y colaboradores en 2016). Se incubó el hongo en medio de caldo papa dextrosa y después del tiempo de incubación se realizó una extracción líquida: líquido con acetato de etilo y se obtuvo el extracto, esto coincide con la metodología empleada para la obtención de extracto de AcOEt-CPD del género *Diaporthe* sp. aislado de las hojas de *Cissus trifoliata*. Polonio et al., 2016 concluyeron que la concentración de ácido 3-nitropropionico (3-NPA) aumentó después del consumo inicial de azúcares reductores, lo que indica que el compuesto se produce después de la fase de producción de alta energía del hongo, este estudio demuestra la producción de este compuesto por plantas y hongos endófitos, lo que indica que el ácido 3-nitropropionico puede estar involucrado en los sistemas de defensa y nutrición de endófitos y plantas hospedantes, y también podría participar en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Nagarajan y colaboradores en 2021 recopila compuestos activos y menciona al ácido 3-nitropropionico por su actividad contra las larvas de *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar).

En el caso de la molécula etiquetada como D-146-150 obtenida del extracto de AcOEt-CPD del hongo *Diaporthe* sp., identificada posteriormente como ácido 3-nitropropionico se determinó su actividad antimicobacteriana, obteniendo una CMI de 50  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa H37Rv y CMI de  $>50$   $\mu\text{g/mL}$  para la cepa G117. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Ganihigama y colaboradores en 2014, evaluaron la molécula ácida 3-nitropropionico obteniendo una CMI de 12.5 y 50.0  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa H37Rv y la cepa

H37Ra respectivamente. Songsiriritthigul y colaboradores en el 2021 evaluaron el ácido 3-nitropropionico para conocer el mecanismo por el cual inhibe el crecimiento de la micobacteria. Estos investigadores demostraron que la proteína transportadora 2-trans-enoil-acil reductasa (InhA) se inhibe a un valor de IC<sub>50</sub> de 71 μM (8.45 μg/mL). El complejo contiene el bucle de unión al sustrato InhA en una conformación abierta y ordenada con Tyr158. Este es un residuo catalíticamente importante cuya orientación define diferentes conformaciones del complejo sustrato/inhibidor de InhA, en la posición "fuera". La molécula ocupa un sitio de unión hidrófobo adyacente al cofactor NAD<sup>+</sup> y cercano al utilizado por el difeniléter triclosán, pero se une predominantemente a través de interacciones de enlaces de hidrógeno electrostáticas y mediadas por agua con la columna vertebral de la proteína y el cofactor NAD<sup>+</sup>.

La exposición humana al ácido 3-nitropropionico aparentemente se ha producido durante siglos a partir de nueces de árbol en Nueva Zelanda, donde las tribus maoríes las consumían como alimento básico, y de los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* utilizados en la producción de alimentos básicos orientales, incluido el miso (pasta de soja fermentada) y katsuobushi (atún seco fermentado). Se han reportado envenenamientos accidentales por la exposición con ácido 3-nitropropionico con nueces de karaka sin procesar y caña de azúcar enmohecida en China (Burdock, et al., 2001)

El ácido 3-nitropropionico es una toxina fúngica que altera la actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) de las mitocondrias actuando como un inhibidor reversible de la fumarasa y la aspartasa y un inhibidor irreversible, no competitivo ("suicida") de la deshidrogenasa del ácido succínico, además reduce la síntesis de ATP, lo que lleva a una producción excesiva de radicales libres que resulta en la degeneración de las

neuronas espinosas medias (MSN) GABAérgicas en el cuerpo estriado. Esto se caracteriza por alteraciones motoras, una manifestación clínica clave de la enfermedad de Huntington. El ácido 3-nitropropionico tiene el potencial de alterar varios procesos celulares, incluidas las funciones mitocondriales, el estrés oxidativo, la apoptosis y la neuroinflamación que imitan condiciones patógenas similares a las de la EH (enfermedad de Huntington) en animales. (Upadhyay, et al., 2023)

Hay reportes de pacientes con casos leves de intoxicación por el ácido 3-nitropropionico los cuales presentan vómito, sienten náuseas y agotamiento, y tienen diarrea, dolor de estómago y dolor de cabeza, y la mayoría se recupera después de unos días, los casos graves tienen más síntomas graves, que generalmente desarrollan distonía y coma (Skogvold et al., 2021)

El ácido 3-nitropropionico tiene potencial de uso en modelo animal al ser no genético es más fácil de manejar, adquirir y controlar, todo esto para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para la enfermedad de Huntington debido a su neurotoxicidad, alterando el metabolismo mitocondrial. La toxicidad del 3-NPA afecta a la microglía, los astrocitos y las neuronas, y causa excitotoxicidad secundaria al hacer que las neuronas sean más vulnerables a los niveles basales endógenos de glutamato, al tiempo que provoca una reducción de la disponibilidad de ATP. Este escenario provoca el alivio del bloqueo de  $Mg^{2+}$  dependiente del voltaje en el poro del NMDA-R (receptor de N-metil-D-aspartato). A su vez, la activación de estos receptores conduce a la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  al citoplasma y a una mayor activación de varias enzimas dependientes del calcio, incluidas las calpaínas. En conjunto, estos eventos conducen a la muerte celular por diferentes vías: necrosis y/o apoptosis, dependiendo de la intensidad del daño y el tipo

de célula (Túnez, et al 2010). Las líneas de investigación en base a este modelo pueden ser: su interacción con biomoléculas para producir proteínas oxidadas o nitradas aberrantes, así como las posibles acciones protectoras de diferentes antioxidantes. Su uso en modelos transgénicos, explorando la señalización transcripcional y transducciones asociada con su toxicidad inducida, o la caracterización de su patrón de expresión de genes y proteínas a través de estudios genómicos y proteómicos. También se observan alteraciones de comportamiento evocadas por ácido 3-nitropropionico, y su uso con otros modelos para tener un modelo más complejo y preciso para la enfermedad de Huntington (Túnez, et al., 2010; Upadhayay et al., 2023).

