
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología

Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales

Tesis

**Investigación de la actividad antibacteriana de hongos
endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

I.BQ. GUADALUPE FLORES ARROYO

Director de tesis:

DRA. MARÍA LUISA VILLARREAL ORTEGA

Co-director de tesis:

M. en B. ROSARIO DEL CARMEN FLORES VALLEJO

CUERNAVACA MORELOS, AGOSTO DE 2019.



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales, del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM, bajo la dirección y supervisión de la Dra. María Luisa Villarreal Ortega y la Co-dirección de la M. Biotec. Rosario del Carmen Flores Vallejo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la dicha de vivir y culminar una etapa más.

Al Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales CEIB, UAEM por brindarme un espacio para mi formación profesional.

Agradezco a mis formadores, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro.

A mi directora de tesis, Dra. María Luisa Villarreal Ortega, agradezco profundamente el haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, para mí ha sido un privilegio. Gracias por su apoyo brindado, confianza, disposición, asesoramiento y sobre todo por confiar en mí.

A mi Co-directora M. en B. Rosario del Carmen Flores Vallejo, gracias por todo el apoyo, dedicación y asesoramiento que demostraste en cada momento. Tu ayuda ha sido fundamental, has estado en los momentos más turbulentos, el proyecto no fue fácil, pero siempre estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían. Sin duda alguna, he aprendido mucho de ti. Gracias por creer en mí.

A los Doctores integrantes de mi comité tutorial, Dr. Alexandre Cardoso Taketa, Dra. Anabel Ortiz Caltempa, Dr. Ashutosh Sharma, gracias por su orientación, su apoyo incondicional y sobre todo por compartirme sus conocimientos.

Al. L.I. Víctor Martínez por el apoyo administrativo brindado.

A la Biol. Fernanda Cristina Barrera Garduño por su ayuda en los diferentes trámites que realice durante mi estancia en el CEIB.

A mis compañeros de Laboratorio, Olga, Renier, Eli, Rocío, Abril, Itzel, Uriel, Christian, Miguel, Leonel, Mónica, Mónica Itzel y Brenda, por brindarme su apoyo en los momentos que solicite un favor, por las buenas y malas experiencias que vivimos juntos, pero sobre todo por dejarme compartir muchos momentos gratos e inolvidables a su lado. Gracias por su amistad.

A mis amigas Erika y Lili, por brindarme su cariño y amistad, gracias por estar ahí cuando más lo necesite. Momentos inolvidables pase a su lado. Gracias por hacer más ameno el camino.

Al programa de becas para posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número de registro #85833.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi padre

Ricardo, que ha sido mi pilar fundamental en mi formación profesional, por ser mi ejemplo a seguir, por tus consejos, oportunidad y recursos para lograrlo. Gracias por confiar en mí, por tus palabras de aliento, en especial una “La mejor herencia que te puedo dejar es el estudio”. Te amo papá.

A mi madre

Juana, por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a crecer, gracias por tus consejos, paciencia y amor, sobre todo por estar al pendiente de mí en todo momento, porque a pesar de la distancia siempre estuviste conmigo. Te amo mamá.

A mis hermanas

Jazmín y Anel, por el amor que me brindan, por estar siempre apoyándome. Y sobre todo por tratar de sacar lo mejor de mí y ser un buen reflejo para ustedes. Las amo pequeñas.

A mi amado esposo

Isaac Noe, por formar parte de mi vida, por tu gran amor, por motivarme cuando creía que ya no podía. Tu ayuda ha sido fundamental en este logro de mi vida, has estado conmigo en los tiempos más difíciles y siempre dando lo mejor de ti. Te amo amor.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un esfuerzo total es una victoria completa”.

-Mahatma Gandhi-

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1 INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	- 3 -
1.3 OBJETIVOS.....	- 4 -
1.3.1 Objetivo General.....	- 4 -
1.3.2 Objetivos Específicos.....	- 4 -
1.4 HIPÓTESIS.....	- 4 -
II. MARCO TEÓRICO.....	- 5 -
2.1 Enfermedades bacterianas que prevalecen a nivel mundial.....	- 5 -
2.2 Bacterias.....	- 6 -
2.2.1 Generalidades.....	- 6 -
2.2.2 Morfología bacteriana.....	- 6 -
2.2.3 Bacterias Gram-positivas (+) y Gram-negativas (-).....	- 7 -
2.3 Actividad antibacteriana.....	- 8 -
2.3.1 Agentes antibacterianos.....	- 8 -
2.3.2 Clasificación de los antibióticos y su mecanismo de acción.....	- 8 -
2.3.3 Clasificación sobre su estructura química.....	- 9 -
2.3.4 Actividad antibacteriana en plantas.....	- 9 -
2.4 Uso de plantas medicinales en América.....	- 10 -
2.5 Uso de plantas medicinales antibacterianas en México.....	- 11 -
2.5.1 Antecedentes Históricos.....	- 11 -
2.6 Métodos de evaluación de productos naturales con actividad antibacteriana.....	- 12 -
2.6.1 Método de difusión.....	- 13 -

2.6.2 Método de dilución	- 14 -
2.7 Generalidades de <i>Crescentia alata</i> Kunth	- 15 -
2.7.1 Clasificación taxonómica	- 16 -
2.7.2 Descripción morfológica	- 16 -
2.7.3 Distribución geográfica	- 17 -
2.8 Usos etnobotánicas	- 19 -
2.9 Aportaciones científicas de <i>Crescentia alata</i> Kunth	- 19 -
2.10 Hongos endófitos	- 21 -
2.10.1 Descubrimiento e historia de los hongos endófitos	- 21 -
2.10.2 Relación hongo endófito-planta hospedera	- 21 -
2.10.3 Mecanismos de los hongos endófitos contra factores bióticos	- 22 -
2.10.4 Aplicación de hongos endófitos	- 22 -
2.10.5 Aportación científica de hongos endófitos aislados de otras plantas con actividad antibacteriana	- 23 -
2.10.6 Aportación científica de hongos endófitos aislado de <i>C. alata</i>	- 24 -
III. METODOLOGÍA	- 25 -
3.1 Estrategia experimental	- 25 -
3.2 Tipo de estudio	- 26 -
3.3 Materiales	- 26 -
3.4 Ensayo experimental	- 27 -
3.4.1 Ensayo para curvas de crecimiento	- 27 -
3.4.2 Ensayo de actividad antibacteriana	- 28 -
3.4.3 Preparación de los extractos de biomasa y sobrenadante de hongos endófitos ...	- 29 -
3.4.4 Preparación de antibióticos	- 29 -
3.4.5 Pruebas bioquímicas	- 31 -
3.4.6 Tinción de Gram	- 33 -
3.5 Análisis Estadístico	- 33 -
IV. RESULTADOS	- 34 -
4.1 Morfología bacteriana	- 34 -
4.2 Pruebas bioquímicas	- 35 -
4.3 Curvas de crecimiento	- 36 -
4.4 Actividad antibacteriana de extractos del endo y exo-metaboloma de hongos endófitos aislados de <i>C. alata</i> Kunth.	- 38 -

4.4.1 Porcentaje de actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de micelio (endo-metaboloma) de hongos endófitos de <i>C. alata</i>	- 38 -
4.4.2 Porcentaje de actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de micelio (endo-metaboloma) de hongos endófitos de <i>C. alata</i>	- 39 -
4.4.3 Porcentaje de actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo del sobrenadante (exo-metaboloma) de hongos endófitos de <i>C. alata</i>	- 40 -
4.4.4 Extractos metanólico de micelio y acetato de etilo del sobrenadante con actividad antibacteriana de hongos endófitos de <i>C. alata</i> , contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. typhi</i>	- 41 -
4.4.5 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de <i>C. alata</i> contra <i>E. coli</i>	- 47 -
4.4.6 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de <i>C. alata</i> contra <i>S. aureus</i>	- 48 -
4.4.7 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de <i>C. alata</i> contra <i>P. aeruginosa</i>	- 50 -
4.4.8 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de <i>C. alata</i> contra <i>S. typhi</i>	- 52 -
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	- 54 -
VI. CONCLUSIÓN	- 60 -
5.1 Perspectivas	- 61 -
REFERENCIAS	- 62 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes formas y agrupamientos que presentan las bacterias. Tomada de Mariana Ruiz en Wikimedia Commons	- 7 -
Figura 2. Ilustración original de <i>Crescentia alata</i> Kunth. De Francisco Manuel Blanco (O.S.A.) ..	- 16 -
Figura 3. Mapa de distribución potencial de la especie <i>Crescentia alata</i> Kunth.....	- 18 -
Figura 4. Distribución de <i>Crescentia alata</i> (Cuatecomate, Cirian) en el estado de Morelos	- 18 -
Figura 5. Estrategia experimental para medir la actividad antibacteriana de <i>C. alata</i> Kunth y sus hongos endófitos.....	- 25 -
Figura 6. Diseño de la placa de 96 pozos para curvas de crecimiento.	- 28 -
Figura 7. Caracterización morfológica de las especies bacterianas: a) <i>E. coli</i> , b) <i>S. aureus</i> , c) <i>K. pneumoniae</i> , d) <i>P. aeruginosa</i> , e) <i>S. typhi</i> , f) <i>S. agalactiae</i> y g) <i>L. monocytogenes</i>	- 34 -
Figura 8. Caracterización bioquímica de las especies bacterianas.	- 35 -
Figura 9. Cinéticas de crecimiento del panel de bacterias en estudio.....	- 37 -
Figura 10. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	- 45 -
Figura 11. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	- 46 -
Figura 12. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.-	- 46 -
Figura 13. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra <i>S. typhi</i> ATCC 6539.	- 46 -

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de extractos fúngicos del endo y exo-metaboloma con actividad antibacteriana.	- 38 -
Gráfica 2. Porcentaje de aislados de extractos fúngicos del A) endo y B) exo-metaboloma con actividad antibacteriana.....	- 38 -
Gráfica 3. Porcentaje de actividad antibacteriana de extractos metanólicos de hongos endófitos contra a) <i>E. coli</i> , b) <i>S. aureus</i> , c) <i>S. typhi</i> y d) <i>P. aeruginosa</i>	- 39 -
Gráfica 4. Porcentaje de actividad antibacteriana de extractos de sobrenadante de hongos endófitos contra: a) <i>E. coli</i> , b) <i>S. aureus</i> y c) <i>P. aeruginosa</i>	- 40 -
Gráfica 5. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i>	- 47 -
Gráfica 6. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i>	- 49 -
Gráfica 7. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra <i>P. aeruginosa</i>	- 51 -
Gráfica 8. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra <i>S. typhi</i>	- 52 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción de antibióticos.....	- 8 -
Tabla 2. Clasificación taxónomica de <i>Crescentia alata</i> Kunth	- 16 -
Tabla 3. Aportación científica sobre <i>C. alata</i> Kunth.	- 20 -
Tabla 4. Estudio sobre hongos endófitos de diferentes plantas con actividad antibacteriana	- 23 -
Tabla 5. Género de hongos endófitos aislados de <i>C. alata</i> Kunth y otros estudios endófitos de otras plantas pertenecientes a los mismos géneros que han presentado actividad antibacteriana.....	- 24 -
Tabla 6. Cinéticas de crecimiento del panel de bacterias.....	- 37 -
Tabla 7. Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de <i>C. alata</i> contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhi</i> y <i>P. aeruginosa</i>	- 42 -
Tabla 8. Comparación de media (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en <i>E. coli</i>	- 48 -
Tabla 9. Comparación de medias (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en <i>S. aureus</i>	- 49 -
Tabla 10. Comparación de medias (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en <i>P. aeruginosa</i>	- 51 -
Tabla 11. Comparación de medias (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en <i>S. typhi</i>	- 53 -

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius

µg: microgramos

µL: mililitros

µm: micrómetros

ADNr: ADN ribosómico

AMH: Agar Mueller Hinton

AST: Agar Soya Trypticaseína

ATC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivo de Referencia)

CEIB: Centro de Investigación en Biotecnología

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CST: Caldo Soya Trypticaseína

