



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



**Evaluación química y de actividad antibacteriana de los
extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de
Crescentia alata Kunth.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

BIÓL. MIGUEL ANGEL LINARES ARAGON

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA

CODIRECTORA DE TESIS:

M. en Biotec. ROSARIO DEL CARMEN FLORES VALLEJO

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (CEIB)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (Directora) (CEIB)

M. en Biotec. Rosario del Carmen Flores Vallejo (Codirectora) (CEIB)

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a toda mi familia por todo el apoyo que me han brindado, en especial a mi abuelita, mi hermana y mi mamá.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) por confiar en mi y aceptarme en la maestría en biotecnología.

Agradezco a mi comité tutorial por los consejos brindados en cada evaluación, para realizar un buen proyecto y con buenos resultados.

Al doctor Jesús Silva Sánchez por proporcionarnos amablemente la cepa *E. coli* ATCC 25922.

A la doctora María Luisa Teresa Villarreal Ortega. Gracias por confiar en mi cuando la fui a buscar como tutora, por aceptarme dentro de su grupo de investigación en el Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales (LIPM) donde siempre me sentí tan comfortable y contento. Por el apoyo que me brindó cuando se lo pedí. Me gustó tanto el proyecto que no sentí el tiempo transcurrido.

A mi codirectora, la maestra en Biotecnología Rosario del Carmen Flores Vallejo. Gracias por todo el apoyo que me brindaste durante mi estancia en la maestría, por tus consejos, por tus sugerencias, por la atención brindada a pesar de estar ocupada, con todo esto me has ayudado a crecer como estudiante, no tengo ninguna duda de que serás una gran investigadora, admiro tu perseverancia, disciplina y la manera que te apasiona la ciencia por el bien de la humanidad.

Agradezco a cada uno de mis compañeros del laboratorio, me gustó el ambiente de trabajo, siempre fue sano, siempre me sentí a gusto con ustedes, tanto que no sentí el tiempo.

Agradezco en general a los laboratorios del CEIB por el apoyo brindado cuando lo requerí.

Al programa de becas para posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Bacterias que requieren nuevos antibióticos.....	4
2.2. Generalidades sobre las bacterias.....	5
2.3. Antecedentes históricos sobre el descubrimiento de enfermedades causadas por bacterias.....	11
2.3.1. Enfermedades infecciosas de origen bacteriano.....	11
2.3.2. Bacterias que causan enfermedades en México.....	12
2.4. Antibiosis.....	13
2.4.1. Descubrimiento del primer antibiótico.....	14
2.5. Problema de salud pública: la resistencia a los antibióticos.....	14
2.5.1. Advertencia de Alexander Fleming sobre la resistencia a los antibióticos.....	15
2.5.2. Surgimiento y detección de las primeras bacterias resistentes a antibióticos.....	15
2.6. Agentes antibacterianos.....	15
2.6.1. Agentes bacteriostáticos.....	15
2.6.2. Agentes bactericidas.....	16
2.7. Clasificación de los antibióticos.....	16
2.8. Métodos para evaluar actividad antibacteriana.....	22
2.8.1. Difusión en disco.....	23

2.8.2. E- test (Epsilon Test).....	23
2.8.3. Macrodilución.....	23
2.8.4. Microdilución.....	24
2.8.5. Bioautografía por contacto.....	24
2.8.6. Bioautografía directa.....	24
2.8.7. Bioautografía por superposición.....	24
2.9. Estandarización de Bioautografía.....	25
2.10. Métodos para identificar parcialmente grupos de metabolitos antibacteriano.....	27
2.10.1. Cromatografía en papel.....	27
2.10.2. Cromatografía en Capa Fina.....	27
2.10.3. Cromatografía en Columna Abierta.....	27
2.11. Fuentes de productos antibacterianos.....	28
2.11.1. Plantas.....	28
2.11.2. Microorganismos endófitos.....	29
2.11.2.1. Generalidades sobre los hongos endófitos.....	29
2.11.2.2. Hongos endófitos como alternativa biotecnológica.....	29
2.11.2.3. Descubrimiento de los hongos endófitos.....	30
2.11.2.4. Localización de los hongos endófitos.....	30
2.11.2.5. Diversidad y clasificación de hongos endófitos.....	31
2.11.2.6. Modo de transmisión de los hongos endófitos.....	32
2.11.2.7. Importancia de los hongos endófitos.....	32
2.11.2.8. Interacción planta hospedera-hongo endófito.....	34
2.11.2.9. Efecto antagónico de los hongos endófitos.....	36
2.11.2.10. Complicaciones del uso de hongos endófitos como productores de metabolitos antibacterianos.....	36
2.11.2.11. Estrategias para que los hongos endófitos vuelvan a producir componentes con actividad antibacteriana.....	36
2.11.2.12. Hongos endófitos aislados de plantas medicinales mexicanas.....	37
2.11.2.13. Metabolitos secundarios bioactivos producidos por hongos endófitos.....	37

2.11.2.14. Reportes de efecto antibacteriano de los componentes producidos por hongos endófitos.....	40
2.11.2.15. Actividad antibacteriana de <i>Fusarium</i> sp.....	44
2.11.2.16. Actividad antibacteriana de <i>Colletotrichum</i> sp.....	44
2.11.2.17. Actividad antibacteriana de <i>Periconia</i> sp.....	46
2.12. <i>Crescentia alata</i> Kunth.....	46
2.12.1. Descripción morfológica de <i>C. alata</i> Kunth.....	47
2.12.2. Distribución de <i>C. alata</i> en México.....	47
2.12.3. Distribución geográfica de <i>C. alata</i> Kunth en el estado de Morelos.....	48
2.12.4. Aprovechamiento de <i>C. alata</i> Kunth.....	49
2.12.5. Importancia en la medicina tradicional.....	49
2.12.6. Actividad antimicrobiana de <i>C. alata</i> Kunth.....	49
2.12.7. Hongos endófitos aislados de la planta medicinal mexicana <i>Crescentia alata</i> Kunth.....	50
2.12.8. Efecto antibacteriano de los extractos de micelio de hongos endófitos aislados de la planta medicinal mexicana <i>C. alata</i> Kunth contra bacterias sensibles a antibióticos.....	50
3. JUSTIFICACIÓN.....	52
4. OBJETIVOS.....	53
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	53
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	53
5. HIPÓTESIS.....	54
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
6.1. Estrategia experimental.....	55
6.2. Estandarización del método de bioautografía y evaluación del extracto más bioactivo.....	56
6.3. Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	57
6.4. Reactivación, obtención de extracto y preservación de actividad antibacteriana producida por el hongo endófito <i>Periconia</i> cf. <i>ignaria</i>	57
6.4.1. Preparación de preinóculo.....	58
6.4.2. Cultivo líquido en matraz Erlen-Meyer.....	59

6.4.3. Exo-metaboloma: obtención de extractos orgánicos de sobrenadante	60
6.5. Separación e identificación de compuestos con actividad antibacteriana por CCF.....	61
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
7.1. Estandarización de bioautografía utilizando resazurina.....	62
7.2. Estandarización de bioautografía utilizando cloruro de tetrazolio.....	64
7.3. Evaluación de cuatro extractos de hongos endófitos aislados de <i>C. alata</i> Kunth contra <i>E. coli</i> ATCC 25922, utilizando resazurina.....	65
7.4. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra <i>E. coli</i> ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.....	66
7.5. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	67
7.6. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	68
7.6.1. Bioautografía del extracto SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923 utilizando Agar Infusión Cerebro Corazón.....	69
7.7. Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	72
7.8. Concentración Mínima Inhibitoria contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	74
7.9. Bioautografía contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	77
7.10. Bioautografía contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923, con fase móvil cloroformo: metanol (5:1).....	78
7.11. Dilución del extracto SH23 en DMSO.....	79
7.12. Dilución del extracto SH23 en metanol.....	80
7.13. Dilución del extracto SH23 en acetato de etilo.....	80
7.14. Bioautografía contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923, con fase móvil cloroformo: metanol (7:3).....	86
7.15. Identificación parcial mediante CCF, del grupo de componente responsable de la actividad contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	87
8. CONCLUSIONES.....	91
9. PERSPECTIVAS.....	92
10. REFERENCIAS.....	93

11. APÉNDICE I	104
11.1. Cromatografía en Capa Fina del extracto de micelio del hongo endófito <i>Cercospora cf. apii</i> . (MH01).....	104
12. APÉNDICE II	106
12.1. Reactivación y producción del extracto producido por el hongo endófito <i>Periconia cf. ignaria</i>	106
12.2. Primera obtención del extracto SH23	107
12.3. Segunda obtención del extracto SH23	109
12.4. Reactivación del hongo endófito <i>Periconia cf. ignaria</i> a partir de biomasa almacenada a 4 °C en CPD.....	110
12.5. Cromatografía en Capa Fina de los sobrenadantes de extracto SH23, utilizando como revelador químico: vainillina sulfúrica.....	111
13. APÉNDICE III	115
13.1. Actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 del extracto SH23 obtenido de una segunda generación de un cultivo de <i>Periconia cf. ignaria</i>	115
14. APÉNDICE IV	116
14.1. Bioautografía contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923, utilizando fase móvil cloroformo/ metanol (7:1).....	116
14.2. CCF del extracto SH23 revelado con reactivo de Liebermann- Burchard.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Lista de bacterias patógenas resistentes a antibióticos.....	4
Figura 2. Célula procariota.....	5
Figura 3. Morfología bacteriana.....	5
Figura 4. Tinción de Gram.....	6
Figura 5. Diferencia entre la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.....	8
Figura 6. Fases de crecimiento bacteriano.....	9
Figura 7. Clasificación y localización de endófitos.....	31
Figura 8. Representación de componentes producidos por endófitos.....	33
Figura 9. Interpretación del costo-beneficio entre las interacciones de la planta-microorganismo endófito.....	35
Figura 10. Phomopsicalasina.....	42
Figura 11. Artesanol A y 2-hidroxi-6-ácido metilbenzoico.....	43
Figura 12. Guanacastepeno.....	43
Figura 13. Porcentaje de componentes conocidos y desconocidos producidos por endófitos.....	44
Figura 14. Ácido colletotrico.....	45
Figura 15. Distribución de <i>Crescentia alata</i> Kunth en México.....	48
Figura 16. Distribución geográfica de <i>C. alata</i> Kunth en el estado de Morelos.....	48
Figura 17. Preparación de preinóculo.....	59
Figura 18. Polaridad de algunos solventes.....	82

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Elementos esenciales, fuentes y funciones en los procariotas.....	10
Tabla 2. Enfermedades infecciosas causadas por bacterias.....	12
Tabla 3. Agentes etiológicos más frecuentes en infección de vías urinarias en México.....	13
Tabla 4. Agentes antibacterianos.....	16
Tabla 5. Clasificación de antibióticos.....	17
Tabla 6. Métodos de bioautografía publicados en artículos científicos.....	25
Tabla 7. Clasificación de los hongos endófitos.....	32
Tabla 8. Ejemplo de metabolitos secundarios con actividad biológica, producidos por hongos endófitos.....	38
Tabla 9. Condiciones de preservación de biomasa de <i>Periconia cf. ignaria</i>.....	58

ÍNDICE DE IMÁGENES.

Imagen 1. <i>Crescentia alata</i> Kunth.....	47
Imagen 2. Bioautografía por superposición en agar contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 a las 3 horas de incubación.....	63
Imagen 3. Bioautografía por superposición en agar contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 a las 24 horas de incubación.....	63
Imagen 4. Bioautografía por superposición en agar contra <i>E. coli</i> ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.....	64
Imagen 5. Bioautografía estandarizada contra <i>E. coli</i> ATCC 25922, utilizando resazurina.....	65
Imagen 6. Bioautografía estandarizada contra <i>E. coli</i> ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.....	66
Imagen 7. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853.....	68
Imagen 8. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	69
Imagen 9. Bioautografía del extracto SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	70
Imagen 10. Actividad antibacteriana del extracto SH23 contra la bacteria <i>S. aureus</i> ATCC 25923 en ausencia de cloruro de tetrazolio.....	71
Imagen 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto SH23 contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	72
Imagen 12. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	74
Imagen 13. Bioautografía del extracto SH23 contra <i>E. coli</i> ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.....	77
Imagen 14. Bioautografía del extracto SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923, utilizando cloruro de tetrazolio.....	78
Imagen 15. CCF del extracto SH23 diluido en DMSO.....	79
Imagen 16. Extracto SH23 diluido en acetato de etilo.....	81
Imagen 17. Actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	83
Imagen 18. CCF de extracto SH23 diluido en acetato de etilo.....	84

Imagen 19. Bioautografía contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923, con una fase móvil cloroformo/ metanol (7:3).....	87
Imagen 20. Cromatografía en Capa Fina del extracto SH23.....	88
Imagen 21. CCF del extracto SH23 reveladas con distintos reactivos químicos.....	89
Imagen 22. Separación de componentes del extracto de micelio MH01 mediante CCF.....	106
Imagen 23. Primera obtención de biomasa de <i>Periconia cf. ignaria</i>.....	107
Imagen 24. Extracción del extracto de sobrenadante SH23 con acetato de etilo.....	108
Imagen 25. Extractos de sobrenadante SH23 extraídos con acetato de etilo.....	109
Imagen 26. Extractos de sobrenadante SH23 después de evaporar el acetato de etilo.....	109
Imagen 27. Intento de reactivación del hongo endófito <i>Periconia cf. ignaria</i> en APD.....	110
Imagen 28. Segunda obtención de biomasa de <i>Periconia cf. ignaria</i>.....	111
Imagen 29. CCF de los extractos de sobrenadante SH23 Amarillo 1, Naranja 1, Naranja 2 y Naranja 3.....	112
Imagen 30. Actividad antibacteriana del extracto SH23, de un cultivo de segunda generación de <i>Periconia cf. ignaria</i>, contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	116
Imagen 31. Bioautografía del extracto SH23 contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923, con una fase móvil cloroformo/metanol (7:1).....	117
Imagen 32. CCF del extracto SH23 revelada con reactivo de Liebermann Burchard.....	118

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Grafica 1. Actividad antibacteriana del extracto SH23.....	76
---	-----------

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico

AMH. Agar Muller Hinton

ARN. Ácido ribonucleico

ARNt. Ácido ribonucleico de transferencia

ATCC. Colección Americana de Cultivos Tipo (por sus siglas en inglés “American Type Culture Collection”)

APD: Agar Papa Dextrosa

BLAST. Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local (por sus siglas en inglés “Basic Local Alignment Search Tool^a)

CCA. Cromatografía en Columna Abierta

CCF. Cromatografía en Capa Fina

CEIB. Centro de Investigación en Biotecnología

CMH. Caldo Muller Hinton

CMI. Concentración Mínima Inhibitoria

CST. Caldo Soya Tripsicaseína

CPD. Caldo Papa Dextrosa

DOF. Diario Oficial de la Federación

DMSO. Dimetil Sulfoxido

E. coli. *Escherichia coli*

Fr. Frente de Retención

GAE. Ácido Gálico

HPLC. Cromatografía Líquida de Alta Presión (por sus siglas en inglés “High Performance Liquid Chromatography”)

ICC. Infusión cerebro corazón

INSP. Instituto Nacional de Salud Pública

ITS. Región espaciadora interna transcrita (por sus siglas en inglés “Internal Transcribed Spacer”)

mL. Mililitro

mm. Milímetro

m.s.n.m. metros sobre el nivel del mar

OMS. Organización Mundial de la Salud

RMN. Resonancia magnética nuclear

RPM. Revoluciones por minuto

PBPs. Proteínas fijadoras de penicilina (por sus siglas en inglés “Penicillin Binding Proteins”)

sp. Especie

TLC. Cromatografía en capa fina (por sus siglas en inglés “Thin Layer Chromatography”)

µg. Microgramo

UAEM. Universidad Autónoma del Estado de Morelos

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México

UV. Ultravioleta

RESUMEN.

El uso inadecuado de antibióticos ha provocado la selección de bacterias resistentes a estos fármacos. Este fenómeno ha provocado la disminución de la efectividad terapéutica de los antibióticos que se utilizan comúnmente. Ante esta situación que podría ocasionar la siguiente pandemia, es importante invertir en investigación y desarrollo de biomoléculas novedosas para combatir las infecciones causadas por bacterias resistentes. En investigaciones previas, usando los ensayos de microdilución en placa y difusión en pozo en agar, se ha demostrado que los hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth tienen actividad contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* etc. Sin embargo, se desconocen los compuestos químicos responsables de dicha actividad. En un futuro los componentes producidos por hongos endófitos aislados de plantas mexicanas como *Crescentia alata* Kunth, podrían utilizarse como una estrategia biotecnológica alternativa en la producción de nuevos antibióticos. En el presente trabajo de investigación se estandarizó un método basado en bioautografía en Cromatografía en Capa Fina (CCF) el cual permitió identificar la clase de metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito aislado de *Crescentia alata* Kunth que demostró la mayor actividad antibacteriana (mayor halo de inhibición). El extracto del sobrenadante del hongo endófito aislado de la rama de *C. alata* identificado como *Periconia cf. ignaria* (CaBr80), inhibió el crecimiento de *E. coli* ATCC 259122 y *S. aureus* ATCC 25923 (halo de inhibición 8.7 mm con ambas bacterias) y en el ensayo de bioautografía presentó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 250 y 31.25 µg/punto de aplicación del extracto respectivamente. Los resultados de las pruebas bioquímicas de revelado de las placas de CCF indicaron que el compuesto/s con Frente de Retención (Fr: 0.72) responsable de inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 podría pertenecer a la clase de los alcaloides (aminas biogénicas), terpenos o en particular una amina fenólica. Dicho compuesto generó un halo de inhibición de 10 mm de ancho y 17 mm de alto. Después de resembrar la segunda generación de los cultivos *in vitro* de *P. ignaria*, el hongo comienza a perder la capacidad de producir los compuestos antibacterianos. El presente trabajo de investigación reporta por primera vez a los compuestos antibacterianos secretados por una cepa de hongo endófito del género *Periconia* aislado en México de *Crescentia alata* Kunth, y con actividad antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923.

ABSTRACT.

The inappropriate use of antibiotics has led to the selection of bacteria resistant to these drugs. This phenomenon has resulted in a decrease in the therapeutic effectiveness of commonly used antibiotics. Faced with this situation that could lead to the next pandemic, it is important to invest in research and development of novel biomolecules to combat infections caused by resistant bacteria. In previous research, using the microdilution plate and agar well diffusion assays, endophytic fungi isolated from *Crescentia alata* Kunth have been shown to have activity against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* etc. However, the chemical compounds responsible for this activity are unknown. In the future, the components produced by endophytic fungi isolated from Mexican plants such as *Crescentia alata* Kunth, could be used as an alternative biotechnological strategy in the production of new antibiotics. In the present research work, a method based on Bioautography in Thin Layer Chromatography (TLC) was standardized, which allowed identifying the class of secondary metabolites produced by the endophytic fungus isolated from *Crescentia alata* Kunth that showed the highest antibacterial activity (greater halo of inhibition). The extract from the supernatant of the endophytic fungus isolated from the branch of *C. alata* identified as *Periconia* cf. *ignaria* (CaBr80), inhibited the growth of *E. coli* ATCC 259122 and *S. aureus* ATCC 25923 (8.7 mm inhibition halo with both bacteria) and in the bioautography test it presented a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 250 and 31.25 µg / point of application of the extract respectively. The results of the biochemical development tests of the TLC plates indicated that the compound with Retention Front (RF: 0.72) responsible for inhibiting the growth of *S. aureus* ATCC 25923 could belong to the class of alkaloids (biogenic amines), terpenes or in particular a phenolic amine. Said compound generated an inhibition halo 10 mm wide and 17 mm high. After reseeded the second generation of *in vitro* cultures of *P. ignaria*, the fungus begins to lose the ability to produce antibacterial compounds. The present research work reports for the first time antibacterial compounds secreted by an endophytic fungus strain of the genus *Periconia* isolated in Mexico from *Crescencia alata* Kunth, and with antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) las malas prácticas en la administración de antibióticos han provocado un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas y muertes causadas por bacterias resistentes a antibióticos de amplio espectro (OMS, 2017). Dada la creciente ineffectividad de los antibióticos actuales, se requiere urgentemente de la investigación y descubrimiento de nuevos antibióticos que ayuden a combatir este problema de salud a nivel mundial (Reardon, 2014; Nseir *et al.*, 2005). En Mexico, a pesar de la implementación de políticas públicas que regulen de manera mas estricta la comercialización y administración de productos antibióticos tanto en humanos como en animales indicadas en el “acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la estrategia nacional contra la resistencia a antimicrobianos” (DOF, 2018), las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedades infecciosas por microorganismos resistentes a antibióticos siguen en aumento (INSP, 2018).

Una de las estrategias biotecnológicas que pueden asistir en el descubrimiento de nuevos antibióticos es el aislamiento y cultivo de hongos endófitos, particularmente los que se encuentran en plantas medicinales. Los hongos endófitos producen metabolitos secundarios durante la interacción con su planta hospedera, y la protegen de infecciones causadas por microorganismos patógenos (Yang, *et al.*, 1994). En diversos estudios, se ha reportado que los hongos endófitos producen componentes de interés farmacológico y biotecnológico (Strobel y Daisy, 2003; Jalgaonwala *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2014). Varios metabolitos secundarios antibacterianos, han sido aislados de hongos endófitos correspondientes a diferentes géneros fúngicos. Por ejemplo, el altersolanol A una antraquinona que fue capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*, es producida por hongos endófitos del género *Phoma* sp. (Yang *et al.*, 1994); mientras que el guanacastepeno un diterpeno producido por un hongo endófito no identificado, daña la membrana celular de las bacterias *E. coli imp* (Singh *et al.*, 2000). Sin embargo, hasta la fecha solo una pequeña proporción equivalente al 10 % de los hongos endófitos, han sido caracterizados. Por lo tanto, la diversidad de clases de metabolitos bioactivos producidos en sus cultivos es considerablemente alta (Hawksworth, y Rossman, 1987). Estudiar a los hongos endófitos

como fuente de compuestos antibacterianos, es prometedor para identificar nuevas clases de moléculas con potencial terapéutico (Strobel y Daysi 2003).

En el Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales (LIPM) del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Flores-Vallejo, en el año 2017, seleccionó a la planta medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth para su estudio científico, basándose en el criterio etnomédico. Aisló por primera vez hongos endófitos de diferentes tejidos de la planta. En dicho trabajo se identificaron 44 aislamientos con morfotipo productor de pigmentos, los cuales fueron capaces de producir diversas clases de metabolitos secundarios al ser cultivados *in vitro*. De los seleccionados, 13 presentaron un efecto antiinflamatorio sin diferencia significativa comparados contra la indometacina. Este trabajo se realizó en un modelo *in vitro* con células de macrófagos murinos. Considerando los usos medicinales de *C. alata*, Flores Vallejo, en 2017, mencionó que los metabolitos secundarios producidos en el endo- y exo- metaboloma de los hongos endófitos también podrían tener actividad antibacteriana (Flores-Vallejo, 2017). Continuando con las investigaciones, en el trabajo de Morales-Aguilar en el 2017, se investigó la actividad antibacteriana del endo-metaboloma de los hongos endófitos de *C. alata*. En esta investigación se identificaron extractos metanólicos de micelio que fueron capaces de inhibir hasta el 44 % el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, a una concentración de 500 µg/mL, probados en el ensayo de microdilución en placa. Flores-Arroyo en 2019, realizó un escrutinio masivo a través del ensayo de difusión en pozo en agar, e identificó que el 50 % y 52 % de los extractos del endo- y exo-metaboloma de los hongos endófitos, respectivamente, fueron capaces de inhibir el crecimiento de 4 de 7 bacterias sensibles a antibióticos, las cuales incluyen a: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhi* ATCC 6539 (Flores-Arroyo, 2019). Al caracterizar por biología molecular a los 44 morfotipos de hongos endófitos, se comprobó que pertenecen a 17 géneros (Flores-Vallejo *et al.*, 2020). Hasta ahora se ha identificado que los extractos de hongos endófitos de 11 géneros: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Periconia*, *Cercospora*, *Diaporthe*, *Trametes*, *Aureobasidium*, *Podospora*, *Xylaria*, *Cladosporium*, y *Pseudocercospora* demostraron actividad antibacteriana (Flores-Arroyo, 2019). En la presente investigación, se tuvo como objetivo evaluar la actividad

antibacteriana de los extractos de hongos endófitos de los géneros: *Periconia*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Pseudocercospora*, contra *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, así como identificar el perfil químico de los extractos mediante Cromatografía en Capa Fina, para separar y conocer el tipo de metabolitos secundarios que pueden ser responsables de la actividad antibacteriana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Bacterias que requieren nuevos antibióticos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2017, reportó un número importante de bacterias resistentes a los antibióticos, catalogándolas en tres niveles diferentes; nivel medio: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* sp., nivel elevado: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* sp., *Salmonellae* sp., *Neisseria gonorrhoeae* y nivel crítico: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (Figura 1). Actualmente las bacterias resistentes a los antibióticos causan diversas enfermedades, algunos ejemplos son: salmonelosis, gonorrea, tuberculosis, neumonía, etc. (Berrocal *et al.*, 2018; De La Rosa *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2018; Padilla-Serrano *et al.*, 2018).

Crítica	Elevada	Media
<ul style="list-style-type: none">• <i>P. aeruginosa</i>• <i>A. baumannii</i>• Enterobacteriaceae (<i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>Proteus</i> spp.) (carbapenémicos, productoras de ESBL)	<ul style="list-style-type: none">• <i>S. aureus</i> (meticilina)• <i>H. pylori</i> (claritromicina)• <i>Salmonella</i> (fluoroquinolonas)• <i>Campylobacter</i> spp. (fluoroquinolonas)• <i>N. gonorrhoeae</i> (cefalosporinas)• <i>E. faecium</i> (vancomicina)	<ul style="list-style-type: none">• <i>S. pneumoniae</i> (penicilina)• <i>Shigella</i> spp. (fluoroquinolonas)

Figura 1. Lista de bacterias patógenas resistentes a antibióticos (Adaptada de: OMS, 2017).

2.2. Generalidades sobre las bacterias.

Las bacterias son microorganismos procariontes (Figura 2), unicelulares, y que se reproducen por fisión binaria. Estos microorganismos emergieron aproximadamente hace 3 - 4 billones de años, y constituyen la forma de vida más abundante en el mundo hablando en términos de biomasa y número de especies (UNAM, 2017).

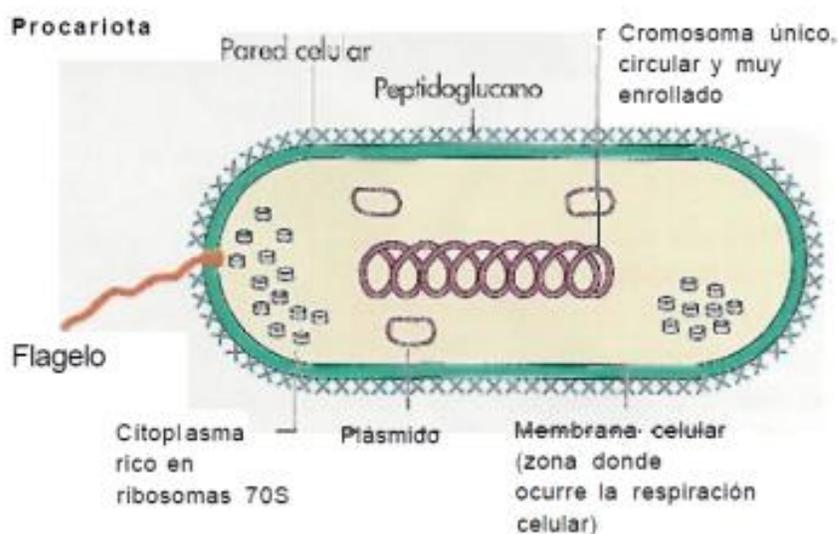


Figura 2. Célula procariota (Tomado de: Murray *et al.*, 2008).

La morfología de las células bacterianas es muy diversa, pero en general se clasifica en 7 grupos (Figura 3).

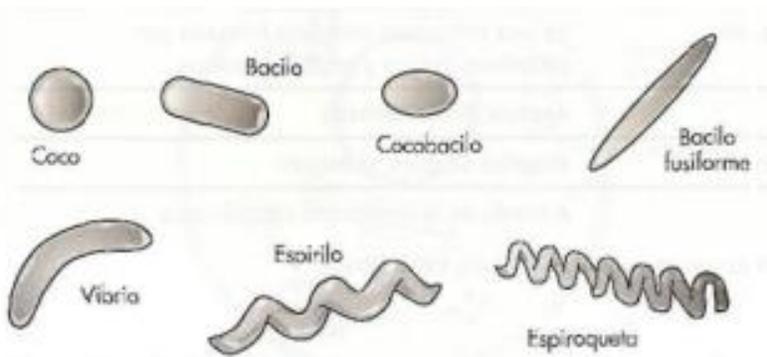


Figura 3. Morfología bacteriana (Tomado de: Murray *et al.*, 2008).

Las bacterias se conforman básicamente por: nucleoide (cromosoma bacteriano), citoplasma, y una serie de envolturas las cuales son: membrana citoplasmática, pared celular y cápsula. Poseen organelos locomotores llamados flagelos, y otros que ayudan en su adherencia; tales como el pili y las fimbrias. Existen ciertos tipos de pili relacionados con la transferencia de

material genético circular (plásmidos), a través del fenómeno de conjugación bacteriana. En la conjugación una bacteria donante pasa material genético a una bacteria receptora, el contacto se da mediante el pili (Murray *et al.*, 2008).

Para identificar a las bacterias uno de los métodos más usados es la tinción diferencial de su pared celular, descubierta por Gram en 1883. Las bacterias se dividen en Gram-positivas si se tornan de color violeta, y Gram-negativas si no asimilan el colorante básico y aparecen teñidas en color rojo (Figura 4) (del Rey Calero, 1977). En las bacterias Gram-positivas el colorante cristal violeta es fijado con una solución yodada, el colorante es atrapado en la capa gruesa de peptidoglucano. En las bacterias Gram-negativas el colorante se disemina por la membrana externa, y se elimina de la capa delgada de peptidoglucano (Murray *et al.*, 2008).

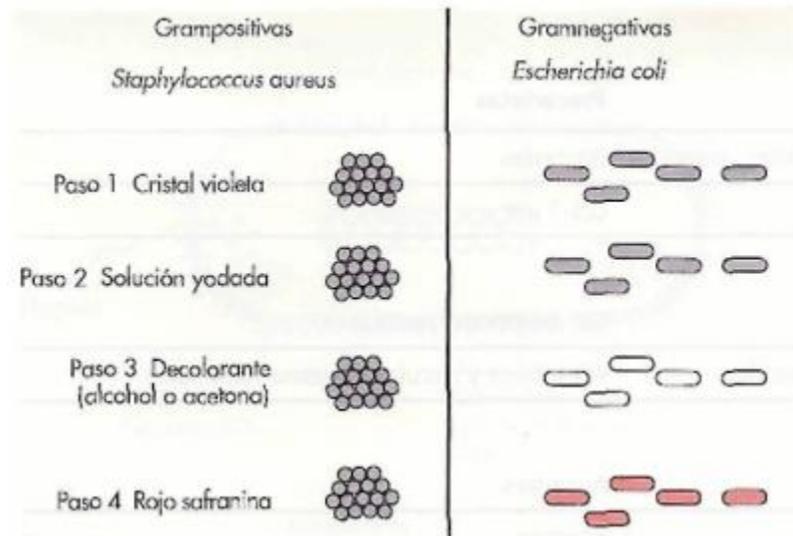


Figura 4. Tinción de Gram (Tomado de: Murray *et al.*, 2008).

La pared celular de las bacterias Gram-positivas (Figura 5), se forma principalmente por peptidoglucano, el cual rodea la membrana citoplasmática y forma una malla con función semejante al exoesqueleto de los insectos. La proporción de mureína está entre el 50 y 100% de la pared celular. La mureína de las bacterias Gram-positivas es más gruesa que la de las gramnegativas, también se constituye por ácido teicoico y ácido lipoteicoico, este último puede ser reemplazado por ácido teicurónico o residuos de N-acetilhexosamina. También está constituida por polisacáridos (del Rey Calero, 1977; Murray *et al.*, 2008). La pared

celular de las bacterias Gram-negativas (Figura 5), es más compleja ya que contiene dos capas que rodean la membrana citoplasmática. Se encuentra una capa delgada de peptidoglucano en la parte externa de la capa de peptidoglucano, la cual es exclusiva de las bacterias Gram-negativas. La zona que está entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la membrana externa es el espacio periplásmico. En ese espacio hay enzimas (proteasas, fosfatasas, lipasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de hidratos de carbono), que sirven para la degradación y metabolización de macromoléculas. La membrana externa mantiene la estructura bacteriana y funciona como una barrera impermeable a macromoléculas. La parte interna de la membrana externa contiene fosfolípidos y la parte externa está compuesta por lipopolisacáridos. Si se observa mediante un microscopio electrónico se puede observar una densa capa interna compuesta por mureína, la cual representa entre 5-20 % de la pared celular. La mureína está unida de forma covalente a unas lipoproteínas. Otro componente de la pared celular de estas bacterias son los lipopolisacáridos, los cuales contienen lípido A (del Rey Calero, 1977; Murray *et al.*, 2008).