## 6. CONCLUSIONES

- Se realizó el primer estudio de hongos endófitos de las hojas de *C. trifoliata* con potencial actividad antibacteriana y citotóxica.
- De las hojas frescas de *C. trifoliata* se lograron aislar dos especies de hongos del género *Colletotrichum*: *Colletotrichum siamense* y *Colletotrichum kahawae* y un hongo del género *Diaporthe* sp., identificadas de acuerdo con sus características macroscópicas, microscópicas y su secuencia genómica.
- El rendimiento de los 18 extractos totales obtenidos de los tres hongos endófitos aislados fue en un rango de 0.0267 a 4.9805 g. El extracto 12 obtenido del CPD extraído con AcOEt del hongo *Colletotrichum kahawae* (B) fue el que se obtuvo en menor rendimiento (0.0267 g) y el extracto 11 obtenido del Medio Arroz extraído con CHCl<sub>3</sub>/MeOH del hongo *Diaporthe* sp. fue el extracto que se obtuvo con el mayor rendimiento (4.9805 g).
- *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos fue la bacteria que mostró mayor sensibilidad a todos los extractos evaluados con una CMI de 200 µg/mL. El extracto 11 (AcOEt-CPD) obtenido del hongo *Colletotrichum kahawae* presento, una CMI de 100 µg/mL contra *E. faecium* resistente a vancomicina. El extracto 5 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH- MA (FS↑)) obtenido del hongo *Colletotrichum siamense* fue el que mostró mayor espectro antibacteriano contra las 6 cepas farmacorresistentes con una CMI de 200 µg/mL, a excepción de *S. aureus* resistente a meticilina que mostro una CMI >200 µg/mL.

- El extracto 7 (CPD-AcOEt) obtenido del hongo *Diaporthe* sp. fue el único extracto que mostro actividad contra *M. tuberculosis* teniendo una CMI de 50 µg/mL contra la cepa H37Rv.
- El extracto 1 (AcOEt- CPD) obtenido de *Colletotrichum siamense* mostró 64.82 % de viabilidad celular contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a 50 µg/mL, mientras que en la línea celular normal mostro una viabilidad celular de 103.5%. El extracto 9 (Hexano-MA) obtenido del hongo del género *Diaporthe* sp., tuvo un 53.28% de viabilidad celular en la línea de carcinoma de pulmón SKLU-1, mientras que la viabilidad en las células normales fue de 92.79 %.
- Se aisló y caracterizo estructuralmente el compuesto ácido 3-nitropropionico del extracto de AcOEt de CPD del hongo del género *Diaporthe* sp.
- El ácido 3-nitropropionico obtenido del extracto AcOEt de CPD del hongo del género *Diaporthe* sp., mostró una CMI de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv.
- La hipótesis se acepta ya que se logró aislar un metabolito secundario del hongo endófito *Diaporthe* sp. que mostró débil actividad antimicobacteriana, por lo que es probable que existe en el extracto otros metabolitos secundarios más activos que no se lograron aislar y caracterizar estructuralmente debido a que se obtuvo una cantidad pequeña de extracto.

## 7. PERSPECTIVAS

- Evaluar los extractos obtenidos a concentraciones mayores a 200 µg/mL contra las 6 cepas bacterianas resistentes y sensibles, por el método de microdilución.
- Evaluar otras células cancerígenas como las células hepáticas y de riñón para dar una perspectiva más amplia del potencial de los extractos obtenidos.
- De los sólidos obtenidos se tiene poca cantidad y están impuros por lo cual se puede optar por tratar de purificar por medio de HPLC y poder caracterizar los compuestos aislados.
- Identificar la especie del hongo aislado del género *Diaporthe* sp.

## 8. REFERENCIAS

1. Aamir, M., Rai, K. K., Zehra, A., Kumar, S., Yadav, M., Shukla, V., & Upadhyay, R. S. (2020). Fungal endophytes: Classification, diversity, ecological role, and their relevance in sustainable agriculture. En *Elsevier eBooks* (pp. 291-323). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818734-0.00012-7>
2. Aghamohammad, S., & Rohani, M. (2022). Antibiotic resistance and the alternatives to conventional antibiotics: The role of probiotics and microbiota in combating antimicrobial resistance. *Microbiological Research*, 267, 127275. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127275>
3. Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>
4. Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2013). Fungal endophytes - secret producers of bioactive plant metabolites. *Die Pharmazie*, 68(7), 499–505
5. Alzoreky, N., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 223-230. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00169-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00169-1)
6. Arivudainambi, U. E., Anand, T. D., Shanmugaiah, V., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2011). Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61(3), 340-345. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2011.00780.x>

7. Assob, J. C., Kamga, H. L., Nsagha, D. S., Njunda, A. L., Nde, P. F., Asongalem, E. A., Njouendou, A. J., Sandjon, B., & Penlap, V. B. (2011). Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-70>
8. Bamisile, B. S., Dash, C. K., Akutse, K. S., Keppanan, R., & Wang, L. (2018). Fungal endophytes: Beyond herbivore management. *Frontiers In Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544>
9. Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2021). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology: An International Journal On Fungal Biology*, 13(1), 39-55. <https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>
10. Barrales-Cureño, H., & de la Rosa Montoya, R. (2014). Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol. *Biotecnología Vegetal*, 14(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/23/423>
11. Basu, A., Saito, K., Meyer, K., Ray, R. B., Friedman, S. L., Chang, Y. H., & Ray, R. (2006). Stellate cell apoptosis by a soluble mediator from immortalized human hepatocytes. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 11(8), 1391–1400. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-8312-z>
12. Biela, A., Hammermeister, A., Kaczmarczyk, I., Walczak, M., Koziej, L., Lin, T. Y., & Glatt, S. (2023). The diverse structural modes of tRNA binding and recognition. *The Journal of biological chemistry*, 299(8), 104966. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104966>

13. Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(9), 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>
14. Bungihan, M. E., Tan, M. A., Kitajima, M., Kogure, N., Franzblau, S. G., De la Cruz, T. E., Takayama, H., & Nonato, M. G. (2011). Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. *Journal of natural medicines*, 65(3-4), 606–609. <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0518-x>
15. Burdock, G. A., Carabin, I. G., & Soni, M. G. (2001). Safety assessment of  $\beta$ -nitropropionic acid: a monograph in support of an acceptable daily intake in humans. *Food Chemistry*, 75(1), 1-27. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(01\)00194-7](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(01)00194-7)
16. Calabrese, E. J., Osakabe, N., Di Paola, R., Siracusa, R., Fusco, R., D'Amico, R., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., Fritsch, T., Abdelhameed, A. S., Wenzel, U., Franceschi, C., & Calabrese, V. (2023). Hormesis defines the limits of lifespan. *Ageing Research Reviews*, 91, 102074. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102074>
17. Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., & Caradus, J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw114. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw114>
18. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2022). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>

19. De Carvalho Ribeiro, F. P., Fonseca, F. C. S., Alves, I., Santos, I., Mitoshi, H., Branco, A., & Uetanabaro, A. P. T. (2012). Xylariaceae endophytic fungi metabolites against salmonella. En InTech eBooks. <https://doi.org/10.5772/28623>
20. De Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2019). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e180-e190. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(19)30488-7)
21. Dhakshinamoorthy, M., Packiam, K. K., Kumar, P. S., & Saravanakumar, T. (2021). Endophytic fungus *Diaporthe caatingaensis* MT192326 from *Buchanania axillaris*: An indicator to produce biocontrol agents in plant protection. *Environmental Research*, 197, 111147. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111147>
22. Estrada-Castillón, E., Soto-Mata, B. E., Garza-López, M., Villarreal-Quintanilla, J. Á., Jiménez-Pérez, J., Pando-Moreno, M., Sánchez-Salas, J., Scott-Morales, L., & Coteria-Correa, M. (2012). Medicinal plants in the southern region of the State of Nuevo León, México. *Journal Of Ethnobiology And Ethnomedicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-8-45>
23. 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>
24. Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

25. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.who.int/today>, consultado el 20 de diciembre de 2024.
26. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal Of Cancer*, 149(4), 778-789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
27. Fernandes, N. G. (2012). Medicinal properties of plants from the genus Cissus: A review. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 6(16). <https://doi.org/10.5897/jmpr11.1637>
28. 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.2.362-366.1998>
29. Ganihigama, D. U., Sureram, S., S., Hongmanee, P., Aree, T., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2014). Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: Pyrrolodiquinolines and vermelhotin as anti-tubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.026>

30. González, V., & Tello, M. L. (2010). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47(1), 29-42. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0073-x>
31. Gustine, D. L., Shenk, J. S., Moyer, B. G., & Barnes, R. F. (1974). Isolation of  $\beta$ -Nitropropionic Acid from Crownvetch 1. *Agronomy Journal*, 66(5), 636-639. <https://doi.org/10.2134/agronj1974.00021962006600050010x>
32. Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., & Sticher, O. (1998). Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Social Science & Medicine*, 47(11), 1859-1871. [https://doi.org/10.1016/s0277-9536\(98\)00181-6](https://doi.org/10.1016/s0277-9536(98)00181-6)
33. 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(1), 296. <https://doi.org/10.3390/molecules27010296>
34. Huang, L., Yuan, M., Ao, X., Ren, A., Zhang, H., & Yang, M. (2018). Endophytic fungi specifically introduce novel metabolites into grape flesh cells in vitro. *PLoS ONE*, 13(5), e0196996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196996>
35. Imlach, W. L., Finch, S. C., Dunlop, J., & Dalziel, J. E. (2009). Structural determinants of lolitrems for inhibition of BK large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels. *European Journal Of Pharmacology*, 605(1-3), 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.031>
36. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) DATOS NACIONALES. Actualizado al 02 de febrero de 2024 Recuperado de:

<https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=8823#:~:text=En%202022%2C%20en%20M%C3%A9xico%20se,2012%2C%20a%2068.92%20en%202022.>

37. Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., Komwijit, S., & Sathitkunanon, T. (2007). Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. BCC 8613. *Tetrahedron*, 63(29), 6855-6860. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.062>
38. Kaddes, A., Fauconnier, M., Sassi, K., Nasraoui, B., & Jijakli, M. (2019). Endophytic Fungal Volatile Compounds as Solution for Sustainable Agriculture. *Molecules*, 24(6), 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules24061065>
39. Kjer, J., Wray, V., Edrada-Ebel, R., Ebel, R., Pretsch, A., Lin, W., & Proksch, P. (2009). Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *Journal of natural products*, 72(11), 2053–2057. <https://doi.org/10.1021/np900417g>
40. Koolen, H. H. F., Soares, E. R., Moura, F., Da Silva, A., De Almeida, R. A., Duarte, A., De Souza, L., De Medeiros, L. S., Filho, E. R., Queiroz, A., & De Souza, L. (2012). An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. An endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. *Química Nova*, 35(4), 771-774. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422012000400022>
41. Lans, C. A. (2006). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal Of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-45>
42. Lassak, E. V. (Erich V.) & McCarthy, Tara & Hinton, Betty. (1997). Australian medicinal plants / E.V. Lassak & T. McCarthy. Kew, Vic.: Reed

43. Latz, M. A., Jensen, B., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5-6), 555-567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
44. Leslie, J., Summerell, B., & Bullock, S. (2008). *The Fusarium Laboratory Manual* (1st ed.). Wiley. Retrieved from <https://www.perlego.com/book/2783756/the-fusarium-laboratory-manual-pdf> (Original work published 2008)
45. Li, Z., Chang, P., Gao, L., & Wang, X. (2019). The Endophytic Fungus *Albifimbria verrucaria* from Wild Grape as an Antagonist of *Botrytis cinerea* and Other Grape Pathogens. *Phytopathology*, 110(4), 843-850. <https://doi.org/10.1094/phyto-09-19-0347-r>
46. Lin, X., Huang, Y., Fang, M., Wang, J., Zheng, Z., & Su, W. (2005). Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthesp.* *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.025>
47. Liu, L., Liu, S., Jiang, L., Chen, X., Guo, L., & Che, Y. (2008). Chloropupukeananin, the First Chlorinated Pupukeanane Derivative, and Its Precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Organic Letters*, 10(7), 1397–1400. <https://doi.org/10.1021/ol800136t>
48. Lowenfels, J., Lewis W. (2021) *Cultivar con microbios: La guía del cultivador orgánico de la red de nutrientes del suelo*. Editorial Melusina
49. Lugtenberg, B. J., Caradus, J. R., & Johnson, L.J. (2016). Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(12), fiw194. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw194>
50. Macías-Rubalcava, M. L., Ruiz-Velasco Sobrino, M. E., Meléndez-González, C., & Hernández-Ortega, S. (2014). Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from



from *Cissus incisa*. *Bioorganic chemistry*, 109, 104745.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104745>

57. Nocado-Mena, D., Cornelio, C., Camacho-Corona, M. D. R., Garza-González, E., Waksman de Torres, N., Arrasate, S., Sotomayor, N., Lete, E., & González-Díaz, H. (2019). Modeling Antibacterial Activity with Machine Learning and Fusion of Chemical Structure Information with Microorganism Metabolic Networks. *Journal of chemical information and modeling*, 59(3), 1109–1120.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00034>

58. Nocado-Mena, D., Ríos, M. Y., Ramírez-Cisneros, M. Á., González-Maya, L., Sánchez-Carranza, J. N., & Del Rayo Camacho-Corona, M. (2021). Metabolomic Profile and Cytotoxic Activity of *Cissus incisa* Leaves Extracts. *Plants*, 10(7), 1389.  
<https://doi.org/10.3390/plants10071389>

59. Nocado-Mena, D., Rivas-Galindo, V. M., Navarro, P., Garza-González, E., González-Maya, L., Ríos, M. Y., García, A., Ávalos-Alanís, F. G., Rodríguez-Rodríguez, J., & Camacho-Corona, M. D. R. (2020). Antibacterial and cytotoxic activities of new sphingolipids and other constituents isolated from *Cissus incisa* leaves. *Heliyon*, 6(8), e04671. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04671>

60. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.  
<https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

61. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2021). Resistencia a los antimicrobianos.  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

62. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2024). 1.2 TB mortality. (2024, December 20). <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024/tb-disease-burden/1-2-tb-mortality#fig--1-2-16>
63. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2024). 2.4 Drug-resistant TB treatment (20 de Diciembre 2024). <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024/tb-diagnosis-and-treatment/2-4-drug-resistant-tb-treatment>
64. Onyechi, U. A., Judd, P. A., & Ellis, P. R. (1998). African plant foods rich in non-starch polysaccharides reduce postprandial blood glucose and insulin concentrations in healthy human subjects. *British Journal Of Nutrition*, 80(5), 419-428. <https://doi.org/10.1017/s0007114598001482>
65. PlantDataBase. Cissus Incisa. Available online: [https://www.wildflower.org/plants/result.php?id\\_plant=citr2](https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=citr2) (accessed on 25 February 2022).
66. Polonio, J. C., Ribeiro, M. A. D. S., Rhoden, S. A., Sarragiotto, M. H., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2016). 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. *Fungal Biology*, 120(12), 1600-1608. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.006>
67. 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. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100050>

68. Purahong, W., & Hyde, K. D. (2010). Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal Diversity*, 47(1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0083-8>
69. Qiao, M., Li, J., Fang, L., Li, J., & Yu, Z. (2021). Morphology, Phylogeny and Pathogenicity of *Colletotrichum menglaense* sp. nov., Isolated from Air in China. *Pathogens*, 10(10), 1243. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101243>
70. Rai, N., Gupta, P., Verma, A., Tiwari, R. K., Madhukar, P., Kamble, S. C., Kumar, A., Kumar, R., Singh, S. K., & Gautam, V. (2023). Ethyl Acetate Extract of *Colletotrichum gloeosporioides* Promotes Cytotoxicity and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *ACS Omega*, 8(4), 3768-3784. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05746>
71. Rodrigues, K. F. (1994). The Foliar Fungal Endophytes of the Amazonian Palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86(3), 376. <https://doi.org/10.2307/3760568>
72. Rodríguez, R. J., White, J. F., Jr, Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
73. Salgado, J. M., Mansi, D. N., & Gagliardi, A. (2009). *Cissus sicyoides*: analysis of glycemic control in diabetic rats through biomarkers. *Journal of medicinal food*, 12(4), 722–727. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0157>
74. Sánchez-Aguirre, O. A., Linares-Márquez, P., Sánchez-Medina, A., & Cano-Asseleih, L. M. (2021). Consideraciones bioéticas para la investigación científica de plantas medicinales contra el cáncer en México. *Revista Latinoamericana de Bioética*, 21(1), 45-60. <https://doi.org/10.18359/rlbi.5010>

75. Sánchez-Fernández, R. E. (2010). Potencial alelopático de extractos del micelio y medio de cultivo de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae). Universidad Nacional Autónoma de México
76. Sánchez-Fernández, R. E. (2016). Actividad antagónica antifúngica, y fitotóxica de hongos endófitos de *Gliricidia sepium* (Fabaceae): identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México.
77. Sánchez-Fernández, Rosa Elvira, Sánchez-Ortiz, Brenda Lorena, Sandoval-Espinosa, Yunueth Karina Monserrat, Ulloa-Benítez, Álvaro, Armendáriz-Guillén, Beatriz, García-Méndez, Marbella Claudia, & Macías-Rubalcava, Martha Lydia. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 132-146.
78. Sandoval Espinosa, Yunueth Karina Monserrat. (2014). "Aislamiento y purificación de hongos endófitos con potencial antifúngico y fitotóxico de *Lysiloma acapulcense*". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/209498>
79. Schulz B., & Boyle C. (2006) What are Endophytes? In: Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds) *Microbial Root Endophytes*. Soil Biology, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.
80. Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(Pt 6), 661–686. <https://doi.org/10.1017/s095375620500273x>

81. Secretaría de Salud (2023). 079. En 2022 se registran más de 28 mil casos de tuberculosis en México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-de-tuberculosis-en-mexico>
82. Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L., & Lupo, S. (2018). Diversity and virulence of *Diaporthe* species associated with wood disease symptoms in deciduous fruit trees in Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(3), 431-444. [https://doi.org/10.14601/phytopathol\\_mediterr-20678](https://doi.org/10.14601/phytopathol_mediterr-20678)
83. Shiono, Y., Kosukegawa, A., Koseki, T., Murayama, T., Kwon, E., Uesugi, S., & Kimura, K. I. (2011). A dimeric pyrrocidine from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochemistry Letters*, 5(1), 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.10.008>
84. Singh, A., Kumar, J., Sharma, V. K., Singh, D. K., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., & Kharwar, R. N. (2021). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of an endophytic *Fusarium proliferatum* (ACQR8), isolated from a folk medicinal plant *Cissus quadrangularis* L. *South African Journal Of Botany*, 140, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.004>
85. Skogvold, H. B., Yazdani, M., Sandås, E. M., Vassli, A. Ø., Kristensen, E., Haarr, D., Rootwelt, H., & Elgstøen, K. B. P. (2021). A pioneer study on human 3-nitropropionic acid intoxication: Contributions from metabolomics. *Journal Of Applied Toxicology*, 42(5), 818-829. <https://doi.org/10.1002/jat.4259>
86. Songsiriritthigul, C., Hanwarinroj, C., Pakamwong, B., Srimanote, P., Suttipanta, N., Sureram, S., Suttisintong, K., Kamsri, P., Punkvang, A., Spencer, J., Kittakoop, P., & Pungpo, P. (2021). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* InhA by 3-nitropropanoic

- acid. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 90(3), 898-904.  
<https://doi.org/10.1002/prot.26268>
87. Souza, B. D. S., & Santos, T. T. D. (2017). Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. *Journal Of Bioenergy and Food Science*, 4(2), 113-126.  
<https://doi.org/10.18067/jbfs.v4i2.121>
88. Standley, P. C. (1967) Trees and shrubs of Mexico. Smithsonian Institution: US Government; Vol. 1
89. Suradkar, K. P., & Hande, D. V. (2017). Morphotaxonomy of endophytic fungi on *Cissus quadrangularis* from Amravati (MS) India. *J Bacterial Mycol*, 5, 253-258.
90. Swaroop, P. S., Raut, G. N., Gonnade, R. G., Verma, P., Gokhale, R. S., & Reddy, D. S. (2012). Antituberculosis agent diaportheone B: synthesis, absolute configuration assignment, and anti-TB activity of its analogues. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(28), 5385. <https://doi.org/10.1039/c2ob25831e>
91. Tian, L., Ren, H., Xi, J., Fang, J., Zhang, J. Z., & Wu, Q. (2021). Diverse anti-inflammation and anti-cancer polyketides isolated from the endophytic fungi *Alternaria* sp. MG1. *Fitoterapia*, 153, 105000. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105000>
92. Túnez, I., Tasset, I., La Cruz, V. P., & Santamaría, A. (2010). 3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington's Disease: Past, Present and Future. *Molecules*, 15(2), 878-916. <https://doi.org/10.3390/molecules15020878>
93. Tyagi, G., Kapoor, N., Chandra, G., & Gambhir, L. (2021). Cure lies in nature: medicinal plants and endophytic fungi in curbing cancer. *3 Biotech*, 11(6).  
<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02803-x>