CST: Caldo Soya Trypticaseína

DMSO: Dimetilsulfóxido

FL: flor

FR: fruto

g/L: gramos sobre litro

H: hoja

Hrs: Horas

KH₂PO₄: Fosfato de potasio

L: Litros

LIMP: Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales

M: micelio

mg: miligramos

MH: Mueller Hinton

mm: milímetros

N: Normalidad

Na₂HPO₄: Fosfato Disódico

NaOH: Hidróxido de sodio

nm: Nanómetros

NP: No presentó

OMS: Organización Mundial de la Salud

p.s.i: libra de fuerza por pulgada cuadrada

pH: Coeficiente que indica grado de acidez o basicidad de una solución

RA: rama

rpm: revoluciones por minuto

RZ: raíz

SN: sobrenadante

Temp: temperatura

UFC: Unidades formadoras de colonias

v/v: volumen-volumen

RESUMEN

El uso indiscriminado de los antibióticos ha promovido la selección de bacterias resistentes a fármacos en ambientes nosocomiales y el sector pecuario. Las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias son la principal causa de morbo-mortalidad en el mundo. El aislamiento y cultivo de hongos endófitos de plantas con valor etnobotánico es una de las estrategias biotecnológicas más prometedoras para desarrollar nuevos fármacos antibacterianos que puedan ser útiles contra las bacterias resistentes a fármacos. En estudios anteriores, se aislaron y caracterizaron los hongos endófitos de la especie medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth, y se identificó un panel de 43 hongos productores de terpenos, esteroides, compuestos fenólicos, alcaloides y glucósidos en los extractos del endo y exo-metaboloma, los cuales han sido identificados hasta género. Los extractos obtenidos de los hongos endófitos presentaron actividad anti-inflamatoria *in vitro* y antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922. El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antibacteriana de los hongos endófitos aislados de diferentes partes de *Crescentia alata* Kunth que puedan representar una alternativa terapéutica, contra un panel de bacterias Gram positivas y negativas sensibles a antibióticos. Por lo que se hipotetiza que los hongos endófitos aislados de diferentes partes de *Crescentia alata* Kunth son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias de interés clínicos, con un efecto antibacteriano similar al de los extractos orgánicos obtenidos de diferentes partes de la planta. Para evaluar la actividad antibacteriana se llevó a cabo la reactivación de las bacterias en Caldo Soya Trypticaseína a 37°C por 24 hrs. aproximadamente, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas y tinción de Gram para su confirmación, curvas de crecimiento de cada una de las bacterias en el equipo Equipo SpectralMax® iD5, se inició el tamizaje de la actividad antibacteriana de 43 extractos del endo y exo-metaboloma de los hongos endófitos por el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton, probando las concentraciones de 10mg/mL y 5mg/mL. Se analizaron los datos en el programa "SAS 9.0 ". De los 43 extractos metanólicos de hongos endófitos de *C. alata*, el 14% inhibió el crecimiento de *E. coli*, el 33% de *S. aureus* y el 5% a *P. aeruginosa* y *S. typhi*. Para los extractos de sobrenadante, el 7% inhibió el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que el 37% inhibió a *P. aeruginosa*. Los géneros *Colletotrichum* sp. y *Cercospora* sp; inhibieron el crecimiento bacteriano de 4 de las 7 especies probadas. Sin embargo, ninguno de los 43 extractos inhibió el crecimiento de *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* y *L. monocytogenes*. Los resultados de este trabajo representan la primera fase de un programa de identificación de productos naturales contra bacterias resistentes a fármacos.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics has promoted the selection of drug-resistant bacteria in nosocomial environments and the livestock sector. Infectious diseases caused by bacteria are the main cause of morbidity and mortality in the world. The isolation and cultivation of endophytic fungi from plants with ethnobotanical value is one of the most promising biotechnological strategies to develop new antibacterial drugs that may be useful against drug resistant bacteria. In previous studies, endophytic fungi of the Mexican medicinal species *Crescentia alata* Kunth were isolated and characterized, and a panel of 43 fungi producing terpenes, steroids, phenolic compounds, alkaloids and glycosides in endo and exo-metabolome extracts were identified, up to gender. The extracts obtained from the endophytic fungi presented anti-inflammatory activity *in vitro* and antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922.

The objective of this work was to analyze the antibacterial activity of the endophytic fungi isolated from different parts of *Crescentia alata* Kunth that may represent an alternative therapeutic, against a panel of Gram positive and negative antibiotic-sensitive bacteria. Therefore, it is hypothesized that the endophytic fungi isolated from different parts of *Crescentia alata* Kunth are specific to inhibit the growth of bacteria of clinical interest, with an antibacterial effect similar to that of the organic extracts obtained from different parts of the plant. To evaluate antibacterial activity, bacteria were reactivated in Tryptone Soya Broth at 37 ° C for 24 hrs. approximately, subsequently biochemical tests and Gram staining were carried out for confirmation, growth curves of each of the bacteria in the SpectralMax® iD5 Equipment team. Screening of the antibacterial activity of 43 endo and exo-metabolic extracts of endophytic fungi, was tested by the method of diffusion in disc, in agar Mueller Hinton, testing the concentrations of 10 and 5mg / mL. The data were analyzed in the SAS statistical package. Of the 43 methanolic extracts of endophytic fungi of *C. alata*, 14% inhibited the growth of *E. coli*, 33% of *S. aureus* and 5% to *P. aeruginosa* and *S. typhi*. For supernatant extracts, 7% inhibited the growth of *E. coli* and *S. aureus*, while 37% inhibited *P. aeruginosa*. The genera *Colletotrichum* sp. and *Cercospora* sp. inhibited bacterial growth of 4 of the 7 species tested. However, none of the 43 extracts inhibited the growth of *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* and *L. monocytogenes*. The results of this work represent the first phase of a multidisciplinary program to identify natural products against drug resistant bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos son una de las principales causas de morbo-mortalidad mundial (Frieden, 2013) Las malas prácticas en la administración de fármacos antibacterianos han promovido la selección de bacterias resistentes, incluso a los fármacos de amplio espectro y de última generación, tales como la colistina (Brown *et al*, 2016) Lo anterior nos urge a identificar nuevos compuestos químicos que pueden ser eficaces en el tratamiento y cura de enfermedades infecciosas asociadas a bacterias resistentes a fármacos. En este sentido los productos naturales obtenidos de las plantas medicinales pueden representar una alternativa para la identificación de compuestos químicos que permitan tratar o prevenir estas enfermedades.

La medicina tradicional mantiene un lugar importante en los países en vías desarrollo como México, ya que el uso de plantas medicinales es la primera opción del 80% de la población para dar tratamiento a diversos problemas de salud (Torres *et al*, 2005). Por esta razón las plantas medicinales han sido el objeto de estudio científico de diferentes áreas de la ciencia, intentando obtener evidencias sobre sus propiedades terapéuticas.

En México la especie medicinal *Crescentia alata* Kunth, conocida popularmente como “cirian” o “cuatecomate”, es una de las especies de mayor cantidad y diversidad de usos etnobotánicos en el estado de Morelos (Solares, 2004). De esta especie, se ha demostrado su actividad antibacteriana, antiinflamatoria e insecticida, entre otras (Rastrelli *et al.*, 2001; Dimayuga *et al.*, 1998; Valladares *et al.*, 2014). Sin embargo, su distribución y su densidad, se han visto afectadas debido a la alteración que ha sufrido el ecosistema y también por el aprovechamiento intensivo del árbol (Solares, 2004).

Una de las herramientas biotecnológicas prometedoras para identificar y producir compuestos antibacterianos efectivos, sin arriesgar la prevalencia de las plantas en sus ecosistemas, es el uso de hongos endófitos. Los hongos endófitos son microorganismos que habitan dentro de los tejidos de las plantas sin causar patologías, y se plantea que mantienen una relación simbiótica (Kusari, Hertweck, & Spiteller, 2012). Los hongos endófitos son capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos en respuesta al estrés biótico o abiótico que experimenta su planta. Y de ellos se han encontrado una gran variedad de compuestos antibacterianos novedosos (Gamboa-Gaitán, 2006).

En estudios anteriores llevados a cabo en el Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del CEIB-UAEM se seleccionó con base en el criterio etnomédico a *C. alata* y se aislaron a sus hongos endófitos (Flores-Vallejo, 2017). Y posteriormente se identificaron aislados capaces de producir un efecto antiinflamatorio (Flores-Vallejo, 2017) y antibacteriano *in vitro* contra *E. coli* ATCC 25922 (Morales, 2017).

Con base a lo anterior, en el presente trabajo se extendió con la investigación de los hongos endófitos aislados de *C. alata* Kunth, evaluando su capacidad para inhibir el crecimiento de un panel de 7 bacterias sensibles a antibióticos.

La implementación del presente proyecto permitió identificar a las cepas de hongos endófitos de *C. alata* con mayor efecto antibacteriano, el cual fue identificado a través de la medición de halos de inhibición con la metodología *in vitro* de difusión en pozo en agar. Los resultados derivados de esta investigación pueden representar una alternativa en la identificación de productos naturales antibacterianos que sean útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Debido a las malas prácticas en la administración de fármacos antibacterianos y a la selección de bacterias resistentes a fármacos, la morbo-mortalidad asociado a enfermedades infecciosas por bacterias resistentes es cada vez mayor. Para entender este problema de salud pública se han investigado a las plantas medicinales en busca de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Actualmente hay un creciente interés en usar como herramientas biotecnológicas a los hongos endófitos presentes en las plantas medicinales para investigar y explotar su capacidad de producción de compuestos antibacterianos. Lo anterior ayudaría a identificar compuestos estructuralmente novedosos, cuya producción sea escalable biotecnológicamente, y que puedan usarse para desarrollar nuevos antibióticos de origen natural. Reduciendo con ello el impacto ecológico que representa la extracción de las especies vegetales de su medio ambiente. En este proyecto se determinó la actividad antibacteriana de los extractos de biomasa y de sobrenadante de los hongos endófitos aislados de diferentes partes de *C. alata*, probándolos contra varias cepas de bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

- Analizar la actividad antibacteriana de los extractos de biomasa y sobrenadante de 43 hongos endófitos aislados de diferentes partes de *Crescentia alata* Kunth.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Cultivar el panel de cepas bacterianas seleccionadas sensibles a antibióticos ATCC, obtener sus perfiles bioquímicos y describir sus características morfológicas macro y microscópicas.
- Identificar los parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas bacterianas a través de métodos indirectos (espectrofotometría).
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de dos concentraciones de los extractos de biomasa y sobrenadante de los hongos endófitos a través del ensayo de difusión en pozos en agar, siguiendo los estándares de la “CLSI” y midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (mm).
- Realizar el análisis estadístico e identificar a los extractos de los hongos endófitos con mayor actividad antibacteriana (mayor halo de inhibición).

1.4 HIPÓTESIS

Los extractos de micelio y sobrenadante de los hongos endófitos aislados de diferentes partes de *Crescentia alata* Kunth son capaces de inhibir el crecimiento de diferentes bacterias de interés clínico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades bacterianas que prevalecen a nivel mundial

La resistencia a los antibióticos (RAM) pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos, siendo una amenaza latente para la salud pública mundial.

La resistencia de los antibióticos afecta a todos los países. Los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacorresistente corren mayor riesgo de tener peores resultados clínicos y morir. Además, consumen más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias (OMS, 2016).

Según (OMS, 2016) las bacterias que más prevalecen a mundial son:

- *Klebsiella pneumoniae* (bacteria intestinal) se ha propagado a todas las regiones del mundo, es una importante causa de infecciones nosocomiales, como la neumonía, la sepsis o las infecciones de recién nacidos y los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. El tratamiento que utilizado son los antibióticos carbapenémicos. Debido a la resistencia, en algunos países los antibióticos carbapenémicos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*.
- *Escherichia coli* es la principal bacteria causante de la diarrea en países en desarrollo, así como la mayoría causa de la diarrea viajera. Una de las clases de medicamentos más utilizados en el tratamiento de las infecciones causadas por *E. coli* son las fluoroquinolonas. En varias partes del mundo el tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes.
- *Staphylococcus aureus* (causa frecuente de infecciones graves en los centros sanitarios y en la comunidad). Se ha estimado que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir del 64% mayor que nos pacientes con infecciones no resistentes.
- *Neisseria gonorrhoeae* es la principal bacteria causante de la gonorrea una infección de transmisión sexual.
- *Enterobacterias* son bacterias Gram negativas que contienen más de 30 géneros y más de 100 especies. La colistina es el último recurso para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales de esta bacteria. Recientemente se ha detectado resistencia a la colistina en varios países y regiones.
- *Plasmodium falciparum* bacteria causante del paludismo. Hasta el 2016 se había confirmado la resistencia al tratamiento de primera línea (tratamientos combinados basados en la artemisinina: TCA) contra el paludismo. La

propagación de cepas resistentes a otras partes del mundo podría suponer un gran reto para la salud pública y poner en peligro los avances recientes en el control del paludismo.

- *Mycobacterium tuberculosis* bacteria causante de la tuberculosis, una enfermedad que afecta los pulmones. Según las estimaciones de la OMS, en 2014 hubo unos 480 000 nuevos casos de tuberculosis multirresistente (TB-MR), es decir resistente a los dos antituberculosos más potentes.
- *Vibrio cholera* es el agente causante del cólera, una enfermedad diarreica aguda. Aunque es considerada benigna o asintomática, en algunas ocasiones ha presentado ser grave y mortal.