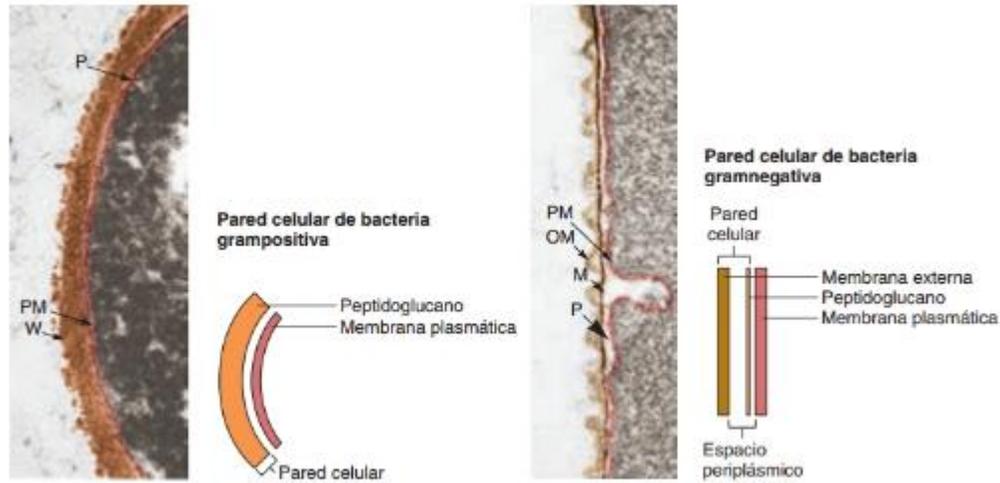


Figura 5. Diferencia entre la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

P: Espacio Periplasmático; PM: Membrana Plasmática; W: Pared de Peptidoglucano; OM: Membrana Externa; M: Capa de Mureína (Tomado de: Brooks *et al.*, 2011).

Una de las estructuras más importante es la pared celular, la cual es rígida y representa el 20% en peso seco, y resiste tanto presiones internas como externas. Los principales constituyentes de la pared celular bacteriana son:

- **Glúcidos:** Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas tienen glucidoaminas, glucosamina, galactosamina y ácido murámico. Adicionalmente las bacterias Gram-negativas tienen ácido siálico.
- **Lípidos:** Elemento importante en las bacterias Gram-negativas, ya que a diferencia de las bacterias Gram-positivas estas presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular. Estos lípidos pueden formar complejos glucidolípido-proteicos.
- **Proteínas:** En las bacterias Gram-negativas los ácidos diaminopiméricos pueden ser reemplazados por lisina en las bacterias Gram-positivas (del Rey Calero, 1977).

Se conocen 4 fases de crecimiento bacteriano, la primera de ellas es la **fase de latencia**; se caracteriza por ser una adaptación de las bacterias a las condiciones del crecimiento. En este periodo las bacterias están madurando y no tienen la posibilidad de dividirse. Otra de las fases de crecimiento es la **fase exponencial**; se caracteriza por la duplicación celular, donde el número de células de la población bacteriana se duplica en un período de tiempo. Otra es la **fase estacionaria**; en la cual la tasa de crecimiento disminuye como resultado de que los nutrientes se están agotando. La última es la **fase de muerte o disminución**; donde las bacterias se quedan sin nutrientes y comienzan a morir (Figura 6) (Murray *et al.*, 2008).

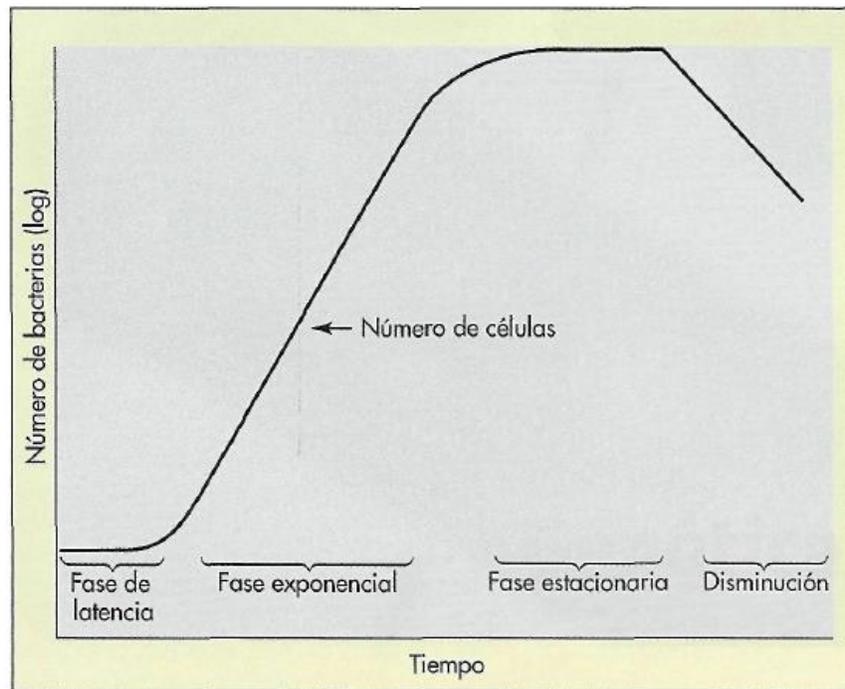


Figura 6. Fases de crecimiento bacteriano (Murray *et al.*, 2008).

Las necesidades básicas para el crecimiento bacteriano son: una fuente de carbono, nitrógeno, una fuente de energía, agua y diversos iones. Las bacterias que obtienen su energía de la oxidación de iones metálicos se conocen como quimiótrofos. Las que son dependientes de sustancias químicas inorgánicas y de una fuente de carbono (CO_2) para producir energía se denominan autótrofas (litótrofas), mientras que las bacterias que requieren fuentes de carbono orgánico se conocen como heterótrofas (organótrofas). Se pueden observar los elementos químicos que necesitan los procariontes en la Tabla 1 (Murray *et al.*, 2008).

Tabla 1. Elementos esenciales, fuentes y funciones en los procariotas (Adaptada de: Murray *et al.*, 2008).

Elemento	Fuente	Función en el metabolismo
C	Compuestos orgánicos, CO₂	Principales componentes del material celular
O	O₂, H₂O, Compuestos orgánicos	
H	H₂, H₂O, Compuestos orgánicos	
N	NH₄⁺, NO₂⁺, N₂, Compuestos orgánicos	
S	SO₄²⁻, S⁺, Compuestos de azufre orgánico	Componentes de aminoácidos azufrados, Cisteína, metionina, Coenzima A
P	HPO₄²⁻	Componente de ácidos nucleicos y fosfolípidos
K	K⁺	Principal catión orgánico, cofactor
Mg	Mg²⁺	Cofactor de muchas enzimas y componentes de membranas celulares
Ca	Ca²⁺	Componente de exoenzimas y de las paredes celulares

Las bacterias que no crecen en presencia de oxígeno se conocen como anaerobias estrictas. Por otra parte, las bacterias que requieren oxígeno para poder crecer, se conocen como aerobias estrictas. La mayoría de las bacterias puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, y a éstas se les conoce como anaerobias facultativas (Murray *et al.*, 2008).

2.3. Antecedentes históricos sobre el descubrimiento de enfermedades causadas por bacterias.

El descubrimiento de que las bacterias pueden causar enfermedades, fue realizado mediante el estudio de “la enfermedad de los cardadores de lana”, “ántrax” o “carbunco” como era conocido en 1850. El carbunco es una enfermedad padecida por animales rumiantes, tanto domésticos como salvajes, y también por las personas que entraban en contacto con ellos, los cuales presentaban síntomas principales como: fiebre, depresión, dificultad para respirar y convulsiones. Mediante estudios microscópicos de análisis de sangre de animales enfermos, se pudo observar una gran cantidad de células en forma de bacilos. En 1876 Robert Koch proporcionó la demostración de que el carbunco era causado por bacterias Gram-negativas de la especie *Bacillus anthracis*. En su experimento inyectó a ratones sanos con fluidos procedentes de un animal doméstico enfermo, los cuales posteriormente desarrollaron los síntomas de la enfermedad, y además presentaban en su sangre a las mismas bacterias (Stanier *et al.*, 1992).

2.3.1. Enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

Muchas bacterias son causantes de enfermedades infecciosas (Tabla 2), las cuales pueden ser moderadas o graves dependiendo de la virulencia de las bacterias causantes de la enfermedad (Brooks *et al.*, 2011).

Tabla 2. Enfermedades infecciosas causadas por bacterias (Tomada de: Brooks *et al.*, 2011).

Bacteria	Enfermedad
<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos
<i>Escherichia coli</i>	Enfermedades urinarias, diarrea
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones cutáneas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía
<i>klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía
<i>Enterobacterias</i>	Neumonía e infecciones urinarias
<i>Shigella sp.</i>	Diarreas
<i>Salmonella typhi</i>	Tifoidea
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis

2.3.2. Bacterias que causan enfermedades en México.

Las infecciones bacterianas prioritarias en México (por ejemplo, en vías urinarias), son causadas por: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.* y *Acinetobacter baumannii*, por ser las que presentan mayor cantidad de aislados resistentes a antibióticos, incluso algunas presentan multirresistencia (Velázquez-Acosta *et al.*, 2018). Por otra parte, estas bacterias son las que causan mayor morbi-mortalidad en México con 61,969 casos reportados de bacteremias, neumonías, e infecciones en vías urinarias de acuerdo con reportes de la Secretaría de Salud en los años 2015 y 2017. En cuanto a muertes por neumonía, el INEGI reportó 21,318 muertes. En el estado de Morelos se reportaron 20,555 casos de infecciones de vías urinarias en 2017 (Secretaría de Salud, 2017). Algunos agentes etiológicos se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Agentes etiológicos más frecuentes en infección de vías urinarias en México (Tomada de: Secretaría de Salud, 2015).

Agente etiológico	Total (N=7,157)	% 100
<i>Escherichia coli</i>	2,341	32.7
<i>Candida albicans</i>	762	10.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	757	10.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	582	8.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	395	5.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	237	3.3
<i>Candida tropicalis</i>	215	3.0
<i>Enterococcus faecium</i>	134	1.9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	119	1.7
<i>Candida glabrata</i>	87	1.2
<i>Proteus mirabilis</i>	86	1.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	75	1.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	69	0.9
Otros*	1,298	18.1

2.4. Antibiosis.

El inicio de los antibióticos comenzó cuando se descubrió la -antibiosis-. Este término fue acuñado por Vuillemin en 1890 para describir al efecto que se produce cuando dos microorganismos interaccionan, y uno de ellos es eliminado mediante sustancias tóxicas producidas por el otro microorganismo, por ejemplo, en interacciones parásitos-bacteria o en la interacción hongos-bacteria. A la antibiosis se le considera un antónimo de la simbiosis. En la investigación de componentes bactericidas se utilizaba el término antibiosis, conforme se investigaba el fenómeno de antibiosis se despertó el interés por investigar los componentes que inhibían o eliminaban a bacterias patógenas. Con estas investigaciones se comenzaron a controlar enfermedades infecciosas causadas por bacterias, por ejemplo: enfermedades gastrointestinales (Bentley y Bennett, 2003).

2.4.1. Descubrimiento del primer compuesto antibiótico.

En 1928, a Alexander Fleming tras una serie de experimentos con bacterias del género *Staphylococcus* se le atribuyó el descubrimiento del primer antibiótico (Penicilina). Fleming originalmente investigaba los compuestos de las secreciones humanas que eran capaces de inhibir el crecimiento bacteriano (ej. Lisozima). Al regresar de un periodo vacacional observó que uno de sus cultivos con bacterias del género *Staphylococcus* estaba contaminado con un moho verde, alrededor del cual no había crecimiento bacteriano, formando una especie de halo de inhibición en la periferia del micelio. Esta serendipia y el conocimiento de Fleming sobre la antibiosis lo impulsó a investigar la identidad del hongo y el compuesto químico que yacía en el jugo amarillento del moho (al que llamó penicilina). Después de lograr el aislamiento del hongo, fue identificado como *Penicillium rubrum*, de cuyos cultivos se encontraron propiedades bactericidas contra las bacterias de los generos *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus* (Fleming, 1929).

Este descubrimiento y las investigaciones impulsadas por Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey en Estados Unidos, lograron la producción industrial de la penicilina. Con ello se redujeron considerablemente el número de muertes causadas por infecciones en 1940, despertando el interés de compañías farmacéuticas para fabricar antibióticos. Por ejemplo, antes de que Fleming descubriera la penicilina no existían tratamientos contra infecciones como: la neumonía, gonorrea, etc. En 1945 se descubrió la estructura de la penicilina la cual presenta un anillo beta-lactámico (The discovery and development of penicillin, 1999).

2.5. Problema de salud pública: la resistencia a los antibióticos.

Hoy en día la resistencia que presentan las bacterias hacia los antibióticos es una problemática muy grave a nivel mundial. Las bacterias resistentes pueden afectar a cualquier persona. La resistencia a los antibióticos es por causa del uso indebido por parte de las personas, por lo que son hábitos que se tienen que mejorar si en un futuro se quiere reducir esta problemática. Van en aumento el número de infecciones causadas por bacterias, por ejemplo: neumonía, tuberculosis, gonorrea y salmonelosis. El tratamiento para estas infecciones se vuelve complicado debido a la resistencia a los antibióticos. Este problema prolonga la estancia en los hospitales, incrementa los costos médicos y aumenta la probabilidad de mortalidad (OMS, 2018).

2.5.1. Advertencia de Alexander Fleming sobre la resistencia a los antibióticos.

Alexander Fleming en su discurso de aceptación del premio Nobel en 1945, advirtió sobre la resistencia a los antibióticos, pidiendo a los médicos que administraran con mesura la penicilina. La medicina moderna a partir de las palabras de Fleming dedujo que la eficacia de los antibióticos podía llegar a su fin por la irresponsabilidad de la humanidad en la administración de antibióticos (Discurso de la directora general en la universidad de Georgetown en el marco de la *Global Futures Initiative*, 2015).

2.5.2. Surgimiento y detección de las primeras bacterias resistentes a antibióticos.

En 1946, en Inglaterra se comenzó a observar resistencia contra la penicilina en aislamientos de estafilococos, estas bacterias comenzaron a evolucionar para volverse rápidamente más resistentes. Entre 1950 y 1960 las bacterias *S. aureus* adquirieron resistencia a la mayoría de los antibióticos. Como consecuencia, además de la penicilina otros antibióticos se comenzaron a introducir al mercado europeo. En 1959 se introdujo la meticilina, pero las bacterias *S. aureus* se volvieron resistentes a este antibiótico un año después. En 1980 también en los hospitales comenzaron a brotar bacterias resistentes (Velázquez-Meza, 2005). En México, entre 1993 y 1998, se identificó una resistencia de *S. aureus* al antibiótico oxacilina. En el año 1999 la resistencia de *S. aureus* a los antibióticos fue incrementando rápidamente (Velázquez-Meza, 2005).

2.6. Agentes antibacterianos.

Son un grupo muy amplio y heterogéneo de fármacos que tienen gran eficacia en los tratamientos de las enfermedades infecciosas. Desde su descubrimiento hasta la actualidad, han sido muy importantes para tratar enfermedades provocadas por bacterias sensibles a los antibióticos (Del Arco, 2014).

2.6.1. Agentes bacteriostáticos.

Los agentes bacteriostáticos (por ejemplo: la tetraciclina), actúan inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias. Mediante la exposición a un agente bacteriostático, las células de poblaciones bacterianas susceptibles cesan su división. Sin embargo, si el agente es retirado las células vuelven a multiplicarse (Tabla 4) (Cavaliere *et al.*, 2005).

2.6.2. Agentes bactericidas.

Los agentes bactericidas como: las fluoroquinolonas; no solo actúan inhibiendo el crecimiento de las células, sino que también desencadenan mecanismos dentro de la célula que van a provocar la muerte de las bacterias. Una ventaja de los agentes bactericidas es que son irreversibles, esto quiere decir que una vez que las bacterias susceptibles son expuestas al agente bactericida, éstas mueren (Tabla 4) (Cavaliere *et al.*, 2005).

Tabla 4. Agentes antibacterianos (Adaptada de Cavaliere *et al.*, 2005)

Agente	Descripción	Referencia
Bacteriostático	Actúan inhibiendo el crecimiento y multiplicación de las bacterias.	Cavaliere <i>et al.</i> , 2005.
Bactericida	Desencadenan mecanismos dentro de la célula que van a provocar la muerte de las bacterias.	Cavaliere <i>et al.</i> , 2005.

2.7. Clasificación de los antibióticos.

Existe una amplia clasificación de los antibióticos con diferentes mecanismos de acción, desde una inhibición proteica en el caso de los aminoglucósidos hasta una fragmentación del ADN con las sulfonamidas (Calderón *et al.* 2011). En la Tabla 5 se resume la clasificación de los antibióticos.

Tabla 5. Clasificación de antibióticos (Adaptada de: Calderón *et al.*, 2011).

Familia química	Efecto	Estructura	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia de las bacterias	Referencia
Aminoglucósidos	Bactericida	Aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol).	Fijación a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano inhibiendo la síntesis proteica.	Mediado por plásmidos y pueden causar alteraciones en la permeabilidad.	Molina <i>et al.</i> , 2009; Calderón <i>et al.</i> 2011.
Rifamicinas	Bactericida	Antibióticos macrocíclicos caracterizados por tener un grupo naftohidroquinona.	Inhiben la síntesis del ADN e impiden la transcripción de la enzima ARN-polimerasa.	Mutaciones genéticas que codifican la enzima ARN polimerasa.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Trimetoprim Sulfametoxazol	Bacteriostático	Surgen de la sustitución de un átomo de hidrógeno por nuevos radicales en el grupo amida de la molécula sulfonamida.	Actúan sobre los microorganismos sensibles que están en plena fase de reproducción, por inhibición competitiva, en la síntesis del ácido para-aminobenzoico.	Impermeabilidad de la membrana bacteriana, disminución de la sensibilidad de estas enzimas a la sulfamida.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Betalactámicos	Bactericida	Presentan un anillo becalactámico.	Unión a transpeptidasas de forma covalente e impidiendo la formación de la pared celular.	Alteración en las PBPs, producción de enzimas betalactamasas y disminución del antibiótico para alcanzar el sitio blanco de las PBPs.	Suárez y Gudiol, 2009; Calderón <i>et al.</i> 2011.
Daptomicina	Bactericida	Está formada por 13 aminoácidos y una cadena peptídica lateral.	Inhibición de síntesis de proteínas y de ADN y ARN.	Tiene un mecanismo de acción novedoso y hasta el momento no se ha encontrado resistencia cruzada con otros antibióticos.	Calderón <i>et al.</i> 2011.

Cloranfenicol	Bacteriostático y bactericida	Derivado de nitrobenzeno, sustituido en la posición 4. Contiene dos grupos hidroxilo y dos átomos de cloro.	Se une a la subunidad 50S del ribosoma. Involucra la inhibición de síntesis de proteínas.	Mediante enzimas cloranfenicol acetiltransferasa, estas enzimas intracelulares logran inactivar el fármaco a través de la acetilación 3-O.	Morales <i>et al.</i> , 2007; Calderón <i>et al.</i> 2011.
Oxazolidinonas	Bactericida	Las que caracteriza a las oxazolidinonas es que presentan compuestos fluorados.	Se une al sitio 50S del ARN ribosomal bacteriano y logra evitar la unión a la subunidad 30S.	La resistencia se desarrolla de manera lenta a través de mutaciones en múltiples etapas y con una frecuencia muy baja.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Glucopéptidos	Bactericida	Los glucopéptidos son moléculas de estructura compleja que contienen un heptapéptido como estructura central.	Actúan sobre la segunda fase de la síntesis de la pared celular, inhiben la formación del peptidoglucano.	De manera general se considera que los porcentajes de resistencia es bajo mediante mecanismos alternos (bypass).	Pigrau, 2003; Calderón <i>et al.</i> 2011.
Nitrofuranos	Bacteriostático	Presentan modificaciones en las cadenas laterales.	Ingresa a la bacteria donde la enzima nitrofurano sintetasa reduce el fármaco y así tiene acción bactericida sobre ADN, ARN.	Mediante enzimas nitrofurano reductasas.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Macrólidos	Bacteriostático	Presentan un anillo lactónico macrocíclico al que tienen acoplado uno o varios desoxiazúcares o aminoazúcares.	Unión a subunidades ribosomales 50S logrando inhibir a la enzima ARN sintetasa durante la elongación de la cadena proteica.	Mediante cierre de porinas, mutación cromosómica y procesos de metilación de la adenina en la subunidad 23S ribosomal.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Lincomicinas	Bacteriostáticos	Aminoácido unido a un aminoazúcar.	Unión irreversible a las proteínas ribosomales de la subunidad 50S, causa inhibición de	Por enzimas metilasas y esterases las cuales son producidas por estas bacterias.	Prieto y Cervera, 2002;

			la síntesis de proteínas.		Calderón <i>et al.</i> 2011.
Inhibidores de β-lactamasas	Bactericida	Tienen en su estructura química el anillo β -lactámico.	Actúan uniéndose a las betalactamasas de forma irreversible.	Se ha reportado resistencia a estos antibióticos en cepas de la bacteria <i>E. coli</i> las cuales fueron aisladas de pacientes del hospital Cochin (ubicado en Francia), la resistencia a estos antibióticos es mediante la producción de enzimas TRI β -lactamasas.	Videl, <i>et al.</i> , 1992; Calderón <i>et al.</i> 2011.
Monobactámicos	Bactericida	El anillo 4 es beta-lactámico y el segundo anillo es un tiazol.	Se une a una o varias Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP), la transpeptidación durante la síntesis del peptidoglicano.	Por enzimas betalactamasas tanto plasmídicas como cromosómicas de las bacterias, principalmente en <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> .	Rivero <i>et al.</i> 1998; Calderón <i>et al.</i> 2011.
Imidazoles	Bacteriostático y bactericida	Son derivados heterocíclicos que tienen un núcleo radical NO ₂ .	Produce pérdida de la estructura helicoidal del ADN.	No reportado.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Quinolonas	Bactericida	Presenta un anillo de piridona con un grupo carboxilo libre en la posición carboxilo libre.	Inhibición la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN).	Mediante alteración de su enzima blanco: alteraciones en las subunidades de la enzima ADN girasa o de la enzima topoisomerasa IV. Las mutaciones en gyr A, el gen que codifica la subunidad A del la ADN-girasa, es el mecanismo más común en las bacterias Gram-negativas;	Talero-Pérez <i>et al.</i> , 2014.

				mientras que las mutaciones en el par C, el gen que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV, es el mecanismo más frecuente.	
Daptomicina	Bactericida	Formado por 13 aminoácidos y una cadena peptídica lateral.	Inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y ARN.	Se ha reportado resistencia a daptomicina en cepas de bacterias <i>Enterococcus faecium</i> aislados de pacientes con síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria, el mecanismo no fue descrito. La resistencia a la daptomicina es muy baja alrededor de 0.7%.	Montero, <i>et al.</i> , 2008, Calderón <i>et al.</i> , 2011.
Sulfonamidas	Bacteriostático	N-derivados de la (sulfanilamida). El átomo de nitrógeno amídico esta sustituido por sulfadiazina.	Inhibición de la producción del ácido fólico, necesario para la síntesis de ADN.	Mediante mutaciones cromosómicas en ciertos genes como Sul1 y Sul2 los cuales son mediados por transposones o plásmidos, estos genes tienen la capacidad de expresar enzimas dihidropteroato sintasas las cuales son clave en la resistencia a las sulfonamidas.	Talero-Pérez <i>et al.</i> , 2014; Sköld, 2001.

Fosfomicina	Bactericida	Derivados del ácido propiónico, un epóxido y tienen una unión directa entre el carbono y el fósforo.	Impide la acción de la enzima piruvil transferasa, la cual cataliza la primera reacción en la síntesis de la pared celular.	Se ha reportado resistencia <i>in vitro</i> a la fosfomicina en bacterias <i>E. coli</i> mediante mutaciones cromosómicas, la absorción de la fosfomicina es mediada por sistemas por el sistema GlpT permeasa, este sistema es regulado positivamente por Camp y puede disminuir por mutación en los genes ptsI or cyaA.	Silver, 2017; Calderón <i>et al.</i> , 2011.
Tetraciclinas	Bacteriostático	Contienen un anillo de naftaleno de cuatro átomos.	Impide la asociación entre el aminoacil ARNt con el ribosoma bacteriano, inhibe la síntesis de proteínas.	Inhiben el transporte del fármaco al interior de las bacterias o una mayor salida del antibiótico de la célula a su entorno, por lo que es imposible llegar a su sitio de acción en el citoplasma bacteriano, existe resistencia cruzada con casi todas las tetraciclinas.	Eliopoulos <i>et al.</i> , 2003; Calderón <i>et al.</i> , 2011.
Penicilinas	Bactericida	Poseen un núcleo químico, el anillo 6-aminopenicilánico y difieren según su cadena lateral unida a su grupo amino.	Atraviesan las porinas de la bacteria para poder unirse a las proteínas fijadoras de penicilina, llamadas PBPs (Penicillin Binding Proteins), las cuales están implicadas en la síntesis y maduración de los peptidoglicanos	Mediante el cierre de porinas de la pared bacteriana, mediante la modificación de las PBPs y por medio de enzimas betalactamasas.	Calderón <i>et al.</i> , 2011.

			que conforman la pared celular bacteriana.		
Carboxipenicilinas	Bactericida	Betalactámicos que contienen ácido 6-aminopenicilánico.	Atraviesan las porinas de la bacteria y se unen a las proteínas fijadoras de penicilina, llamadas PBPs.	Tanto las carboxipenicilinas y ureidopenicilinas tienen vulnerabilidad a algunas enzimas betalactamasas.	Calderón <i>et al.</i> 2011.
Isoxazolilpenicilinas	Bactericida	La estructura de la molécula de la dicloxacilina presenta dos radicales (R y R1) los cuales son ocupados por dos moléculas de cloro.	Se une a las PBP y altera la síntesis de la estructura de la pared celular.	Puede ser mediante la ruptura del anillo betalactámico o mediante alteraciones en los sitios blanco de las PBPs sobre los que actúan.	Calderón <i>et al.</i> , 2011.
Carbapenémicos	Bactericida	Presentan átomos de carbono en la posición 1 en lugar de átomos de azufre.	Interfieren en la tercera fase de la síntesis de dicha pared celular, provocado lisis celular.	Son muy resistentes a la hidrólisis de las enzimas betalactamasas y la excepción serían las que contienen zinc (carbapenemasas) y que son producidas principalmente por las bacterias <i>Xanthomonas maltophilia</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> y en raras ocasiones en otras especies bacterianas.	Calderón <i>et al.</i> , 2011.

2.8. Métodos para evaluar actividad antibacteriana.

Existen distintos métodos para la evaluación de extractos producidos por plantas o por microorganismos (por ejemplo, hongos endófitos). Algunos de los más utilizados son: difusión en disco, E-test, macrodilución, microdilución, bioautografía directa, bioautografía por contacto y bioautografía por superposición (Herrera, 1999; Balouiri *et al.*, 2016).

2.8.1. Difusión en disco.

Esta técnica determina la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. La técnica comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a diferentes antibióticos. Sobre la superficie de una placa con Agar Müller-Hinton (medio de cultivo diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad), se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas de forma uniforme. Posteriormente se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. La elección de los antibióticos a probar dependerá de la bacteria que se quiere analizar. El antibiótico difundirá desde el papel filtro hacia el agar de forma radial. Se incuba la placa durante 18-24 horas a 37 °C y finalmente se miden los halos de inhibición interpretándolos de acuerdo con tablas de la CLSI. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente Sensible (I) y Resistente (R) (CLSI, 2000).

2.8.2. E- test (Epsilon Test).

E-Test es un método de laboratorio que se usa por microbiólogos para poder determinar una cepa específica de una bacteria o un hongo susceptible a la acción de antibióticos específicos. Se basa en el método de difusión en agar siguiendo los mismos pasos básicos; se usa una tira rectangular impregnada con el antibiótico a evaluar. La cepa de la bacteria se hace crecer uniformemente en un medio (por ejemplo: AMH) en una caja Petri. Posteriormente la tira se pone sobre el medio; el antibiótico difunde al agar, produciendo un gradiente. Después de 24 horas de incubación se crea un halo de inhibición elíptico, el punto en que se intercepten, será la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del antibiótico y esta marcado a una escala exponencial en la tira (Herrera, 1999).

2.8.3. Macrodilución.

Este método es similar a la microdilución, solo que la macrodilución utiliza tubos de ensayos en los cuales se agrega el cultivo con la bacteria a evaluar a escala McFarland. Posteriormente se agrega el antibiótico que se quiere evaluar a diferentes concentraciones de manera decreciente. En forma periódica se deben realizar recuentos de las colonias para verificar la Concentración Mínima Inhibitoria. (CLSI, 2000).

2.8.4. Microdilución.

En la microdilución se utilizan placas de 96 pozos donde se coloca el cultivo bacteriano a escala McFarland, se agregan diferentes concentraciones del antibiótico a evaluar en forma decreciente. Se puede utilizar cloruro de tetrazolio o resazurina como indicadores de viabilidad para calcular la CMI (CLSI, 2000).

2.8.5. Bioautografía por contacto.

Este método se puede emplear para ensayos de actividad antibacteriana. Se utiliza Agar Muelles Hinton con cultivo bacteriano a escala McFarland. Una vez que el agar solidifica, se pone en contacto por 15-20 minutos con una placa TLC en la cual están aplicados los antibióticos o extractos que se quieren evaluar, se hace una incubación que es normalmente a 37°C durante 24 horas, finalmente se miden los halos de inhibición (Naveed *et al.*, 2013).

2.8.6. Bioautografía directa.

La bioautografía directa es un método que se puede utilizar para ensayos de actividad antibacteriana, el cual es basado en la utilización de placas TLC en las cuales se aplican los antibióticos o extractos que se quieren evaluar. Posteriormente esa placa se sumerge 10-15 segundos en un cultivo bacteriano a escala McFarland. La TLC se introduce en una caja Petri y se incuba a 37°C durante 24 horas. A seguir se asperja la placa TLC con resazurina o cloruro de tetrazolio y se hace otra incubación que puede variar de entre 2 a 16 horas. Finalmente se miden los halos de inhibición (Horváth *et al.*, 2010).

2.8.7. Bioautografía por superposición.

Este método es una buena opción para separar los componentes presentes en un extracto activo producido por alguna planta o microorganismo. Al igual que con los métodos anteriores se utilizan placas TLC donde se aplican los antibióticos o extractos que se quieren evaluar. Esta placa se introduce a una caja Petri y se agrega el inóculo, el cual es el cultivo bacteriano a escala McFarland. Cuando el medio de cultivo (por ejemplo: AMH) solidifica, la caja Petri se incuba durante 8 horas a 4 C°- 8 °C. Posteriormente se hace otra incubación

que normalmente es a 37 °C en intervalos de tiempo que varían de 2 a 24 horas. Finalmente se miden los halos de inhibición (Yashavantha *et al.*, 2015).

2.9. Estandarización de Bioautografía.

Existen 3 métodos de bioautografía: bioautografía por contacto, bioautografía directa y bioautografía por inmersión o superposición en agar (que es la combinación de la bioautografía por contacto y la bioautografía directa). En primer lugar, se hizo una amplia búsqueda sobre los diferentes métodos de bioautografía, principalmente los utilizados en ensayos de actividad antibacteriana para saber cuál es el más utilizado (Tabla 6).

Tabla 6. Métodos de bioautografía publicados en artículos científicos.

Método	Inóculo bacteriano	Tiempo de contacto con el inóculo	Tiempo de incubación con el inóculo	Indicador de viabilidad	Tiempo de incubación con el indicador de viabilidad	Referencia
Bioautografía directa	10 ⁴ UFC/mL	N/A	24 horas	1 mg/mL cloruro de trifetil tetrazolio	24 horas	Sartoratto <i>et al.</i> , 2004
Bioautografía directa	10 ⁹ UFC/mL	5 segundos	24 y 48 horas	0.2, 1 y 5 mg/mL violeta <i>p</i> -iodonitrotetrazolio	4 horas	Valgas <i>et al.</i> , 2007
Bioautografía por superposición en agar	10 ⁸ UFC/mL	N/A	24 horas	2 mg/mL violeta <i>p</i> -Iodonitrotetrazolio	N/A	Nostro <i>et al.</i> , 2000
Bioautografía por superposición en agar	1,5 x 10 ⁷ UFC/mL	N/A	12 horas aproximadamente	N/A	N/A	Nogueira <i>et al.</i> , 2007
Bioautografía por contacto	S/D	N/A	24 horas	1.6 mg/30 mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	24 horas	Naveed <i>et al.</i> , 2013
Bioautografía directa	4 x 10 ⁷ UFC/mL	10 segundos con 50	17 horas	Se sumergieron 10 s con 1.6 mg/mL bromuro de 3-	4 horas a 37°C	Horváth <i>et al.</i> , 2010

		mL de inóculo y se dejó secar 2 min.		(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio		
--	--	--------------------------------------	--	---	--	--

N/A: No Aplica S/D: Sin Datos

Tabla 6. (Continuación)

Método	Inóculo bacteriano	Tiempo de contacto con el inóculo	Tiempo de incubación con el inóculo	Indicador de viabilidad	Tiempo de incubación con el indicador de viabilidad	Referencia
Bioautografía directa	S/D	S/D	22 horas a 37 °C	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	30 minutos a temperatura ambiente	Choma, 2005
Bioautografía por superposición en agar	S/D	N/A	24 horas a 37 °C	1 mg/mL de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	24 horas a 37°C	Yashavantha <i>et al.</i> , 2015
Bioautografía por superposición en agar	1.5 x 10 ⁸ UFC/mL	N/A	18-24 horas después de permitir la difusión de los tratamientos durante 30 min.	N/A	N/A	Purwantini <i>et al.</i> , 2015
Bioautografía por superposición en agar	S/D	N/A	24 horas a 37 °C después de permitir la difusión de los tratamientos durante 10 horas a 8 °C	1 mg/mL de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	24 horas a 37°C	Rakshith <i>et al.</i> , 2013
Bioautografía directa	S/D	S/D	12 horas a 28°C	0.5 mg/mL de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio	2 horas	Shan <i>et al.</i> , 201

N/A: No Aplica S/D: Sin Datos

2.10. Métodos para identificar parcialmente grupos de metabolitos antibacterianos.

Existen diferentes tipos de cromatografía, los cuales ayudan a separar diversos tipos de componentes producidos por plantas y microorganismos. Algunos de los más utilizados son los siguientes:

2.10.1. Cromatografía en papel.

Este tipo de cromatografía es de las más utilizadas en los laboratorios para poder realizar análisis cualitativos, es relativamente sencilla. Se utiliza una fase estacionaria que es una tira de papel filtro. Se emplea una fase móvil, puede ser un solvente como cloroformo o metanol. Por último, el solvente utilizado como fase móvil se hace ascender por capilaridad. La separación se realiza en función de la afinidad de los solutos con las dos fases. Las que sean mas solubles en agua se van a quedar cerca del punto donde se aplicó la muestra, las menos solubles en agua pero más solubles en el solvente, llegarán más lejos (Técnicas cromatográficas, 2007).