94. Udupa, K. N., & Prasad, G. C. (1962). *Cissus quadrangularis* in healing fractures. A clinical study. *Journal of the Indian Medical Association*, 38, 590–593.
95. Udupa, K. N., & Prasad, G. C. (1964). FURTHER STUDIES ON THE EFFECT OF *CISSUS QUADRANGULARIS* IN ACCELERATING FRACTURE HEALING. *The Indian journal of medical research*, 52, 26–35
96. Upadhayay, S., Yedke, N. G., Rahi, V., Singh, S., Kumar, S., Arora, A., Chandolia, P., Kaur, P., Kumar, M., Koshal, P., Jamwal, S., & Kumar, P. (2023). An Overview of the Pathophysiological Mechanisms of 3-Nitropropionic Acid (3-NPA) as a Neurotoxin in Huntington’s Disease Model and Its Relevance to Drug Discovery and Development. *Neurochemical Research*, 48(6), 1631-1647. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03868-1>
97. USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. 2022. Germplasm Resources Information Network (GRIN Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=10629>. Accessed 25 February 2022
98. USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. 2022. Germplasm Resources Information Network (GRIN Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=10629>. Accessed 25 February 2022
99. Wang, Y., Hao, X., Wang, L., Xiao, N. B., Wang, X., & Yang, Y. (2016). Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep35287>

100. Weir, B., Johnston, P., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies In Mycology*, 73, 115-180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
101. Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., & Meevootisom, V. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 20(3), 265-272. <https://doi.org/10.1023/b:wibi.0000023832.27679.a8>
102. Yang, Q., Fan, X., Guarnaccia, V., & Tian, C. (2018). High diversity of Diaporthe species associated with dieback diseases in China, with twelve new species described. *MycoKeys*, 39, 97-149. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.26914>
103. Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & Kang, Y. J. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental Biology And Medicine*, 246(16), 1791-1801. <https://doi.org/10.1177/15353702211005390>
104. Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., & Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165(6), 437-449. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009>
105. Zgoda, J., & Porter, J. (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>
106. Zhao, S., Li, J., Liu, J., Xiao, S., Yang, S., Mei, J., Ren, M., Wu, S., Zhang, H., & Yang, X. (2023). Secondary metabolites of *Alternaria*: A comprehensive review of

chemical diversity and pharmacological properties. *Frontiers In Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1085666>

107. Zheng, R., Li, S., Zhang, X, & Zhao, C. (2021). Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 959. <https://doi.org/10.3390/ijms22020959>
108. Zhu, Y., Ma, L., Xue, H., Li, Y., & Jiang, N. (2024). New species of Diaporthe (Diaporthaceae, Diaporthales) from *Bauhinia variegata* in China. *MycKeys*, 108, 317-335. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.108.128983>