2.2 Bacterias

2.2.1 Generalidades

Las bacterias son organismos unicelulares, presentes en casi todos los hábitats de la Tierra. Los científicos las consideran como los seres más numerosos del planeta. Una de las razones por las cuales son tan exitosas es porque pueden utilizar una amplia variedad de fuentes de alimento.

Constituyen un grupo heterogéneo de organismos desde el punto de vista morfológico. Difieren de los eucariotas, además de su pequeño tamaño, carecen de núcleo diferenciado, contienen un solo cromosoma, formado por un ADN circular de doble helicoide, sin proteínas asociadas, carecen de microtúbulos y estructuras relacionadas (centriolos, huso cromosomático, etc.). Carecen también de retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias.

La mayoría de bacterias presentan estructuras como: pared celular, membrana plasmática y citoplasma. En el citoplasma se localiza un ADN circular y numeroso ribosomas.

2.2.2 Morfología bacteriana

Las bacterias tienen una envoltura rígida o pared bacteriana que determina su forma: esférica, cocos; cilíndrica (alargada), bacilos; bacilos cortos redondeados (cocobacilos); helicoidal, espiroquetas, etc.

En ocasiones las bacterias presentan morfología variable, dependiendo de las condiciones del cultivo (edad del cultivo, tipo de medio de cultivo, presencia de antibióticos etc.). A veces las bacterias no se dividen totalmente, no se individualizan, y entonces dan lugar a agrupaciones de diferentes formas: cadenas

(estreptococos) racimos (estafilococos), o conjunto de dos (diplococos) (De la Rosa & Prieto, 2003) (Figura 1).

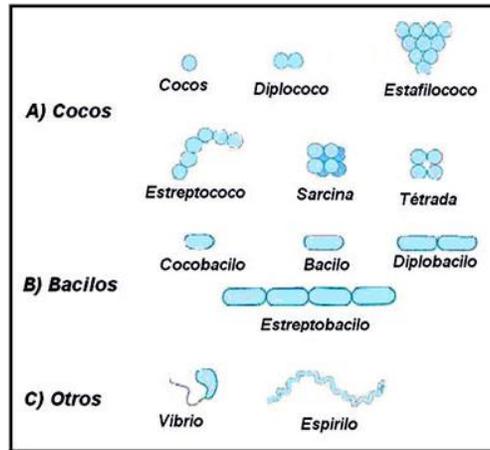


Figura 1. Diferentes formas y agrupamientos que presentan las bacterias. Tomada de Mariana Ruiz en Wikimedia Commons

Las bacterias se pueden clasificar de diferentes maneras: como a) por morfología y agrupación, b) pH requerido, c) requerimiento de oxígeno, d) temperatura y e) por composición de la pared celular que reaccionan a la tinción de Gram.

Esta última ayuda a interpretar su grupo taxonómico al que pertenecen, ya sea Gram positivas o Gram negativas.

2.2.3 Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

Hans Christian Gram, las bacterias pueden clasificarse en dos grupos: Gram negativas y Gram positivas.

Las bacterias Gram positivas, tienen una capa gruesa de peptidoglicano (mureina), contiene pocos lípidos, no se decoloran por que dificulta la penetración de alcohol que pudiera extraer el colorante (permanecen teñidas de azul).

Las bacterias Gram negativas tienen una pared de peptidoglicano más delgada, recubierta por una envoltura de composición fundamental lipídica (se tiñen de color rojo) (De la Rosa & Prieto, 2003).

2.3 Actividad antibacteriana

2.3.1 Agentes antibacterianos

Los agentes antimicrobianos pueden interferir en diferentes funciones que llevan a cabo las bacterias, tales como la síntesis de sus proteínas, ácidos nucleicos, producción de aminoácidos o azúcares del medio, los cuales son necesarios para la síntesis de sus paredes o membrana celular.

Los antimicrobianos pueden actuar en una o más de sus funciones de las bacterias y producir dos efectos: muerte bacteriana (agentes bactericidas) o solo inhibir el desarrollo y reproducción del germen (agentes bacteriostáticos) (Molina, 2017).

2.3.2 Clasificación de los antibióticos y su mecanismo de acción

Los antibióticos se clasifican de acuerdo al mecanismo de acción y en 7 grandes grupos (Tabla 1) (Mendoza, 2011):

Tabla 1. Mecanismo de acción de antibióticos

Mecanismo de acción	Ejemplos
Inhibición de la pared celular	Penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, oxacilina, nafcilina
Daño en la membrana plasmática	Polimixina, nistalina, anfotericina B
Inhibición de la síntesis de proteínas	Aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Rifamicina, actinomicina D, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina
Antimetabolitos	Trimetoprim, sulfonamidas
Inhibidores de betalactamasas	Sulbactam, clavulanato, tazobactam
Antifímicos	Etambutol, pirazinamida, isoniazida, estreptomina, rifampicina

Tomada: Mendoza Medellín A. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

2.3.3 Clasificación sobre su estructura química

Agrupar a los antibióticos sobre la base de su estructura química y los denominar como familias o clases de antibióticos:

- a) Aminoglucósidos
- b) Cefalosporinas
- c) Cloranfenicol
- d) Macrólidos y lincomicinas
- e) Quinolonas y fluoroquinolonas
- f) Penicilinas o betalactámicos
- g) Sulfonamidas
- h) Tetraciclinas

2.3.4 Actividad antibacteriana en plantas

Los antibacterianos de origen microbiológico parecen haber agotado sus posibilidades en esta lucha; sin embargo, desde las plantas o árboles, ya sean terrestres o acuáticas, se han identificado compuestos con diferentes actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas etc. que constituyen un importante reservorio. Las especies vegetales tienen una creciente demanda en compuestos antimicrobianos debido al aumento de la población con inmunodepresión y a la creciente resistencia a los antibióticos, lo que constituye una amenaza mundial según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS)

El estudio científico de las plantas medicinales brinda la posibilidad de describir nuevos fármacos que posteriormente se pueden sintetizar, pero también permiten un conocimiento más profundo de los vegetales que conducen a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos de síntesis (Luján, 2006).

Por ejemplo en la familia *Annonaceae*, se han encontrado un interesante número de alcaloides y acetogeninas (γ -metilbutenolidos o γ -metilbutenolactonas, con una cadena lateral no ramificada de C30 o C32 unido al C α , esta cadena lateral es usualmente oxidada, exhibiendo 1, 2 ó 3 anillos tetrahidrofuranos y/o grupos hidroxilos, acetoxilos, epoxidos o carbonilos) con un amplio rango de actividades biológicas: citotóxicas, antitumoral, pesticida, antiviral, antibiótica etc.

Con base a lo antes mencionado, en los últimos años se ha ido incrementando la investigación científica, para la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana en plantas.

2.4 Uso de plantas medicinales en América

Desde hace miles de años, los seres humanos hemos utilizado a los recursos naturales vegetales existentes en nuestro entorno para el cuidado de nuestra salud, identificando sus propiedades como alimento y como medicina a base de prueba y error. Las prácticas en la medicina tradicional quizás han sido el principal testigo y producto de esta interacción entre las plantas y el hombre, de la que tantos beneficios se han reportado en favor de la humanidad (Torres, Perez, & Contreras, 2005).

La medicina prehispánica, se fundamentó en el conocimiento empírico de las propiedades medicinales de los recursos botánicos existentes en diferentes zonas del territorio que hoy conforman a México. Tal conocimiento fue transmitido de generación en generación a través de relatos y rituales religiosos de manera que los pueblos mesoamericanos pudieron asociar e identificar cualidades y poderes de plantas, animales y elementos de su naturaleza, los cuales han aportado nuevos conocimientos a la medicina local. Se sabe que en México antiguo tenían amplios conocimientos sobre los seres vivos e incluso en ciertas ramas de la medicina y de la farmacología, ya que utilizaban plantas, minerales y partes de animales en el tratamiento de algunas enfermedades (Suaste-Gomez, 2006) (Lozoya, 2000).

De esta manera, a través de los años y con el cambio de las tribus nómadas a sedentarias los conocimientos se fueron fortaleciendo, permitiendo su difusión y transmisión de generación en generación, logrando así una materia de estudio, con la finalidad de mantener el bienestar del ser humano: la etnobotánica y la etnofarmacología.

Con el descubrimiento de América se empezó a conocer la herbolaria medicinal, de la cual se sigue haciendo uso actualmente, considerando que ahora se conoce de manera científica los beneficios que otorga algunas de las especies vegetales, lo cual ha beneficiado a la medicina moderna (Herrera, 2005).

2.5 Uso de plantas medicinales antibacterianas en México

2.5.1 Antecedentes Históricos

Desde hace miles de años el hombre distinguió entre las plantas que servían para comer y para curar, de las que podían matar (Viesca, 1997). En México el uso de plantas medicinales constituye un conocimiento invaluable que ha generado desde la época precolombina.

En restos arqueológicos del territorio mexicano, hay registros paleobotánicos de plantas ya diferenciadas por sus propiedades curativas pertenecen a la cultura Teotihuacana (Didier, 1995).

Las primeras tribus sedentarias y agrícolas que se instalaron en la parte norte de la península de Yucatán, datan por lo menos de mil quinientos años A.C., de suerte que su existencia coincide, con la de los pueblos más antiguos de Europa (Viesca, 1997).

Con la llegada de los españoles a México en el siglo XVI se solicita que el vasto conocimiento del país sea escrito, creando documentos importantes sobre el tema, tal es el caso de Fray Bernardino de Sahagún, quien se interesó desde el inicio sobre los mitos, las costumbres y por supuesto, las enfermedades y los recursos vegetales y animales que se utilizaban para atender la salud de la población y fue en 1577 cuando comenzó la recopilación, a la cual se le llamo Códice Florentino. Éste códice tiene una amplia sección dedicado exclusivamente a las plantas medicinales de los indios mexicano (Suaste-Gomez, 2006)

Con base a esto, los mexicas allí encontraron una fuente inagotable de práctica, resultado del reparo cuidadoso y la reflexión sobre las propiedades de las innumerables plantas que crecen en sus dominios.

Otro aporte de medicina antigua fue hecho por los mayas, los cuales se albergaron en la península de Yucatán. Los mayas tuvieron cierta influencia sobre el progreso de la medicina mesoamericana. Sin embargo, estos aportes fueron quemados por Fray Diego de Landa junto con otros cientos de códices prehispánicos, terminando así con todo el vestigio de la cultura maya. Se especula que eventualmente arrepentido de su crueldad y destrucción de la gente Maya y sus códices, decidió escribir su historia el mismo. El libro es considerado ser un resumen completo y preciso de los mayas, éste libro fue titulado como “Relación de las cosas de Yucatán” (Suaste-Gomez, 2006). Por otro lado, una de las fuentes más antiguas de la medicina mesoamericana escrito después de la conquista fue “*El Libellus de medicinalibus indorum herbis*”, más conocido como el Códice Cruz-Badiano (de plantas medicinales mexicanas), fue descrito en 1552 por el médico náhua Martín

de la Cruz (encargado de los niños internos del Colegio de la Santa Cruz Tlatelolco). También se le reconoce como el último gran herbario medieval.

La religión que comprende el sur y el suroeste de México (Guerrero, Oaxaca, sur de Veracruz, Chiapas, Campeche, Tabasco, Yucatán, Quintana Roo) es una de las zonas del mundo con mayor diversidad biológica y cultura (Diario Oficial de la Federación, 2014).

Estimaciones de la M. en C. Abigail Aguilar, entre el 70% y el 80% de la población recurre a las plantas medicinales para curar padecimiento que van desde un simple resfriado hasta enfermedades de tipo gastrointestinales, dermatitis, etc. Actualmente ya no solo se usan empíricamente, o por conocimiento transmitido de generación en generación, sino que cada vez se realizan más estudios científicos; sin embargo, de las más de 6000 especies usadas con fines terapéuticos solo el 10% han sido estudiadas a nivel farmacológico, microbiológico y fitoquímico (Aguilar, 1994) (Didier, 1995)

Sharma *et al*, 2016 reportó las propiedades antibacterianas *in vitro* de 343 especies de plantas de 92 familias botánicas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, un ejemplo de estas es *Crescentia alata* Kunth.

2.6 Métodos de evaluación de productos naturales con actividad antibacteriana

Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control bacteriano. Existen pruebas estandarizadas *in vitro* conocidas como bioensayos de susceptibilidad antimicrobiana, las cuales son técnicas esenciales en la búsqueda de actividades biológicas de nuevos compuestos naturales.

Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antibacteriana se encuentran los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina en forma cualitativa el efecto antibacteriano de los extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos (Taroco *et al*. 2006).

Por otro lado los métodos de dilución son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana, la técnica más utilizada es la denominada concentración mínima inhibitoria (CMI), con la cual se define la concentración

mínima capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Esta técnica puede ser mejorada con la ayuda de indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana.

Una vez que se ha establecido de forma cualitativa y cuantitativa el efecto antibacteriano de los extractos es conveniente determinar el compuesto responsable de dicha actividad. La bioautografía es la técnica más utilizada para tal fin ya que nos indica directamente la localización del compuesto de interés en una cromatografía de capa delgada.

Las pruebas de susceptibilidad antibacteriana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas. Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados hasta detalles como la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de actividad antibacteriana, pueden influir en los resultados de manera contundente (Ramirez & Castaño, 2009).

A continuación se describirán a detalle los tres métodos principales para evaluar la actividad antibacteriana.

2.6.1 Método de difusión

Es un método cualitativo, el cual se caracteriza por ser de fácil estandarización, así mismo, está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido, además de ser reproducible.

Esta técnica se realiza en pozos o disco, actualmente ya se encuentran estandarizados ambos, los cuales son recomendados por el NCCLS.

Es recomendado cuando se desconoce la sensibilidad de una bacteria, si presenta alguna resistencia a los antibióticos más frecuentes.

El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar y sobre el cual se coloca un papel filtro de 6 mm de diámetro o se deposita en un pozo en el agar de la placa una cantidad determinada de la sustancia a probar (Bauer et al. 2000).

2.6.2 Método de dilución

Esté método es apropiado para cuantificar la actividad antibacteriana, puesto que la cantidad del extracto de la planta o el compuesto activo es mezclado con una cantidad de medio de cultivo. Lo cual puede ser llevado tanto a medio sólido como medio líquido. La concentración final deseada debe ser considerada p/v o v/v con respecto al medio de cultivo.

- **Dilución en agar**

El agar es mezclado con una cantidad del extracto de la planta para así obtener una concentración final con el medio. Cabe destacar este método requiere de gran cantidad del extracto.

- **Dilución en medio líquido**

Se procederá de la misma forma descrita anteriormente para obtener una concentración final del extracto en el medio, sin embargo, la interpretación de los resultados se realiza de manera diferente, por turbidimetría e indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad bacteriana. En el caso de los indicadores REDOX, los utilizados principalmente son el bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y resazurina (Ramirez & Castaño, 2009).

Estos dos métodos pueden realizarse en placas de 96 pozos, teniendo en cuenta las proporciones arriba mencionadas. La CMI se considera aquella concentración en la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio de color.

2.7 Generalidades de *Crescentia alata* Kunth

Es un árbol polifacético, conocido con varios nombres comunes como: higüero (Puerto Rico); güira (República Dominicana); calabaza (Cuba); taparo (Venezuela); mate, pilche (Ecuador); huingo (Perú); bassenboon (Surinam); cuite (Brasil); calabash, calabash-tree (Estados Unidos), jícaro, jícara, morro, guacal, calabacero totumo (América Central), cujete, cirían, tecomate, guaje (México) (Geilfus, 1987).

Una de las referencias más antiguas fue descrita por Francisco Hernández en el siglo XVI, quien comentó “esta planta tiene la propiedad de contener las diarreas, detiene la caída del cabello y el fruto cura las hernias inguinales” (Pool-Chalé, 2014).

Crescentia alata Kunth y *Crescentia cujete* L. son dos de las especies que existen de la planta del morro, “*Crescentia*” dedicada al biólogo Pietro Crescenzi, “cujete” perteneciendo al dialecto náhuatl y L. la abreviatura de su estudioso Carl von Linné (Pool-Chalé, 2014).

A inicios del siglo XX la Sociedad Mexicana de Historia Natural la relata como: aperitiva, catártica, para tratar contusiones, emoliente y pectoral. Posteriormente en el siglo XVIII, Ricardo Ossado en el Libro del Judío la refiere con las propiedades para aliviar la tos de los tísicos. Años después Maximiliano Martínez le atribuye propiedades como anticatarrales, antiescabíatica, antisifilitica, aperitiva, contusiones, dermatosis, orquitis y espasmos.

Narciso Souce reportó que la planta era astringente, alivia diarreas y enfermedades broncopulmonares. Finalmente la Sociedad Farmacéutica de México reportó usos contra padecimientos hepáticos, pectorales y contusiones (Pool-Chalé, 2014).

2.7.1 Clasificación taxonómica

En la Tabla 2 se presenta la clasificación taxonómica de *Crescentia alata* Kunth.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Crescentia alata* Kunth

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Bignoniaceae
Tribu	Crescentieae
Género	<i>Crescentia</i>
Especies	<i>C. alata</i> <i>C. cujete</i>

2.7.2 Descripción morfológica

***Crescentia alata* Kunth** es un árbol caducifolio de 4 a 8 m. (hasta 18 cm.) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 30 cm; algunos ejemplares llegan a medir hasta 60 cm.

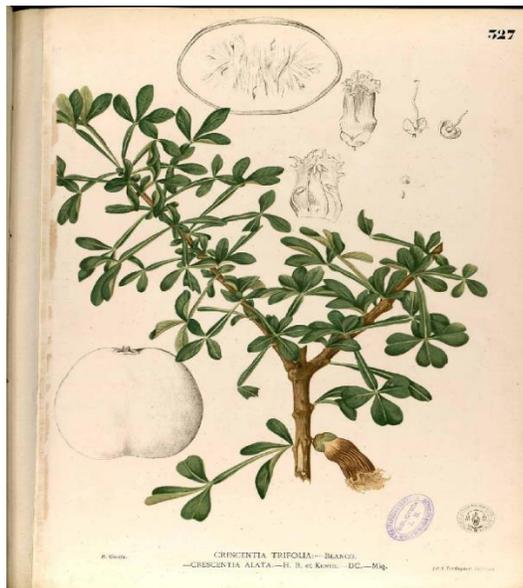


Figura 2. Ilustración original de *Crescentia alata* Kunth. De Francisco Manuel Blanco (O.S.A.)

Presenta una copa deprimida o abierta (no existe propiamente una copa). Respecto a las hojas, compuestas o simples en cada fascículo, las hojas compuestas 3-foliadas (raramente 5-foliadas), folíolos de 1 a 4.5 cm. de largo; hojas simples más pequeñas (figura 2).

El tronco con las ramas torcidas o ramas gruesas alargadas, casi horizontales con crecimiento indefinido. Frecuentemente los frutos se originan del tronco o de las ramas gruesas. Su fruto es un pepo o calabaza, más o menos esférico de 7 a 10 cm. (15 cm.) de diámetro. Sus semillas son pequeñas, delgadas y color castaño, midiendo de 6 a 7 mm de ancho, las cuales se reparten en la pulpa del fruto. Sus flores presentan un olor a almizcle, inflorescencia cauliflora con una o dos flores nacidas en ramas más largas o en el tronco. Cáliz dividido en dos lóbulos, corola de color canela, tubular campanulada y carnosa.

Su corteza externa fisurada con grietas o hendiduras cortas, longitudinales con bordes rectos, con un grosor total de 3 mm. Su raíz sistema radical profundo y su sexualidad hermafrodita (CONABIO, 2017)

2.7.3 Distribución geográfica

Origen

Crescentia alata Kunth originaria de México, se extiende desde México hasta Colombia, Perú y Brasil. Cultivado en el sur de Florida y en California (Estados Unidos) e introducido en Bermudas. Ha sido cultivado en los trópicos del Viejo Mundo.

Estatus

Habita en áreas abiertas tipo sabana, propio de tierras planas bajas, cañadas, en las selvas bajas subcaducifolias que bordean los lechos secos de arroyos y en la selva baja caducifolia que cubren las serranías. Tipo de suelo pedregoso, pardo somero.

Habitat

Respecto a la importancia ecológica, es un elemento característico y a menudo dominante en la sabana seca.

Distribución

Se le encuentra en la región costera desde Baja California, Sonora y Sinaloa hasta Oaxaca y Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Veracruz y poco frecuente en la Depresión Central: México, Morelos, Michoacán y Puebla. Altitud: 0 a 1,200 m.

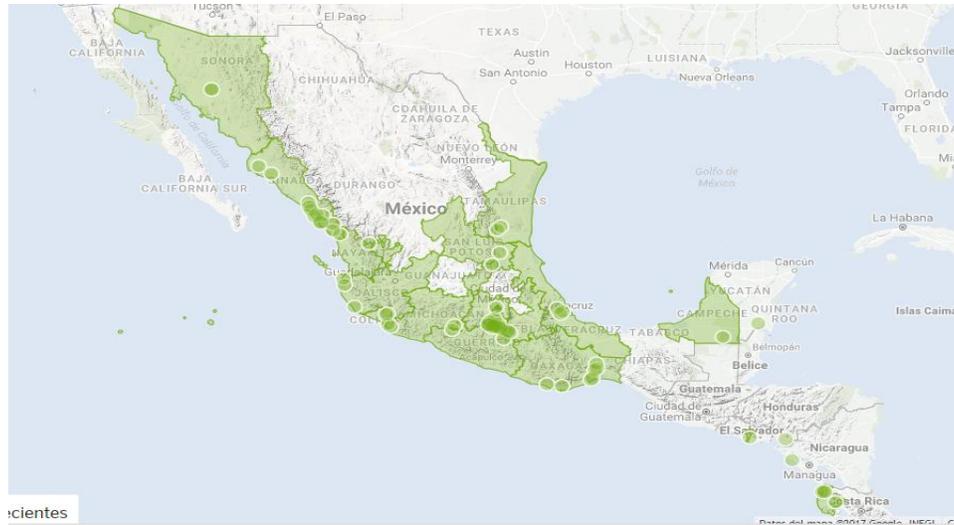


Figura 3. Mapa de distribución potencial de la especie *Crescentia alata* Kunth.

Extraído del libro Árboles tropicales de México. Pennington, T., J. Sarukhán, (2005).

C. alata presenta una distribución más amplia hacia la zona centro de Morelos, pero se reportó de acuerdo a los estudios de campo que la distribución de *C. alata* en la actualidad se restringe principalmente hacia el zona sur del estado, en altitudes de 900 a 1250 m.s.n.m. en clima cálido subhúmedo, con pendientes de 0 a 8o en lomeríos y de 10 a 20o en serranía (Solares, 2004). Respecto a su repartición es de aislada, principalmente en sierra (Quilamula, Tepalcingo, Rancho Viejo, cerro del Chisco, Huautla) y regular en mesetas y lomeríos (Huajintlán, Michapa, al noreste de Apancingo, puente de Terrones y Mazatepec) al sur poniente del estado.

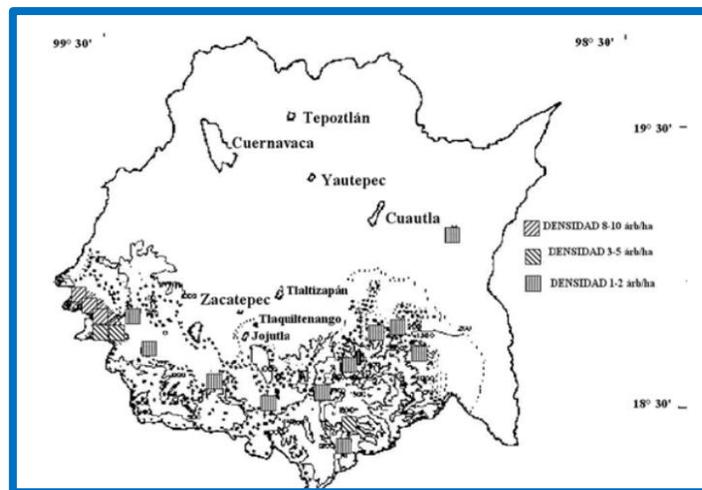


Figura 4. Distribución de *Crescentia alata* (Cuatecomate, Cirian) en el estado de Morelos

2.8 Usos etnobotánicas

C. alata es un componente florístico de la selva baja caducifolia que hace aproximadamente 30 años se distribuía desde la parte central de Morelos, pero que debido a su alto grado de aprovechamiento por los artesanos, su presencia se ha reducido a la zona sur de la entidad. Su alto uso tradicional la ubica como una de las especies de selva baja caducifolia de mayor importancia, pero también como una de las más explotadas (Solares, 2004), siendo una de las 20 especies más importantes en el Estado de Morelos. Ocupa el 6º lugar en cuanto a intensidad de usos y el 13º lugar en cuanto a diversidad de usos. Debido a esto, es una de las especies que está siendo fuertemente impactada en sus poblaciones naturales.