2.10.2. Cromatografía en Capa Fina.

Consiste en una capa absorbente de sílica sobre placas de diferentes materiales como: aluminio, vidrio u otro soporte, que es la fase estacionaria; también se utiliza una fase móvil líquida como el cloroformo y el metanol. La fase estacionaria es polar y el eluyente tiene que ser menos polar que la fase estacionaria, de modo que los componentes con menor polaridad son los que van a eluir más rápido (Técnicas cromatográficas, 2007).

2.10.3. Cromatografía en Columna Abierta.

En esta cromatografía la fase móvil es un líquido, el cual puede ser una combinación de solventes como: acetato de etilo, éter de petróleo, metanol, etc., los cuales van a descender por una columna de vidrio que debe ser empaquetada con un soporte sólido. Este material varía, pero se puede utilizar sílice, alúminas, y resinas de intercambio ionico. La diferente capacidad de los solventes para eluir un soluto es independiente de la naturaleza del soluto, cuando sea mayor la fuerza del eluyente del solvente, más rápidamente se eluiran los solutos de la columna (Técnicas cromatográficas, 2007).

2.11. Fuentes de productos antibacterianos.

Existen fuentes naturales productoras de metabolitos secundarios, por ejemplo: las plantas silvestres; o bien el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Mediante estas últimas se pueden desarrollar nuevas alternativas para obtener metabolitos de interés farmacológico, utilizando el cultivo *in vitro* como fuente alternativa para la producción de compuestos activos. Se ha tratado de optimizar diferentes técnicas con la finalidad de aumentar la producción de metabolitos secundarios, que incluso ha permitido el descubrimiento de nuevas moléculas para tratar enfermedades, estas se podrían usar en la industria farmacéutica y biotecnológica (Pérez, 2011).

Una fuente alternativa de metabolitos secundarios que se ha investigado recientemente son los endófitos de origen bacteriano o fúngico. Pueden pasar la totalidad o parte de su ciclo de vida en forma intracelular o intercelular en los tejidos de la planta huésped. Los hongos endófitos producen gran variedad de metabolitos secundarios de interés farmacéutico y biotecnológico (Tan y Zou, 2001).

2.11.1. Plantas.

Las plantas son organismos fotosintéticos, no tienen capacidad locomotora, y su pared celular se compone principalmente de celulosa. Estos organismos son una fuente importante de compuestos antibacterianos. Las plantas medicinales son una de las principales fuentes de metabolitos secundarios que pueden usarse para producir antibióticos. En México existe gran variedad de plantas medicinales, que todavía son utilizadas por la población para tratar diversas enfermedades. Aproximadamente 343 plantas medicinales mexicanas cuentan con estudios científicos sobre su actividad antibacteriana *in vitro*, de las cuales se han identificado compuestos efectivos contra bacterias sensibles y resistentes a fármacos (Sharma *et al.*, 2017).

En México se conocen más de 6,000 especies de plantas medicinales (Villarreal *et al.*, 2014), muchas de éstas se usan para estudios de actividad antibacteriana, por ejemplo: extractos de la planta *Crescentia alata* Kunth (Morales-Aguilar, 2017).

El estado de Morelos es rico en plantas medicinales, que son usadas por la población independientemente de los recursos económicos que posean. La diversidad vegetal en

Morelos se basa en aspectos etnobotánicos, fitoquímicos, y farmacológicos. La flora medicinal está representada por aproximadamente 821 especies.

2.11.2. Microorganismos endófitos.

En el artículo de Sánchez-Fernández y colaboradores del 2013, se menciona la importancia de los microorganismos endófitos a partir de su descubrimiento en sus plantas hospederas. Va desde una actividad antifúngica, antiviral, antiinflamatoria y antibacteriana etc. Se han descubierto componentes producidos por hongos endófitos tales como: alcaloides, terpenos y compuestos aromáticos. Hoy en día se busca investigar con más detalle a los hongos endófitos, ya que son una fuente importante de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Rajamanikyam *et al.*, 2017).

2.11.2.1. Generalidades sobre los hongos endófitos.

Los microorganismos endófitos son mayoritariamente hongos y bacterias que viven de manera intra o intercelular en los tejidos de sus plantas hospederas, sin causar daño aparente o síntomas de enfermedad (Martinez-Klimova, 2017). Estos microorganismos están estrechamente relacionados con su planta hospedera. Los hongos endófitos son capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos, lo que permite la supervivencia de ambos organismos. La planta hospedera le proporciona nutrición y alojamiento a su huésped, y los hongos endófitos (huésped), le proporcionan protección contra microorganismos patógenos. Los hongos endófitos son de gran interés, ya que son capaces de producir componentes novedosos (Sánchez-Fernández *et al.* 2013).

2.11.2.2. Hongos endófitos como alternativa biotecnológica.

En el artículo de revisión de Sánchez-Fernández y colaboradores del 2013, se menciona la importancia de los microorganismos endófitos desde su descubrimiento en sus plantas hospederas. Varios aislados de endófitos presentan diversas actividades biológicas, tales como: antifúngica, antiviral, antiinflamatoria y antibacteriana, etc. Se han descubierto componentes producidos por hongos endófitos como: alcaloides, terpenos y compuestos aromáticos. Hoy en día se busca profundizar en las investigaciones acerca de los hongos

endófitos, pues representan una fuente importante de metabolitos secundarios novedosos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Rajamanikyam *et al.*, 2017).

En los últimos 20 años la investigación de hongos endófitos ha aumentado debido a que son capaces de producir *in vitro* metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas. Es por eso que se considera que los hongos endófitos podrían utilizarse como herramienta biotecnológica en la identificación y producción de nuevos antibióticos, sin comprometer la prevalencia de su planta hospedera (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

2.11.2.3. Descubrimiento de los hongos endófitos.

En los años 80's se descubrieron los hongos endófitos (Guerin, 1898). Existen varias definiciones sobre los microorganismos endófitos (Stone *et al.*, 2000), pero en el presente trabajo se utilizará la definición de Wilson, que define a los endófitos como microorganismos (bacterias y hongos) que habitan dentro de los tejidos de su planta hospedera y aparentemente no le causan daño (Wilson, 1995).

2.11.2.4. Localización de los hongos endófitos.

Los hongos endófitos pueden habitar intracelularmente, intercelularmente o ambas. Habitan dentro de diferentes tejidos de las plantas como: hojas, tallo, raíz y ramas (Figura 7).

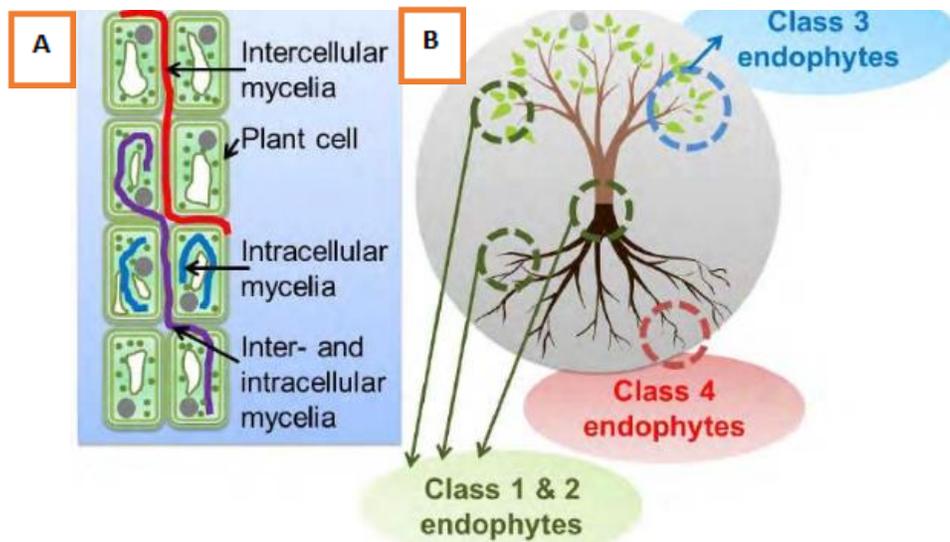


Figura 7. Clasificación y localización de endófitos. A) se muestra donde se pueden localizar los hongos endófitos en su planta hospedera a nivel celular. B) Localización de endófitos en diferentes partes de la planta. (Tomado de: Kusari y Spiteller, 2012b).

2.11.2.5. Diversidad y clasificación de hongos endófitos.

Se estiman entre 1.3 y 1.5 millones de especies de hongos endófitos (Rosa *et al.*, 2011), los cuales se encuentran en diferentes partes de la planta hospedera. Los hongos endófitos se dividen en Claviceptáceos y no Claviceptáceos (Tabla 7) (Rodríguez *et al.*, 2009).

Tabla 7. Clasificación de los hongos endófitos (Tomada de: Sánchez Fernández *et al.*, 2013).

Criterio	Clavicipitáceos	No Clavicipitáceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión*	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros
*Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.				

2.11.2.6. Modo de transmisión de los hongos endófitos.

Los hongos endófitos se transmiten por varios mecanismos. Va a depender del entorno donde se encuentren, el género, y la especie de los hongos endófitos. Se pueden transmitir asexualmente por transmisión vertical mediante hifas, y también sexualmente por transmisión vertical u horizontal vía esporas. (Saikkonen *et al.*, 2004).

2.11.2.7. Importancia de los hongos endófitos.

Desde el pasado se ha recurrido a las plantas medicinales como fuente natural de componentes bioactivos para producir medicamentos. Los componentes bioactivos de las plantas medicinales son utilizados en farmacología y biotecnología para producir medicamentos. Sin embargo, éstas no son las únicas que producen este tipo de sustancias, también las producen los insectos, las bacterias, y los hongos endófitos (Tan y Zou, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Packiaraj *et al.*, 2016).

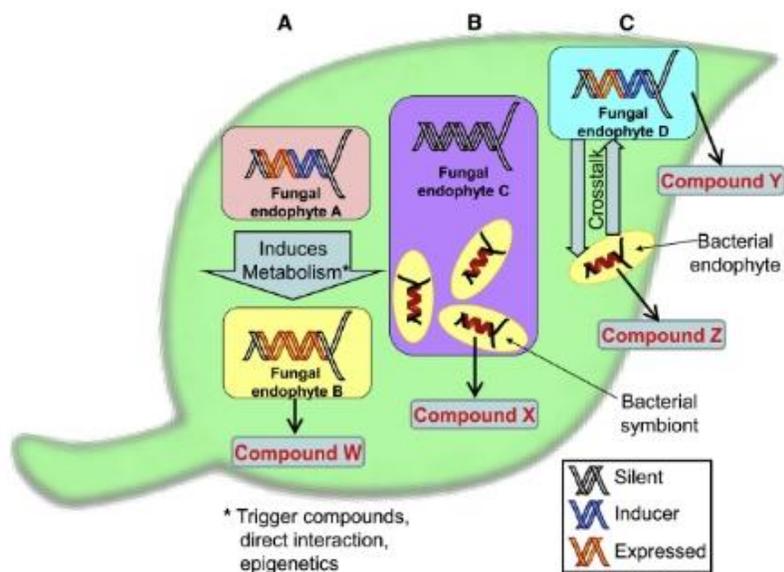


Figura 8. Representación de componentes producidos por endófitos.

- a) Interacción hongo-hongo b) Interacción hongo-bacteria c) Interacción hongo-bacteria. (Tomada de: Kusari *et al.*, 2012a).

Hoy en día más de la mitad de los medicamentos que se han generado fue gracias a sustancias secretadas por las plantas medicinales, sin embargo, la naturaleza es tan inmensa que existen otros seres (hongos endófitos) que producen componentes bioactivos. Cabe destacar que muchos de esos componentes aún no han sido investigados (Callies, 2011). La investigación de los componentes bioactivos producidos por hongos endófitos aumentó cuando los investigadores se dieron cuenta que estos microorganismos son capaces de producir el Taxol, el cual es un medicamento usado para tratar diferentes tipos de cáncer (Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1996; Weaver, 2014).

En el año 1993, Stierle y colaboradores, demostraron que de 200 microorganismos aislados de la corteza interna de la planta *Taxus brevifolia*, el hongo endófito *Taxomyces andreanae* fue el único capaz de producir Taxol® (paclitaxel); después de 3 semanas de cultivarlo en el laboratorio. El paclitaxel fue identificado por cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta presión y espectroscopia de masas. *Taxomyces andreanae* fue capaz de producir 24-50 ng de Taxol por litro de cultivo. Además, en 1996, Strobel y colaboradores identificaron al hongo endófito *Pestalotiopsis microspora* aislado de la corteza interna de la

planta *Taxus wallachiana*. El cultivo del micelio de este hongo fue capaz de producir Taxol a partir de las dos semanas de cultivo. La cantidad de Taxol que produce *P. microspora* es de 60-70 ug/L.

2.11.2.8. Interacción planta hospedera-hongo endófito.

En el año de 1994, Yang y colaboradores sugirieron que la interacción entre la planta hospedera y los hongos endófitos es mutualista. Los hongos endófitos no invaden a la planta de una manera que la perjudique. Además, estos investigadores hipotetizaron que la planta hospedera le proporciona protección a los hongos endófitos, y estos últimos la protegen de infecciones patogénicas mediante la producción de componentes bioactivos antimicrobianos. Se dice que la interacción simbiótica (Saikkonen *et al.*, 2004) entre los endófitos y su planta hospedera es de tipo mutualista antagonista (Saikkonen *et al.*, 1998; Faeth, 2002; Rajamanikyam *et al.*, 2017). Por ejemplo, en 2012 Kusari y colaboradores mencionan que mientras la carga de microorganismos (bacterias, hongos) se mantenga balanceada resultará en un antagonismo que beneficiara a ambos (Figura 9). Se ha deducido entonces que los hongos endófitos defienden a su planta hospedera de microorganismos patógenos (Carroll, 1988; Arnold *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008).

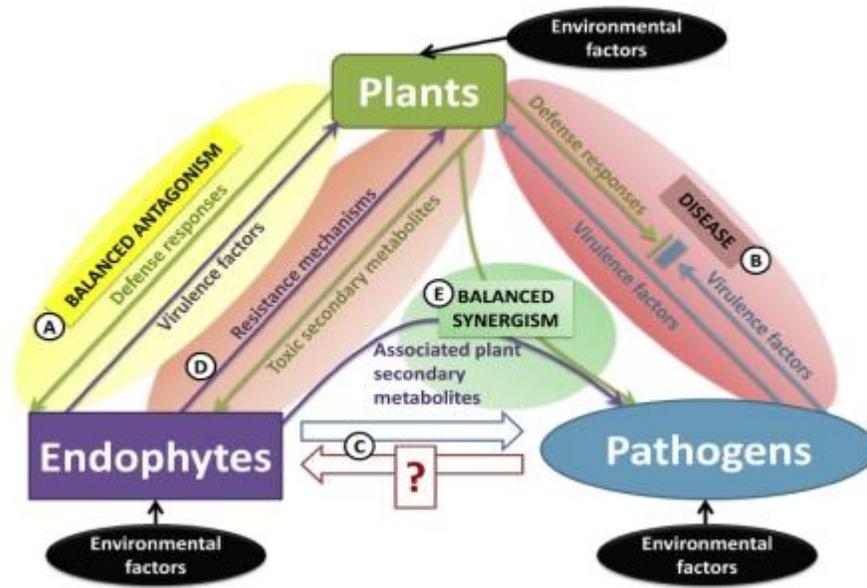


Figura 9. Interpretación del costo-beneficio entre las interacciones de la planta-microorganismo endófito (Tomado de: Kusari *et al.*, 2012a).

Algo interesante es que se creía que los componentes producidos por las plantas eran exclusivamente sintetizados por las especies vegetales (tal fue el caso de las fitohormonas giberilinas), pero de hecho también pueden ser producidas por microorganismos endófitos. En los últimos 10 años se ha hecho el esfuerzo de identificar nuevos metabolitos secundarios producidos por endófitos, y que tengan actividad antibacteriana (Kusari *et al.*, 2012ab). Arnold y colaboradores, en 2003, demostraron que en las hojas de la planta *Theobroma cacao* hay hongos endófitos (hasta en el 100 % de las hojas maduras). De 126 muestras de hojas se encontraron 1,172 microorganismos endófitos. El microorganismo más frecuente en estas hojas fue el hongo endófito *Colletotrichum* sp. (71.9 ± 6.8 % de las hojas). Las hojas infectadas por el patógeno *Phytophthora* sp. que carecen de endófitos mueren 2.8 veces más rápido que las hojas inoculadas con hongos endófitos de los géneros: *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Nectria* sp. y *Xylaria* sp.

2.11.2.9. Efecto antagónico de los hongos endófitos.

Se ha reportado un efecto antagónico entre los hongos endófitos *Hyphomycetes* sp. aislados de la raíz y la corteza de la planta *Taxus globosa*, contra hongos patógenos (*Fusarium* sp. y *Alternaria* sp.) aislados del chile *Capsicum annuum*. En esta investigación se observó que a partir del tercer día de confrontación, las cepas endófitas de *Hyphomycetes* sp (KG10, KG21, KG41, KG45, KG47, KG61, KG72) inhiben entre 42 -50 % el crecimiento de los dos hongos patógenos *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp (Vásquez *et al.*, 2016).

2.11.2.10. Complicaciones del uso de hongos endófitos como productores de metabolitos antibacterianos.

Hay que considerar que puede ser complicado trabajar con microorganismos endófitos, tenemos que tener en cuenta ciertos aspectos, por ejemplo, los hongos endófitos necesitan mantener ciertas condiciones de cultivo (como temperatura, pH, oscuridad, etc.) (Saikia y Bezbaruah, 2008). Se necesita optimizar las condiciones adecuadas para la producción de metabolitos (Kusari *et al.*, 2012). También es recomendable encontrar un método de preservación adecuado (Nakasone *et al.*, 2004). Un aspecto a considerar, es que al cultivar a los hongos endófitos de manera *in vitro*, pueden dejar de producir metabolitos con actividad antibacteriana (Kusari y Spiteller, 2011).

2.11.2.11. Estrategias para que los hongos endófitos vuelvan a producir componentes con actividad antibacteriana.

Una de las estrategias más utilizadas para lograr que los microorganismos endófitos vuelvan a producir componentes con actividad antibacteriana es el co-cultivo. Se basa en cultivar en una misma placa Petri al hongo endófito que mostró actividad antibacteriana, y también cultivar a las bacterias con las cuales ese hongo endófito tuvo actividad, de tal manera que las bacterias estimulen al hongo endófito a producir componentes con actividad antibacteriana (Marmann *et al.*, 2014).

2.11.2.12. Hongos endófitos aislados de plantas medicinales mexicanas.

Se ha investigado a la planta medicinal *Hamelia patens* Jacq. para aislar hongos endófitos. En esta investigación se clasificaron los siguientes géneros de hongos endófitos: *Acremonium*, *Coelomyces*, *Phoma*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Macrophoma* (Gómez *et al.*, 2015).

Se ha reportado diversidad de hongos endófitos en la planta *Taxus globosa* por Rivera-Orduña y colaboradores en el 2011. De la corteza, rama, hoja y raíz de esta planta se aislaron los siguientes hongos endófitos: *Alternaria* sp., *Annulohyphoxylon* sp., *Aspergillus* sp., *Cercophora* aff. *Mirabilis*, *Cercophora mirabilis*, *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Conoplea fusca*, *Daldinia eschscholzii*, *Daldinia* sp., *Hypocrea jecorina*, *Hypoxyton* sp., *Lecythophora* sp., *Letendrea helminthicola*, *Massarina igniaria*, *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Phialophorophoma litoralis*, *Phoma medicaginis*, *Pleosporomycetidae*, *Sporormia lignícola*, *Trichophaea abundans*, *Xylariaceae*, *Xylaria cubensis*, *Xylaria juruensis*, *Xylomelasma*, *Coprinellus domesticus*, *Polyporus arcularius*, *Trametes elegans*. Además, en esta investigación se realizó un árbol filogenético que representa la gran diversidad de hongos endófitos en la planta medicinal mexicana *Taxus globosa*, la cual fue colectada en la sierra alta localizada en el estado de Hidalgo (Rivera-Orduña *et al.*, 2011).

2.11.2.13. Metabolitos secundarios bioactivos producidos por hongos endófitos.

Se identificó el componente 2 α -Hidroxidimeninol por difracción de rayos X, es producido por hongos endófitos *Pestalotiopsis* sp. aislados de las hojas de *Taxus* sp. (Pulici *et al.*, 1996a). En ese mismo año, Pulici y colaboradores también identificaron a los componentes pestalotiopsina A y pestalotiopsina B, los cuales son producidos *Pestalotiopsis* sp. Fueron aislados de las hojas de *Taxus brevifolia*. Los componentes se identificaron por difracción de rayos X.

Se han reportado diferentes componentes de los cuales muchos de ellos son producidos por hongos endófitos, algunos ejemplos son: alcaloides, esteroides, terpenoides, diterpenos, quinonas, flavonoides, péptidos, compuestos alifáticos, cromonas, benzofuranonas, cumarinas, ergosteroles, benzofenonas. derivados de ciclohexano, heteropolisacaridos, fenoles, ácidos fenólicos, lactonas. Estos componentes poseen actividades biológicas como: antifúngica, antiparasitaria, antiviral, antitumoral, antioxidante, antiinflamatoria y muchos de

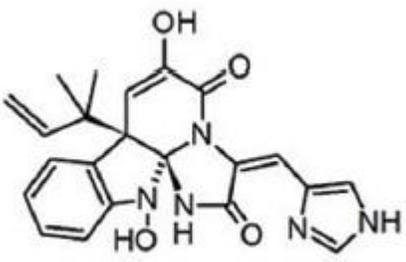
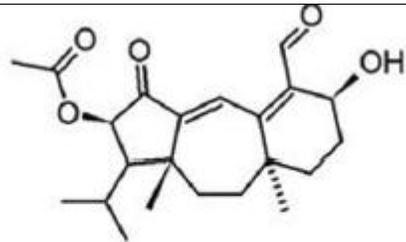
ellos actividad antimicrobiana (Tan y Zou, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Packiaraj *et al.*, 2016; Rajamanikyam *et al.*, 2017).

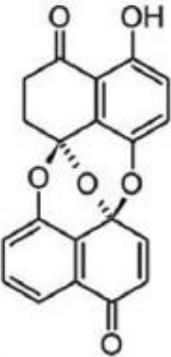
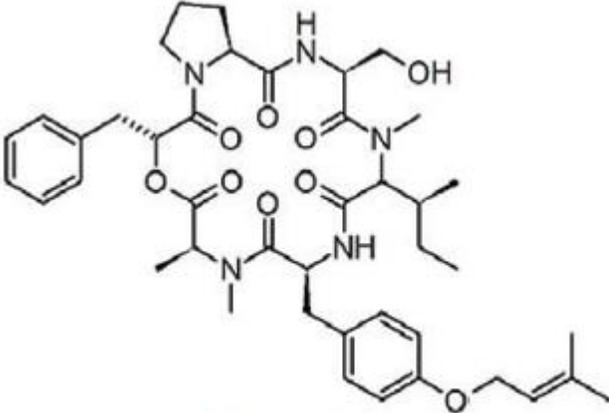
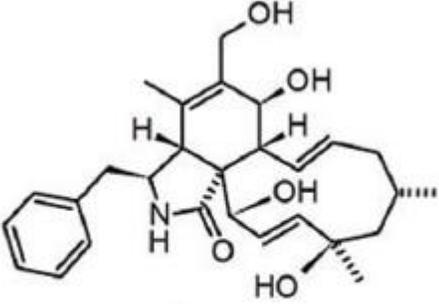
En 1992, Calhoun y colaboradores identificaron de hongos endófitos *Phyllosticta* sp. aislados de *Abies balsamea* los componentes: ácido heptelídico, ácido clorhidrina y ácido hidroheptelídico; estos componentes fueron purificados del extracto de micelio de *Phyllosticta* sp. por medio de cromatografía en capa fina.

Li y colaboradores, el año 2007, identificaron a partir de los hongos endófitos *Pestalotiopsis theae* los componentes pestaloteolos A, B, C y D. Estos fueron identificados por RMN y posteriormente fueron confirmados por cristalografía de rayos X.

En la Tabla 8 se puede observar algunos ejemplos de componentes producidos por hongos endófitos. También se puede apreciar sus diferentes funciones biológicas:

Tabla 8. Ejemplo de metabolitos secundarios con actividad biológica, producidos por hongos endófitos (Adaptada de: Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Hongo endófito/Planta Hospedera	Metabolito Secundario	Actividad Biológica
<i>Penicillium</i> sp. (Trichocomaceae). Endófito de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae)	 <p>Glandicolina B⁶⁰ Alcaloide α-carbolinico.</p>	Antimicrobiana
Hongo CR115 no identificado Endófito de <i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae)	 <p>Guanacastepeno.⁶⁷ Diterpeno (guanacastano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p>	Antibacteriana

<p><i>E. gomezpompae</i> (Pleosporaceae). Endófito de <i>C. acuminata</i> (Verbenaceae).</p>	 <p>Preusomerina EG₁.²⁵ Bisnaftoespirocetal.</p>	<p>Antifúngico</p>
<p><i>Pullularia</i> sp. BCC 8813 (Dothioraceae). Endófito de <i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae).</p>	 <p>Pulularina A.⁶³ Depsipéptido.</p>	<p>Antiviral/Antiplasmó dio</p>
<p><i>Endothia gyrosa</i> IFB-E023 (Cryphonectriaceae). Endófito de <i>Vatica mangachapo</i> (Dipterocarpaceae).</p>	 <p>Citocalasina Z10⁵⁸ Alcaloide policétido isoindólico.</p>	<p>Citotóxico</p>

2.11.2.14. Reportes de efecto antibacteriano de los componentes producidos por hongos endófitos.

En 2004, Wiyakrutta y colaboradores investigaron 360 hongos endófitos que fueron aislados de tallos y hojas de varias plantas, algunas de ellas son: *Chloranthus inconspicuus* Sw., *Cissus repanda* Vahl, *Pluchea indica* Less, *Melientha suavis* Pierre, etc. 92 de los aislamientos de hongos endófitos mostraron efecto antibacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración de 0.0625-200 µg/mL.

Se aislaron 368 hongos endófitos de hojas y ramas de diferentes especies de *Garcinia*; 80 de *G. atroviridis*, 84 de *G. dulcis*, 112 de *G. mangostana*, 47 de *G. nigrolineata* y 45 de *G. scortechinii*. Caldos de fermentación de los hongos endófitos mostraron actividad antimicrobiana. 43-53 % de los caldos de fermentación inhibieron 7-19 mm el crecimiento de *S. aureus* a una concentración mínima inhibitoria de 32-512 µg/mL. Se identificaron molecularmente 8 géneros diferentes de hongos endófitos por la técnica de Espaciador Interno Transcrito (ITS), y los hongos endófitos identificados fueron de los géneros siguientes: *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Phomopsis* y *Xylaria* (Phongpaichit *et al.*, 2006).

En el año 2012, Liang y colaboradores investigaron a la planta *Ophiopogon japonicus*, lograron aislar 30 endófitos de la raíz y el tallo de esta planta. Los resultados más sobresalientes fueron que el extracto de micelio de los hongos endófitos de las cepas MD-03, MD-09, MD-15 y el cultivo de fermentación de la cepa MD-09, MD-29 y MD-30, inhibieron más del 90 % el crecimiento de *S. aureus* a una concentración de 20-40 µg/mL. Los análisis filogenéticos demostraron que 12 de las cepas activas pertenecen al filo *Ascomycota* y se clasificaron en tres clases taxonómicas (*Sordariomycetes*, *Deuteromycetes*, y *Eurotiomycetes*), de acuerdo con análisis morfológicos e ITS realizados.

En el trabajo de Hasanah y colaboradores del 2017, se aislaron del árbol *Cotylelobium melanoxydon* 38 hongos endófitos; de éstos solo 6 muestras de hongos endófitos: EF2K, EF8, EF2A, EF10A, EF10B y EF3A mostraron inhibir el crecimiento de las bacterias *E. coli* ATCC 35218 y *S. aureus* ATCC 25923. Los resultados más significativos fueron que la muestra EF2K inhibió 10.26 mm el crecimiento de *E. coli* y 7.1 mm el crecimiento de *S.*

aureus; EF10A inhibió 10.53 mm el crecimiento de *E. coli* y 7.2 mm el crecimiento de *S. aureus*. Se identificó que EF3A y EF8 mostraron 99 % de homología con *Talaromyces cellulolyticus*; EF10B tuvo 91 % de homología con *Penicillium purpurogenum*; EF2A mostró 100 % de homología con *Aspergillus* sp.; EF2K presentó 99 % de homología con *Trichoderma harzianum* y EF10A tuvo 99 % de homología con *Aspergillus orizae*.

Se reportó un hongo endófito desconocido aislado de *Larix laricina*, éste inhibió el crecimiento de las bacterias: *Vibrio salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 100 µg a 500 µg. El componente responsable de esta inhibición fue el éster 6-oxo-2-propenil-3,6-dihidro-2H-pyran-3-il del ácido 2-metiloctanoico (Findlay *et al.*, 1997).

En 2015, Prabukumar y colaboradores investigaron 4 extractos de hongos endófitos: CC1, CC2, CC3 y CC4 aislados de *Crescentia cujete*, estos tuvieron 99 % de homología con: *Nigrospora sphaerica*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella moniliformis*, y *Beauveria bassiana*. Los extractos fúngicos demostraron tener efecto antibacteriano a 25 µl/disco. El extracto crudo de CC4 inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* ATCC-51812, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212, *Bacillus subtilis* ATCC-441, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-432, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 y *Escherichia coli* ATCC-25922, mostrando inhibición de 10 % a 22 %. Se identificaron varios componentes por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrofotometría de Masas (CG-EM): ácido benceno-1,2-dicarboxílico; dietil éster; benzoato de bencilo; ácido benzoico, 2-hidroxi-, fenil metil éster; ácido dodecanoico; 1,2,3-propanotriol éster; *tetratetracontano*; heneicosano; hexacosano; (-)-isolongifolol; ácido-n-hexadecanoico; hexatriacontano; 1,6-metanonaftalen-1(2H)-ol, octahidro-; ácido carboxílico-1-fenantreno, 1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-d; ácido benzoico; 2-hidroxi-fenil metil éster; 9-octadecenoico; ácido octadecenoico; tetracosano; escualeno; 1-tetradecanol, acrilato; 1-estearoil-1H-Imidazol; 2-tert-Butil-4,6-bis(3,5-di-tert-butil-4-hidroxibenzil) fenol.

Se ha demostrado que el hongo endófito *Phomopsis* sp., aislado de la superficie leñosa de la planta *Salix gracilostyla* var. *Melanostachys*, produce phomopsicalasina la cual posee actividad antimicrobiana. La phomopsicalasina, a una concentración de 4 mg/disco, inhibe

12 mm a *Bacillus subtilis*, 11 mm a *Salmonella gallinarum* y 8 mm a *Staphylococcus aureus*. La estructura de la phomopsicalasina (Figura 10) se comprobó por Espectroscopia de Masas, Resonancia Magnética Nuclear, Radiación Infrarroja y Radiación Ultravioleta (Horn *et al.*, 1995).

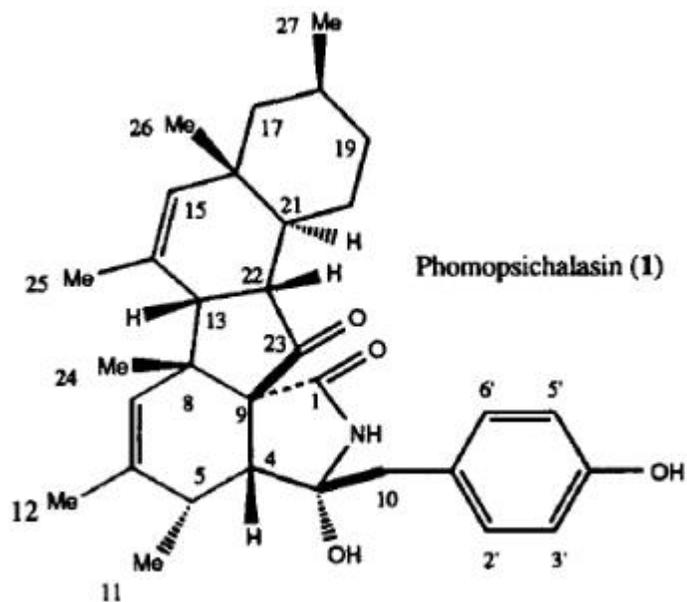


Figura 10. Phomopsicalasina (Tomado de: Horn *et al.*, 1995).

Del cultivo de los hongos endófitos *Phoma* sp. aislados de las hojas de la planta *T. wallachiana*, se aislaron dos componentes: altersolanol A y 2-hidroxi-6-ácidometilbenzoico (Figura 11). Se identificaron por cristalografía de rayos X. Se demostró que el extracto crudo de etil acetato del tallo de *T. wallachiana* inoculados con hongos *Phoma* sp. inhibieron a las bacterias *B. subtilis* a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. Se confirmó la presencia de 0.68 g de artesanol A en el extracto de etil acetato conforme al peso seco del tallo de *T. wallachiana* (Yang *et al.*, 1994).