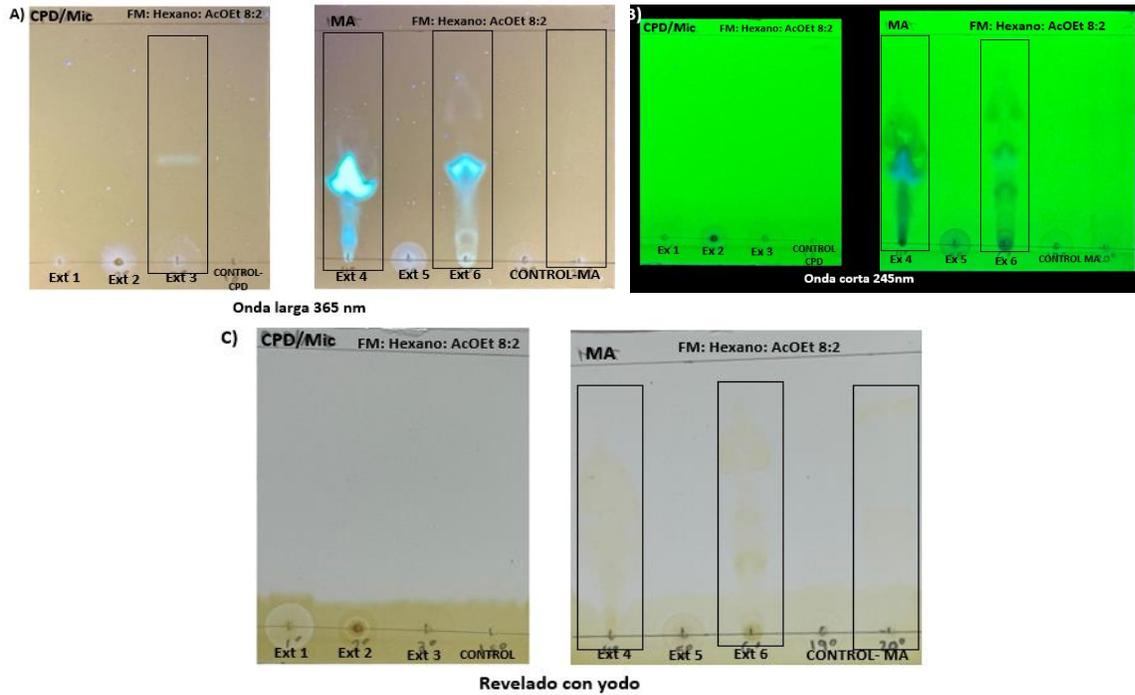
## 9. ANEXOS

### 1. Medios de cultivo utilizados:

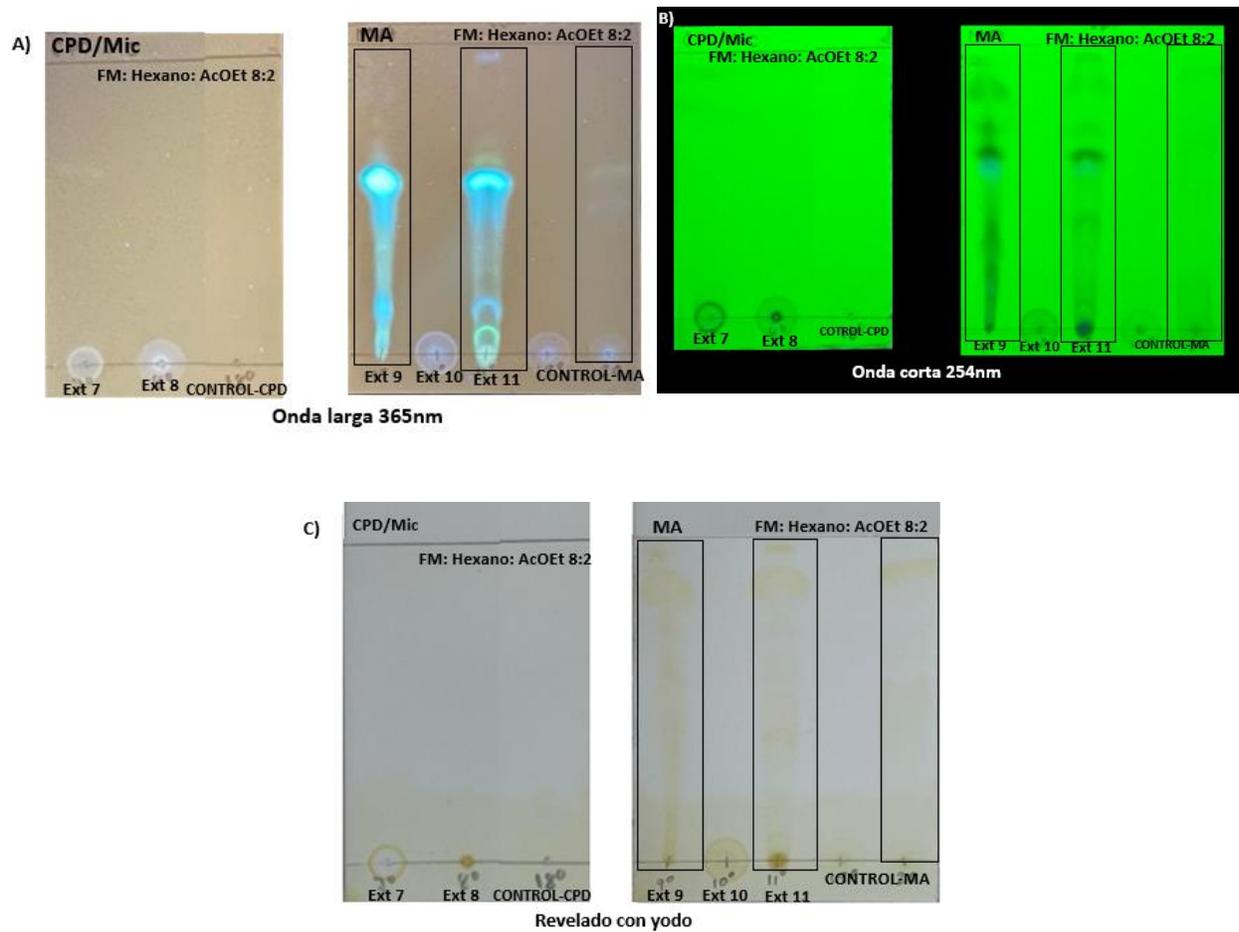
- Medio Agar Papa Dextrosa
  - Se necesitan 39gr de medio en polvo para disolver en 1000mL de agua destilada
  - Esterilizar a 121°C, a 15 lbs de presión durante 15 min.

- Medio Agar Agua
  - Se necesitan 20 gr de agar en polvo para disolver en 100 mL de agua destilada
  - Esterilizar a 121°C, a 15 lbs de presión durante 15 min.
- Cultivo Caldo papa dextrosa
  - Pelar y cortar 200 gr de papa fresca, hervir la papa con 1000ml de agua destilada, filtrar con gasa y conservar el caldo y desechar la papa, agregar 20gr de dextrosa en polvo y homogenizar la mezcla, aforar a 1lt con agua destilada esterilizar a 121°C, a 15 lbs de presión durante 15 min.
- Medio Arroz
  - Pesar 300 gr de arroz blanco y lavar una vez con agua corriente y una vez con agua destilada, colarlo y colocarlo en el matraz, agregar 300ml de agua destilada y esterilizar a 121°C, a 15 lbs de presión durante 15 min.
- Etanol 75%
- Antibiótico: Cloranfenicol
  - Pesar 50mg de cloranfenicol en polvo y disolver en 1000 mL de medio de cultivo, ajustar a las cantidades necesarias.
- Clorox 64%
  - Medir 640 mL de clorox y aforar a 1000 mL con agua destilada
- Ácido tartárico 10%
  - Pesar 1 g de ácido tartárico y aforar a 10 mL con agua destilada.

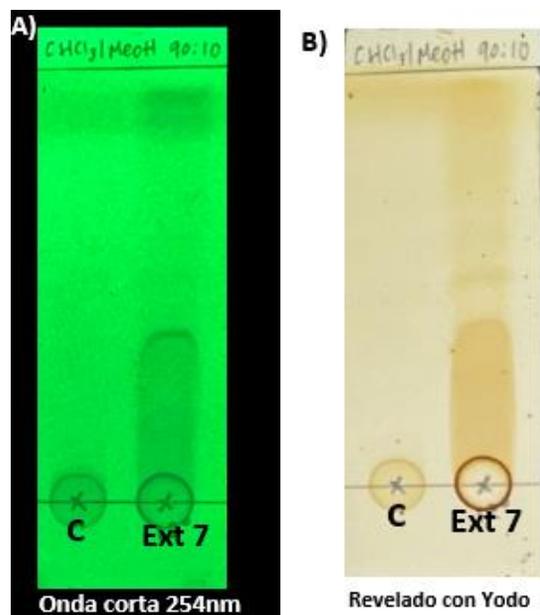
2. Análisis por TLC de los extractos obtenidos de los hongos endófitos aislados de las hojas de *C. trifoliata*:



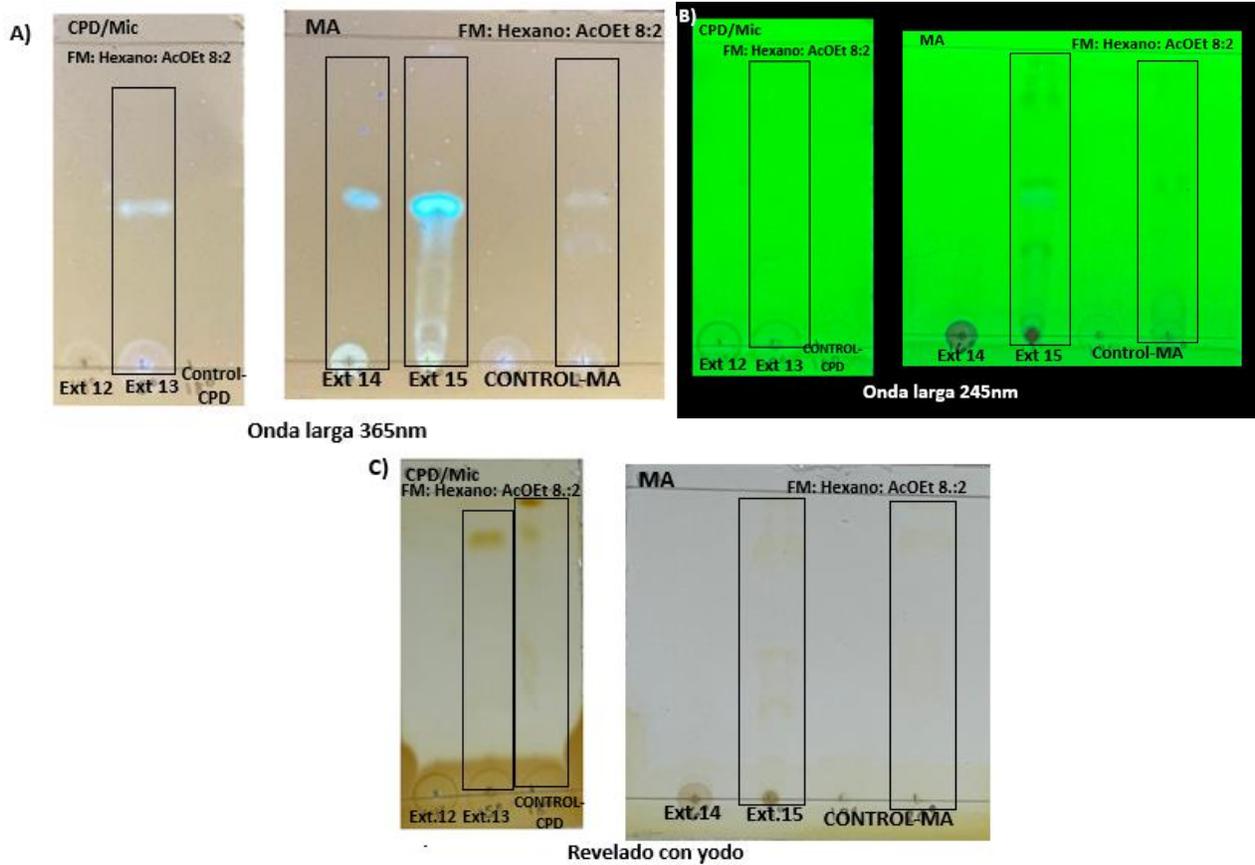
**Figura A2.1.** TLC del hongo número uno AA-VIC3C (N): *Colletotrichum siamense* (extractos del 1 al 6), reveladas con A) Onda larga B) Onda corta C) Yodo; de izquierda a derecha se observan los extractos obtenidos del cultivo de caldo papa dextrosa (CPD) y por separado los extractos obtenidos del cultivo de Medio Arroz esto para las tres imágenes.



**Figura A2.2.** TLC del hongo número dos AA-VIC3 (F): *Diaporthe* sp. (extractos del 7 al 11), reveladas con A) Onda larga, B) Onda corta y C) Yodo; de izquierda a derecha se observan los extractos obtenidos del cultivo de caldo papa dextrosa (CPD) y por separado los extractos obtenidos del cultivo de Medio Arroz esto para las tres imágenes.

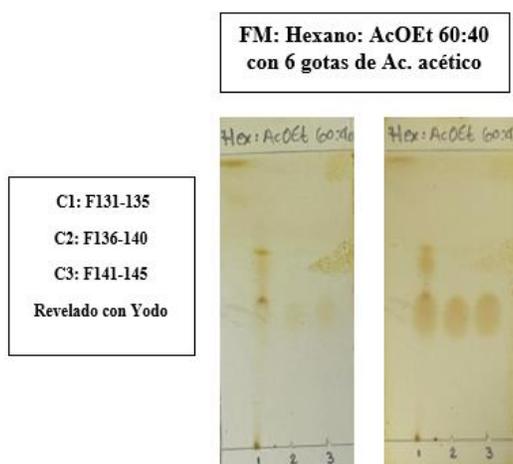


**Figura A2.3.** TLC del hongo número dos AA-VIC3 (F), *Diaporthe* sp., (Extracto 7),  
reveladas con A) UV Onda corta y B) Yodo.

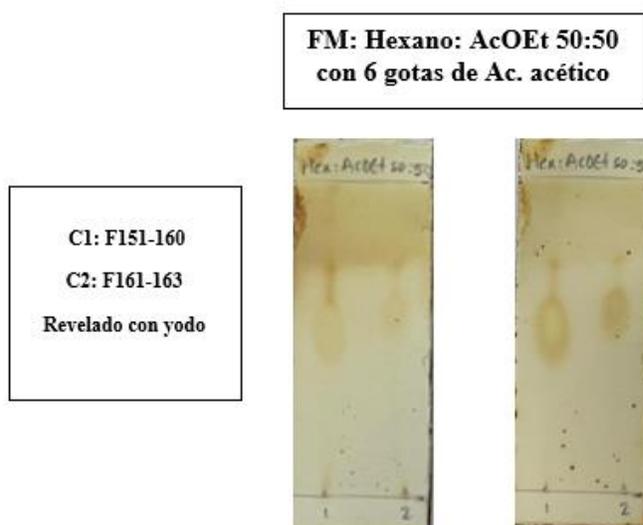


**Figura A2.4.** TLC del hongo número tres PDA-IVC3o (B)(*Colletotrichum kahawae*) (extractos del 12 al 15), reveladas con A) Onda larga, B) Onda corta y C) Yodo; de izquierda a derecha se observan los extractos obtenidos del cultivo de Medio Arroz (MA) y por separado los extractos obtenidos del cultivo de caldo papa dextrosa (CPD) esto para las tres imágenes.