Los usos que recibe esta especie son de tipo artesanal, comestible, medicinal (fruta, hojas, raíz y flor) y uso doméstico (frutas, jícaras).

Para uso doméstico el fruto del jícaro y jícara posee un exocarpo llamado cáscara, es muy duro y ha sido usado desde la época prehispánica así como la pulpa. La cáscara del jícaro o morro ha sido usada para hacer utensilios de cocina (cucharas, platos hondos, recipientes para colecta de leche y tomar bebidas) (Pool-Chalé, 2014) .

De manera artesanal el fruto es utilizado para fabricar instrumentos musicales como maracas. Otro uso ha sido con fines comestibles ya que la pulpa también es usada como alimento para ganado (Zamora *et al*, 2001)

En los usos medicinales se utiliza la pulpa que sirve como laxante, emético, emoliente y antidiarréico; además, en decocción sirve como hemostático, para la dermatitis, las hemorroides y los golpes. Los indígenas utilizan la pulpa para fortalecer las encías y garantizar una buena dentadura. La pulpa cocida se da de beber a las parturientas con el fin de limpiar cualquier residuo de placenta y evitar infecciones postparto (Chizmar, 2009)

La hoja calentada y el zumo en instilación se utilizan para el dolor de oído. La semilla en casos de tos persistente, principios de asma o bronquitis.

2.9 Aportaciones científicas de *Crescentia alata* Kunth

Tabla 3. Estudios científicos recientes han validado el uso etnomédico de *Crescentia alata*, demostrando su actividad antioxidante, antiinflamatoria, insecticida y antibacteriana. Sin embargo, se ha reportado que debido a la sobreexplotación de la especie, esta se ha visto afectada, por la alteración que ha sufrido la selva baja caducifolia.

Tabla 3. Aportación científica sobre *C. alata* Kunth.

Extracto	Compuesto	Actividad	Referencia
Etanólico		Antibacteriana contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Dimayuga-Encarnación <i>et al.</i> , 1998
Hexánico, Clorofórmico y Metananólico		Antimicrobiana <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. coli</i> y <i>Candida albicans</i>	Rojas, Lévaro <i>et al.</i> , 2000.
Etanólico		Antibacteriana (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Murillo-Álvarez <i>et al.</i> , 2003.
Metanólico	Flavonoides	Antiinflamatoria	Rastrelli Le. <i>et al.</i> , 2001.
Etanólico	Alcaloides, Flavonoides, esteroides y fenoles	Antiinflamatoria Anticancerígena	Solares-Arenas <i>et al.</i> , 2004.
Hexánico Clorofórmico		Antibacteriana contra cepas clínicas <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i>	Pio-León, <i>et al.</i> , 2003.
Cetónico		Antibacteriana contra <i>S. aureus</i>	Cates R., <i>et al.</i> , 2013.
Etanólico	Iridoides	Bioinsecticida	Valladares-Cisneros <i>et al.</i> , 2014.

2.10 Hongos endófitos

2.10.1 Descubrimiento e historia de los hongos endófitos

La palabra “endófito” etimológicamente significa “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta). El término “endófito” lo propuso Baryen en 1866 y los primeros registros de la presencia de hongos endófitos provienen del año 1898. Este término se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas. En 1995, Wilson restringió el término únicamente a microorganismo, refiriéndose solo a bacterias y hongos, los cuales no provocan daño aparente a la planta hospedera (Wilson, 1995).

Sin embargo, el término actualmente se refiere a bacterias, hongos, insecto y algas. Los hongos endófitos se definen como microorganismos que se encuentran la mayor parte de su vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño aparente (Rodríguez & Redman, 2009).

2.10.2 Relación hongo endófito-planta hospedera

Cuando se habla de “endofitismo” se refiere a una asociación de costo-beneficio, no obstructiva, asintomática y transitoria.

La relación entre el hongo endófito y su hospedero puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis. En esta relación ambos microorganismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos (Kusari, Hertweck, & Spiteller, 2012).

En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, estas varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio, se establece una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad (Sánchez-Fernandez *et al.*, 2013).

Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno o a otros hongos endófitos; sin embargo, no puede inhibir a los microorganismos que se encuentran en su mismo entorno.

2.10.3 Mecanismos de los hongos endófitos contra factores bióticos

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su planta hospedera contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales) por medio de dos mecanismos (Sánchez-Fernandez *et al.*, 2013).

1) Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.

2) Indirectos: inducen o incrementan la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.

2.10.4 Aplicación de hongos endófitos

Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sin número de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco o un agroquímico potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos (Debbad *et al.*, 2009).

Así mismo, la presencia de toxinas y metabolitos secundarios con efectos fisiológicos sobre otros organismos, conduce a otra pregunta: ¿cuál es el potencial biotecnológico de los endófitos?, un posible campo de acción de las propiedades de los endófitos, es en la protección de cultivos mediante la producción de metabolitos que evitan o disminuyen tanto la herbivoría como la susceptibilidad a patógenos y a tensión ambiental (por ejemplo, a sequía). Por otro lado, es posible que otros compuestos del metabolismo de los hongos endófitos tengan usos industriales y medicinales, lo que constituye un estímulo adicional para estudiar este grupo. Ya que podrían usarse para desarrollar nuevos antibióticos de origen natural, los cuales serían menos dañinos para el hombre y en el medio ambiente, así como, contribuir a disminuir la resistencia bacteriana.

De tal manera y con base a lo antes mencionado, se están buscando alternativas de origen natural para producir fármacos antibacterianos. Contando con las herramientas biotecnológicas y usando hongos endófitos con actividad antibacteriana se podrían cultivar dichos hongos en menor tiempo y con la ventaja de brindar un gran número de compuestos activos para la fabricación de fármacos.

2.10.5 Aportación científica de hongos endófitos aislados de otras plantas con actividad antibacteriana

Los hongos endófitos son cosmopolitas y diversos y se cree que la mayor parte de la inmensa cantidad de hongos que falta por describir, se encuentra asociada de este modo a plantas y líquenes, por esto, son necesarios estudios relacionados a la identificación de estos microorganismos especiales en distintas áreas geográficas (Gamboa-Gaitán, 2006). Es evidente que mucho trabajo resta por hacerse en el campo de los hongos endófitos y uno de los aspectos prioritarios es la descripción taxonómica de especies en sus hospederos naturales (Ramirez R. , 2006) . En la tabla 4 se muestran algunos ejemplos de hongos endófitos con actividad antibacteriana.

Tabla 4. Estudio sobre hongos endófitos de diferentes plantas con actividad antibacteriana

Planta	Actividad	Id. del hongo endófito	Aislamiento del hongo	Referencia
<i>Mitrephora wangii</i> .	Gram positivas	<i>Aspergillus sp</i>	Flores	Monggoot-S <i>et al.</i> , 2018
<i>Melodorum fruticosum</i> (queso blanco)	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i>	<i>Diaporthe spp.</i>	Flores	Tanapichatsakul-C <i>et al.</i> , 2018
<i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Nigrospora</i> <i>Aspergillus</i> , <i>Ascochyta</i> <i>Colletotrichum</i> , <i>Exidia</i> , <i>Clitopilus</i> y <i>Nomuraea</i>	Hojas	Atiphasaworn-P <i>et al.</i> , 2017
<i>Vellozia gigantea</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Diaporthe miriciae</i> <i>Trichoderma effusum</i>	Hojas y raíces	Ferreira-M <i>et al.</i> , 2017
<i>Sida acuta</i>	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. agalactiae</i>	<i>Diaporthe spp.</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Trametes</i> ,	Corteza	Liu-Y <i>et al.</i> , 2016
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Fusarium solani</i>	Hoja	Shah-A <i>et al.</i> , 2017
<i>Olea europaea</i>	Gram positivas y negativas	<i>Penicillium</i>	Hoja	Malhadas-C <i>et al.</i> , 2017
	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Xylaria</i>	Corteza descompuesta	Mogollon-I <i>et al.</i> , 2013.

2.10.6 Aportación científica de hongos endófitos aislado de *C. alata*

Hasta la fecha se ha clasificado a nivel de género o especie a los hongos endófitos de *C. alata* mediante la secuencias de ADNr (ADN ribosómico) de ITS2 (Tabla 5) (Flores-Vallejo *et al.*, 2017). En lo que respecta a la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth, existe un primer estudio reportado (Morales-Aguilar *et al.*, 2017), donde se identificó que los extractos de micelio eran capaces de inhibir hasta un 33% el crecimiento de la cepa sensible a ampicilina de *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 5. Género de hongos endófitos aislados de *C. alata* Kunth y otros estudios de endófitos de otras plantas (mismos géneros) con actividad antibacteriana.

Identificación de hongos endófitos aislados de <i>C. alata</i> (Flores-Vallejo <i>et al.</i> , 2017)	Otros estudios en otras plantas				
	Género	Actividad antibacteriana	Aislado	Compuesto	Referencia
<i>Cercospora sp.</i>		<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i>	Rama	Alcaloide	Hema-P <i>et al.</i> , 2015
<i>Colletotrichum sp.</i>		<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Hoja	No	Sierra-García <i>et al.</i> , 2012
<i>Diaporthe sp.</i>		<i>S. aureus</i>	Rama	No	Sousa-J <i>et al.</i> , 2016
<i>Fusarium sp.</i>		<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i>	Flor	Naftoquinona	Tayung-K <i>et al.</i> , 2011
<i>Podospora sp.</i>		<i>Serratia</i>	Hojas	Furanonas	Wang-Y <i>et al.</i> , 1993
<i>Aerobasidium sp.</i>		<i>P. aeruginosa</i>	Hojas	No	Kalantar-E <i>et al.</i> , 2006
<i>Periconia sp.</i>		<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Hoja	No	Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015
<i>Trematophoma sp.</i>		<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>S. typhimurium</i>	Raíz	No	Castillo-Machalskis <i>et al.</i> , 2007
<i>Trametes sp.</i>		<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Flores	No	Machoa-Arevalos <i>et al.</i> , 2017
<i>Aureobasidium sp.</i>		<i>E. coli</i>	Hojas	No	Rodriguez-A <i>et al.</i> , 2011
<i>Cladosporium sp.</i>		<i>Shigella</i> , <i>E. coli</i>	Raíz	macrolidos	Castillo-Machalskis <i>et al.</i> , 2007
<i>Xylaria feejeensis sp.</i>		<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Corteza	No	Mogollón-I <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus</i>		<i>E. coli</i>	Hoja	No	Nasimiyu <i>et al.</i> , 2018.
<i>Fusarium sp.</i>		<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Rama	No	Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015

III. METODOLOGÍA

3.1 Estrategia experimental

La metodología experimental descrita a continuación fue establecida y asesorada por la M. en Biotec. Rosario del Carmen Flores Vallejo durante su trabajo como Auxiliar de Investigador (SIN 3) de la Dra. María Luisa Villareal Ortega.

En el figura 5 se resume la estrategia experimental general para medir la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth.

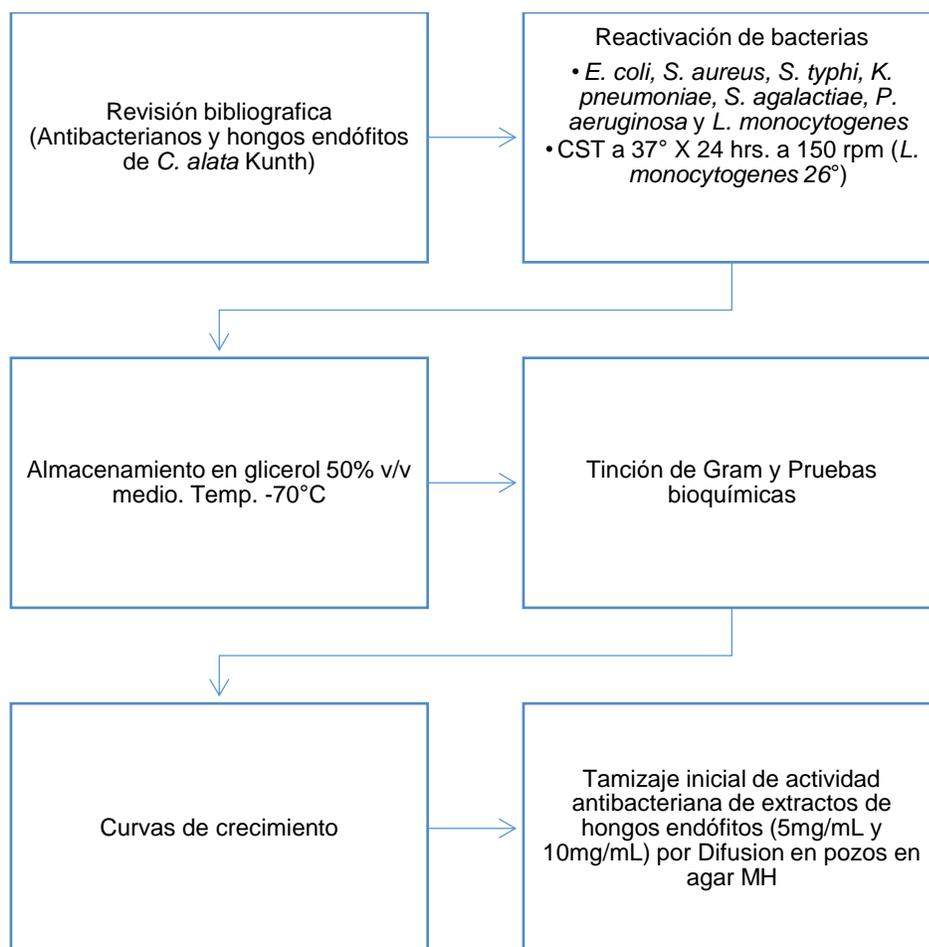


Figura 5. Estrategia experimental para medir la actividad antibacteriana de *C. alata* Kunth y sus hongos endófitos.