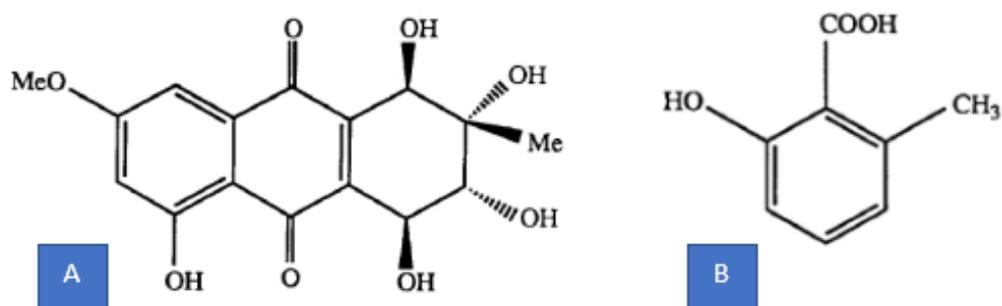


Figura 11. A) Artesanol A, B) 2-hidroxi-6-ácido metilbenzoico (Tomado de: Yang *et al.*, 1994).

Singh y colaboradores, en el año 2000, aislaron de la planta *Daphnopsis americana* un hongo endófito desconocido. Estos investigadores demostraron que este hongo endófito es capaz de producir Guanacastepeno (Figura 12). Además este componente tiene actividad antibacteriana a concentraciones de 0.4 - 50 μg / pozo contra *S. aureus* resistente a metilicina, y contra *Enterococcus faecium* resistente a a vancomicina. Un dato interesante de este artículo fue que el guanacastepeno tuvo actividad bactericida contra *E. coli imp* con las siguientes concentraciones: 16, 32 y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se demostró que este componente daña la membrana de *E. coli imp*.

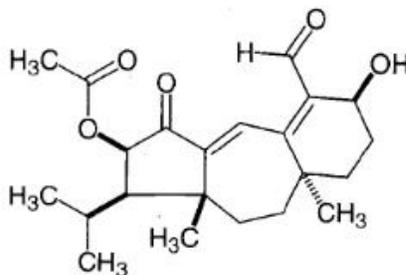


Figura 12. Guanacastepeno (Tomado de: Singh *et al.*, 2000).

Muchos componentes bioactivos ya han sido identificados a partir de microorganismos endófitos, sin embargo, aún hay muchos componentes que permanecen desconocidos (Figura 13). Por lo tanto, falta identificar muchos microorganismos endófitos, investigar los metabolitos secundarios que producen, así como saber sus actividades biológicas (Schulz *et al.*, 2002; Packiaraj *et al.*, 2016).

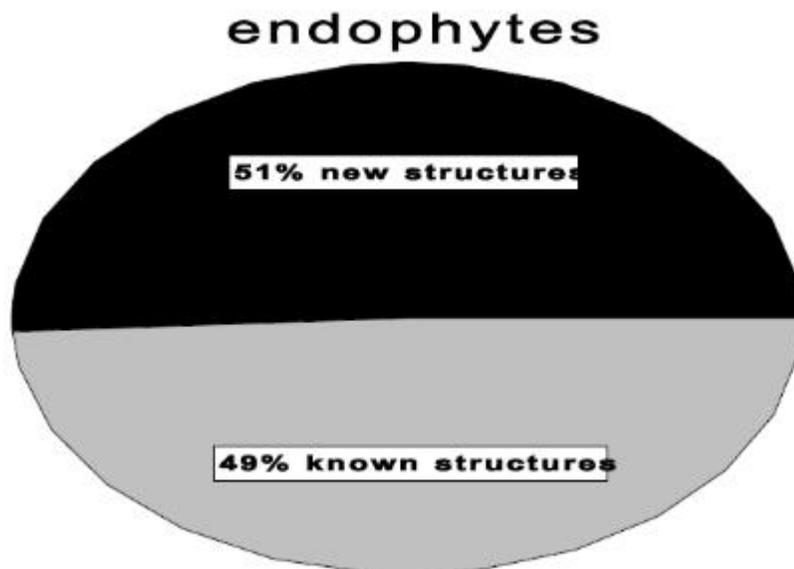


Figura 13. Porcentaje de componentes conocidos y desconocidos producidos por endófitos (Tomado de: Schulz *et al.*, 2002).

2.11.2.15. Actividad antibacteriana de *Fusarium* sp.

En la investigación de Xu y colaboradores en 2008, se demostró que los hongos endófitos de la cepa DzF2 aislados de los rizomas del tubérculo *Dioscorea zingiberensis*, tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* a una concentración de 1000 ug/mL. La cepa DzF2 demostró ser 99 % similar a el hongo endófito *Fusarium redolens* de acuerdo con los datos de análisis morfológicos y BLAST.

2.11.2.16. Actividad antibacteriana de *Colletotrichum* sp.

Los hongos endófitos *Colletotrichum* sp. fueron aislados del tallo de la planta *Artemisia annua*. Varios componentes fueron identificados por RMN y por HPLC: 6-isoprenilindole-3-ácido carboxílico; 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxi ergosta-7,22 dieno; 3 β -hidroxi-ergosta-5-eno; 3-oxo- ergosta-4,6,8; 22 tetraeno; 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-dieno; 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,9; 22-trieno; 3-oxo-ergosta-4-eno. Los componentes derivados de ergosterol 3 β -hidroxi-ergosta-5-eno; 22-tetraeno y 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-dieno tuvieron actividad inhibitoria contra las bacterias *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis* a una concentración de 25–75 mg/ml (Lu *et al.*, 2000).

En la investigación de Packiaraj y colaboradores, en el 2016, se lograron aislar los siguientes géneros de hongos endófitos de *Cinnamomun malabattrum*: *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*. Posteriormente se investigó el extracto crudo de *Colletotrichum*, el cual a partir de una concentración de 100 µg/mL logró inhibir el crecimiento de las siguientes especies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella boydii*. Más adelante este extracto se analizó por Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas (CG-EM) y se identificaron los siguientes componentes:

- N-didehidrohexacarboxi 1-2,4,5-trimetil piperazina.
- 6-(t-butylimino)-8-(3'-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-2H,6H-pirimido[2,1-b][1,3]tiazina-7-carbonitrilo.
- 1,2,4-triazol lluro.
- 4,4'-isopropilideno-bis-(2-ciclohexil fenol).
- fluoro bis [3-fluorodimetilsilil-2,2,4,4,6,6-hexametil-1,3,5-triaza-2,4,6-trisilaciclohexil]borano.
- fenol, 3,5-dimetoxi- acetato.

Los hongos endófitos *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados del tallo de la planta *Artemisia mongólica*, producen ácido colletotrico (Figura 14). Este componente fue identificado por RMN. Además, posee actividad antimicrobiana contra diferentes especies bacterianas. El ácido colletotrico a concentraciones mínimas inhibitorias de 0.05, 0.5 y 0.01 mg/mL tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias: *B. subtilis*, *S. aureus*, y *S. lutea* (Zou *et al.*, 2000).

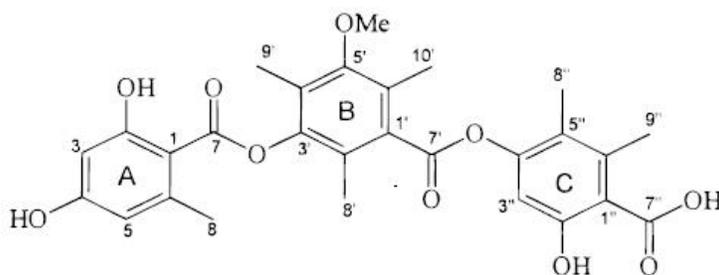


Figura 14. Ácido colletotrico (Tomado de: Zou *et al.*, 2000).

2.11.2.17. Actividad antibacteriana de *Periconia* sp.

Kim y colaboradores, en el año 2004, lograron identificar componentes llamados periconicinas A y B. Son diterpenos los cuales se producen por hongos endófitos del género *Periconia* sp. y tuvieron actividad antibacteriana. Estos hongos endófitos fueron aislados de ramas de la planta *Taxus cuspidata*. La periconicina A logró inhibir el crecimiento de *E. coli* a una CMI de 100 µg/mL. Por otra parte, la periconicina B inhibió el crecimiento de *S. aureus* a una CMI de 50 µg/mL.

De hongos endófitos *Periconia* sp. aislados de la planta *Piper longum* L. se ha identificado un compuesto alcaloide llamado piperina, el cual mostró tener actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* a una CMI de 1.74 – 2.62 µg/mL (Verma *et al.*, 2011).

Tavares y colaboradores, en el 2017, demostraron que el hongo endófito *Periconia ignaria* A2C47 inhibió 17.7 ± 0.58 mm el crecimiento de *S. aureus* GL 8702. Además, en su artículo reportaron que este hongo endófito era capaz de producir compuestos fenólicos. Se reportó en este trabajo que extractos de *Periconia ignaria* A2C47 produjeron 21.99 ± 0.46 mg de ácido gálico/g.

Además, Flores-Vallejo y colaboradores, en el 2020, reportaron que los hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth producían mayormente componentes del grupo de los terpenos y de los compuestos fenólicos.

2.12. *Crescentia alata* Kunth.

Es un árbol de la familia *Bignoniaceae* y se conoce como: Ayale (Sonora), Guaje Cirián, Güiro (Michoacan y Guerrero), Jayascate, Jícara, Jicarita, Morro (Oaxaca), Tecomate (Sinaloa.), Cuatecomate (Morelos). Esta planta se puede encontrar en zonas de climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados a partir de los 100 hasta los 1554 m.s.n.m. (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, 2009).

2.12.1. Descripción morfológica de *C. alata* Kunth.

El árbol puede llegar a medir 14 m de altura, tiene la corteza color café claro (Imagen 1). Las hojas están reunidas en 3 foliolos que salen de un mismo punto. Las flores son de color amarillo verdosas y morado-café, en ocasiones con franjas de color rosa púrpura. Crecen solitarias sobre el tallo o también en grupos de dos o tres. Los frutos son casi esféricos, nacen pegados al tallo y miden cerca de 15 cm de diámetro, presentan una pulpa negruzca (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, 2009). Entre los usos más destacables de este árbol está el medicinal para tratar: mal de orín, diarrea, dolor de cabeza, etc. (Olivares-Pérez *et al.*, 2018).



Imagen 1. *Crescentia alata* Kunth (Tomada de: Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, 2009).

2.12.2. Distribución de *C. alata* en México.

El árbol *Crescentia alata* habita en áreas abiertas tipo sabana en las selvas bajas caducifolias. Se distribuye en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Chihuahua, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Morelos (Figura 15).



Figura 15. Distribución de *Crescentia alata* Kunth en México (Adaptada de Peralta-Valverde, 2012).

2.12.3. Distribución geográfica de *C. alata* Kunth en el estado de Morelos.

En Morelos *Crescentia alata* Kunth se distribuye en la región Suroeste del estado, abarcando municipios como: Miaatlán, Coatlán del Río, Amacuzac, Mazatepec, Jojutla, Tlaquiltenango y poblados como: Rancho viejo, Michapa, Apancingo, Huajintlán, Chisco, Quilamula y Huautla (Figura 16).

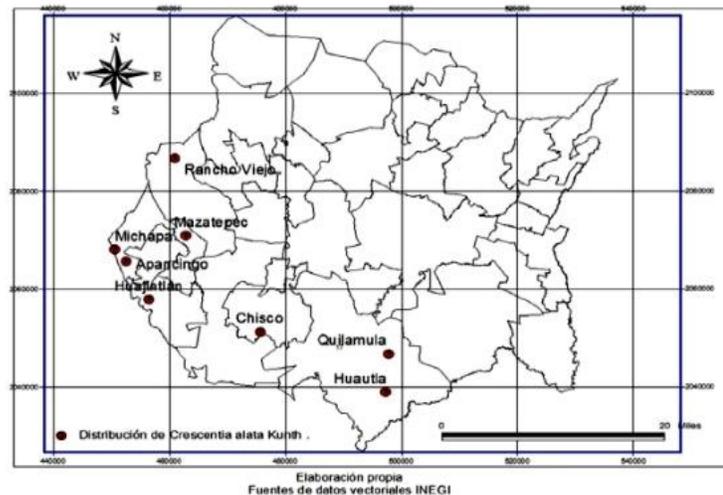


Figura 16. Distribución geográfica de *C. alata* Kunth en el estado de Morelos (Datos tomados de: Solares-Arenas, 2004).

2.12.4. Aprovechamiento de *C. alata* Kunth.

El aprovechamiento de los tejidos de la planta *Crescentia alata* Kunth es muy variado, por ejemplo, el tronco de la planta puede utilizarse como madera de construcción, para fabricar artesanías, o también como leña. La cascara del fruto se utiliza para producir maracas, las semillas se pueden secar y moler para preparar agua de sabor o también pueden tostarse y comerse como suplemento alimenticio. Las hojas y las semillas se utilizan para alimentar al ganado (CONABIO, 2019).

2.12.5. Importancia en la medicina tradicional.

Los tejidos de fruto, hoja, raíz y flor de *C. alata* se usan en la medicina tradicional mexicana para tratar diversas infecciones y enfermedades tales como: disentería, mal de orín, dolor de cabeza y problemas de la dentición. La infusión de la raíz es usada como tratamiento contra la diabetes, y la infusión de las hojas es utilizada como astringente para la diarrea, que también se usa como tratamiento para el cabello. La flor se utiliza para retardar el parto. La pulpa del fruto cruda funciona como laxante, y hervida se usa contra enfermedades como el asma y bronquitis. La pulpa hervida del fruto se usa para tratar golpes y para curar heridas, cabe resaltar que también es antiinflamatoria y antimicrobiana (CONABIO, 2019).

2.12.6. Actividad antibacteriana de *C. alata* Kunth.

En el 2004, Campos y Velasquez demostraron que los extractos de pulpa de *C. alata* Kunth poseen principios activos como: glucósidos, flavonoides, alcaloides y taninos. Además, demostraron que el extracto etanólico de pulpa inhibió 12 mm el crecimiento de las bacterias *Shigella* sp.

Pío-León y colaboradores, en el año 2013 demostraron que los extractos hexánicos del fruto de *Crescentia alata* Kunth inhibieron a las bacterias: *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* sp. a una CMI de 1-2 mg/mL, y los extractos clorofórmicos inhibieron a *Salmonella thyphi* y *Shigella* sp. a una CMI de 4 mg/mL.

2.12.7. Hongos endófitos aislados de la planta medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth.

En el Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales del CEIB-UAEM, Flores-Vallejo, en 2017, investigó a *Crescentia alata* Kunth, de la cual aisló por primera vez 219 hongos endófitos de diferentes tejidos de esta planta. El tejido con más hongos endófitos fue la hoja (138). En esta investigación se identificaron 44 morfotipos de hongos endófitos productores de diversos metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro*. Cabe destacar que estos morfotipos fueron capaces de producir los siguientes metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, terpenos, esteroides y ácidos grasos, los cuales fueron producidos tanto en el endo-metaboloma como en el exo-metaboloma de los hongos endófitos. En este último es donde se produce una mayor cantidad y diversidad de metabolitos secundarios. Dichos aislados de endófitos presentaron actividad antiinflamatoria *in vitro* en células de macrófagos murinos.

2.12.8. Efecto antibacteriano de los extractos de micelio de hongos endófitos aislados de la planta medicinal mexicana *C. alata* Kunth contra bacterias sensibles a antibióticos.

Flores-Vallejo y colaboradores, en el 2020 mencionaron que los extractos de diferentes partes de *Crescentia alata* Kunth, así como los hongos endófitos aislados de diferentes tejidos de la planta, podrían tener efecto antibacteriano, por lo que las investigaciones en el Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales prosiguieron. Morales-Aguilar, en el 2017, demostró que el extracto metanólico de micelio (MH35) inhibió 43 % en el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 a una concentración de 1000 µg/mL, mientras que el extracto de micelio #10 inhibió 44 % el crecimiento de esta bacteria a una concentración de 500 µg/mL. Dicho extracto pertenece a la cepa de *Trematophoma* sp. (CaFt35) aislado de fruto (Flores-Vallejo, 2020).

En el Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales del CEIB se continuó con la investigación de los extractos de los hongos endófitos aislados de *C. alata*. Flores-Arroyo, en 2019, realizó un escrutinio masivo de los extractos probando las concentraciones de 5 y 10 mg/mL de cada extracto a través del ensayo de difusión en pozo en agar. En dicho trabajo identificó que el 50 % y 52 % de los extractos del endo- y exo-metaboloma de los hongos

endófitos, respectivamente, fueron capaces de inhibir el crecimiento de 4 de las 7 bacterias sensibles a antibióticos, las cuales incluyen: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhi* ATCC 6539. Al caracterizar por biología molecular a los 44 morfotipos de hongos endófitos se identificó que pertenecen a 17 géneros (Flores-Vallejo *et al.*, 2020). Hasta ahora se ha identificado que los extractos de hongos endófitos de 11 géneros: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Periconia*, *Cercospora*, *Diaporthe*, *Trametes*, *Aureobasidium*, *Podospora*, *Xylaria*, *Cladosporium*, y *Pseudocercospora* demostraron actividad antibacteriana (Flores-Arroyo, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente la resistencia a los antibióticos por bacterias presentes en ambientes nosocomiales y medios naturales, sigue siendo un problema de salud mundial. La OMS estima que para 2050 el número de muertes causadas por microorganismos resistentes a antimicrobianos ascendería de 700 mil anuales a 10 millones por año, con un incremento del gasto económico en salud de 55 billones de dólares actualmente, a 100 trillones de dólares anuales (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System -GLASS- Report Early Implementation, 2016-2017).

En particular en México las cifras de mortalidad atribuibles a infecciones por bacterias resistentes son de 21,318 muertes por neumonía, siendo los principales agentes etiológicos las bacterias: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* (INEGI, 2017). En Morelos se han reportado 20,555 casos de infecciones en vías urinarias causadas por *E. coli*, y *P. aeruginosa* (Secretaría de Salud, 2017).

Las bacterias se han adaptado, han incorporado diferentes mecanismos moleculares que les permiten resistir dosis altas de antibióticos utilizados como último recurso, tales como la colistina (Reardon, 2014; OMS, 2017; INSP, 2018).

En los últimos años, la abundancia de aislados bacterianos clínicos y ambientales resistentes a antibacterianos ha aumentado. Se están buscando nuevas estrategias para contrarrestar el problema (Constanza *et al.*, 2014; González-Andrade, 2015; Avendaño-López, 2018; Inoue y Minghui, 2017; Nseir *et al.*, 2005).

Una de las estrategias consiste en identificar nuevos metabolitos antibacterianos a partir de hongos endófitos, este enfoque se basa en el cultivo *in vitro* de hongos endófitos que tienen la capacidad de producir metabolitos antibacterianos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

De la planta medicinal mexicana *C. alata* Kunth se han aislado hongos endófitos capaces de generar un efecto antiinflamatorio y antibacteriano. La evaluación y obtención del perfil químico de los metabolitos antibacterianos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth podría ayudar en el futuro a producir nuevos antibióticos.

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad antibacteriana de extractos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth e identificar el perfil químico del extracto con mayor actividad.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1.-Estandarizar las condiciones del ensayo de bioautografía antibacteriana (usando rezasurina y cloruro de tetrazolio), utilizando seis extractos previamente identificados como bioactivos correspondientes al endo- y exo-metaboloma de hongos endófitos de los géneros: *Fusarium*, *Cercospora*, *Pseudocercospora*, *Aspergillus* y *Periconia*.

2.-Evaluar al extracto con mayor actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923, a través del método estandarizado de bioautografía con la medición de sus halos de inhibición.

3.-Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto bioactivo contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.

4.- Utilizando el método estandarizado de bioautografía, determinar las condiciones cromatográficas que permitan separar a los componentes del extracto más bioactivo.

5.- Identificar en el extracto más bioactivo el grupo de compuestos responsables de la actividad antibacteriana, a través de diferentes agentes derivatizantes químicos como: cloruro férrico, vainillina, reactivo de Dragendorff, reactivo de Lieberman Burchard y reactivo de ninhidrina.

Con el propósito de cumplir con los objetivos 4 y 5, la meta propuesta consistió en reactivar los cultivos del hongo endófito más bioactivo para obtener mayor cantidad del extracto e identificar las condiciones de almacenamiento y preservación que permitieran seguir con la producción de los compuestos con actividad antibacteriana.

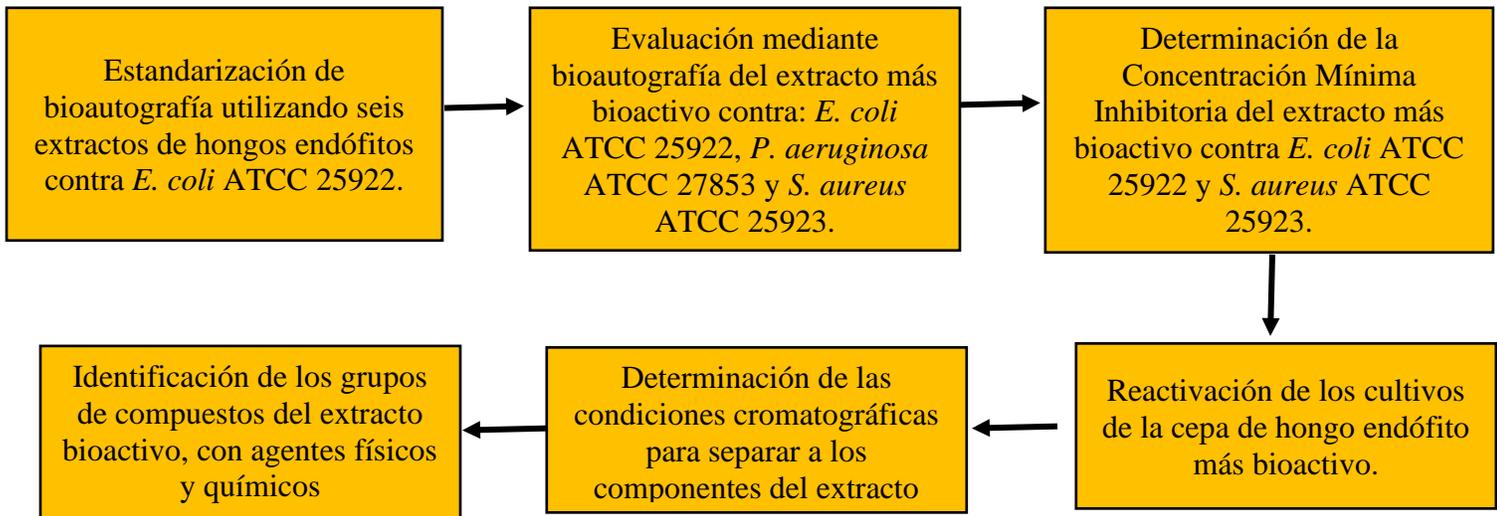
5. HIPÓTESIS.

La actividad antibacteriana de los extractos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth se debe a la presencia de metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos o terpenos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizó la metodología establecida por la M. en Biotec. Rosario del Carmen Flores Vallejo durante su trabajo como Auxiliar de Investigador de SNI 3, en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB-UAEM).

6.1. Estrategia experimental:



6.2. Estandarización del método de bioautografía y evaluación del extracto más bioactivo.

Para la estandarización del método de bioautografía se hizo una búsqueda en la literatura de los métodos de bioautografía (Tabla 6), entre los métodos más utilizados esta el de superposición en agar. Este método fue el que utilizamos para estandarizar. De igual manera se utilizó para la evaluación del extracto más bioactivo y se realiza de la siguiente manera:

Se utilizaron placas de aluminio de Cromatografía Capa Fina (Merck) con una capa absorbente de sílica gel 60 F₂₅₄. En nuestros ensayos utilizamos placas de 5x5 cm para los ensayos del extracto crudo y de 8x4 cm para migrar el extracto. Las placas se envolvieron cuidadosamente en papel aluminio y se introdujeron dentro de bolsas de polipapel. Posteriormente estas bolsas se colocaron en un vaso de precipitado de 250 mL, el cual se cubrió con papel aluminio. Las placas TLC se esterilizaron a 121 °C 1 libra de presión en un equipo (Yamato Sterilizer SM510).

Las placas TLC se dejaron secar en un horno (BG H102) a 50 °C. Posteriormente dentro de una campana de flujo laminar (VECO), se aplicaron 5 microlitros de los siguientes extractos y controles:

(1) MH01 extracto de micelio de *Cercospora* cf. *apii* (CaLv01); (2) MH05 extracto de micelio de *Fusarium* cf. *fujikoroii* (CaRt05); (3) SH23 extracto de acetato de etilo de sobrenadante de *Periconia* cf. *ignaria* (CaBr80); (4) SH25 extracto de acetato de etilo de sobrenadante de *Fusarium* cf. *fujikoroii* (CaFw25); (5) SH34 extracto de sobrenadante de *Aspergillus* cf. *calidoustus* (CaLv34); y (6) SH43 extracto de sobrenadante de *Pseudocercospora* sp. (CaLv27).

Los controles negativos fueron: acetato de etilo; DMSO; agua marca PISA y los controles positivos fueron ampicilina; kanamicina; tetraciclina; levofloxacino. El punto de aplicación nunca excedió de 0.5 cm de diámetro. Las TLC se coloraron durante 20-80 minutos bajo el flujo de aire de la campana para permitir que los solventes se evaporaran. Posteriormente las TLC se introdujeron en cajas Petri estériles de 8x8 cm o en cajas Petri estériles de 10 x 9 cm (en el caso de las TLC migradas), las cajas se sellaron con parafilm (Picazo, 2000).

Dentro de una campana de flujo laminar (Veco VFL-B-09), se prepararon los inóculos de la siguiente manera:

Después de la incubación de la bacteria a cultivar (por ejemplo: *E. coli* ATCC 25922) durante 14 horas a una temperatura de 37 °C a 150 RPM, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman Du^R 640) colocando 1 mL de inóculo bacteriano en una celda de plástico de 1 cm de ancho, y en otra celda se coloca CMH estéril como blanco. La absorbancia se midió con luz visible a 625 nm, debe marcar 0.8-1 unidades de absorbancia (escala McFarland que equivale aproximadamente a 1×10^8 UFC/mL). Posteriormente en un tubo falcon de 45 mL estéril se preparó un inóculo bacteriano, el cual debe contener: 2.5 mL del cultivo bacteriano a escala McFarland, 2.5 mL de resazurina (0.8 mg/mL) o 2.5 mL de cloruro de tetrazolio (1 mg/mL). Por último, se agregaron 20 mL de AMH o ICC (en el caso de utilizar a *S. aureus* ATCC 25923) (Yashavantha *et al.*, 2015).

6.3. Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se utilizaron TLC de aluminio de sílica gel 60 F₂₆₄ Merck de 5 x 5 cm. esterilizadas durante 15 minutos a 121 °C y 1 libra de presión (Yamato Sterilizer SM510). Se coloraron 5 µl (punto de aplicación) del extracto a diferentes concentraciones: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.8 µg/punto de aplicación, haciendo dobles diluciones seriadas. Se utilizó cloruro de tetrazolio como indicador de viabilidad (ver inciso 6.2).

6.4. Reactivación, obtención de extracto y preservación de actividad antibacteriana producida por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria*.

Para la reactivación y obtención de extracto bioactivo, se utilizó el micelio del hongo endófito más bioactivo (*Periconia cf. ignaria*), el cual estuvo almacenado durante 4 años a una temperatura de 4 °C. Se intentó reactivar a partir de diferentes tipos de biomasa de *Periconia cf. ignaria*, la cual se almacenó a diferentes condiciones. Para el caso de biomasa almacenada en agar, se utilizó la base de puntas de 1 mL para tomar uno o tres discos de micelio e inocularlos a 25 mL de APD o 25 mL de CPD. Para las demás condiciones se tomó biomasa con una espátula metálica estéril y se inoculó a 25 mL de APD o 25 mL de CPD (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de preservación de biomasa de *Periconia cf. ignaria*.

Condiciones de preservación de biomasa de <i>Periconia cf. ignaria</i>	Reactivación
Agar 4 °C	Sólido (APD)
	Líquido (CPD)
Glicerol 50 % -20 °C	Sólido (APD)
	Líquido (CPD)
Liofilizada a -70 °C	Sólido (APD)
	Líquido (CPD)
Glicerol al 50 % a -70 °C	Sólido (APD)
	Líquido (CPD)
Liofilizada -20 °C	Sólido (APD)
	Líquido (CPD)

En caso de reactivar en APD, la biomasa se debe inocular a 25 mL de CPD para poder preparar el preinóculo.

6.4.1. Preparación de preinóculo.

Una vez que se logra reactivar a la cepa, se preparó un preinóculo de acuerdo con lo reportado anteriormente por Flores-Vallejo: se tomaron del micelio del hongo endófito bioactivo 3 discos de 0.5 cm de diámetro y 0.8 cm de grosor y se inocularon en 3 tubos falcon de 50 mL que deben contener 25 mL de Caldo Papa Dextrosa Bioxon ® estéril (Figura 17). Los tubos se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 6 días aproximadamente en condiciones de oscuridad (Flores-Vallejo, 2017).

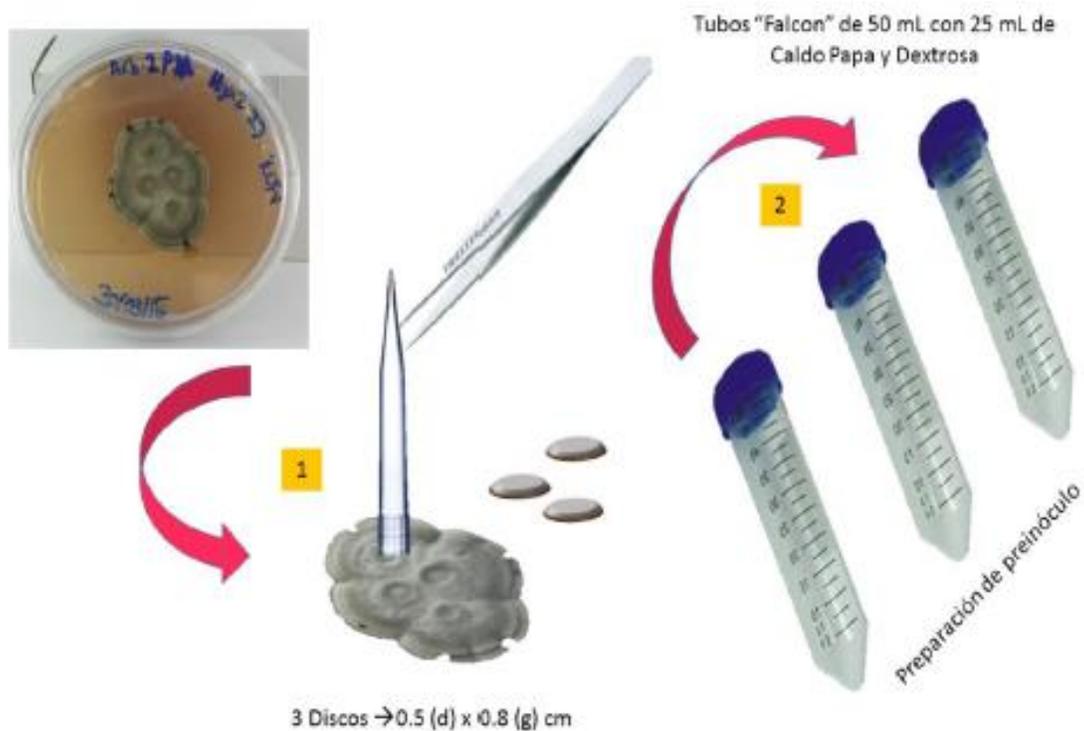


Figura 17. Preparación de preinóculo (Tomado de Flores-Vallejo, 2017).

6.4.2. Cultivo líquido en matraz Erlen-Meyer.

Después de la incubación de los preinóculos, dentro de una campana de flujo laminar, éstos se vaciaron dentro de un matraz Erlen-Meyer de 1 L con 500 mL de CPD. En caso de utilizar la reactivación en medio solido, se emplean 3 preinóculos, y si se reactiva en medió líquido, se emplea un solo preinóculo para 3 matraces, dividiendo la biomasa en 3 partes iguales. Los matraces inoculados se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 8-9 días aproximadamente.

Una vez terminado el tiempo de incubación en el matraz Erlenmeyer, y con la ayuda de una bomba de vacío, manta de cielo estéril, matraz Kitasato estéril y embudo Buchner estéril, se hizo la filtración del micelio y recuperación del sobrenadante.

6.4.3. Exo-metaboloma: obtención de extractos orgánicos de sobrenadante.

Para preparar los extractos orgánicos de sobrenadante, se realizó una separación líquido-líquido con cada una de las muestras filtradas. Para esto se utilizó un embudo de separación de 500 mL relación (1:1) (mL de sobrenadante/mL acetato de etilo).

Los extractos orgánicos de sobrenadante se introdujeron en contenedores de vidrio de 100mL y se llevaron a sequedad en una campana de extracción Fume Hood LabTeh®. Una vez secos se les agregó 1 mL de metanol para despegar los restos de extracto de las paredes del frasco de vidrio. Posteriormente se tomó ese mililitro de extracto diluido en metanol y se incorporó a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Después, los tubos Eppendorf se dejaron 1 día dentro de una campana de extracción Fume Hood LabTeh® para permitir la evaporación del metanol. Posteriormente se agregó DMSO para resuspender el extracto, se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm en equipo Thermo Scientific, se vortexó durante 1 minuto en equipo Vortex Genie 2 G560. También se sonicó durante 5 minutos en aparato Fisher Scientific® FS20. Por último se esterilizaron los extractos con filtros de membrana poliestersulfona de 0.22 µm estériles para poder utilizarlos en los ensayos de actividad antibacteriana. Después de usarlos, los extractos se almacenaron a -70 °C en congelador LG.