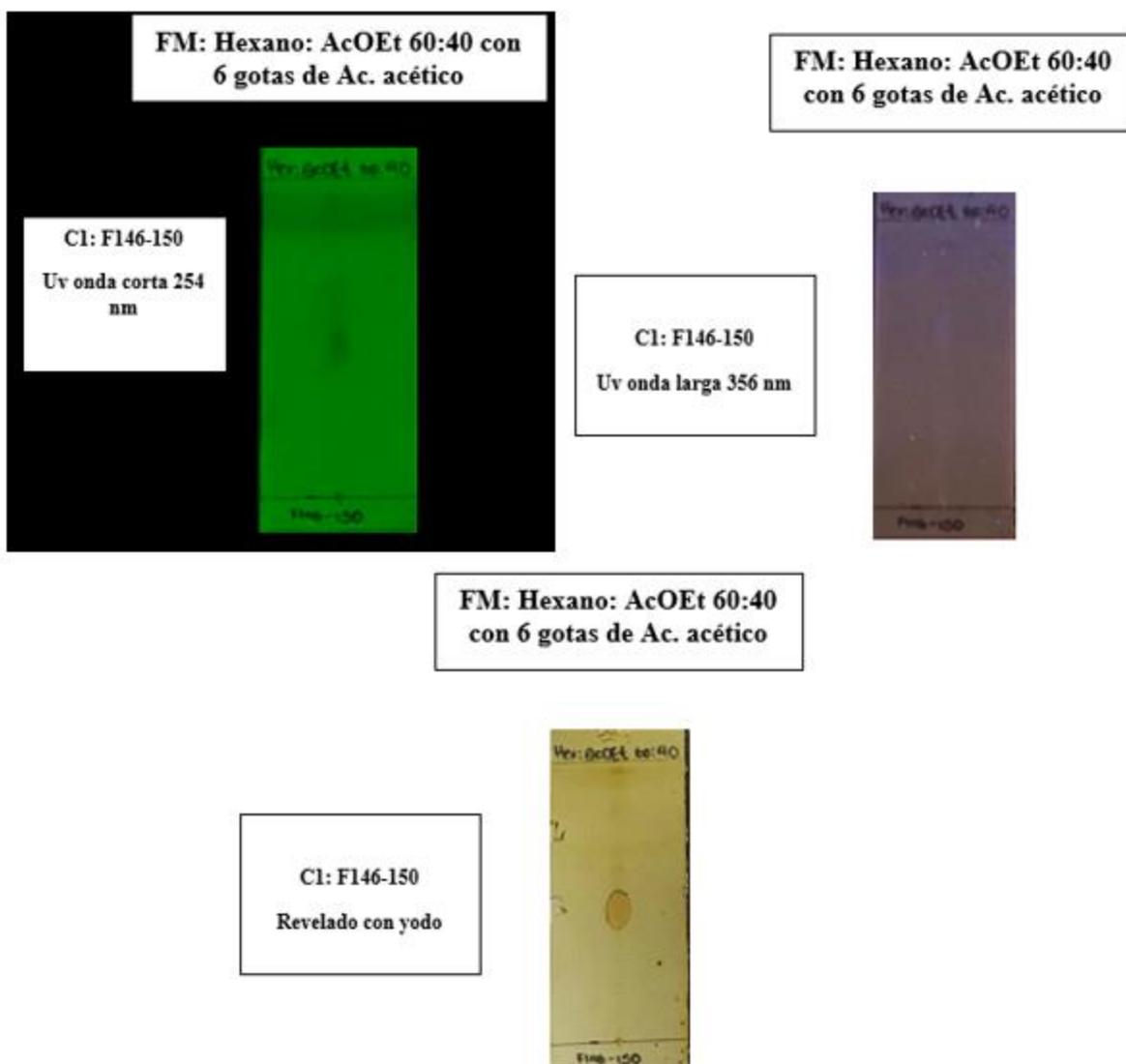
### 3. Análisis por TLC de las fracciones obtenidas



**Figura A3.1.** TLC de las fracciones 131-145, se puede observar más de una mancha en la TLC lo que significa que hay más de un compuesto presente en la muestra.



**Figura A3.2.** TLC de la fracción 151-163, se observan dos manchas, lo cual sugiere que la muestra está impura y hay más de un compuesto presente.

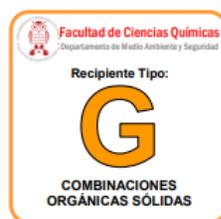


**Figura A 3.3.** TLC del compuesto puro aislado (Ácido 3-Nitropropionico), su comportamiento bajo Luz UV de onda corta 254nm, onda larga 356nm y revelado con yodo.

## 4. Disposición de Residuos

La disposición de residuos de la metodología anteriormente descrita se realizó conforme a la Facultad de Ciencias Químicas, en los laboratorios de Química de Productos Naturales: se utilizó de mayor manera el recipiente tipo C para los solventes usados en la obtención de los extractos, así como el recipiente tipo A para la disposición de la sílica que se utilizó en la columna cromatográfica, y la basura industrial para el deshecho de placas de TLC, guantes, material impregnado con solventes entre otros y en el Laboratorio de Biotecnología I, se utilizó el recipiente tipo Colorantes y lugol, basura industrial y en el manejo de material biológico tanto en este laboratorio como en la Facultad de Medicina en el Laboratorio de infectología Molecular II fue conforme a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002- Protección ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos, donde los cultivos y cepas de agentes infecciosos e desecharon en bolsas de polietileno rojas, y el material punzocortante desechable se dispuso en material rígido de color rojo.





## 5. Constancia de Congresos

The certificate is framed with a decorative border of butterflies in various colors (orange, yellow, white, black) and a large green number '18' on the left side. At the top, it features logos for the organizing institutions: a circular emblem with a butterfly, the coat of arms of the State of Michoacán, and the Amipronat logo. The text is centered and includes the names of the awarding organizations, the recipient's name, the title of the work, and the date and location of the event. Two signatures are present at the bottom, each with a horizontal line underneath and the name of the signatory below.

**18**

Reunión Internacional  
de Investigación en  
Productos Naturales  
Dr. Carlos M. Cerdo García Rojas

**Amipronat**  
Asociación Mexicana de Investigación  
en Productos Naturales

La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y  
La Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales

Otorgan la presente:

*Constancia*

**a:** Mitzi García Bernal, Martha Lydia Macías Rubalcava, Pilar del Carmen Morales San Claudio, Elvira Garza González, Deyani Nocado Mena, María del Rayo Camacho Corona

Por haber presentado el trabajo titulado:

Aislamiento de hongos endófitos de las hojas de *Cissus trifoliata* y actividad antibacteriana de sus extractos obtenidos

En el marco de las actividades de la 18a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, que se llevó a cabo del 24 al 27 de Mayo de 2023 en la ciudad de Morelia Michoacán, México.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo  
Presidenta de la AMIPRONAT

Dra. Rosa Eiva Norma Del Río Torres  
Presidenta del Comité Organizador Local



**La Facultad de Ciencias Químicas  
de la Universidad Autónoma de Nuevo León**



otorga el presente

**Reconocimiento a:**

**María del Rayo Camacho Corona , Mitzi García Bernal , Martha Lydia Macías  
Rubalcava, Pilar del Carmen Morales San Claudio, Adriana Romo Pérez**

por su participación como ponentes con el trabajo

Actividad anticancerígena de los extractos obtenidos de hongos endófitos  
aislados de las hojas de *Cissus trifoliata*

**VII CONGRESO INTERNACIONAL DE  
QUÍMICA E INGENIERÍA VERDE**

Llevado a cabo el 19 y 20 de octubre de 2023  
en Monterrey Nuevo León, México

**Dra. Argelia Vargas Moreno**  
DIRECTORA