3.2 Tipo de estudio

Retrospectivo, prospectivo y experimental

3.3 Materiales

Las bacterias fueron donadas por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) sede Cuernavaca Morelos.

Bacterias Gram positivas

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
- *Streptococcus agalactiae* ATCC 27591

Bacterias Gram negativas

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Salmonella typhi* ATCC 6539

Controles positivos:

- Ácido nalidíxico
- Ampicilina
- Ticarcilina
- Estreptomina
- Kanamicina
- Tetraciclina
- DMSO AL 100% v/v

Control negativo:

- DMSO 5% v/v
- Agua destilada estéril

3.4 Ensayo experimental

3.4.1 Ensayo para curvas de crecimiento

1° Fase: Reactivación de bacterias “stock” almacenadas en 70°C en glicerol 50% v/v

- En un tubo Falcon de 50 mL se re-activaron las bacterias, se tomó 100µL del cultivo e inoculó en 10mL de Caldo Soya Trypticaseína (CST) estéril por un máximo de 24 horas (dependiendo la velocidad de crecimiento de cada bacteria) a 150 rpm y 37°C (excepto *L. monocytogenes* que se incubará a 26°C).

2° Fase: Cultivo en medio sólido

- Del inoculó se tomó 50 µL y se sembró por estriado en cajas Petri (100x15mm) con Agar Mueller Hinton (AMH) y Agar Soya Trypticaseína (AST). Se selló las cajas Petri con parafilm e incubaron por 24 horas a 37°C (excepto *L. monocytogenes* se incubó a 26°C).

3° Fase: Cultivo en medio líquido

- De las cajas Petri previamente inoculadas, se tomó con un asa de siembra 3 colonias definidas e inoculó en un tubo Falcon con 10mL de Caldo Soya Trypticaseína (CST) y Caldo Mueller Hinton (CMH). Posteriormente se incubó los tubos a 37°C a 150rpm por 14 ó 18 horas dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada bacteria.

4° Fase: Curvas de crecimiento

- Del cultivo líquido previamente inoculado se tomó 1mL (pipeteando para homogeneizar) y se vació en una celda de 1 cm de ancho para medir su densidad óptica (unidad de absorbancia) en el equipo de espectrofotometría a una longitud de onda de 625nm. La absorbancia arrojó un valor entre 0.8-1.0 unidades de absorbancia para tener un 10X de un Estándar McFarland 0.5 (1×10^8 UFC/mL).
- Se tomó un 1 mL del inoculo que estaba en un 10X de Estándar McFarland 0.5, y se vertió en 20mL de Caldo Mueller Hinton (CMH) y Caldo Soya Trypticaseína (CST) estéril y se agitó para homogeneizar.
- El inoculo homogeneizado se colocó en cajas Petri y con la ayuda de una micropipeta multicanal se tomó 100µL del medio e inoculó en una placa de 96 pozos a 37°C en el equipo SpectralMax® iD5 en el cual se tomó lecturas de absorbancia a 625nm cada hora durante 24 horas. Se usó como control

caldo Mueller Hinton y caldo Soya Trypticaseína sin inocular. Se colocó de la siguiente manera:



Figura 6. Diseño de la placa de 96 pozos para curvas de crecimiento.

3.4.2 Ensayo de actividad antibacteriana

- En un tubo Falcon de 50 mL se activaron las bacterias, se tomó 100µL del cultivo e inoculó en 10mL de CST estéril por 24 horas (dependiendo la velocidad de crecimiento de cada bacteria) a 150 rpm y 37°C (excepto *L. monocytogenes* se incubó a 26°C).
- Del inoculó se tomó 50 µL y se sembró por estría en cajas Petri con agar Mueller Hinton. Se selló las cajas Petri con parafilm e incubó por 24 horas a 37°C (excepto *L. monocytogenes* se incubará a 26°C).
- De las cajas Petri previamente inoculadas, se tomó con un asa de siembra 3 colonias definidas e inoculó en un tubo Falcon con 10mL de caldo Mueller Hinton. Posteriormente se incubó los tubos a 37°C a 150 rpm por 14 o 18 horas (dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada bacteria).
- Se tomó en condiciones de esterilidad 1 mL del cultivo bacteriano pipeteando varias veces hasta homogeneizar, se vació en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se midió su densidad óptica (unidades de absorbancia) a una longitud de onda de 625nm en un espectrofotómetro (celda 1 cm de ancho). La medida de absorbancia estaba entre 0.08 y 0.1 unidades de absorbancia para tener un estándar McFarland 0.5 (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Si el inoculó excedía las unidades, se realizó una dilución 1:2 v/v de cultivo con caldo Mueller Hinton estéril.
- Se preparó agar Mueller Hinton al 1.5% p/v de agar bacteriológico, se vació en tubos Falcon de 50mL, 22.5mL del agar y se esterilizó.

- Se sacó el medio de cultivo y se dejó enfriar hasta que obtuvo una temperatura de 40° a 45°C, se dejó solidificar.
- Posteriormente se vació 2.5mL del estándar McFarland 0.5 del caldo de cultivo bacteriano en una caja Petri estéril y se mezcló con 22.5mL del agar Mueller Hinton. Se mezcló suavemente para homogeneizar y se dejó solidificar.
- Una vez solidificado el medio de cultivo inoculado, se realizaron 6 pozos de aproximadamente 0.7 cm con la ayuda de puntas estériles de 1000µL. Cada pozo tuvo un espacio entre cada uno de aproximadamente 1.25cm. Se selló las cajas con parafilm.
- Se incubó las cajas a 37°C por 4 horas.
- Después de incubarlas por 4 horas, se inoculó 100µL de cada extracto y como control positivo 100µL de antibiótico, como control negativo 100µL de DMSO al 100% v/v o agua destilada estéril por cada pozo de la caja.

3.4.3 Preparación de los extractos de biomasa y sobrenadante de hongos endófitos

- Los extractos ya estaban esterilizados por filtración con 0.22 µ y preparados a una concentración stock inicial de 100mg/mL con DMSO al 100% v/v.
- De los extractos se prepararon soluciones de trabajo de 10 y 5mg/mL.

3.4.4 Preparación de antibióticos

Los antibióticos se prepararon en un buffer de fosfato o agua destilada dependiendo según cada antibiótico.

Los buffer de fosfatos se prepararon de la siguiente manera:

- Se pesó 9.08g de KH_2P_0_4 y se mezcló con 1L de agua destilada.
- Se pesó 11.48g de Na_2HPO_4 y se mezcló con 1L de agua destilada.
- Posteriormente se tomó 1.96mL de KH_2P_0_4 previamente preparado y se mezcló con 8.04mL de Na_2HPO_4 previamente preparado.
- De la mezcla anterior se tomó 9.0 mL y se añadió en agua destilada hasta obtener un volumen final de 10mL. Se ajustó el pH a 6.0 con gotas de NaOH a 0.1N. Esta solución se esterilizó por filtración con 0.22µm.

Los stocks de los antibióticos se prepararán de la siguiente manera:

- Se esterilizaron por filtración con 0.22µm y se preparó a una concentración stock inicial de 10mg/mL (10000µg/mL) con agua destilada estéril con un pH de 5-8.5 o en buffer de fosfatos estéril con un pH de 6.0.
- Los stocks de los antibióticos se sellaron con Parafilm, protegidos de la luz y almacenados a una temperatura de 4°C.

Las soluciones de trabajo se prepararán de la siguiente manera:

- Se tomó 20µL del stock inicial y se diluyó en 980µL de agua destilada estéril con un pH de 5-8.5 o en buffer de fosfato estéril con un pH de 6.0.

Para las bacterias se utilizarán los siguientes controles de antibióticos:

Gram negativas

- Amoxicilina o Ampicilina: Se preparó una solución de 10 mg/mL con buffer de fosfatos con un pH de 6.0 y se mezcló bien hasta homogeneizar. Se esterilizó por membrana de filtración de 0.22µm.
- Ticarcilina: Se preparó una solución de 10 mg/mL con buffer de fosfatos con un pH de 6.0 y se mezcló bien hasta homogeneizar. Se esterilizó por membrana de filtración de 0.22µm.
- Ácido nalidíxico: Se preparó una solución de 10 mg/mL con buffer de fosfatos con un pH de 6.0 y se mezcló bien hasta homogeneizar. Se esterilizó por membrana de filtración de 0.22µm.

Gram positivas

- Estreptomina: Se preparó una solución de 10 mg/mL con buffer de fosfatos con un pH de 6.0 y se mezcló bien hasta homogeneizar. Se esterilizó por membrana de filtración de 0.22µm.
- Gram positivas y Gram negativas
- Kanamicina: Se preparó una solución de 10 mg/mL con buffer de fosfatos con un pH de 6.0 y se mezcló bien hasta homogeneizar. Se esterilizó por membrana de filtración de 0.22µm.
- Tetraciclina: Se preparó una solución de 10 mg/mL con buffer de fosfatos con un pH de 6.0 y se mezcló bien hasta homogeneizar. Se esterilizó por membrana de filtración de 0.22µm.

3.4.5 Pruebas bioquímicas

Agar McConkey

- Se suspendió 16.06g/L de agar MacConkey y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación hasta se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveó a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL y se dejó solidificar.
- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Incubar a 37°C por 16 a 20 hrs.

Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB)

- Se suspendió 36g/L de agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveo a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL y dejó solidificar.
- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Se incubó a 37°C por 16 a 20 hrs.

Agar Base Sangre

- Se suspendió 40g/L de agar Base Sangre y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveo a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL del agar y se agregó 5-10% de sangre ovina desfibrinada estéril, se homogeneizó y se dejó solidificar.
- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Incubar a 37°C por 16 a 20 hrs.

Agar Base Pseudomonas

- Se suspendió 48.4g/L de agar Base pseudomonas y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveo a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL del agar y se dejó solidificar.

- Se colocaron 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Se incubó a 37°C por 16 a 20 hrs.

Agar verde bilis brillante

- Se suspendió 58g/L de agar verde bilis brillante y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveo a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL del agar y se dejó solidificar.
- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Se incubó a 37°C por 16 a 20 hrs.

ChroMagar Staph aureus

- Suspendió 82.5g/L de ChroMagar Staph aureus y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación hasta y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveo a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL del agar y se dejó solidificar.
- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Se incubó a 37°C por 16 a 20 hrs.

Agar Sal y Manitol

- Se suspendió 111g/L de agar sal y manitol y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- Se autoclaveo a 120° (15 p.s.i.) durante 15 minutos.
- Se vertió en las placas 25 mL del agar y dejar solidificar.
- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Se incubó a 37°C por 16 a 20 hrs.

Agar Salmonella-Shigella

- Se suspendió 60g/L de agar Salmonella-Shigella y se diluyó en 1L de H₂O estéril.
- Se calentó con agitación y se llevó a ebullición hasta su disolución total.
- No esterilizar.
- Se vertió en las placas 25 mL del agar y se dejó solidificar.

- Se colocó 20µL del inóculo previamente preparado y se estrió con la ayuda de una asa.
- Se incubó a 37°C por 16 a 20 hrs.

3.4.6 Tinción de Gram

- Se tomó una colonia de la cepa bacteriana y se realizó un extendido en un porta objetos y se dejó secar.
- Posteriormente se pasó el portaobjeto 3 o 4 veces por la llama de un mechero de Bunsen.
- Se cubrió la muestra con solución de Cristal Violeta por 1 minuto, transcurrido el tiempo se enjuagó con agua destilada.
- Se colocó lugol por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada.
- Se cubrió la muestra con alcohol cetona por 30 segundos, se enjuagó con agua destilada.
- Posteriormente se colocó safranina por 1 minuto, transcurrido el tiempo se enjuagó con agua destilada.
- Se dejó secar el extendido.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión y leyó a un objetivo de (100X)

3.5 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de comparaciones ANOVA multifactorial, en el paquete estadístico SAS 9.0.