Para la obtención del extracto de acetato de etilo se hizo el mismo procedimiento que con el DMSO, a excepción de que el extracto de acetato de etilo se esterilizó con filtros de membrana nylon. Estos filtros se esterilizaron durante 15 min a 20 libras/pulgada² envolviendo el filtro con aluminio y introduciéndolo en un frasco de vidrio. Este último se envolvió en aluminio para proteger el filtro del golpe de calor que se genera en el proceso de esterilización.

6.5. Separación e identificación de compuestos con actividad antibacteriana por CCF.

Se aplicaron 5 μL de extracto por cada punto de aplicación (equivalente a 500 μg de extracto/punto de aplicación). Posteriormente, seis TLC se migraron en una cámara cromatográfica con la fase móvil cloroformo: metanol (5:1 v/v) o (7:3 v/v). Con una de las TLC migradas se identificó el Frente de Retención (Fr) de los compuestos bioactivos mediante bioautografía por superposición en agar (Ver apartado 6.2) (Yashavantha *et al.* 2015). Las otras cinco se utilizaron para revelarlas con agentes químicos.

Se utilizaron agentes físicos y químicos como luz UV, vainillina (Attaway *et al.*, 1965), cloruro férrico (Miller, 2013), reactivo de Dragendorff (Verma *et al.*, 2011), reactivo de ninhidrina (Landua y Awapara, 1949) y reactivo de Liebermann–Burchard (Huang *et al.*, 1961) para identificar parcialmente los componentes.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Estandarización de bioautografía utilizando resazurina.

Para los ensayos de bioautografía, se estandarizó el método de superposición en agar; ya que produce resultados más reproducibles en comparación de los otros métodos. Se utilizaron TLC de aluminio de sílica gel 60 F₂₆₄ Merck de 5 x 5 cm, en las cuales se colocaron 5 µl de cada tratamiento. El punto de aplicación no excedió de 5 mm, colocando 5 µl por punto de aplicación para todos los experimentos. Como indicador de viabilidad para la bacteria *E. coli* ATCC 25922 se utilizó resazurina a una concentración final de 0.8 mg/mL. Claramente se lograron observar halos de inhibición a las 3 y 24 horas en donde se aplicaron la ampicilina (10 µg/punto de aplicación) y la kanamicina (30 µg/punto de aplicación). En los controles negativos no se observó halos de inhibición.

A las 3 horas de incubación de *E. coli* ATCC 25922 a 37 °C, se observaron dos halos de inhibición, uno de 11.9 mm en la ampicilina y otro de 8.4 mm en la kanamicina (Imagen 2). A las 24 horas se observó un halo de inhibición de 22.15 mm en la ampicilina (Imagen 3). De acuerdo con estos resultados y con los puntos de corte equivalentes de CMI establecidos por la CLSI, la cepa de *E. coli* ATCC 25922 con la que se trabajó es sensible a ampicilina y resistente a kanamicina.

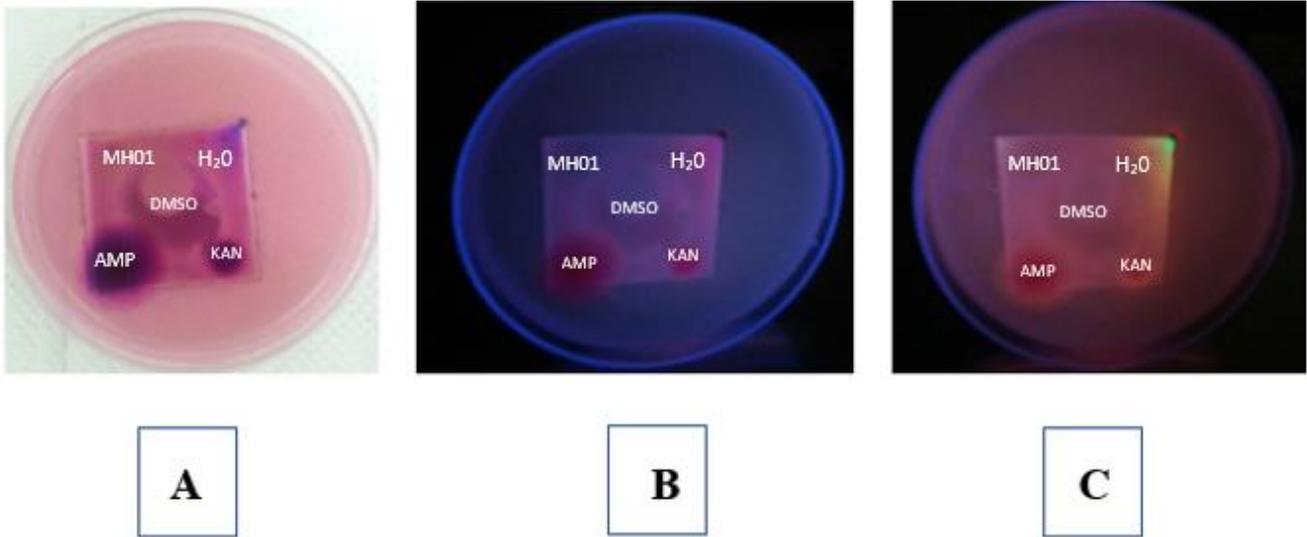


Imagen 2. Bioautografía por superposición en agar contra *E. coli* ATCC 25922 a las 3 horas de incubación.

A) Luz visible B) Luz UV de onda larga y C) Luz UV de onda corta. MH01: Extracto de micelio 01 (*Cercospora cf. apii*); DMSO: Dimetilsulfóxido; AMP: Ampicilina; KAN: Kanamicina.

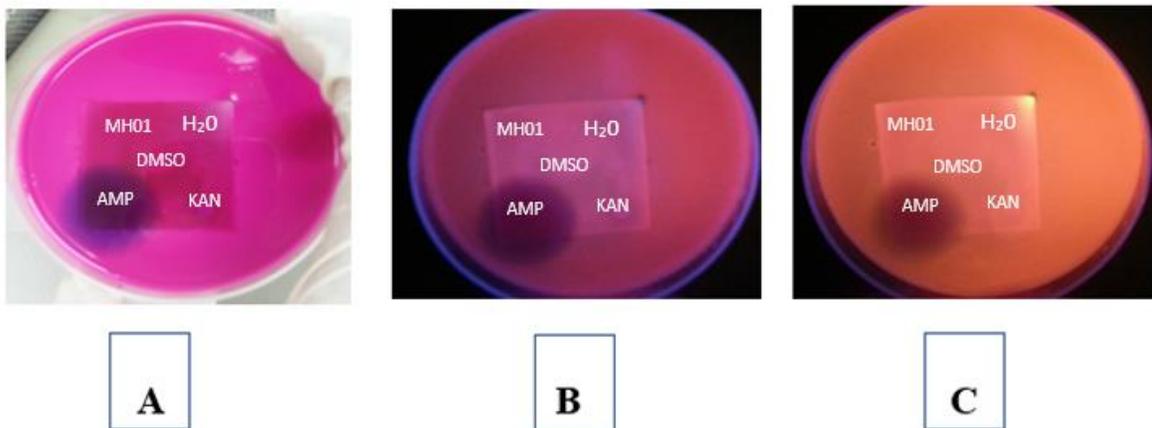


Imagen 3. Bioautografía por superposición en agar contra *E. coli* ATCC 25922 a las 24 horas de incubación.

A) Luz visible B) Luz UV de onda larga y C) Luz UV de onda corta. MH01: Extracto de micelio 01 (*Cercospora cf. apii*); DMSO: Dimetilsulfóxido; AMP: Ampicilina; KAN: Kanamicina.

7.2. Estandarización de bioautografía utilizando cloruro de tetrazolio.

Para corroborar lo resultados anteriores también se utilizó cloruro de tetrazolio como indicador de viabilidad, se utilizó a una concentración final de 1 mg/mL, a esta concentración muestra buenos resultados (Yashavantha, *et al.*, 2015). A las 24 horas de incubación de *E. coli* ATCC 25922 a 37 °C, se observaron halos de inhibición solamente en los controles positivos. En la kanamicina (30 µg/ punto de aplicación) se observó un halo de inhibición de 5.4 mm y en la ampicilina (10 µg/ punto de aplicación) se produjo un halo de inhibición de 17.7 mm (Imagen 4).

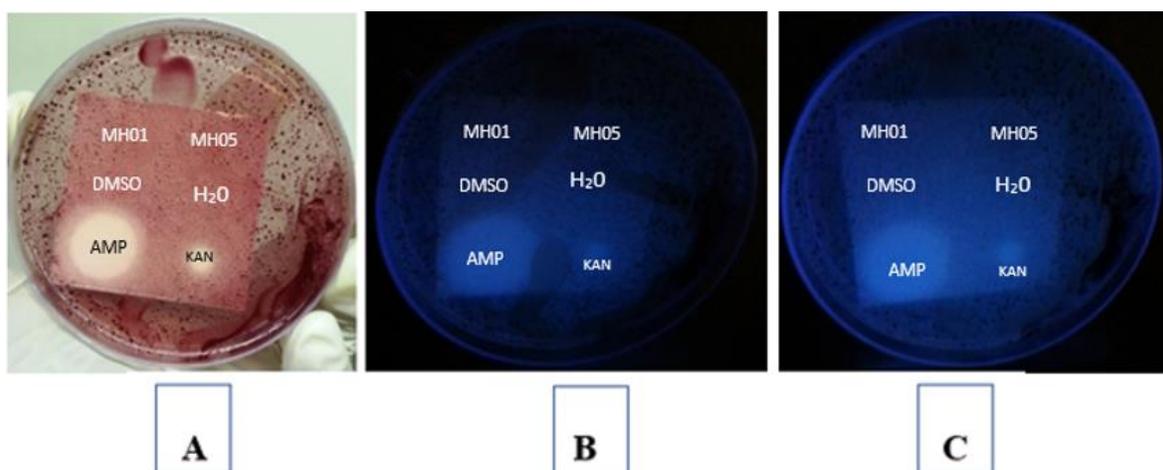


Imagen 4. Bioautografía por superposición en agar contra *E. coli* ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.

A) Luz visible B) Luz UV de onda larga y C) Luz UV de onda corta. MH01: Extracto de micelio 01 (*Cercospora cf. apii*), MH05: Extracto de micelio 05 (*Fusarium cf. fujikoroii*), DMSO: Dimetilsulfóxido, AMP: Ampicilina, KAN: Kanamicina.

Con ambos indicadores (resazurina y cloruro de tetrazolio), fue posible estandarizar los controles. De acuerdo con la Tabla 2 A-1 del manual de la CLSI, en el ensayo por bioautografía por superposición en agar, la bacteria *E. coli* ATCC 25922 es catalogada como sensible a ampicilina y resistente a Kanamicina. Los datos reportados por la CLSI coinciden con los obtenidos en el ensayo, indicando que las condiciones experimentales estandarizadas para realizar el ensayo de bioautografía son útiles para identificar compuestos con actividad antibacteriana, comparables con antibióticos descritos en manuales de la CLSI.

7.3. Evaluación de cuatro extractos de hongos endófitos aislados de *C. alata* Kunth contra *E. coli* ATCC 25922, utilizando resazurina.

En este ensayo se evaluaron los siguientes 4 extractos: SH25 (*Fusarium cf. fujikoroï*), SH34 (*Aspergillus cf. calidoustus*), SH43 (*Pseudocercospora sp.*), SH23 (*Periconia cf. ignaria*). Se realizó una bioautografía por el método de superposición en agar utilizando resazurina (a una concentración final de 0.8 mg/mL). A las 2 horas de incubación a 37 °C se logró observar claramente un halo de inhibición de 8.2 mm de *E. coli* ATCC 25922, donde se aplicó el extracto SH23 (Imagen 5).

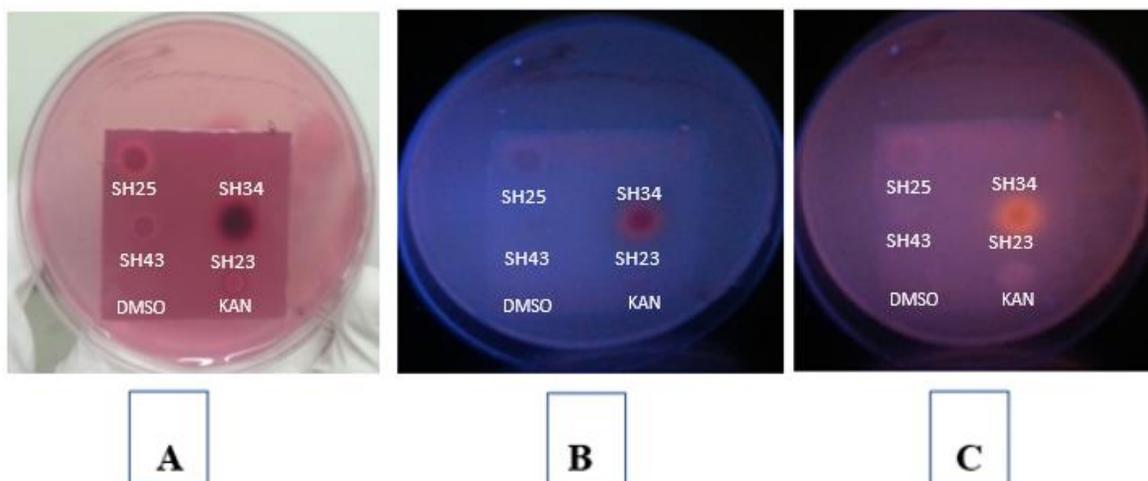


Imagen 5. Bioautografía estandarizada contra *E. coli* ATCC 25922, utilizando resazurina.

A) Luz visible B) Luz UV de onda larga y C) Luz UV de onda corta. SH25: Extracto de sobrenadante 25 (*Fusarium cf. fujikoroï*); SH34: Extracto de sobrenadante 34 (*Aspergillus cf. calidoustus*); SH43: Extracto de sobrenadante 43 (*Pseudocercospora sp.*); SH23: Extracto de sobrenadante 23 (*Periconia cf. ignaria*); DMSO: Dimetilsulfóxido; KAN: Kanamicina.

El único extracto bioactivo contra *E. coli* ATCC 25922 fue el extracto de sobrenadante SH23 producido por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria*, por lo que para los ensayos posteriores se seleccionó este extracto.

7.4. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra *E. coli* ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.

Como en el ensayo de actividad antibacteriana utilizando resazurina no se alcanzó a observar el halo de inhibición en el control positivo (kanamicina), se hicieron otros tres experimentos independientes para corroborar que existía actividad antibacteriana en el extracto SH23, pero esta vez se realizaron utilizando cloruro de tetrazolio como indicador de viabilidad. A las 16 horas de incubación a 37 °C se logró observar en *E. coli* ATCC 25922, un halo de inhibición de 8.7 mm. (Imagen 6). También se logró observar un pequeño halo de inhibición de 5.3 mm en la kanamicina (30 µg/punto de aplicación) y un halo de inhibición de 18.6 mm en la ampicilina (10 µg/punto de aplicación). En los controles negativos no se observó halos de inhibición. El halo de inhibición de este experimento fue similar con el halo de inhibición del extracto de sobrenadante SH23 del experimento realizado con resazurina (Imagen 5). De acuerdo con la Tabla 2 A-1 del manual de la CLSI, *E. coli* ATCC 25922 es catalogada como sensible a ampicilina y resistente a kanamicina.

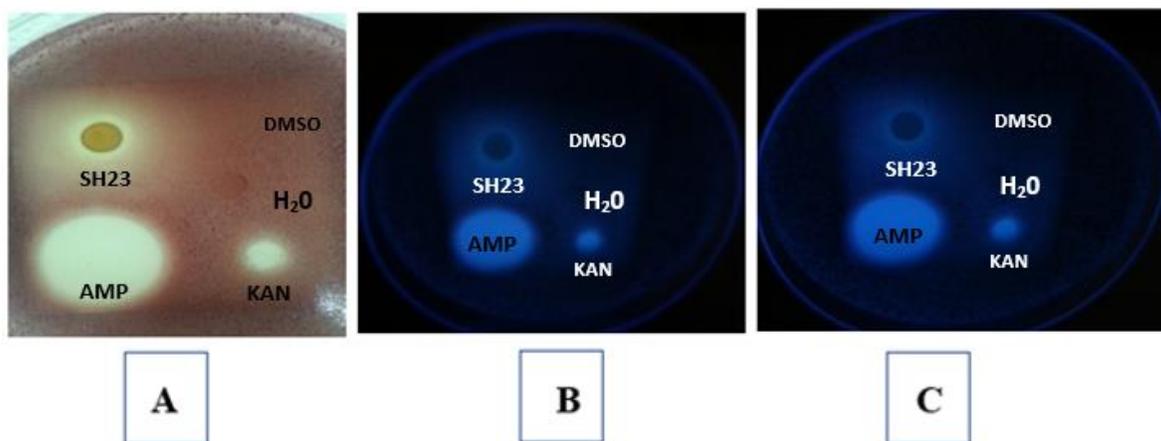


Imagen 6. Bioautografía estandarizada contra *E. coli* ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio. A) Luz visible B) Luz UV de onda larga y C) Luz UV de onda corta. SH23: Extracto de sobrenadante 23; DMSO: Dimetilsulfóxido; AMP: Ampicilina; KAN: Kanamicina.

De acuerdo a Hegstad y colaboradores (2014) y a Gefen y colaboradores (2017), el efecto del extracto SH23 podría ser bactericida, aunque para confirmar esto se tendría que hacer un ensayo de microdilución en placa.

7.5. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Se probó el extracto de sobrenadante SH23 a una concentración de 100 mg/mL contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, se observó una leve actividad del extracto contra esta bacteria, ya que se observó muy poca inhibición a esta concentración. Sin embargo, no se formó un halo de inhibición como en el control positivo (levofloxacino 5 µg/punto de aplicación). El halo de inhibición en el levofloxacino fue de 18 mm (Imagen 7). Otros autores como Flores-Arroyo y colaboradores, en el 2019, demostraron que extractos producidos por el hongo endófito *Colletotrichum* sp., aislado de la planta medicinal *Crescentia alata* Kunth, inhibieron 4.5 mm el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a una concentración de 10 mg/mL, a una concentración de 5 mg/mL inhibieron 4.5 mm el crecimiento de la misma bacteria.

Por otra parte, Radji y colaboradores, reportaron en el 2011 que extractos producidos por el hongo endófito *Microdiplodia hawaiiensis*, aislados de la planta *Garcinia mangostana*, inhibieron 7.2 mm el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a una concentración de 100 µg/mL

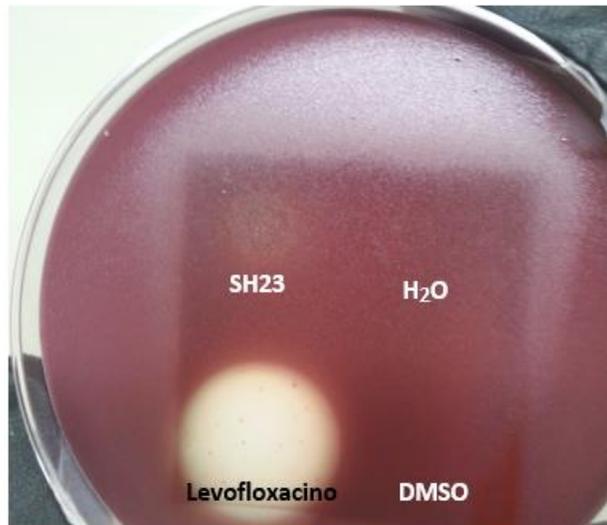


Imagen 7. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. SH23: Extracto de sobrenadante SH23; DMSO: Dimetilsulfóxido.

7.6. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra *S. aureus* ATCC 25923.

Se hizo un experimento utilizando cloruro de tetrazolio como indicador de viabilidad. En este experimento se utilizó agar sangre para favorecer el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923, anteriormente se utilizó AMH, pero no se formaron nítidamente los halos de inhibición. A las 16 horas de incubación a 37 °C se logró observar un halo de inhibición de 14 mm donde se colocó el extracto SH23. Sin embargo, no se logró observar un halo de inhibición en el control positivo (Imagen 8-A), el cual fue levofloxacin (10 µg/punto de aplicación). Solo se observó a un halo de inhibición de 23 mm donde se aplicó el levofloxacin en ausencia de cloruro de tetrazolio (Imagen 8-B).

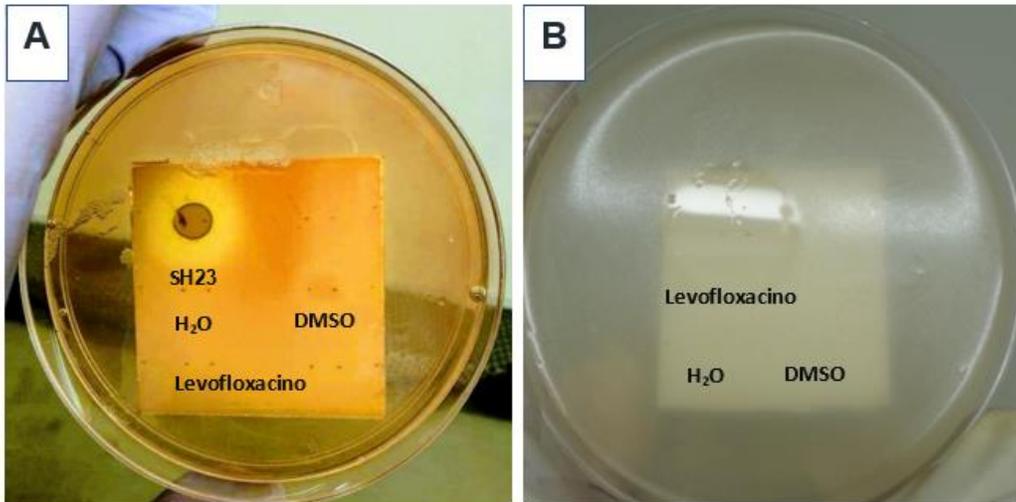


Imagen 8. Actividad antibacteriana del extracto de sobrenadante SH23 contra *S. aureus* ATCC 25923. A) Presencia de cloruro de tetrazolio B) Ausencia de cloruro de tetrazolio. SH23: Extracto de sobrenadante SH23; DMSO: Dimetilsulfóxido.

El control positivo no estaba funcionando, por lo que se decidió probar con otros antibióticos como gentamicina y penicilina, los cuales son recomendados por la CLSI contra *S. aureus*. Además se hizo el experimento con otra cepa de *S. aureus* (ATCC 29213), el medio utilizado fue el mismo (Agar Infusión Cerebro Corazón), pero tampoco se formaron halos de inhibición en la penicilina y gentamicina (Imagen 9).

7.6.1. Bioautografía del extracto SH23 contra *S. aureus* ATCC 25923 utilizando Agar Infusión Cerebro Corazón.

Se hicieron experimentos con agar infusión cerebro corazón, porque favorece la observación más nítida de los halos de inhibición. Se lograron ver dos halos de inhibición, uno en el extracto SH23 amarillo 1. El halo de inhibición fue de 9 mm, y otro donde se colocó el extracto SH23 Naranja 1, el halo de inhibición de fue de 8 mm (Imagen 9). Estos extractos fueron obtenidos de una segunda generación (segunda resiembra) del hongo endófito *Periconia cf. ignaria*.

Sin embargo, aún utilizando otros antibióticos como penicilina y gentamicina, y utilizando otra cepa de *Staphylococcus* (*S. aureus* ATCC 29213), ninguno funcionó (Imagen 9).

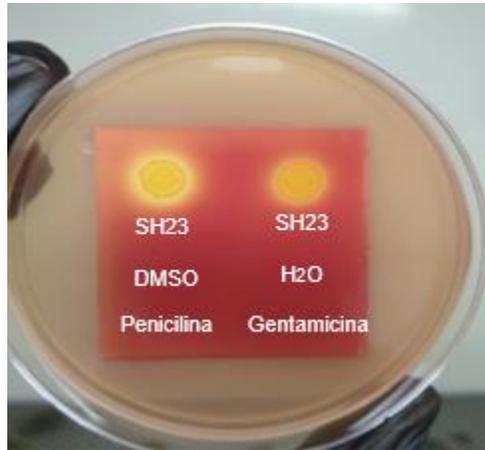


Imagen 9. Bioautografía del extracto SH23 contra *S. aureus* ATCC 29213.

AM: Amarillo (500 μg /punto de aplicación); Nar: Naranja (500 μg /punto de aplicación); DMSO: DimetilSulfóxido (5 μL /punto de aplicación); H₂O: Agua (5 μL /punto de aplicación); Penicilina (10 U/punto de aplicación); Gentamicina (10 μg /punto de aplicación).

Aspectos para considerar ante este problema fueron que tal vez algún componente del cloruro de tetrazolio inhibe la actividad del levofloxacino, pues al no utilizar cloruro de tetrazolio, si se ve un halo de inhibición en donde se colocó el levofloxacino. El halo fue de 23 mm contra *S. aureus* ATCC 25923 (Imagen 8-B).

Otra posibilidad por la cual no se pudo formar el halo de inhibición es porque probablemente el levofloxacino inhibe al cloruro de tetrazolio, ya se ha reportado que antibióticos como la ascosina inhibieron la reducción del cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio a formazan (acción por la cual el tetrazolio cambia de color blanco a rosado). Ramachandran y Gottlieb reportaron en 1961, que la reducción del cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio fue inhibida por completo por el antibiótico ascosina, experimento que realizaron con células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Además, en 1969, Tripathi y Gottlieb publicaron que la pirrolnitrina inhibió la reducción del tetrazolio 2,2'-di-p-nitrofenil-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bi-fenileno)-5,5'-difenilditetrazolio. La pirrolnitrina también inhibió la reducción del cloruro de tetrazolio 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil, ya que hizo que se redujera la producción de CO₂ para los experimentos en que se utilizó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otra parte, en algunas ocasiones se necesitan concentraciones muy bajas (de hasta 0.03 U/mL) para que la prueba de cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio pueda detectar la actividad de este y otros antibióticos como estreptomycin y terramicina (Neal y Calbert, 1954), pero estas concentraciones son demasiado bajas para utilizarlas contra microorganismos como *S. aureus* de acuerdo con la CLSI.

Se hizo un experimento más en ausencia de cloruro de tetrazolio, en el que se logró observar un halo de inhibición de 22 mm donde se colocó levofloxacin (5 µg/punto de aplicación), y un halo de inhibición de 8.7 mm donde se colocó el extracto SH23 amarillo 1 (500 µg/punto de aplicación) (Imagen 10). En el control negativo no hubo halo de inhibición.

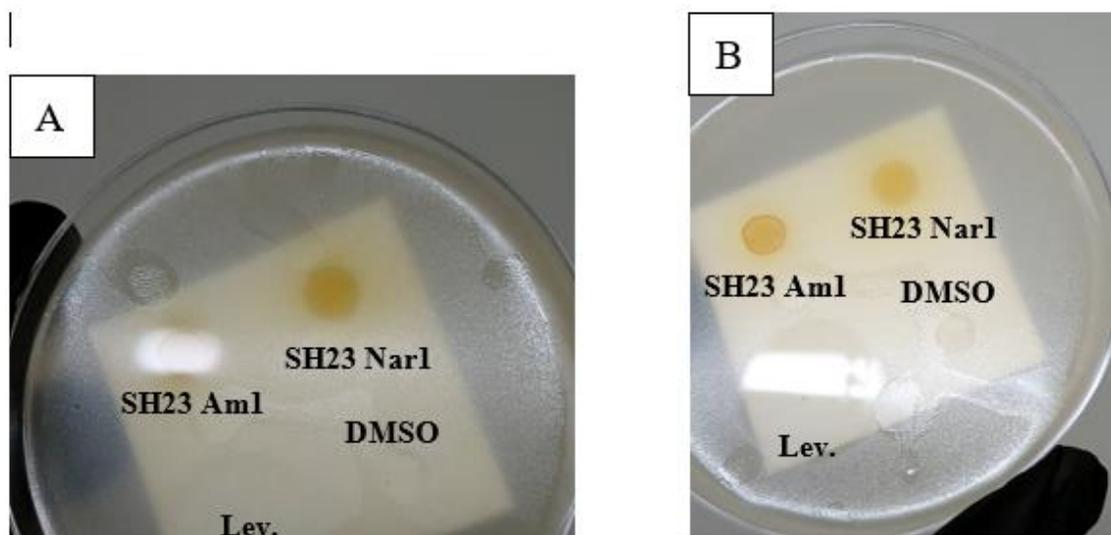


Imagen 10. Actividad antibacteriana del extracto SH23 contra la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 en ausencia de cloruro de tetrazolio. Dado que los halos de inhibición solo se observaron a contraluz, se necesitaron 2 fotografías de la misma placa. En este experimento se utilizó AMH sin cloruro de tetrazolio. Los halos de inhibición se observaron a contraluz. A) Actividad del extracto SH23 Amarillo 1, B) Actividad del levofloxacin. SH23 AM1: Extracto de sobrenadante SH23 Amarillo 1; SH23 Nar1: Extracto de sobrenadante SH23 Naranja 1; Lev: Levofloxacin; DMSO: Dimetilsulfóxido. El punto de aplicación fue de 5 µL en todos los tratamientos.

7.7. Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) contra *E. coli* ATCC 25922.

La CMI del extracto SH23 contra *E. coli* ATCC 25922 se determinó por bioautografía, se utilizaron 6 concentraciones: 250 μg , 125 μg , 62.5 μg , 31.25 μg , 15.625 μg y 7.813 g en un volumen de 5 μl en el punto de aplicación. Se utilizó cloruro de tetrazolio como indicador de viabilidad. Se observó en la TLC que la CMI fue de 250 μg / punto de aplicación (Imagen 11).

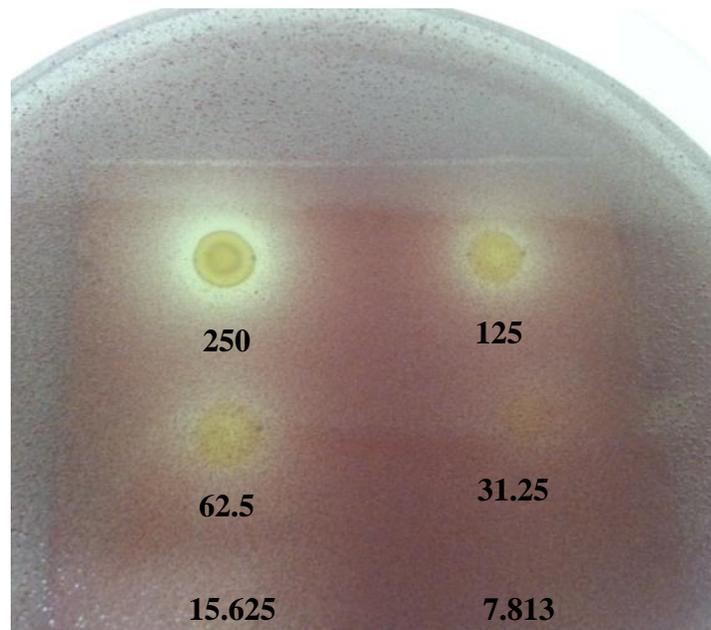


Imagen 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto SH23 contra *E. coli* ATCC 25922. Las concentraciones: 250 μg , 125 μg , 62.5 μg , 31.25 μg , 15.625 μg , y 7.813 μg se hicieron mediante diluciones seriadas y todas se aplicaron por punto de aplicación de 5 μL .

En la Imagen 11 se observó que la CMI contra *E. coli* ATCC 25922 fue de 250 µg por punto de aplicación. En comparación con otros autores, quienes reportaron que la concentración para inhibir el crecimiento de esta bacteria fue más alta, 50 mg/mL. Por ejemplo, Flores-Arroyo y colaboradores, en el 2019 determinaron que extractos producidos por el hongo endófito *Colletotrichum* sp., aislado de la planta *Crescentia alata* Kunth, inhibieron 8.5 mm el crecimiento de la bacteria *E. coli* ATCC 26922 a una concentración de 10 mg/mL mediante del método de difusión en agar. Por otra parte, Morales-Aguilar y colaboradores, en el 2017, demostraron que extractos producidos por el hongo endófito *Trematophoma* sp. inhibieron hasta un 43 % el crecimiento de la bacteria *E. coli* ATCC 26922 a una concentración de 1 mg/mL.

Packiaraj y colaboradores, en el 2016, demostraron que extractos de acetato de etilo producidos por hongos endófitos *Colletotrichum gloeosporioides* inhibieron 12.3 ± 2.1 el crecimiento de *E. coli* a una CMI de 100 µg/mL. Por otra parte, se ha reportado actividad en *E. coli* a concentraciones más bajas. Xu y colaboradores, en el 2008, demostraron que extractos de n-butanol a una concentración de 31 µg/mL, inhibieron 22 mm el crecimiento de *E. coli*. El hongo endófito *Colletotrichum gloeosporioides*, fue aislado de hojas de un árbol *Cinnamomum malabattrum* ubicado en la India.

Corrado y Rodrigues, en el año 2004, reportaron que a una concentración de 2 mg/mL, los extractos metanólicos producidos por hongos endófitos *Phomopsis* sp. aislados de hojas de *Aspidosperma tomentosum*, y del tejido leñoso de *Spondias mombin*, inhibieron 5 mm el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. Las plantas fueron colectadas en Brasil.