Comparando las medias de:

- Extracto de micelio y sobrenadante de hongos endófitos.
- Las concentraciones probadas de los extractos a 5mg/mL y 10mg/mL.

IV. RESULTADOS

4.1 Morfología bacteriana

Se realizó la caracterización de las bacterias por morfología, donde se puede observar en la figura 7 se pueden observar las siguientes características:

- Escherichia coli* 25922: Gram negativo, bacilos cortos.
- Staphylococcus aureus* ATCC 25923: Gram positivo, coco que puede estar en pares, racimos o cadenas.
- Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031: Gram Negativo, bacilos cortos.
- Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853: Gram negativo, bacilo recto o ligeramente curvado.
- Salmonella typhi* ATCC 6539: Gram negativo, bacilos o cilindros con puntas redondas.
- Streptococcus agalactiae* ATCC 27591: Gram positivo, coco en cadenas.
- Listeria monocytogenes* ATCC19115: Gram positivo, bacilos cortos.

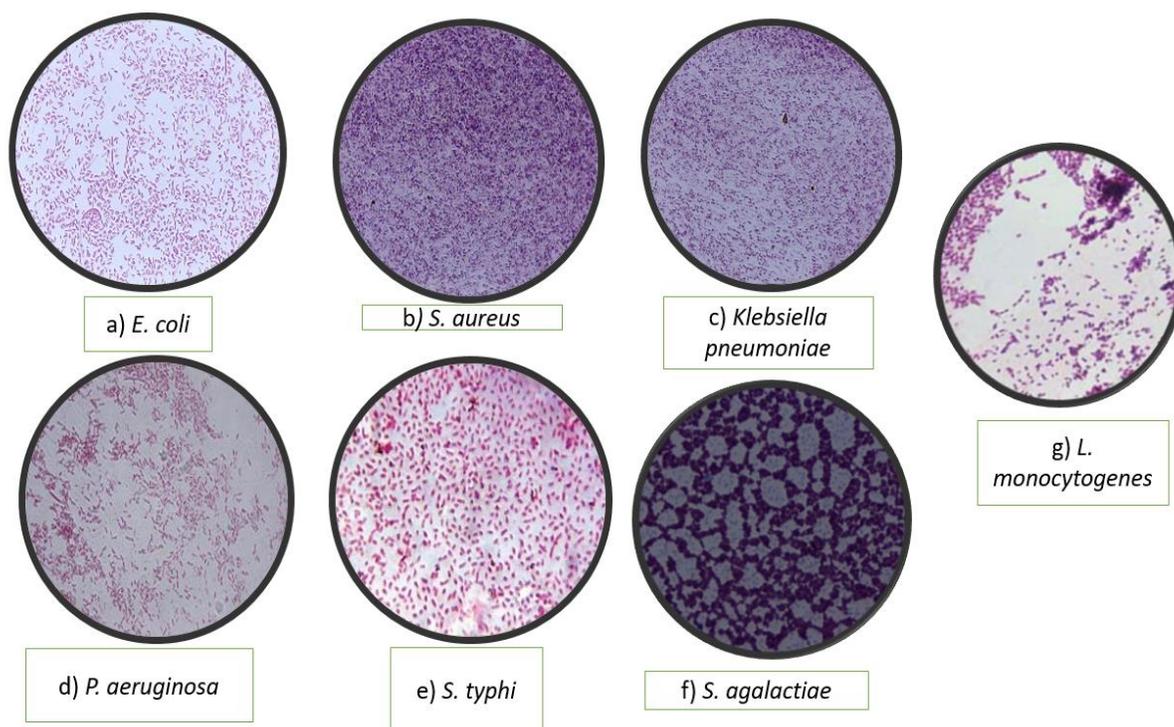


Figura 7. Caracterización morfológica de las especies bacterianas: a) *E. coli*, b) *S. aureus*, c) *K. pneumoniae*, d) *P. aeruginosa*, e) *S. typhi*, f) *S. agalactiae* y g) *L. monocytogenes*.

4.2 Pruebas bioquímicas

Como se observa en la Fig. 8 se realizaron las pruebas bioquímicas del panel de bacterias para corroborar su identificación.

- a) *E. coli* ATCC 25922, de la familia Enterobacteriaceae, bacteria Gram negativa anaerobia facultativa, fermentadora de glucosa y lactosa.
- b) *S. aureus* ATCC 25923, de la familia Staphylococcaceae, bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa, productor de coagulasa y catalasa.
- c) *K. pneumoniae* ATCC 10031, de la familia Enterobacteriaceae, bacteria Gram negativo, fermentadora de lactosa más producción de gas.
- d) *P. aeruginosa* ATCC 27 853, de la familia Pseudomonadaceae, bacteria Gram negativa, anaerobia secretora de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso, fluorescente) y piorrubina (rojo pardo).
- e) *S. typhi* ATCC 6539, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacteria Gram negativo, anaerobia facultativa, productoras de ácido sulfúrico y fermentadora de glucosa sin producir gas, no fermenta lactosa.
- f) *S. agalactiae* ATCC 27591, de la familia Streptococcaceae, bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, beta-hemolítico.
- g) *L. monocytogenes* ATCC 19115, pertenece a la familia Lactobacilacea, bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, catalasa positiva.

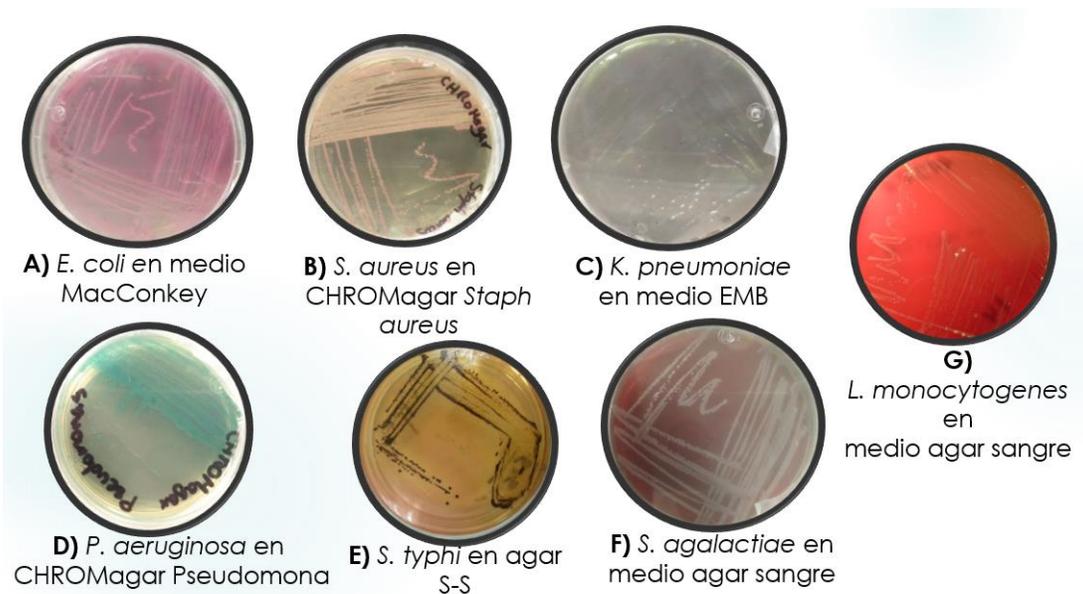
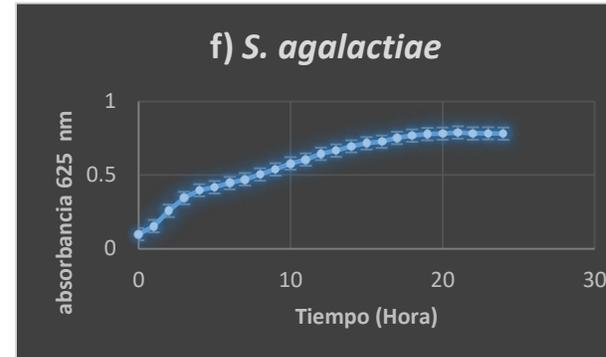
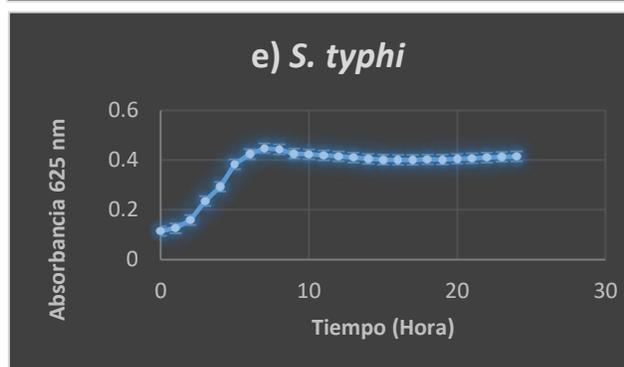
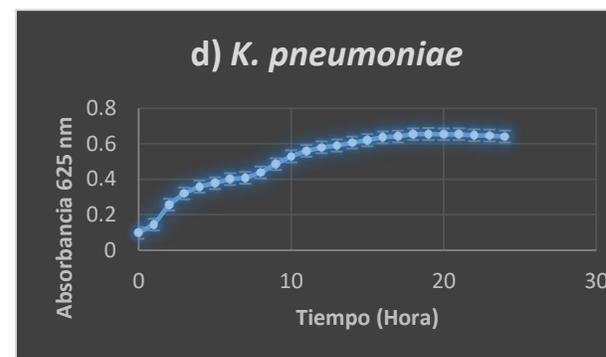
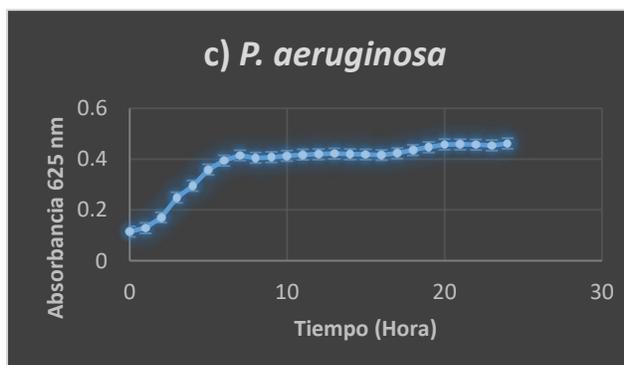
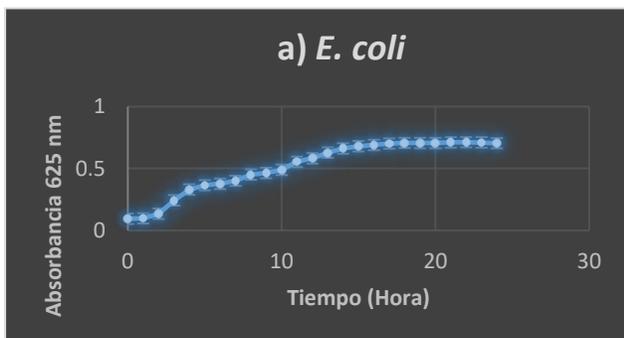


Figura 8. Caracterización bioquímica de las especies bacterianas.

4.3 Curvas de crecimiento

Se determinó la velocidad de crecimiento de cada una de las especies bacterias Figura 9, su crecimiento se midió en una placa de 96 pozos a 37°C en el equipo SpectralMax® iD5 el cual tomó lecturas de absorbancia a 625 nm cada hora durante 24 horas. Así mismo se determinó el tiempo de inicio de la fase exponencial y la fase estacionaria (Tabla 6). Para *K. pneumoniae* y *L. monocytogenes* a la primera hora empezó la fase exponencial, mientras que para *P. aeruginosa* a las 7 horas comenzó la fase exponencial. En lo que respecta a la fase estacionaria; *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* detuvieron su crecimiento hasta las 23 horas. Mientras que *E. coli* comenzó la fase estacionaria a las 15 horas. Para *S. typhi*, la fase exponencial comenzó a la tercer hora, mientras que su crecimiento se detuvo a las 15 horas.