A pesar de estas comparaciones se debe de tener en cuenta que las muestras probadas en los ensayos de actividad antibacteriana de este trabajo no fueron purificadas. Probablemente aumentaría su actividad utilizando compuestos puros. Por ejemplo, Kim y colaboradores, demostraron en 2004 que la periconicina A producida por el hongo endófito *Periconia* sp., inhibió el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 a una CMI de 100 µg/mL. El hongo endófito *Periconia* sp. fue aislado de las ramas de la planta Koreana *Taxus cuspidata*.

7.8. Concentración Mínima Inhibitoria contra *S. aureus* ATCC 25923.

La CMI del extracto SH23 contra la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 fue de 31.25 μg /punto de aplicación. Donde se colocó el extracto a esta concentración hubo un halo de inhibición de 5 mm (Imagen 12).

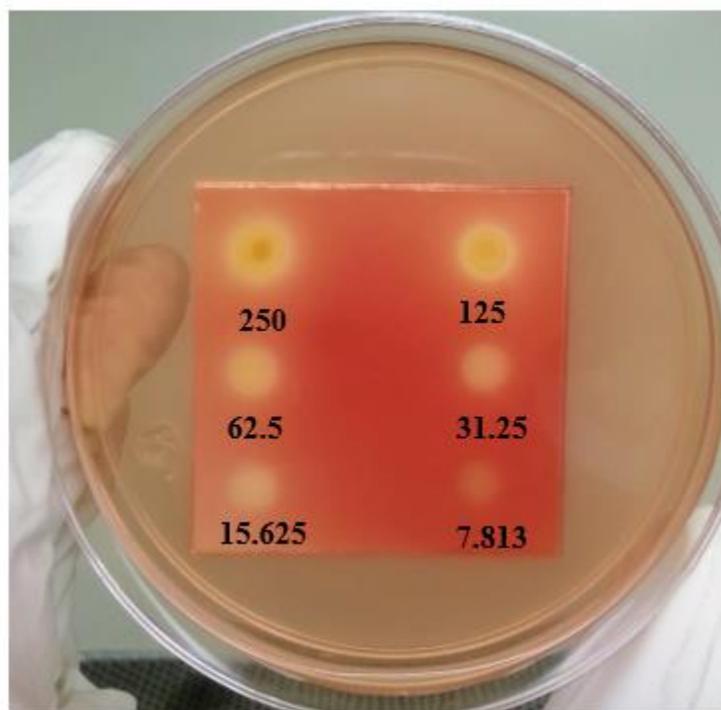


Imagen 12. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto SH23 contra *S. aureus* ATCC 25923. Las concentraciones se hicieron mediante diluciones seriadas y todas se aplicaron por punto de aplicación de 5 μL .

Se necesitó una concentración de 31.25 μg /punto de aplicación que equivale a 6.25 mg/mL para inhibir el crecimiento de la bacteria *S. aureus* ATCC 25923, la cual es una concentración más baja a la obtenida por Flores-Arroyo y colaboradores en el 2019, que demostraron que los extractos producidos por hongos endófitos *Podospora* sp., aislados de la planta *Crescentia alata* Kunth, inhibieron 5.75 mm el crecimiento de *S. aureus* 25923 a una concentración de 10 mg/mL.

Por otra parte, Yashavantha y colaboradores, en el 2015, reportaron que extractos producidos por hongos endófitos *Phomopsis liquidambaris* aislados de la planta *Cryptolepis buchanani* Roem inhibieron 22.3 mm el crecimiento de la bacteria *S. aureus* MTCC 7443 a una concentración de 100 µg/disco.

Astuti y colaboradores, en el año 2014, lograron separar mediante CCF varios componentes del extracto de acetato de etilo, producidos por el hongo endófito *P. crocatum* aislado de la planta *Piper crocatum* Ruiz & Pav perteneciente a Indonesia. Como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica gel F254 y como fase móvil se utilizó n-hexano: acetato de etilo: ácido glacial (10:89:1). También demostraron que estos componentes tenían actividad contra *S. aureus*, la inhibición del crecimiento de esta bacteria fue de 16 mm a una CMI de 250 µg.

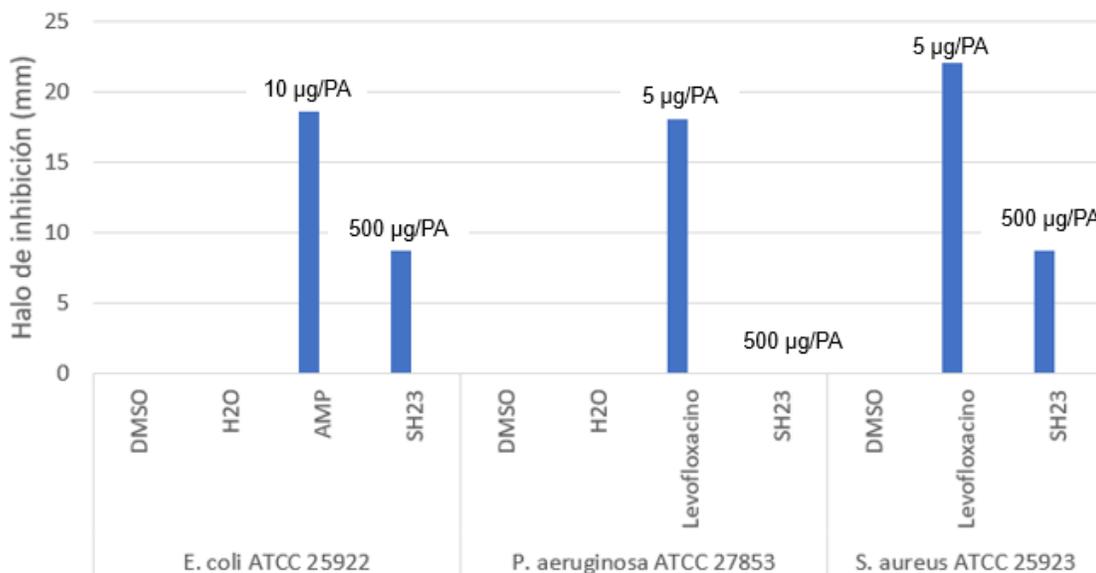
En el año 2015, Jade Yin y colaboradores, publicaron que los componentes presentes en el extracto de acetato de etilo, producido por el hongo endófito *Aspergillus terreus* MP15 aislado de las hojas de la planta *Swietenia Macrophylla* (obtenida de Malasia), inhibieron 13 ± 1 mm el crecimiento de la bacteria *S. aureus* a una concentración de 50 mg/mL. Además, este extracto fue separado mediante CCF utilizando placas de aluminio de sílica gel 60 F254, y como fase móvil se utilizaron diclorometano: metanol (9:1). También se logró identificar mediante análisis de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, al di-n-octil phthalato. Los autores mencionan que este componente es el que podría ser el responsable de la actividad antibacteriana.

También se ha reportado que los componentes presentes en los extractos de acetato de etilo producidos por hongos endófitos aislados de *Cinnamomum burmanni*, los cuales fueron obtenidos de Indonesia, tuvieron actividad contra *S. aureus* InaCC-B4. El hongo endófito *Pestalotiopsis* sp. C1BP-1 produjo componentes contra esta bacteria ya que inhibió 16 mm el crecimiento de *S. aureus* a una concentración de 10 mg/mL. Los componentes se separaron mediante CCF usando como fase estacionaria placas de sílica gel GF254, la fase móvil fue diclorometano: metanol (10:1) (Praptiwi, *et al.*, 2015).

Una vez obtenida la CMI contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, lo siguiente fue migrar al extracto utilizando cromatografía en capa fina, con una longitud de placas TLC de 8 cm. Se comprobó anteriormente que con esta longitud hay una mejor separación de los

extractos (Imagen 22), la corrida se realizó en combinación con bioautografía contra *E. coli* y contra *S. aureus*.

Se puede observar en la Gráfica 1 que existe gran diferencia entre la ampicilina y el extracto SH23, lo que nos indicaría que el extracto no posee una actividad tan buena como la ampicilina. Sin embargo, debemos tener en cuenta que en los experimentos realizados en este trabajo, se utilizó el extracto crudo. La actividad podría incrementar al purificar el componente. Además, el extracto estuvo almacenado durante 4 años y aún así mostró poseer actividad antibacteriana. Por ejemplo, Morales-Aguilar, en el 2017 demostró que el hongo endófito *Colletotrichum* aislado de *C. alata* Kunth recién cultivado *in vitro*, inhibió 44 % el crecimiento de la bacteria *E. coli* ATCC 25922 a una CMI muy baja, la cual fue de 0.5 mg/mL.



Grafica 1. Actividad antibacteriana del extracto SH23.

DMSO: Dimetilsulfóxido; H₂O: Agua; KAN: Kanamicina; AMP: Ampicilina; SH23: Extracto SH23; PA: Punto de aplicación.

7.9. Bioautografía contra *E. coli* ATCC 25922.

Ya estandarizada la bioautografía, se procedió a migrar el extracto de sobrenadante SH23 aplicando este extracto sobre una TLC de aluminio de sílica gel (fase estacionaria). El extracto se aplicó en el centro a 1 cm de altura, con una carga de 500 µg de extracto. La fase móvil fue cloroformo/metanol a una proporción 5:1 (v/v), el volumen total fue de 18 mL. Se logró observar en la parte superior el Fr: 1 (Imagen 13).

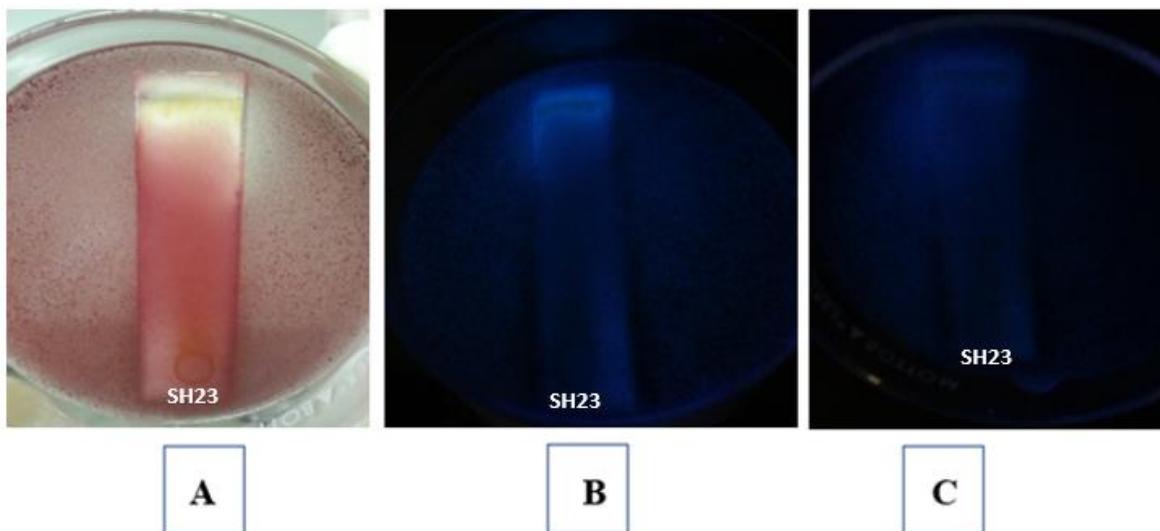


Imagen 13. Bioautografía del extracto SH23 contra *E. coli* ATCC 25922, utilizando cloruro de tetrazolio.

A) Luz visible B) Luz UV de onda larga y C) Luz UV de onda corta. SH23: Extracto de sobrenadante 23. Placa migrada con fase móvil cloroformo: metanol (5:1).

7.10. Bioautografía contra *S. aureus* ATCC 25923, con fase móvil cloroformo: metanol (5:1).

Contra *S. aureus* ATCC 25923 se formaron dos halos de inhibición, uno con Fr de 0.3 en la parte inferior y otro de 1 en la superior (Imagen 14).



Imagen 14. Bioautografía del extracto SH23 contra *S. aureus* ATCC 25923, utilizando cloruro de tetrazolio. SH23: Extracto de sobrenadante 23 (500 μg /punto de aplicación).

Placa migrada con fase móvil cloroformo: metanol (5:1).

Los halos de inhibición formados en este experimento fueron similares a los resultados de Yashavantha y colaboradores. Estos autores publicaron dos artículos interesantes en 2015. En su primera publicación reportaron que la migración del extracto de acetato de acetato de etilo producido por el hongo endófito *Phomopsis liquidambaris* CBR-15, con un Fr de 0.56, inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*. En la publicación posterior demostraron que el hongo endófito *Phomopsis liquidambaris* CBR-18 aislado de hojas ramas y raíz de *Cryptolepis buchanani* Roem (ubicada en la India), sintetiza genes policétido sintasa relacionados con actividad antibacteriana. El método de bioautografía permitió encontrar el Fr, el cual fue de 0.56. La CMI contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* fue entre 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La migración del extracto no fue lo suficientemente favorable para la separación de los componentes presentes en este extracto. Se hizo una CCF del extracto SH23 y se expuso a luz de onda corta y onda larga, pero no se lograron a observar bandas definidas (Imagen15).

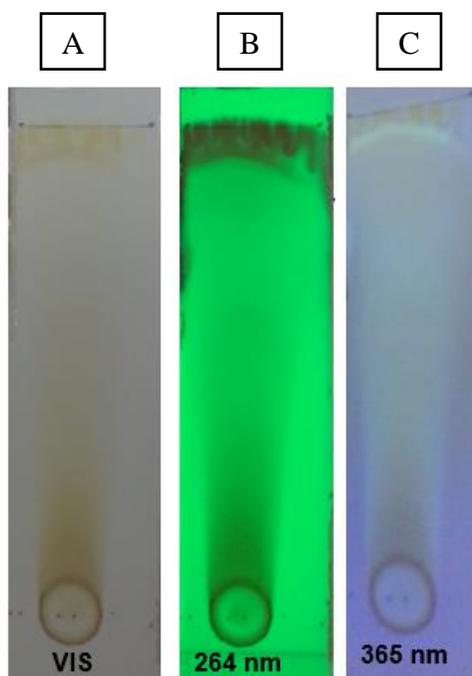


Imagen 15. CCF del extracto SH23 diluido en DMSO.

A) Luz visible B) Luz de onda corta C) Luz de onda larga. Se colocaron 500 μ g del extracto. Placa migrada con fase móvil cloroformo: metanol (5:1).

7.11. Dilución del extracto SH23 en DMSO.

Inicialmente el extracto SH23 se había diluido en DMSO, debido a que este disolvente es ampliamente empleado en la solubilización de compuestos puros y extractos en las evaluaciones antibacterianas. Entre sus propiedades se incluyen: una rápida penetración en las membranas biológicas (en este caso en la pared celular bacteriana) y además es considerado de baja toxicidad (Brayton, 1985). En las imágenes 5 y 6 se puede observar que donde se colocó DMSO (control negativo), no se formó ningún halo de inhibición contra *E. coli* ATCC 25922.

Por otra parte, en estudios previos, Flores-Arroyo en 2019 diluyó en DMSO los extractos obtenidos a partir de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth y obtuvo buenos resultados en ensayos de actividad antibacteriana.

Además, Tavares y colaboradores en el 2017 obtuvieron buenos resultados de actividad antibacteriana diluyendo en DMSO el extracto producido por *Periconia ignaria* (A2C47). Se demostró que estos extractos diluidos en DMSO inhibieron 17.7 mm el crecimiento de la bacteria *S. aureus* GL 8702.

Sin embargo, se puede apreciar en la Imagen 15, que diluir el extracto con DMSO no favoreció a la hora de separar los componentes del extracto mediante CCF, entonces se procedió diluir el extracto en metanol. Se debe evitar el uso de DMSO en procesos cromatográficos, ya que este disolvente tiene una fuerte afinidad por la sílica en fase normal, comprometiendo su desarrollo.

7.12. Dilución del extracto SH23 en metanol.

Se procedió diluir el extracto en metanol, autores como Corrado y Rodrigues en el 2004, obtuvieron buenos resultados de actividad antibacteriana diluyendo extractos producidos por el hongo endófito *Phomopsis* sp. Sin embargo, el metanol no favoreció ya que nuestro extracto se precipitó.

7.13. Dilución del extracto SH23 en acetato de etilo.

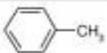
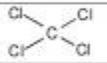
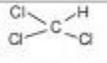
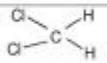
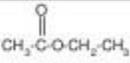
Debido a que el metanol no favoreció la dilución del extracto SH23, se procedió a diluir en acetato de etilo. Autores como Yashavantha y colaboradores, en el 2015, obtuvieron buenos resultados de actividad antibacteriana diluyendo en acetato de etilo extractos producidos por el hongo endófito *Phomopsis liquidambaris* CBR-15. Los autores demostraron que estos extractos inhibieron 22.3 mm el crecimiento de *S. aureus* (MTCC 7443). Al diluir el extracto en acetato de etilo, fue posible lograr buenos resultados. Se obtuvo una solución homogénea y sin precipitado a una concentración de 100 mg/mL (Imagen 16).



Imagen 16. Extracto SH23 diluido en acetato de etilo.

La diferencia de solubilidad entre metanol y el acetato de etilo podría deberse a una cuestión de polaridad de los componentes presentes en el extracto, pues el metanol es más polar que el acetato de etilo (Figura 18).

TABLA DE DISOLVENTES MÁS USADOS
EN ORDEN DE POLARIDAD

DISOLVENTES	FORMULA SEMI-DESARROLLADA	Pe °C	Pe Cd. Méx	Densidad δ
Éter de petróleo	Mezcla de hidrocarburos	35-60°		0.640
Hexano	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69°		0.659
Tolueno		110°		0.865
Benceno		80°		0.874
Éter	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35°		0.706
Tetracloruro de carbono	CCl_4 	77°		1.604
Clorofomo	CHCl_3 	61°		1.492
Cloruro de metileno - Diclorometano	CH_2Cl_2 	40°		1.325
Acetato de etilo		77°		0.902
Acetona		56°		0.791
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	78°		0.785
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65°		0.791
Agua		100°		1.000

P
O
L
A
R
I
D
A
↓

iv

Q. Orgánica I (1311)

Figura 18. Polaridad de algunos solventes (Tomado de: Química Orgánica I, 2006).

Además de obtener un extracto de acetato de etilo bien diluido y homogéneo, la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 permaneció (Imagen 17). Se formó un halo de inhibición de 8.1 mm donde se colocaron 500 μg del extracto SH23 diluido con DMSO, también se formó un halo de inhibición donde se colocaron 500 μg del extracto SH23 diluido con acetato de etilo, y levemente un halo de inhibición donde se colocaron 30 μg de tetraciclina. En los controles negativos (DMSO, acetato de etilo y H_2O) no se formaron halos de inhibición (Imagen 17).



Imagen 17. Actividad antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923.

SH23D: Extracto de sobrenadante 23 diluido en DMSO; SH23A: Extracto de sobrenadante

23 diluido en acetato de etilo; D: DimetilSulfóxido; AE: Acetato de Etilo; H₂O: Agua;

Tetra: tetraciclina. El punto de aplicación fue de 5 µL.

La dilución del extracto en acetato de etilo también permitió una mejor separación cromatográfica de los componentes presentes en el extracto SH23 (Imagen 18).

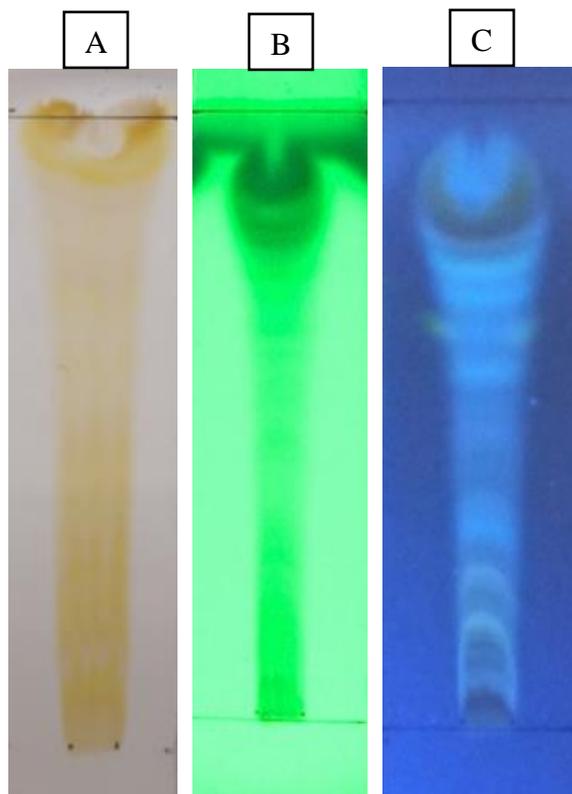


Imagen 18. CCF de extracto SH23 diluido en acetato de etilo. Se colocaron 500 μg del extracto. A) Luz visible B) Luz de onda corta 264 nm C) Luz de onda larga 365 nm. Placa migrada con fase móvil cloroformo: metanol (5:1).

Actualmente se está documentando la utilidad de los hongos endófitos. Por ejemplo, se ha reportado que se sintetizaron nanopartículas de plata que contienen extractos del hongo endófito *G. mangiferae* aislado de hojas de *Citrus* sp. provenientes del sur de la India. Estas nanopartículas tienen la capacidad de formar poros en células bacterianas causándoles la muerte. Las nanopartículas tuvieron actividad contra *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* a una CMI de 3.12 µg/mL (Balakumaran *et al.*, 2015). Por otra parte, Singh y colaboradores, en el 2013, también sintetizaron nanopartículas de plata a partir de *Penicillium* sp. aislado de hojas de *Curcuma longa* (provenientes de la India). Además, estas nanopartículas fueron capaces de inhibir 21 mm el crecimiento de *P. aeruginosa* y 15 mm el crecimiento de *K. pneumoniae*.

Estudios realizados por Hussein y colaboradores, en el año 2015, mencionan que la biosíntesis de nanopartículas mediante hongos endófitos es un método confinable y no tóxico. Estos investigadores demostraron que los parámetros de optimización para las nanopartículas producidas por hongos endófitos fueron: 50 °C, pH 6 y una incubación de 72 horas. Las nanopartículas tuvieron actividad contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, inhibiendo su crecimiento 2 mm y 1.6 mm respectivamente.

Además, en el año 2015, Singh y colaboradores publicaron que las nanopartículas de plata de hongos endófitos *Fusarium* sp. aislado de hojas de *Withania somnifera* (colectada en la India), tuvieron un tamaño de 12 a 20 nm y de forma esférica. Los resultados fueron corroborados por estudios de Microscopio Electrónico de Transmisión. También se comprobó que estas nanopartículas de plata inhibieron 26 mm el crecimiento de *E. coli*, 26 mm el crecimiento de *S. typhi* y 28 mm el crecimiento de *S. aureus*.

Por otra parte, algunos hongos endófitos, también secretaron componentes contra bacterias resistentes a antibióticos (Buatong *et al.*, 2011; Phongpaichit, *et al.*, 2006; Ratnaweera, *et al.*, 2015).

Se ha reportado por parte de Ibrahim y colaboradores, en el año 2014, que los componentes producidos por hongos endófitos aislados de las hojas de *Swietenia macrophylla* (colectada en Malasia), inhibieron el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Phongpaichit y colaboradores, en el año 2006, reportaron que los extractos crudos de acetato de etilo obtenidos del hongo endófito *Aspergillus aculeatus*, mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina SK1 a una CMI de MIC 128 µg/mL.

De igual manera Buatong y colaboradores, en el 2011, publicaron que extractos crudos producidos por hongos endófitos sintetizaron componentes contra la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina SK1.

Posteriormente, en el año 2015, Ratnaweera y colaboradores demostraron que la equisetina producida por el hongo endófito *Fusarium* sp., tuvo actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 resistente a meticilina, a una CMI de 8 µg/mL. El hongo endófito fue aislado de flores de la planta cactácea *Opuntia dillenii*, que fueron colectadas en Sri Lanka.

7.14. Bioautografía contra *S. aureus* ATCC 25923, con fase móvil cloroformo: metanol (7:3).

Se hizo una bioautografía contra *S. aureus* ATCC 25923 utilizando el extracto bioactivo SH23, el cual fue diluido en acetato de etilo, con la finalidad de separar a los componentes del extracto y poder encontrar el frente de retención (Fr). En la Imagen 19 se puede apreciar el Frente de Retención el cual fue de 0.72, y generó un halo de inhibición de 10 mm de ancho y 17 mm de alto. Además se puede observar que el componente responsable de la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 presentó una pigmentación café.

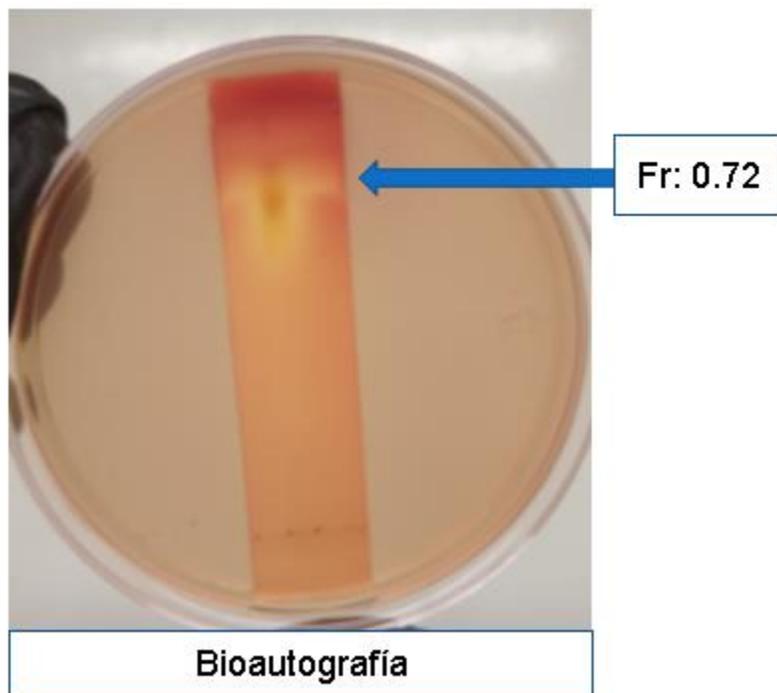


Imagen 19. Bioautografía contra *S. aureus* ATCC 25923, con una fase móvil cloroformo/ metanol (7:3).

Como indicador de viabilidad se utilizó cloruro de tetrazolio.

7.15. Identificación parcial mediante CCF, del grupo de componente responsable de la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923.

Se realizaron experimentos de CCF para ensayos de bioautografía e identificación parcial de los componentes. Se utilizaron TLC de 8x4 cm, la fase móvil fue cloroformo/metanol (7:3). En la Imagen 20 se puede apreciar que todas las placas migradas con la fase móvil cloroformo metanol (7:3) presentaron el mismo patrón de migración, tanto en luz visible como con luz UV.

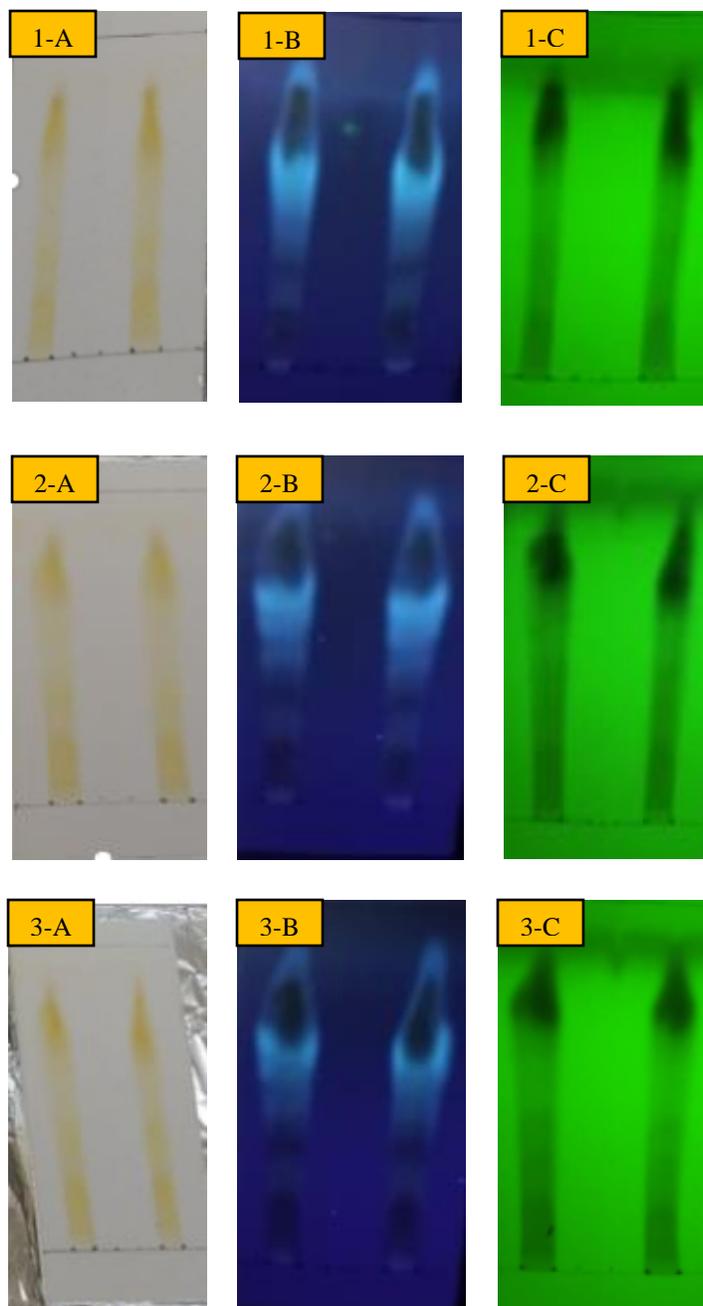


Imagen 20. Cromatografía en Capa Fina del extracto SH23. 1-A, 2-A y 3-A (luz visible); 1-B, 2-B y 3-B (luz UV de onda larga 365 nm); 1-C, 2-C y 3-C (luz UV de onda corta 264 nm). La fase móvil fue cloroformo: metanol (7:3).

Una de estas placas se utilizó para realizar una bioautografía. Las otras cinco se revelaron con diferentes reactivos químicos como: vainillina, cloruro férrico, reactivo de Dragendorff, reactivo de ninhidrina (Imagen 21).

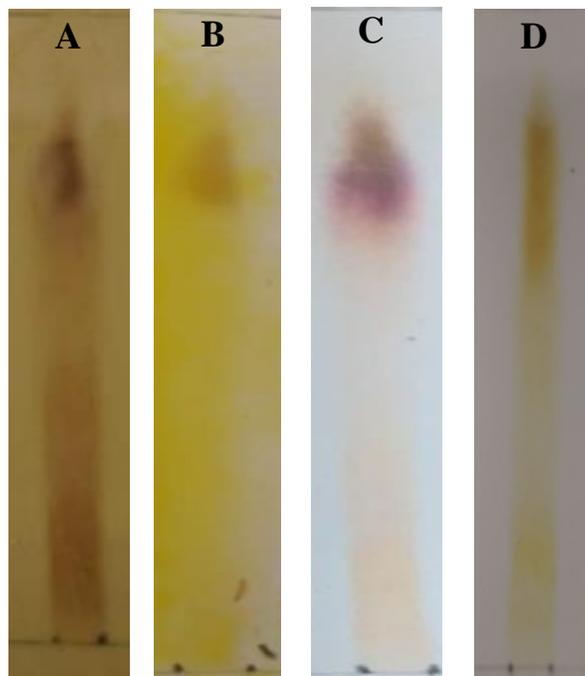


Imagen 21. CCF del extracto SH23 reveladas con distintos reactivos químicos.

A) Cloruro férrico; B) Reactivo de Dragendorff; C) Vainillina; D) Reactivo de ninhidrina.
Placa migrada con fase móvil (7:3).

El reactivo de ninhidrina presentó una coloración café intenso en la parte superior lo cual podría denotar la presencia de aminas biogénicas en el extracto (Landua y Awapara, 1949) (Imagen 21-D)

De acuerdo con los resultados observados en las TLC reveladas con diferentes reactivos químicos, la banda de interés podría estar constituida por alcaloides, aminas fenólicas o terpenos ya que el Fr: 0.72 desarrolló una coloración naranja en la placa donde se colocó el reactivo de Dragendorff (Imagen 21-B), esto indica presencia de alcaloides (Sreevidya y Mehrotra, 2003) y grupos aminados (Rubia y Gomez, 1977). En *Periconia ignaria*, ya se han identificado alcaloides por parte de Verma y colaboradores en 2011. Por otra parte, en la placa donde se reveló con cloruro férrico hubo una coloración roja (Imagen 21-A), lo que indica la presencia de compuestos fenólicos (Miller, 2015).

En la placa que se aspejó con vainillina se puede observar una banda color morado, los que indica presencia de terpenos (Attaway *et al.*, 1965) (Imagen 21-C).

En cuanto a componentes purificados producidos por hongos endófitos *Periconia* sp., ya se han reportado periconicinas por parte de Kim y colaboradores, en el año 2004. Estas periconicinas mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* a una CMI de 100 y 12.5 µg/mL respectivamente.

También se ha identificado un alcaloide llamado piperina, producido por hongos endófitos *Periconia* sp., el cual tuvo actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* a una CMI muy baja, la cual fue de 1.74 – 2.62 µg/mL (Verma *et al.*, 2011).

Previamente en el 2017, Tavares y colaboradores demostraron que el hongo endófito *Periconia ignaria* (A2C47) fue capaz de producir compuestos fenólicos. Los extractos producidos por este hongo inhibieron a *S. aureus* GL 8702 a una concentración 5 mg/mL.

Gao y colaboradores en el 2019 reportaron que hongos del género *Periconia* produjeron Periconiastona A un ergosterol que tuvo actividad contra *S. aureus* a una CMI de 4 µg/mL.

Por otra parte, se ha reportado que los hongos endófitos aislados de la planta medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth, produjeron componentes del grupo de los terpenos y de los compuestos fenólicos (Flores-Vallejo *et al.*, 2020).

8. CONCLUSIONES

-Hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth, tienen la capacidad de producir componentes con actividad antibacteriana.

-El hongo endófito *Periconia cf. ignaria* secreta componentes con actividad antibacteriana contra las bacterias sensibles a antibióticos: *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.

-La CMI contra las bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 fue de 250 y 31.25 μg /punto de aplicación de 5 μL .

-El hongo endofito *Periconia cf. ignaria* deja de producir componentes con actividad antibacteriana a partir de la segunda generación.

-El/los componentes del extracto SH23 responsables de la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923, podrían ser aminas fenólicas, alcaloides o terpenos.

9. PERSPECTIVAS

- Aislar y purificar el/los componentes del extracto de sobrenadante SH23 producido por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria*, responsable de la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923.
- Demostrar mediante ensayos de co-cultivo que el hongo endófito *Periconia cf. ignaria* tiene la capacidad de volver a producir componentes contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923.
- Determinar mediante biología molecular el gen que codifica para los componentes de actividad contra *S. aureus* ATCC 25923, producidos por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria*.
- Realizar ensayos de actividad antibacteriana contra bacterias resistentes a antibióticos, con el extracto de sobrenadante SH23 producido por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria*.
- Optimizar parámetros como pH, temperatura para lograr una mayor producción de metabolitos antibacterianos a partir del hongo endófito *Periconia cf. ignaria*.

10. REFERENCIAS.

- Aguilar, A. (1996). Plantas medicinales del herbario IMSS: cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. Ciudad de México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., *et al.* (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (26), 15649–15654.
- Astuti, P., Wahyono, and Ashido, O. (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pav. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2), S592-S596.
- Attaway, J. A., Barabas, L. and Wolford, R. (1965). Analysis of terpene hydrocarbons by thin layer chromatography. *Analytical Chemistry*, 37 (10), 1289-1290
- Avendaño-López, M. (2018). Antimicrobial resistance. Some aspects of a big problem. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 83 (4), 380-391.
- Balakumaran, M., Ramachandran, R and Kalaichelvan, P. (2015). Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* forextracellular synthesis of silver nanoparticles andtheir *in vitro* biological activities. *Microbiological Research*, 178 (1), 1-17.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Koraichi, S. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6 (1), 71-79.
- Bentley, R. and Bennett, J. M. (2003). What is an antibiotic? revisited. *Advances Applied Microbiology*. 52(1), 303-331.
- Berrocal, A. J., Barrios, M. M., y Solórzano, V. F. (2018). Resistencia antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae* en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35 (1), 155-156.
- Brayton, C. F. (1985). Dimethyl Sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*, 76 (1), 61-90.
- Brooks, G. F., Carrol, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. y Mietzner, T. A. (2011). *Bacteriología. Microbiología Médica*, edición 25 (pp. 145-163). Ciudad de México: McGraw-Hill Interamericana.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. (2011). Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (1), 3005–3008.
- Calderón, E., Arista, A., Hernández, M., Gómez, D., Macías, M., Xóchihua, L., *et al.* (2011). *Manual de antibióticos*. Ciudad de México: Grupo Percano de Editoras Asociadas, S.A. de C.V.
- Calhoun, L. A., Findlay, J. A., Miller, D. and Whitney, N. J. (1992). Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. *Mycological Research*, 96 (4), 281-286.
- Callies, O. (2011). La farmacia naturaleza-fuente de fármacos en el siglo XXI. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 1 (2), 149-153.
- Campos, E. Y. y Velasquez, S. R. (2004). Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de la pulpa de el fruto *Crescentia alata* (morro) en bacterias de origen gastrointestinal. Tesis de Licenciatura. Universidad de el Salvador. pp. 68.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69 (1), 2-9.

- Cavaliere, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., Sautter, R. L., McCarter, Y. S., Sharp, S. E., *et al.* (2005). Modos de acción de los antimicrobianos. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (pp.3-8). Seattle, Washington: Editora Coordinadora, Coyle, M. B.
- Choma, I. M. (2005). Screening of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in milk by HPLC and by TLC with direct bioautography. *Journal of Planar Chromatography*, 19 (1), 104-108.
- CLSI (2000). Consultado por última vez: 28 de mayo de 2019, de Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Recuperado de sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- CONABIO. (2019). *Crescentia alata*. Consultado por última vez: 08 de enero de 2019 de, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Recuperado del sitio web: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/10-bigno1m.pdf
- Corrado, M. and Rodrigues, K.F. (2004). Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*. 44 (2), 157–160
- De la Rosa, R., Enciso, Y., Mazón, M., Lugo, R., Valencia, D., Arenas, M., *et al.* (2018). Resistencia a β -lactámicos por β -lactamasas en enterobacterias aisladas de infección urinaria en mujeres de Caborca, Sonora, México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 5 (2), 16-22.
- Del Arco, J. (2014). Antibióticos: situación actual. *Farmacia Abierta*, 28 (5), 29-33.
- Del Rey Calero, J. (1977). Constitución de las bacterias, microbiología e inmunobiología de las enfermedades infecciosas, primera edición (pp 21-30). Madrid, España: Editorial Marban.
- Discurso de la directora general en la universidad de Georgetown en el marco de la *Global Futures Initiative* (2015). Consultado por última vez: 30 de septiembre de 2019, de Organización Mundial de la Salud. Recuperado de sitio web: <http://www.who.int/dg/speeches/2015/georgetown-university-lecture/es/>
- DOF (2018). Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la estrategia nacional de acción contra la resistencia a los antimicrobianos. Consultado por última vez: 5 de junio de 2018, de Diario Oficial de la Federación. Recuperado de sitio web: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018.
- Eliopoulos, G. M. and Roberts, M. C. (2003). Tetracycline therapy: update. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (4), 462–467.
- Faeth, S. H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *Oikos*, 98 (1), 25-36.
- Findlay, J. A., Li, G. and Johnson, J. A. (1997). Bioactive compounds from an endophytic fungus from Eastern larch (*Larix laricina*) needles. *Canadian Journal of Chemistry*, 75 (1), 716-719.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal Experimental Pathology*, 10 (3), 226-236.
- Flores-Vallejo, R. d. C., Folch-Mallol, J.L., Ashutosh, S., Cardoso-Taketa, A., Alvarez-Berber and Villarreal, M. L. (2020). ITS2 ribotyping, *in vitro* anti-inflammatory

- screening, and metabolic profiling of fungal endophytes from the Mexican species *Crescentia alata* Kunth. South African Journal of Botany, 1-12.
- Flores-Arroyo, G. (2019). Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth. Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca. pp. 73.
- Flores-Vallejo, R.d.C. (2017). Aislamiento de hongos endófitos de la especie medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth., productores de compuestos antiinflamatorios, y caracterización preliminar de endo y exometaboloma secundario. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca. pp. 231
- Gao, W., Chai, C., He, Y., Li, F., Hao, X., Cao, F. *et al.* (2019). Periconiastone A, an Antibacterial Ergosterol with a Pentacyclo [8.7.0.0^{1,5}.0^{2,14}.0^{10,15}] heptadecane System from *Periconia* sp. TJ403-rc01. Organic Letters, 21 (20), 8469–8472.
- Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J. and Balaban, N. (2017). TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. Scientific Reports, 7 (41284), 1-9.
- Gómez- Rivera, A. S., López, C. Y., Martínez, M., Cachón, X. (2015). Caracterización morfológica de hongos endófitos aislados de *Hamelia patens* Jacq. y Lantana L. de Chetumal, Quintana Roo, México. Teoría y Praxis, 19 (1), 33-44.
- Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., *et al.* (2018). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. Lancet Infectious Diseases, 18(1), 37-46.
- Guerin, M.P. (1898). Structure particuliere du fruit de quelques graminees. Botanisches, 12 (1), 365-374.
- Hasanah, U., Idramsa, R. and Prasetya, E. (2017). Molecular identification of endophytic fungi from Bark of Raru (*Cotylelobium melanoxylon*) that produce the antibacterial compounds. Biosaintifika, 9 (3), 380-386.
- Hawksworth, D. C., and A. Y. Rossman. (1987). Where are the undescribed fungi?, Phytopathology, 87 (9), 888–891.
- Hegstad, K., Giske, C., Haldorsen, B., Matuschek, E., Schønning, K., Leegaard, T. *et al.* (2014). Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. Journal of Clinical Microbiology, 52 (5), 1582–1589.
- Herrera, L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana metodología de laboratorio. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños (Costa Rica), 34 (1), 1-3.
- Horn, W. S., Simmonds, M. S., Schwartz, R. E. and Blaney, W. M. (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. Tetrahedron, 51 (14), 3969-3978.
- Horváth, G., Jámor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, E., Héthelyi, E., *et al.* (2010). Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography. Flavour and Fragrance Journal, 25 (1), 178–182.
- Huang, T., Chen, P., Wefler, V. and Raftery, A. (1961). A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. Analytical Chemistry, 33 (10), 1405-1407.

- Husseiny, S. M., Salah, T.A. and Anter, H. A. (2015). Biosynthesis of size-controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 4 (1), 225–231.
- Ibrahim, D., Chai, C. and Sheh-Hong, L. (2014). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Swietenia macrophylla* leaves. Natural Product Communications, 9 (2), 247-250.
- INEGI. (2017). Mortalidades atribuibles a infecciones por bacterias resistentes. Consultado por última vez: 08 de enero de 2019, de Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado del sitio web: <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodem/DEFUNCIONES2017.pdf>
- Inoue, H and Minghui, R. (2017). Antimicrobial resistance: translating political commitment into national action. Bull World Health Organ, 95 (4), 242.
- INSP. (2018). Resistencia bacteriana por uso inadecuado de antibióticos. Consultado por última vez: 17 de mayo de 2018, de Instituto de Salud Publica. Recuperado de sitio web: <https://www.insp.mx/avisos/4733-resistencia-bacteriana-2.html>
- Jade Yin, O. C., Ibrahim, D. and Chai Lee, C. (2015). Bioactive compounds from *Aspergillus terreus* MP15, an endophytic fungus isolated from *Swietenia Macrophylla* leaf. Malaysian Journal of Medical and Biological Research, 2 (3), 262-272.
- Jalgaonwala, R. E., Vishwas, B. and Totaram, R. (2011). A review: natural products from plant associated endophytic fungi. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 1 (2), 21-32.
- Kim, S., Shin, D. S., Lee, T. and Oh, K. B. (2004). Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. Journal of Natural Products, 67 (3), 48-450.
- Kusari, S. and Spiteller, M. (2011). Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? Natural Product Reports, 28 (7), 1203-1207.
- Kusari, S. and Spiteller, M. (2012b). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. Metabolomics, 241-266.
- Kusari, S., Hertweck, C. and Spiteller, M. (2012a). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chemistry & Biology, 19 (7), 792-798.
- Landua, A. and Awapara, J. (1949). Use of modified ninhidryn reagent in quantitative determination of amino acids by paper chromatography. Science (Washington), 109 (1), 389.
- Li, E., Tian, R., Liu, S., Chen, X., Gou, L. and Che, Y. (2007). Pestalothols A-D, bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. Journal of Natural Products, 30 (20), A-E.
- Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S. and Wang, C. (2012). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (*Liliaceae*), BMC Complementary and Alternative Medicine, 12 (1), 1-6.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J. and Tan, R. X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science, 151 (1), 67-73.

- Marmann, A., Aly, A., Lin, W., Wang, B and Proksch, P. (2014). Co-cultivation--a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*, 12 (2), 1043-1065.
- Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, Karol and Sánchez, Sergio. (2017). Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 134 (1), 1-17.
- Mathan, S., Subramanian, V. and Nagamony, S. (2013). Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *European Journal of Experimental Biology*, 3 (4):138-144.
- Miller. (2011). What's the reaction between phenol and ferric chloride?. Consultado por última vez: 21 de julio de 2020, de Quora. Recuperado del sitio web: <https://www.quora.com/Whats-the-reaction-between-phenol-and-ferric-chloride>
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J. and Pachón, J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (3), 178-188.
- Montero, C.I., Stock, F. and Murray, P.R. (2008). Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52 (3), 1167-1170
- Morales, Y. E., Herrera, M. C. y Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38 (1), 58-69.
- Morales-Aguilar, M. (2017). Actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth en el estado de Morelos, México. Tesis de licenciatura sin publicar, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca. pp. 52.
- Murray, P., Rosenthal, K. and Michael, A. (2008). Bacteriología. En *Microbiología Médica*, 5^{ta} edición (pp. 193-415). Madrid, España: Gea Consultoría Editorial, SLL.
- Nakasone, K., Peterson, S. and Jong, S. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. En *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. (pp. 37-47). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., *et al.* (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13 (265), 1-10.
- Neal, C. E. and Calbert, H. E. (1954). The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Consultado por última vez: 14 de noviembre de 2020 de, *Journal of dairy Science*. Recuperado de sitio web: <https://www.journalofdairyscience.org/action/showPdf?pii=S0022-0302%2855%2995015-3>
- Nogueira, M. A., Diaz, G. and Stangarlin, J. R. (2007). Search of antibiotic metabolites from phytopathogenic fungi. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26 (5), 741-743.
- Nostro, A., Germano, M. P., D'Angelo, V., Marino, A. and Cannatelli, M. A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30 (1), 379-384.
- Nseir, S., Pompeo, C. D., Soubrier, S., Delour, P., Lenci, H., Roussel-Delvallez, M. *et al.* (2005). First-generation fluoroquinolone use and subsequent emergence of multiple drug-resistant bacteria in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, 33 (2), 283-289.

- Olivares-Pérez, J., Rojas-Hernández, S., Quiroz-Cardozo, F., Camacho-Díaz, L. M., Cipriano-Salazar, M. A. y Damián-Valdez, B., *et al.* (2018). Diagnóstico de los usos, la distribución y características dasométricas del árbol cirrián (*Crescentia alata* Kunth) en el municipio de Pungarabato, Guerrero, México. *Polibotánica*, 45 (1), 191-204.
- OMS. (2017). Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Consultado por última vez: 27 de febrero de 2017, de Organización Mundial de la Salud. Recuperado del sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2017). Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Consultado por última vez: 27 de febrero de 2017, de Organización Mundial de la Salud. Recuperado del sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2018). Resistencia a los antibióticos. Consultado por última vez: 5 de febrero de 2018, de Organización Mundial de la Salud. Recuperado del sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Packiaraj, R., Jeyakumar, S., Ayyappan, N., Adhirajan, N., Premkumar, G., Rajarathinam, K., *et al.* (2016). Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from endemic tree *Cinnamomum malabattrum*. *Studies in Fungi*, 1 (1), 104-113.
- Padilla-Serrano, A., Serrano-Castañeda, J. J., Carranza-González, R. y García-Bonillo, M. P., *et al.* (2018). Factores de riesgo de colonización por enterobacterias multirresistentes e impacto clínico. *Revista Española de Quimioterapia*, 31 (3), 257-262.
- Peralta-Valverde, G. (2012). Contribución al conocimiento del árbol cirrián (*Crescentia alata* Kunth) variabilidad, selección, morfología, citogenética y fitoquímica. Tesis doctoral sin publicar. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Texcoco, Estado de México. pp. 198.
- Pérez, N. y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biología Vegetal*, 11 (4), 195-211.
- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. (2006) Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, 48 (3), 367-372.
- Picazo. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Consultado por última vez: 15 de mayo de 2019. Recuperado del sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Pigrau, C. (2033). Oxazolidinonas y Glucopéptidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (3), 157-65.
- Pío-León, J., F., Díaz-Camacho, S. P., López-López, M. A., Uribe-Beltrán, M., Willms, K., López-Angulo, G, *et al.* (2013). Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12 (4), 356 – 364.

- Prabukumar, S., Rajkuberan, C., Ravindran, K. and Sivaramakrishnan, S. (2015). Isolation and characterization of endophytic fungi from medicinal plant *Crescentia cujete* L. and their antibacterial, antioxidant and anticancer properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7 (11), 316-321.
- Praptiwi, Ilyas, M., Fathoni, A. and Wulansari, D. (2015). Antibacterial screening of the culture of endophytic fungal extracts isolated from cinnamon stick (*Cinnamomum burmanni* [Nees & T. Nees] Blume). *Teknologi Indonesia*, 38 (1), 33–41.
- Prieto, J. y Cervera, A. (2002). Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. *Medicine*, 8 (69), 3707-3714.
- Pulici, M., Sagawara, F., Koshino, H., Uzawa, J. and Yoshida, S. (1996b). Pestalotiopsins A and B: New caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus brevifolia*. *The Journal of Organic Chemistry*, 61 (6), 2122-2124.
- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Uzawa, J. and Yoshida, S. (1996a). A new isodrimeninol from *Pestalotiopsis* sp. *Journal of Natural Products*, 59 (1), 47-48.
- Purwantini, I., Wahyono, Mustofa and Asmah, R. (2015). Isolation of endophytic fungus from *Artemisia Annuua*, L and identification of their antimicrobial compound using bioautography method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7 (12), 95-99.
- Química Orgánica I. (2006). Tablas de polaridad de solventes orgánicos. Consultado por última vez: 14 de noviembre de 2020 de, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado del sitio web: <https://es.slideshare.net/jestval/tablas-de-polaridad-de-solventes-organicos>
- Radji, M., Sumiati, A., Rachmayani, R. and Elya, B. (2011). Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 10 (1), 103-107.
- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R. and Upadhyayula, S. M. (2017). Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60 (1), 1-26.
- Rakshith, D., Santosh, P., Tarman, K., Gurudatt, D. and Satish, S. (2013). Dereplication strategy for antimicrobial metabolite using thin-layer chromatography–bioautography and LC–PDA–MS analysis. *Journal of Planar Chromatography*, 26 (6), 470–474.
- Ramachandran, S. and Gottlieb, D. (1961). Mode of acción of antibiotics II. specificity of acción of antimycin A and ascocin. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 53 (1), 396 402.
- Ratnaweera, P.B., Silva, E. D., Williams, D. E. and Andersen, R.J. (2015). Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(220), 1-7.
- Reardon, S. (2014). Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature*, 509 (1), 141-142.
- Report early implementation (2017). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System -GLASS-. Consultado por última vez: 09 de noviembre de 2020, de Organización Mundial de la Salud. Recuperado del sitio web: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Rivera-Orduña, F. N., Flores-Bustamante, Z. R., Gracida-Rodriguez, J. N. and Flores-Cotera, L. B. (2011). Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity*, 47 (1), 65-74.
- Rivero, E., Herrera, M. L., Larrondo, H., Lozano, D. y León, D. (1998). Carbapenémicos y monobactámicos. *Acta Médica*, 8 (1), 66-70.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E. and Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 1-17.
- Rosa, L., Vieira, M., Cota, B., Johann, S., Alves, T., Zani, C. and Rosa, C. (2011). Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. En Rundfeldt, C. In drug development. A case study based insight into modern strategies (pp. 469-486). Croatia: Intech
- Rubia, L. and Gomez, R. (1977). TLC Sensitivity of six modifications of Dragendorff's reagent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66 (11), 1656-1657.
- Saikia, R. and Bezbaruah, R. (2008). *Microbial biotechnology*. New Delhi, India: New India Publishing Agency.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M. and Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review Ecology Systematics*, 29 (1), 319- 343.
- Saikkonen, K., Walli, P., Helander, M. and Faeth (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9 (6), 275-280.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., *et al.* (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.
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., and García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C, Rivas-Morales, M. A., Oranday-Cardenas, y Verde-Star, M. J., *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 77-100). Barcelona, España: OmniaScience. pp. 77-100.
- Sartoratto, A., Machado, A. L., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. and Rehder, V. L. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35 (1), 275-280.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A. K. and Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites, *Mycological Research*, 106 (9), 996-1004.
- Schulz, B., Rommert, A.K., Dammann, U., Aust, H. J. and Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*, 103 (10), 1275-1283.
- Secretaría de Salud. (2015). Informe anual de la red hospitalaria de vigilancia epidemiológica. Consultado por última vez: 08 de enero de 2019, de Secretaría de Salud. Recuperado del sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual_rhove_2015.pdf
- Secretaría de Salud. (2017). Informe anual de la red hospitalaria de vigilancia epidemiológica. Consultado por última vez: 08 de enero de 2019, de Secretaría de Salud. Recuperado del sitio web:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215342/3_Reporte_de_marzo_de_2017.pdf

- Shan, T., Sun, W., Lou, J., Gao, S., Mou, Y. and Zhou, L. (2012). Antibacterial activity of the endophytic fungi from medicinal herb, *Macleaya cordata*. African Journal of Biotechnology, 11 (19), 4354-4359.
- Sharma, A., Flores-Vallejo, R. D. C., Cardozo-Taketa, A. and Villarreal, M. L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in mexican traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, 208 (1), 264-329.
- Shenpagam, H., Kanchana, D., Sinduja, G and Sandhya, R (2012). Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its mutational effect in biocontrol activity. International Journal of Pharmaceuticals Sciences and Research, 3 (11), 4338-4344.
- Shukla, S. T., Habbu, P. V., Kulkarni, V. H., Jagadish, K. S., Pandey, A. R. and Sutariya, V. N. (2014). Endophytic microbes: a novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. Asian Journal of Pharmacology and Toxicology, 02 (3), 01-16.
- Silver, L.L. (2017). Fosfomicin: mechanism and resistance. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 7 (1), 1-11.
- Singh, A., Rathod, V., Singh, D., Ninganagouda, S., Kulkarni, P., Mathew, J. and Haq, M. (2015). Bioactive silver nanoparticles from endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from an ethnomedicinal plant *Withania somnifera* (Ashwagandha) and its antibacterial activity. International Journal of Nanomaterials and Biostructures, 5(1), 15-19.
- Singh, D., Rathod, V., Ninganagouda, S., Herimath, J. and Kulkarni, P. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic gram-negative bacteria. Journal of Pharmacy Research, 7(1), 448-453.
- Singh, M., Janso, J. E., Luckman, S. W., Brady, S. F. and Clardy, J. (2000). Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115. The Journal of Antibiotics, 53 (3), 256-261.
- Sköld, O (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. Veterinary Research, 32 (1), 261-273.
- Solares-Arenas, F. (2004). Etnobotánica y usos potenciales del Cirián (*Crescentia alata*, H.B.K.) en el estado de Morelos. Polibotánica, 18 (1), 13-31.
- Sreevidya, N. and Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. Journal of AOAC International, 86 (6), 1124–1127.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. y Painter, P. R. (1992). Los comienzos de la microbiología. R. Y., Stanier, J. L., Ingraham, M. L., Wheelis y P. R., Painter. Microbiología, segunda edición (pp 1-10). Englewood, New Jersey: Reverté, S. A.
- Stierle, A., Strobel, G. and Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. Science, 260 (5105), 214-216.
- Stone, J. K., Bacon, C. W. and White, J. F. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. En C. W. Bacon y J. F. White, Microbial endophytes (pp. 3-29). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Strobel, G and Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67 (4), 491-502.

- Strobel, G. A., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. (2004). Natural products from endophytic fungi. *Journal of Natural Products*, 67 (1), 257- 268.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. and Hess, W. M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142 (2), 435-440.
- Suárez, C. and Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (2), 116–129.
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu., Sasse, F., Jansen, R. and Murali, T.S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal biology reviews*, 30 (1), 1-11.
- Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J. y Rozo-Núñez, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum*, Vol. 19 (1), 11-28.
- Tan, R. X. and Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18, 448- 459.
- Tavares, D. (2017). Antioxidant and antibacterial activity and total phenolic compounds of extracts from pigment-producing filamentous fungi. Tesis de maestría. Universidade Federal de Lavras, Lavras. pp. 87.
- Tayung, K., Barik, B.P., Jha, D.K. and Jha, D.C. (2011). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*, 2 (3), 203–213.
- Técnicas Cromatográficas. (2007). Química analítica instrumental II. Consultado por última vez: 14 de noviembre de 2020 de, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado del sitio web: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf.
- The discovery and development of penicillin (1999). Consultado por última vez: 19 de noviembre de 2019, de Royal Society of Chemistry. Recuperado del sitio web: <https://www.acs.org/content/dam/acsorg/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin/the-discovery-and-development-of-penicillin-commemorative-booklet.pdf>.
- Tripathi, R. K. and Gottlieb, D. (1969). Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology*, 100 (1), 310-318.
- UNAM. (2009). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Consultado por última vez: 13 de noviembre 2020, de Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Recuperado del sitio web: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cirian_o_cuatecomate&id=7347.
- UNAM. (2017). Generalidades de bacterias. Consultado por última vez: 30 de noviembre de 2017, de Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado del sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.htm>
- I.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E. and Smânia Jr., A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, 38 (2), 369-380.
- Vásquez, R., Palma, F., Martínez, L. y López, C. (2016). Efecto antagonista de *Hyphomycetes* endófitos de *Taxus globosa* Schltdl. contra *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp. patógenos de *Capsicum annuum*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 3 (1), 26-37.

- Velázquez-Acosta, C., Cornejo-Juarez, P. y Volkow, P. (2018). Cepas E-ESKAPE multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer. *Salud Pública de México*, 60 (2), 151-157.
- Velázquez-Meza, M. E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Pública de México*, 47 (5), 381-387.
- Verma, C. V., Lobkovsky, E., Gange, A. C., Singh, S. K., and Prakash, S. (2011). Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. Isolated from *Piper longum* L. *The Journal of Antibiotics*, 64 (1), 427-431.
- Videl, G., Beelaouaj, A., Gilly, L., Labia, R., Philippon, A., Nénot, P. and Paul, G. (1992). Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI β -lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 30 (4), 449-462.
- Villarreal, M., Cardoso-Taketa, A., Ortíz, A y Sharma, A. (2014). Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. *Revista Digital Universitaria*, 15 (8), 1-15.
- Wang, K., Lei, J., Wei, J. and Yao, N. (2012). Bioactive natural compounds from the plant endophytic fungi *Pestalotiopsis* spp. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12 (13), 1382-1393.
- Weaver, B. A. (2014). How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25 (18), 2677-2681.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73 (2), 274-276.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwiset-kanjana, K., Ruangrunsi, N., et al. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20 (1), 265-272.
- Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X. and Wang, J. (2008). Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 46 (1), 68-72.
- Yang, X., Strobel, G., Stierle, A., Hess, W. M., Lee, J. and Clardy, J. (1994). A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *Plant Science*, 102 (1), 1-9.
- Yang, Z., Rogers, L.M., Song, Y., Guo, W., and Kolattukudy, P.E. (2005). Homoserine and asparagine are host signals that trigger in planta expresión of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (1), 4197-4202.
- Yashavantha, H. C., Santosh, P., Rakshith, D. and Satish, S. (2015). Molecular characterization of an endophytic *Phomopsis liquidambaris* CBR-15 from *Cryptolepis buchanani* Roem. and impact of culture media on biosynthesis of antimicrobial metabolites. *Biotech*, 5 (1) 165-173.
- Zhou, L., Zhao, J., Xu, L., Huang, Y., Ma, Z. and Wang, J. (2009). Antimicrobial compounds produced by plant endophytic fungi. En In: *fungicides-chemistry, environmental impact & health effects-* (pp. 91-119). Estados Unidos: Nova Science Publishers, Inc.
- Zou, W. X., Meng, J. C., Lu, H., Chen, G. X., Shi, G. X., Zang, T. Y., et al. (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*, *Journal of Natural Products*, 63 (11), 1529-1530.

11. APÉNDICE I.

Se hicieron pruebas cromatográficas con el extracto producido por el hongo endófito *Cercospora* cf. *apii*, esto para estandarizar la longitud de las placas TLC que nos favorecieran en la separación de los componentes de un extracto activo.

11.1. Cromatografía en Capa Fina del extracto de micelio del hongo endófito *Cercospora* cf. *apii*. (MH01).

Para la separación de los componentes del extracto, se utilizó como fase estacionaria una TLC de sílica gel 60 F₂₆₄ Merck de 5 x 5 cm, y otra de 8 x 4 cm. La finalidad del experimento fue estandarizar las condiciones en las que se observara una separación favorable de los extractos. Se cargaron 5 µL del extracto MH01 (500 µg) sobre las TLC. Se hicieron 5 aplicaciones en banda de 5 mm sobre la TLC de 5 x 5 cm., y 4 aplicaciones de 5 mm del mismo extracto en la TLC de 8 x 4 cm. Como fase móvil se utilizó la combinación de solventes cloroformo/metanol (5:1 v/v). El volumen final fue de 18 mL (Flores-Vallejo, 2017). En la Imagen 22 se puede observar una mejor separación cuando el extracto es migrado en una TLC de 8 x 4 cm.

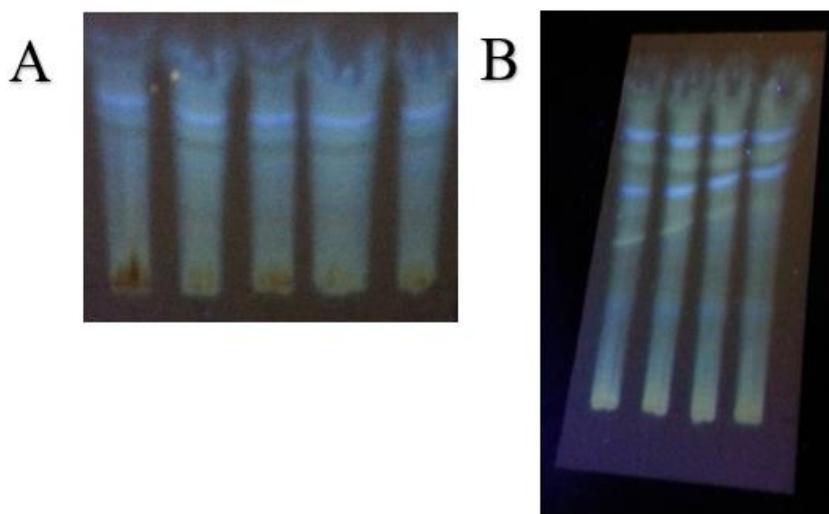


Imagen 22. Separación de componentes del extracto de micelio MH01 mediante CCF.

A) Placa TLC de 5 x 5 cm bajo luz UV de onda larga B) Placa TLC de 8 x 4 cm bajo luz UV de onda larga. Placa migrada con fase móvil (5:1).

Jade y colaboradores, en el 2015, obtuvieron buenos resultados utilizando TLC de una longitud de 10 cm. Realizaron experimentos de actividad antibacteriana y demostraron que extractos del hongo endófito *Aspergillus terreus*, aislado de la planta *Swietenia Macrophylla* obtenida de Malasia, inhibieron 10 mm el crecimiento de *S. aureus*. Además, Flores-Vallejo, en el 2017, tuvo buenos resultados en su búsqueda de componentes con actividad antiinflamatoria, con la técnica de CCF, y utilizando TLC con una longitud de 8 cm de largo.

12. APÉNDICE II.

12.1. Reactivación y producción del extracto producido por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria*.

Dado que se necesitaba más extracto para continuar con los ensayos de actividad antibacteriana y la identificación del grupo de compuestos responsables de la actividad antibacteriana, se procedió a reactivar a la cepa *Periconia cf. ignaria*. Se obtuvieron dos tipos de pigmentación de sobrenadante (Imagen 23-C).

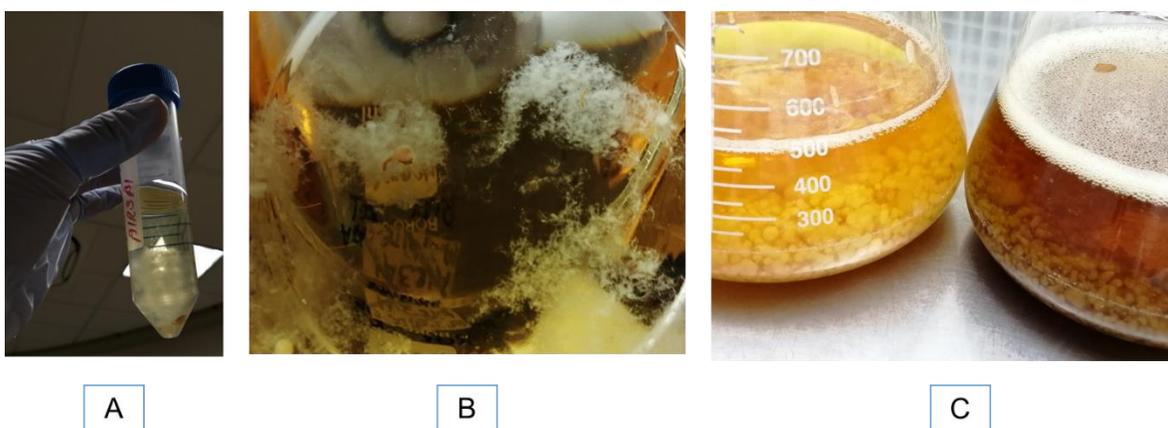


Imagen 23. Primera obtención de biomasa de *Periconia cf. ignaria*

C) Preinóculo (después de 6 días de incubación); D) Matraz inoculado con preinóculos (día cero); E) Matraces después de 9 días de incubación.

12.2. Primera obtención del extracto SH23.

Se logró reactivar a la cepa de *Periconia cf. ignaria* a partir de la biomasa almacenada en agar papa dextrosa. Se prepararon los preinóculos y posteriormente la biomasa se traspasó a matraces con CPD para continuar el crecimiento de la biomasa (Imagen 23-A, B).

Posteriormente, se hizo una filtración y extracción con acetato de etilo. Se recuperó la fase de acetato de etilo que posteriormente nos iba a servir para obtener más extracto (Imagen 24 y 25)

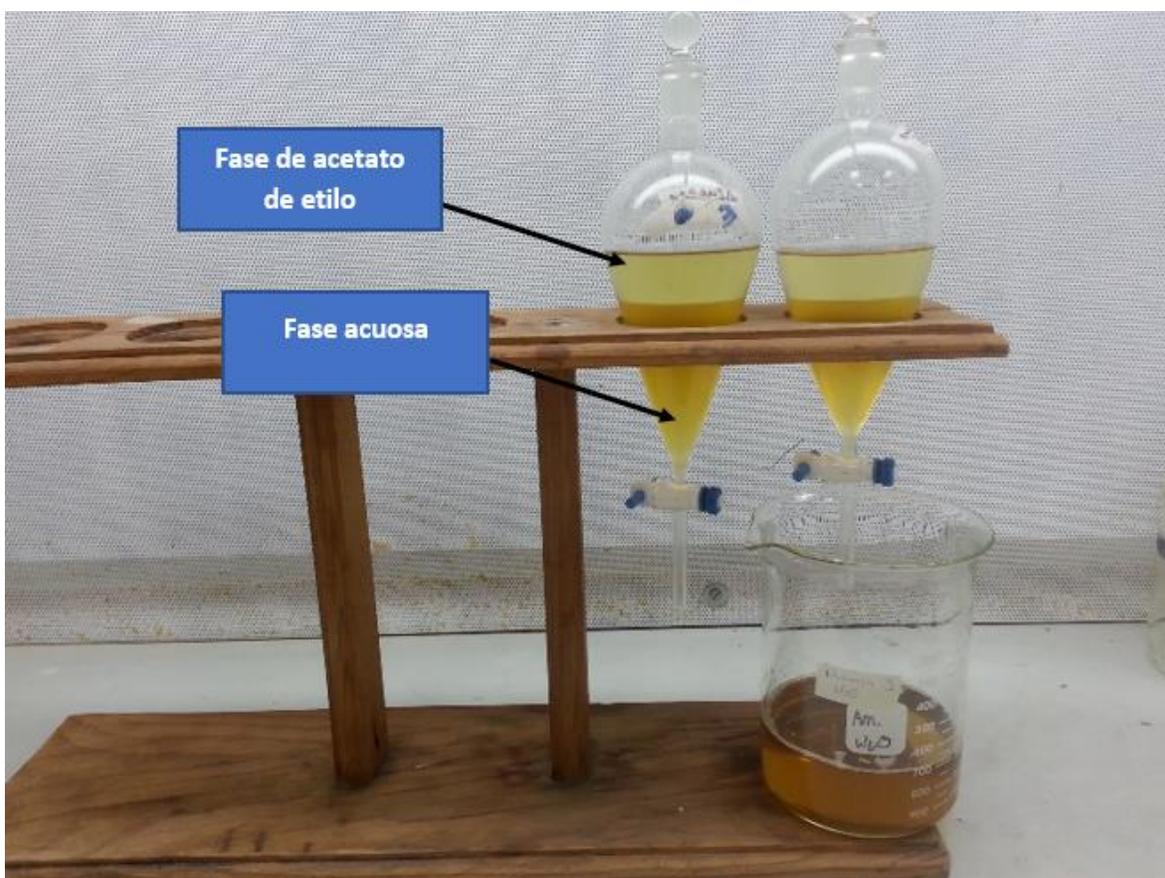


Imagen 24. Extracción del extracto de sobrenadante SH23 con acetato de etilo.

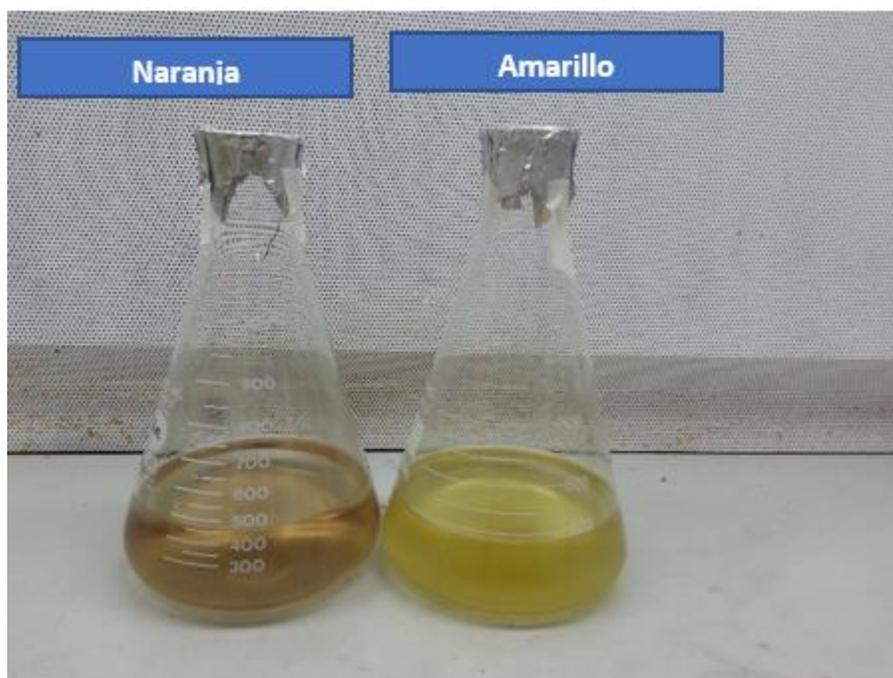


Imagen 25. Extractos de sobrenadante SH23 extraídos con acetato de etilo.

Los sobrenadantes se vaciaron en frascos de 100 mL, y posteriormente a la evaporación del acetato de etilo, se obtuvieron los extractos (Imagen 26).



Imagen 26. Extractos de sobrenadante SH23 después de evaporar el acetato de etilo.

12.3. Segunda obtención del extracto SH23.

Se procedió a obtener más extracto, dado la importancia de este para la evaluación de actividad antibacteriana y experimentos de CCF. Se procedió a tomar micelio del hongo endófito *Periconia* cf. *ignaria* e inocularlo en APD. Sin embargo, no hubo crecimiento micelial (Imagen 27).

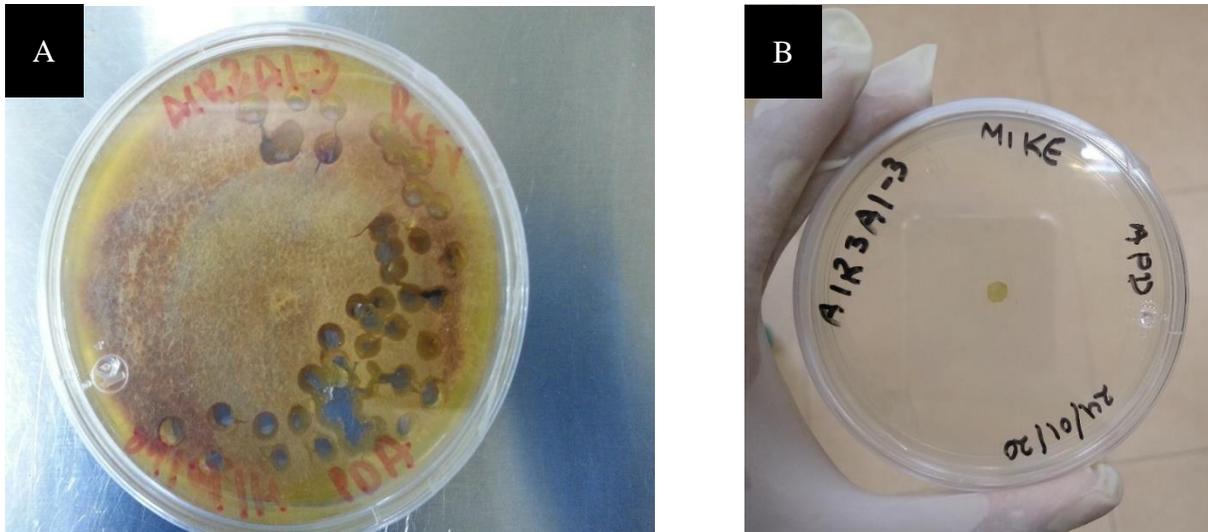


Imagen 27. Intento de reactivación del hongo endófito *Periconia* cf. *ignaria* en APD.

A) Cultivo original almacenado en 2016 a 4 °C; B) Inoculación de micelio a partir del cultivo original.

También se intentó reactivar a este hongo endófito agregando los discos de micelio directamente en CDP como se hizo en la primera obtención de extracto, pero tampoco hubo crecimiento. Debido a estos resultados, se intentaron otras alternativas.

12.4. Reactivación del hongo endófito *Periconia cf. ignaria* a partir de biomasa almacenada a 4°C en CPD.

Se intentó reactivar al hongo endófito *Periconia cf. ignaria* a partir de biomasa almacenada en CPD a 4 °C. A partir de esta biomasa, si se logró reactivar al hongo endófito (Imagen 28-A). También se logró reactivar a partir de biomasa almacenada a -70 °C. (Imagen 28-B).

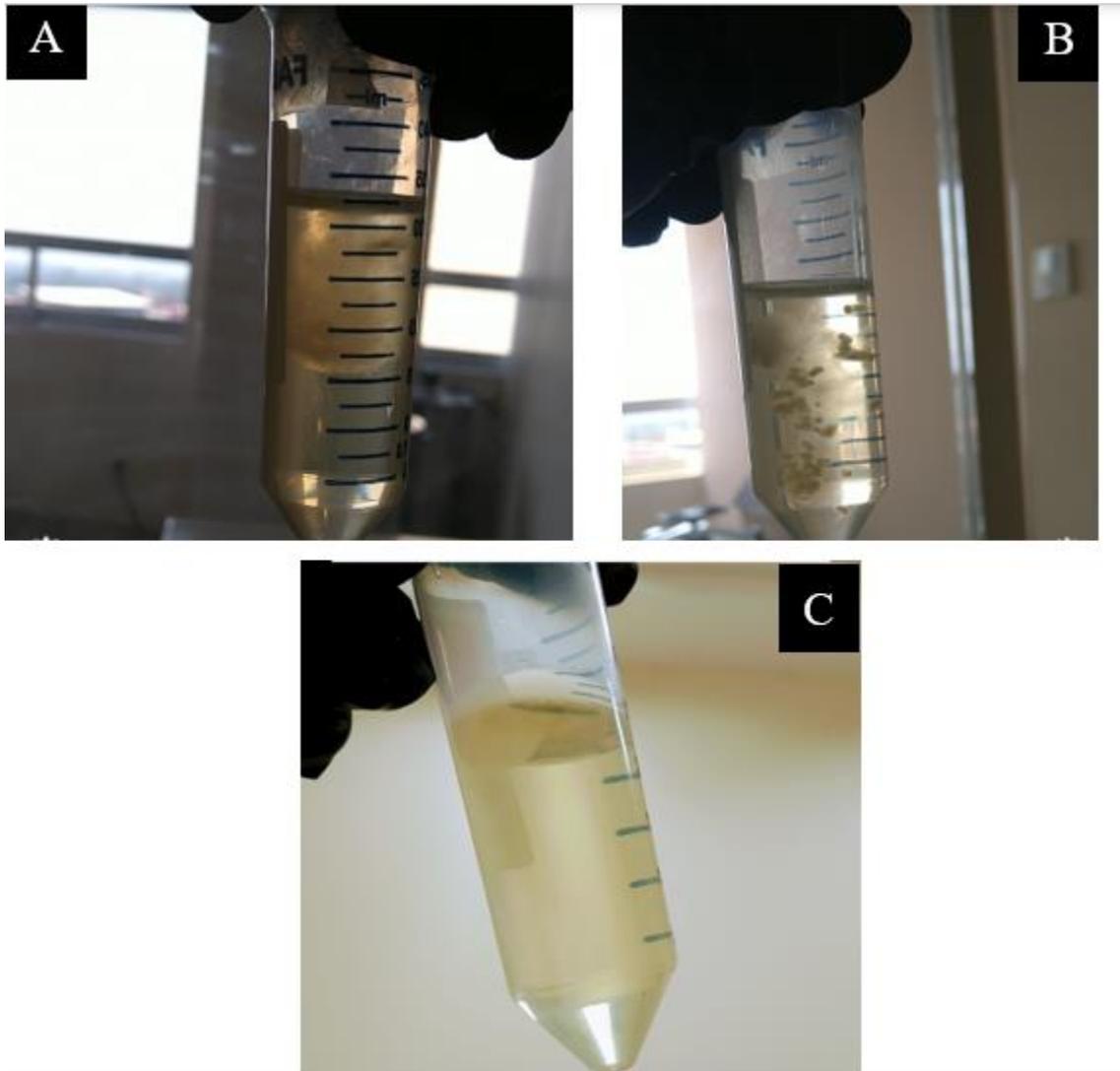


Imagen 28. Segunda obtención de biomasa de *Periconia cf. ignaria*.

A) Reactivación a partir de biomasa almacenada a 4 °C; B) Reactivación a partir de biomasa almacenada a -70 °C; C) CPD Control.

Consiguiendo la reactivación de hongo endófito *Periconia* cf. *ignaria*, los siguientes pasos fueron los mismos que las Imágenes 23 y 24 siguiendo los pasos de inocular la biomasa en matraz, filtración y extracción.

En cuanto a por qué el hongo endófito si se reactivó a partir de biomasa almacenada a 4 °C y -20 °C; se sabe que el almacenamiento de hongos endófitos en agar es el método más utilizado para su preservación. Sin embargo, debe considerarse que este método se debe utilizar para periodos de resiembra de tiempos cortos (Nakasone *et al.*, 2004). Para periodos de tiempo más largos, Nakasone y colaboradores, en 2004, sugirieron almacenar la biomasa de hongos endófitos en condiciones de congelamiento.

12.5. Cromatografía en Capa Fina de los sobrenadantes de extracto SH23, utilizando como revelador químico: vainillina sulfúrica.

Se hizo una CCF migrando 500 µg de los siguientes extractos de sobrenadante SH23: Amarillo 1, Naranja 1, Naranja 2 y Naranja 3. Con el revelador de vainillina se lograron observar bandas color morado: compuestos de los grupos de los terpenos (Imagen 29).

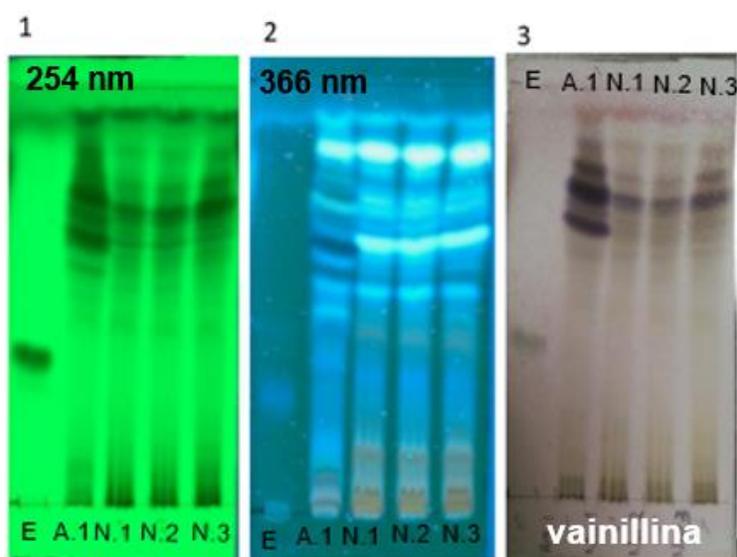


Imagen 29. CCF de los extractos de sobrenadante SH23 Amarillo 1, Naranja 1, Naranja 2 y Naranja 3. 1) Luz UV de onda corta 254 nm; 2) Luz UV de onda larga 366 nm; 3) Vainillina. Placa migrada con fase móvil (5:1).

Como se puede observar en la Imagen 29, hay diferencias en el perfil químico entre los extractos Amarillo y Naranja. Hay que tener en cuenta que puede ser complicado cultivar microorganismos endófitos en condiciones de laboratorio, debido a que algunos de ellos mantienen relaciones fisiológicas con su planta hospedera, y muchos de ellos son especie-específicas (Martinez-Klimova, *et al.*, 2017).

Estas diferencias en el perfil químico, podrían deberse a que el hongo endófito *Periconia cf. ignaria* podría estar produciendo otro tipo de componentes que no son para actividad antibacteriana, debido a que el hongo dejó de ser estimulado por microorganismos (por ejemplo: bacterias), con los cuales si interactuaban en su hábitat natural (Kusari, *et al.*, 2012). De hecho, el extracto SH23 color naranja perdió la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 (Imagen 10).

Suryanarayanan y colaboradores, mencionan en su publicación del 2009, que los endófitos pueden cambiar el perfil químico de los metabolitos que producen. Además, Flores Vallejo, en el 2017, obtuvo el extracto original producido por el hongo endófito *Periconia cf. ignaria* y presentó pigmentación amarilla. Por otra parte, Castillo y colaboradores, en el año 2012, mencionaron que para observar mejores resultados se deben utilizar partes de la planta hospedante recién cosechadas.

Existen factores importantes que se deben controlar como: pH, oscuridad, agitación, etc. Strobel y colaboradores, en el 2004, nos mencionan que mantener estables este tipo de condiciones es esencial para los componentes que los hongos endófitos producen (Strobel *et al.*, 2004). Quizá el variar estos parámetros los hongos endófitos se estresen, produciendo otros componentes.

En el año 2011, Tayung y colaboradores demostraron que las condiciones óptimas para que el hongo endófito *Fusarium solani* produjera componentes con actividad antibacteriana, eran una temperatura de 30 ± 1 °C, un pH entre 10 y 12 y un tiempo de incubación de 10 días. Los componentes producidos por este hongo endófito inhibieron 16.3 ± 0.5 mm el crecimiento de *E. coli* y 18.6 ± 1.1 mm el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. El hongo endófito *Fusarium solani*, fue aislado de la corteza interna de la planta *Taxus baccata*.

Mathan y colaboradores, en el año 2013, reportaron una mayor producción de metabolitos antimicrobianos producidos por el hongo endófito *Aspergillus terreus* KC 582297. Se necesitó optimizar ciertos parámetros como: pH y temperatura. Con este hongo endófito, el pH óptimo para la producción de estos metabolitos fue de 5.5. La temperatura óptima fue de 25 °C y el mejor medio de cultivo fue Caldo Papa Dextrosa. Para el hongo endófito *Fusarium oxysporum*, se necesitó caldo papa dextrosa, una temperatura de 25 °C, una concentración de 3 mg/L de NaCl y un pH de 7. Estos ejemplos, nos dan una idea de la importancia del medio de cultivo y la optimización de estos parámetros para una mayor producción de metabolitos con actividad antibacteriana.

Por otra parte, en estudios realizados en el año 2012 por Shenpagam y colaboradores, se demostró que actinomicetos endófitos aislados de las plantas *Azadiracta indica*, *Ocimum sanctum* y *Phyllanthus amarus*, tuvieron actividad antibacteriana. Además, se demostró que la actinobacteria endófito *Streptomyces* sp., al ser mutada exponiéndola a luz UV, incrementó la producción de metabolitos antibacterianos. Demostraron que al exponer a *Streptomyces* sp. a luz UV, los metabolitos producidos por estos microorganismos inhibieron 2.2 cm el crecimiento *S. aureus* en comparación con los 1.8 cm cuando *Streptomyces* sp. no se expone a luz UV.

En algunos artículos mencionan que la interacción entre los microorganismos endófitos con su planta hospedera es muy importante, ya que en su entorno natural por medio de un efecto que llaman antagonismo, los microorganismos endófitos (en este caso hongos), produjeron componentes que ayudan a su planta hospedera a combatir microorganismos patógenos (Kusari *et al.* 2012a; Vásquez *et al.* 2016; Arnold *et al.* 2003; Schulz *et al.*, 1999).

En estudios de interacción planta hospedera-endófito se ha reportado que la producción de componentes herbicidas, fue tres veces mayor en presencia de endófitos, y dos veces mayor que la de microorganismos fitopatógenos. Demostrando que podría haber una respuesta de defensa por parte de los endófitos (Schulz *et al.*, 1999).

Por otra parte, Suryanarayanan y colaboradores, en el 2009, nos mencionan que es lógico que exista un cambio en el perfil químico de los componentes producidos por hongos endófitos al mantenerlos en condiciones de laboratorio.

Además, Kusari y colaboradores, en el 2012, mencionaron que la planta hospedera podría ser un factor importante en el proceso metabólico de los microorganismos endófitos. Estudios realizados por parte de Yang y colaboradores en el 2005, demostraron que la homoserina y la asparagina (solo son expresados en la planta), y expresaron señales importantes en los genes de virulencia del hongo endófito *Nectria hematococca*.

13. APÉNDICE III.

13.1. Actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922 del extracto SH23 obtenido de una segunda generación de un cultivo de *Periconia cf. ignaria*.

Posteriormente a la obtención de los extractos de sobrenadante SH23, y a la comparación química mediante CCF, se procedió a probar los extractos contra *E. coli* ATCC 25922 para observar si se conservaba la actividad antibacteriana. No se logró observar actividad antibacteriana de los extractos amarillo 1, ni en el extracto naranja 1 (que fueron de los extractos obtenidos). Sólo se logró ver un halo de inhibición de 7 mm en el extracto de sobrenadante SH23 obtenido anteriormente (en 2015), y un halo de inhibición de 19 mm en la ampicilina (10 µg/punto de aplicación) (Imagen 30).

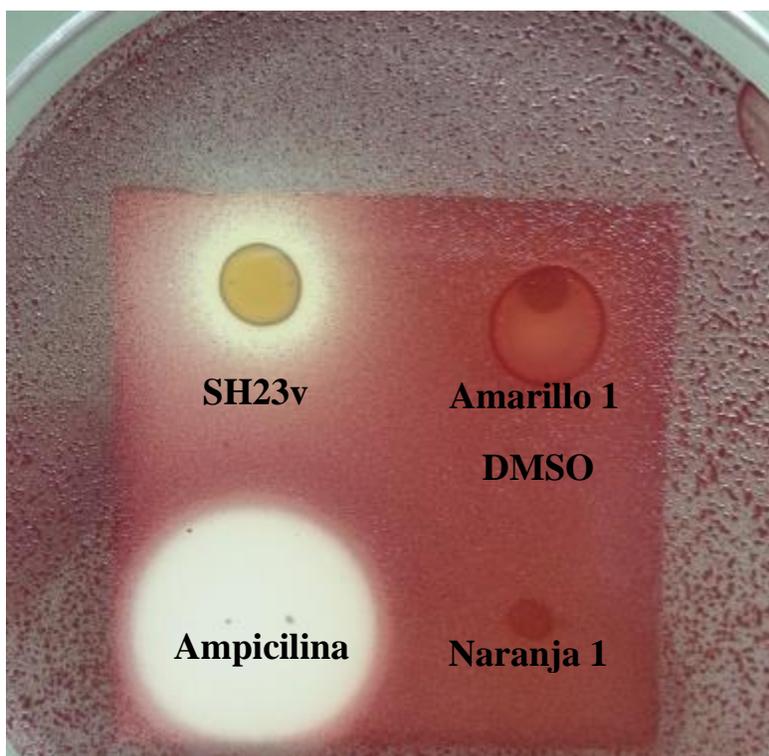


Imagen 30. Actividad antibacteriana del extracto SH23, de un cultivo de segunda generación de *Periconia cf. ignaria*, contra *E. coli* ATCC 25922.

SH23v: Extracto de sobrenadante 23 obtenido de una primera generación de *Periconia cf. ignaria*; DMSO: Dimetilsulfóxido; Amarillo 1 y Naranja 1: Extractos de sobrenadante 23 obtenidos de una segunda generación (segunda resiembra) de *Periconia cf. ignaria*.

El hongo endófito *Periconia cf. ignaria* perdió por completo la actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922 (Imagen 30) a partir de la segunda generación (segundo cultivo). Esta es información importante ya que no se ha reportado.

14. APÉNDICE IV.

14.1. Bioautografía contra *S. aureus* ATCC 25923, utilizando fase móvil cloroformo metanol (7:1).

Se inició estandarizando con una bioautografía de fase móvil cloroformo/metanol (7:3), diferente a la fase móvil utilizada en la Imagen 31, con fase móvil (7:1). Esto fue para incrementar la polaridad y bajar el componente de la actividad contra *S. aureus* ATCC 25923. A pesar de que las fases fueron diferentes, el frente de retención fue el mismo en ambas bioautografías el cual fue 0.72 (Imagen 19 y 31), como indicador de viabilidad se utilizó cloruro de tetrazolio.

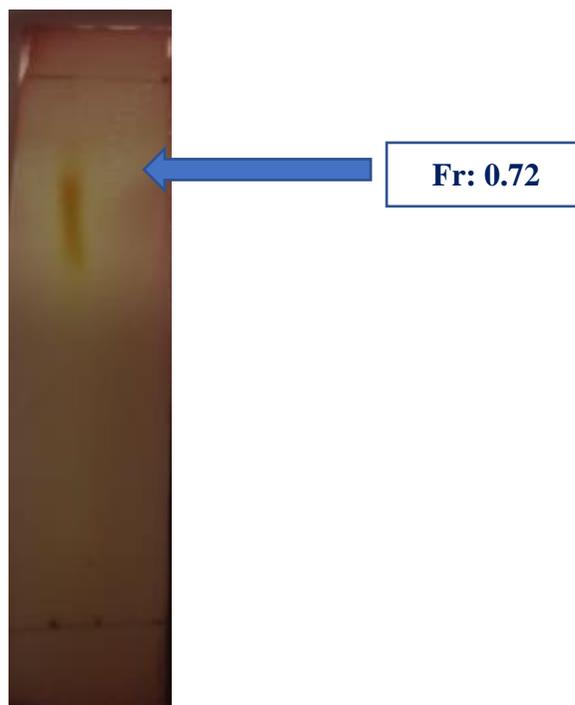


Imagen 31. Bioautografía del extracto SH23 contra *S. aureus* ATCC 25923, con una fase móvil cloroformo/metanol (7:1).

14.2. CCF del extracto SH23 revelado con reactivo de Liebermann-Burchard.

La replica de CCF utilizada en la bioautografía (Imagen31), se reveló con el reactivo de Liebermann Burchard, pero no fue positiva (Imagen 32), ya que no se tiñieron bandas de color verde (Huang *et al.*, 1961).

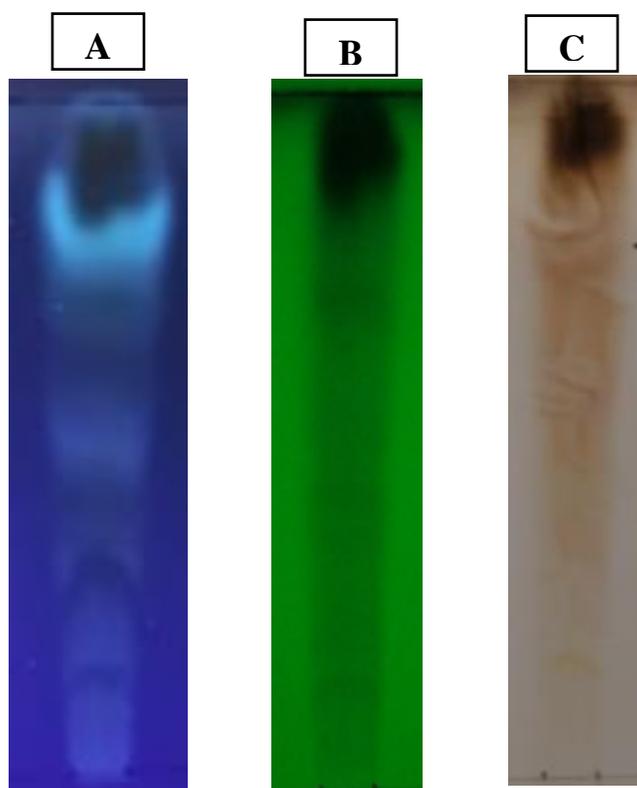


Imagen 32. CCF del extracto SH23 revelada con reactivo de Liebermann Burchard.
Placa migrada con fase móvil cloroformo metanol (7:1).

A) Luz de onda UV de onda larga 365 nm; B) Luz UV de onda corta 254 nm; C) Luz visible



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (directora de tesis, CEIB UAEM)

Mtra. Rosario del Carmen Flores Vallejo (codirectora U. Milenium)

Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Tesis: **"Evaluación química y de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth"**.

Alumno que lo presenta a revisión: **Miguel Angel Linares Aragon**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2020-12-27 23:04:57 | Firmante

STK7iuZZ1b/qFH3SCcxGihNk34tDPujJ+M/Zha54iGW58GNRRX7+1//KlwLQW76TWnw+XOWQVf+LoX+5n4XagrJPxoeflSPtR0jfCO0TtyZaCU7wSypGbBCL3ngkZS/IXOv6V2cN
FsQXb2BhNpPENSUFj1glCanplovegjVx7grhsdbln7Yxuq2SIX56veyiyIXLTfp7OD8kgZmo+7FT4UecwSbh6lvq778rth1LxO752IUbq3x9biHhh+frSwzErKJijelh5XkZ2XIW259GI/tDg
HYw+zylnpt+TiVEpdBTD9MxGFZOIBptV8Ke6wzbWa057M9+pUe6+L84vQPu3g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qtiAkD

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aWCuxcxuZMBV3F9WYcZ75hUBaZyCmG0>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (directora de tesis, CEIB UAEM)

Mtra. Rosario del Carmen Flores Vallejo (codirectora U. Milenium)

Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Tesis: **"Evaluación química y de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth"**.

Alumno que lo presenta a revisión: **Miguel Angel Linares Aragon**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2021-01-11 18:10:32 | Firmante

BI4wapfqFMISXWmZFzm/QaTmH9lgwjBNqRAInNLs6mjGUK9nc8fu5fC1hES2qDq8tLoiB8UZ8SwMFLluop7c242EZ7iMGV7imlcWqTUOYd10E9kTICuoMnFG6PrFLmiFsF4HVak/pJ6pmo1iVWyKMKPy1VP8OXQAhs9OPeMnp7sxfLZ5wUhDBCAXSEQqUvI8JBjzwsG/AC6lc6mN3bgt4W0OAH88sfjMWokxD+9lz+225Y9Tk43IRI7rQDMGp0wunBdNfAoagraVNC2aQ5xxzjrwGcrD1HPRv+xHOy+fnikL9GACvUIZboqaV3mImqal/sF3C1cghW4ays4W/bvg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3MgXEG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/h4bsNz5omuLFvYyJ8blxAL1EqbvWmD5K>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (directora de tesis, CEIB UAEM)

Mtra. Rosario del Carmen Flores Vallejo (codirectora U. Milenium)

Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Tesis: **"Evaluación química y de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth"**.

Alumno que lo presenta a revisión: **Miguel Angel Linares Aragon**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

MTRA. ROSARIO DEL CARMEN FLORES VALLEJO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ROSARIO DEL CARMEN FLORES VALLEJO | Fecha:2021-01-13 20:37:53 | Firmante

g2dixj21SwWfPrB3RWXuXrNNYqz831C9ThuetL.OydUQzBa0IXpdFxyOwdBUZF40YQu+Yfj3Ge8yEVirQL+55zIdpMsCBbXf64VHCDOeZ+msts2XC47FHfHxg9cNpm2MMftXTFu8CXfqu8EolruTn2fV9Y3pm0ZJe7ty+iXuK+7Og/PjtvNINygEwCBraCjPkRy3YqGHGRR56/Avw5Kerj8TVzLQkmXRb2c8NnMWRARIM6qjDGHgHNeyZC1sNn6864tSt92vKoradkEe6fz+53ywgU9611UXF+PB7MqD3aj6lDEsg+n15tMznBxbKDstyjJAx7IHqf1SJ2Ed+j2o0A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[eaEzRI](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/woOlmipvW4FOxB79QWGUwcRJTCdp6aN2>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (directora de tesis, CEIB UAEM)

Mtra. Rosario del Carmen Flores Vallejo (codirectora U. Milenium)

Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Tesis: **"Evaluación química y de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth"**.

Alumno que lo presenta a revisión: **Miguel Angel Linares Aragon**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JESÚS SILVA SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS SILVA SANCHEZ | Fecha:2020-12-17 00:27:53 | Firmante

PztXiqBrr+V0+/0i7WqpeUaLGseoaa3PA+FYNyxPd0AffYIHWHhTRa8l+8HtrcXejwxnQVZx9NRqtPTNMMYfxEDxIWbc/BCGSvc5xkVADlaoEfsz+YGV6G6HqbDK3VrSC8i8Ang4t52s2F3+SoEDqFa9X9CN3IB5EX22A1wW5si//A65hRZdzLipPxVYVOhnHsws5Q4Apw6gRKKdHxKW8lYKIEqNgvsRatm+HhR/gFCH/2Lkg3sZfNPSODV83jbcIEyqButjPXRYmTteYk8uTeFINBjB41uQMFMxrhnmVsj1iINPm4Dxl+V6LqrFPSZJbPOLqsx0CSnCWkBFfZZXucQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xuNaUg](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/COJiw9H7UyA281D7FHR1qPqsETiGHfM4>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de noviembre del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (directora de tesis, CEIB UAEM)

Mtra. Rosario del Carmen Flores Vallejo (codirectora U. Milenium)

Dr. Jesús Silva Sánchez (INSP)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Tesis: **"Evaluación química y de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth"**.

Alumno que lo presenta a revisión: **Miguel Angel Linares Aragon**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOI



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2021-01-13 11:14:33 | Firmante

ajkBv0HI1mnNlrOTPS2dN/+6fxBG6t6Ho9pOizzhnipeMims1A6Ec8KOrzVr49AM0bkFeX9L9Bp5gbZACrMMLJ5n0KcL25/JC2m3jioleLEeV6gBMkXrMNTbRydGBs+jmXiZC+ERG6pxKbMrQUuieO6LL1d4fckBjk0zwMY0l/loJTBv9gVdXKriaNvLRjv+3rkrQ/7D1siDOAQJuFCqMnMgOfn8kOJOskzj+HcOJHmX4uACpOTgCO12nFBsGOknnJCcW+mT6K9Enqu8ICFuviglwaiqbvLc9lJcjWDZ5pzGjPUe15u+q6YPPH/iUwtGb5AAA88hdmNh9hjcM4w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



m2MaVP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GftBkrI6CtOrrfwHLCvcnPA02luZIZhG>