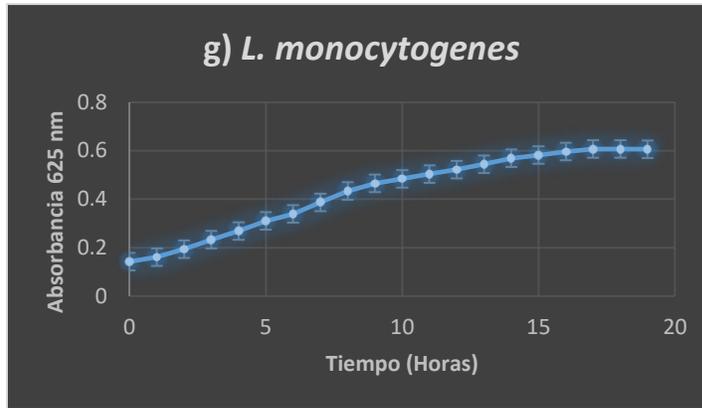


Figura 9. Cinéticas de crecimiento del panel de bacterias en estudio.

Tabla 6. Cinéticas de crecimiento del panel de bacterias.

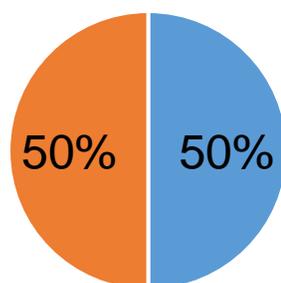
Especie bacteriana # Gráfica	Hora inicial de la fase exponencial	Hora inicial de la fase estacionaria	Velocidad de crecimiento
a) <i>E. coli</i>	3	15	0.0269 hr ⁻¹
b) <i>S. aureus</i>	5	23	0.0091 hr ⁻¹
c) <i>K. pneumoniae</i>	1	23	0.021 hr ⁻¹
d) <i>P. aeruginosa</i>	7	23	0.0114 hr ⁻¹
e) <i>S. typhi</i>	5	20	0.0086 hr ⁻¹
f) <i>S. agalactiae</i>	6	18	0.027 hr ⁻¹
h) <i>L. monocytogenes</i>	1	17	0.0267 hr ⁻¹

4.4 Actividad antibacteriana de extractos del endo y exo-metaboloma de hongos endófitos aislados de *C. alata* Kunth.

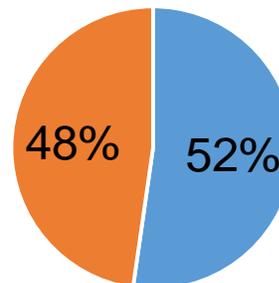
4.4.1 Porcentaje de actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de micelio (endo-metaboloma) de hongos endófitos de *C. alata*.

Se analizó un total de 43 extractos fúngicos, de los cuales el 52% representa el endo-metaboloma y el 50% representa el exo-metaboloma que presentó actividad antibacteriana al menos contra una de las bacterias evaluadas (Gráfica 1). Los extractos del endo-metaboloma que presentaron actividad antibacteriana fueron aislados de rama (26%), hoja (61%) y flor (13%), mientras que para los extractos del exo-metaboloma, fueron aislados de hoja (73%), flor (9%), raíz (4%) y rama (14%) (Gráfica 2 A y B).

Extractos del exo-metaboloma



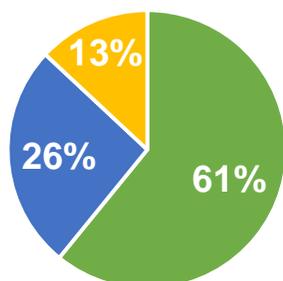
Extractos del endo-metaboloma



■ Con actividad ■ Sin actividad

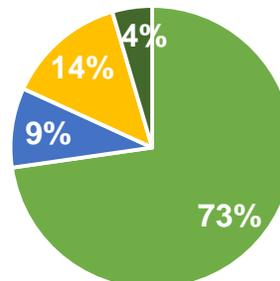
Gráfica 1. Porcentaje de extractos fúngicos del endo y exo-metaboloma con actividad antibacteriana.

A) Extractos del endo-metaboloma con actividad antibacteriana



■ Hoja ■ Rama ■ Flor

B) Extractos del exo-metaboloma con actividad antibacteriana

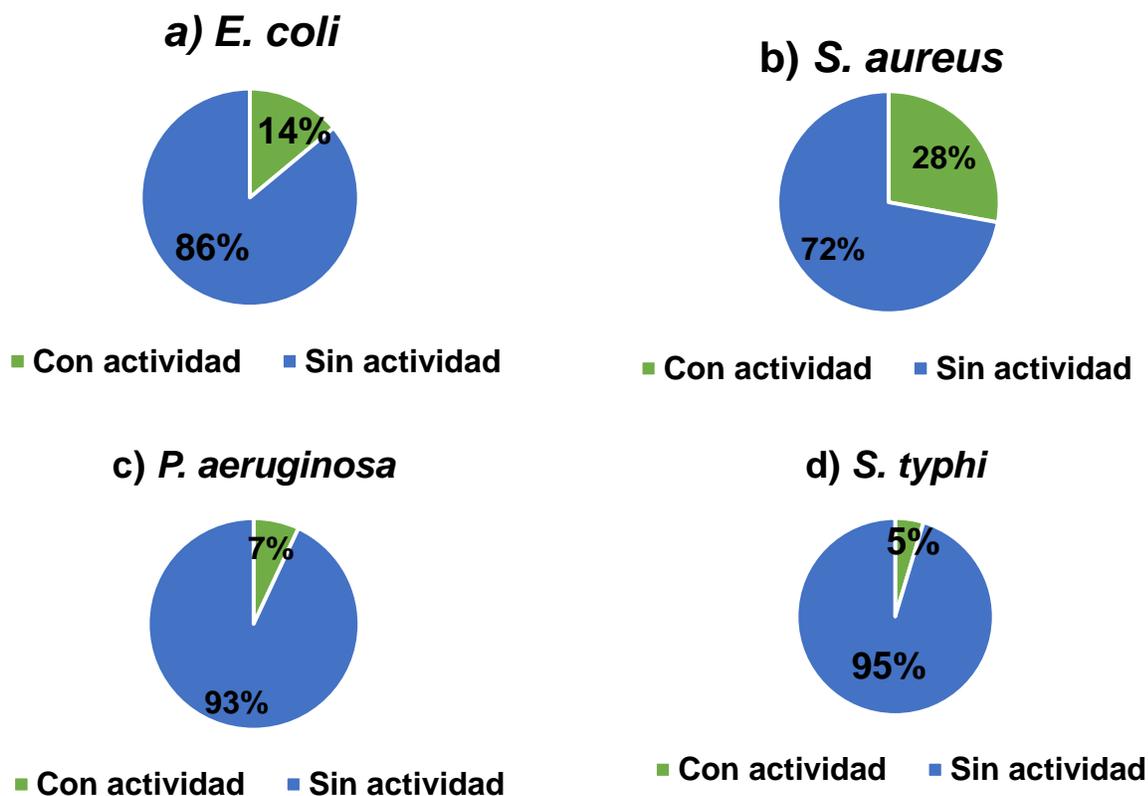


■ Hoja ■ Flor ■ Rama ■ Raíz

Gráfica 2. Porcentaje de aislados de extractos fúngicos del A) endo y B) exo-metaboloma con actividad antibacteriana

4.4.2 Porcentaje de actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de micelio (endo-metaboloma) de hongos endófitos de *C. alata*.

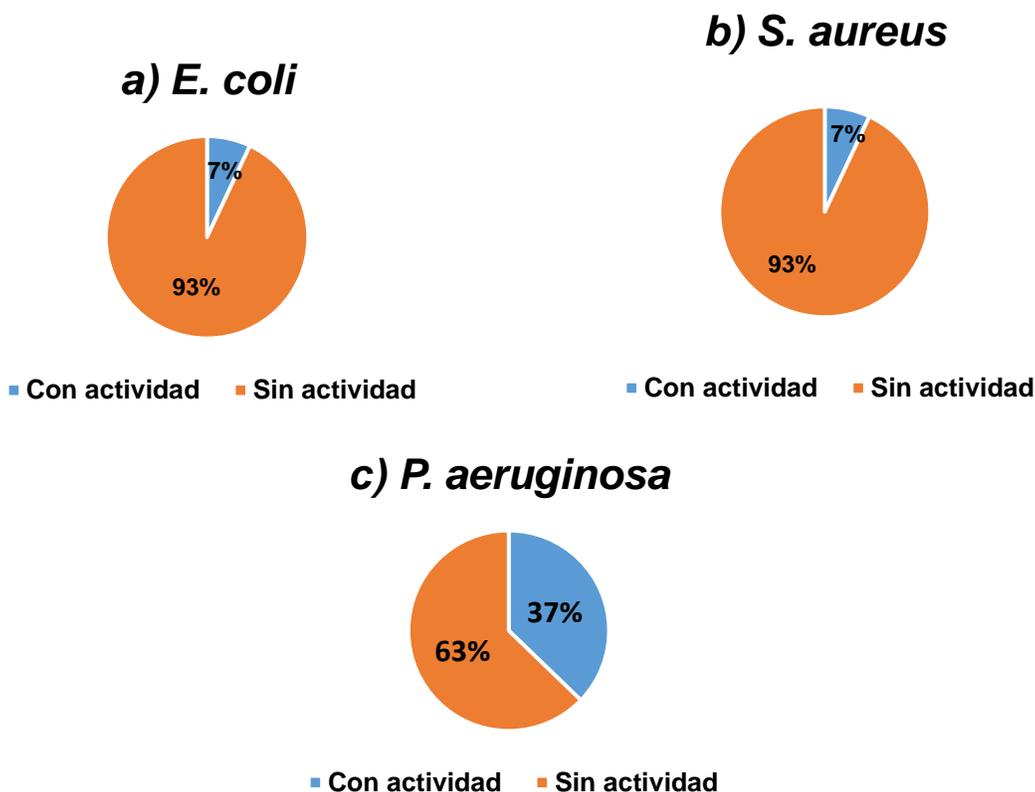
De los 43 extractos metanólicos de micelio de hongos endófitos aislados de *C. alata*, el 14% tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli*, mientras que el 86% no mostró actividad. Para *S. aureus* el 28% presentó actividad, sin embargo, el 72% no tuvo actividad. En lo que respecta a *P. aeruginosa* (7%) y *S. typhi* (5%) de los extractos mostraron actividad, inhibiendo el crecimiento de ambas bacterias, por lo que el resto de los extractos (93 y 95%) respectivamente no mostraron actividad (gráfica 3). Los extractos bioactivos contra las cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, produjeron halos de inhibición entre 1.5 y 8.7 mm, dichos extractos pertenecen a hongos de los géneros: *Cercospora* sp., *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* sp., *Podospora* sp., *Aureobasidium* sp., *Fusarium* sp., *Periconia ignaria*, *Trametes* sp., *Pseudocercospora*, y *Xylaria* sp. (Tabla 7). El género que mostró el halo más grande fue *Colletotrichum* sp. (8.7mm). Cabe mencionar, que ninguno de los 43 extractos metanólicos de micelio pudo inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* y *S. agalactiae*. Sin embargo, el género que inhibió a 4 bacterias fue *Colletotrichum* sp.



Gráfica 3. Porcentaje de actividad antibacteriana de extractos metanólicos de hongos endófitos contra a) *E. coli*, b) *S. aureus*, c) *S. typhi* y d) *P. aeruginosa*

4.4.3 Porcentaje de actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo del sobrenadante (exo-metaboloma) de hongos endófitos de *C. alata*.

Se analizaron 43 extractos de sobrenadante de hongos endófitos aislados de *C. alata*, contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, para ambas el 7% tuvo la capacidad de inhibir su crecimiento, mientras que el 93% no mostró actividad. En lo que respecta a *P. aeruginosa* el 37% de los extractos mostró actividad, inhibiendo su crecimiento, por lo que el resto de los extractos (63%) no mostró actividad (gráfica 4). Los extractos bioactivos contra las cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* produjeron halos de inhibición entre 1.65 y 8.7 mm, dichos extractos pertenecen a hongos de los géneros: *Cercospora* sp., *Colletotrichum* sp., *Podospora* sp., *Periconia ignaria*, *Septoria* sp., *Pseudocercospora*, *Aureobasidium* sp., y *Xylaria* sp. (Tabla 7). Sin embargo, ninguno de los 43 extractos pudo inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* y *S. typhi*. Cabe mencionar que el género *Aureobasidium* sp., mostró el mayor halo de inhibición (8.7), además de que el género *Colletotrichum* sp., pudo inhibir el crecimiento de las tres bacterias.



Gráfica 4. Porcentaje de actividad antibacteriana de extractos de sobrenadante de hongos endófitos contra: a) *E. coli*, b) *S. aureus* y c) *P. aeruginosa*.

4.4.4 Extractos metanólico de micelio y acetato de etilo del sobrenadante con actividad antibacteriana de hongos endófitos de *C. alata*, contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*

En la tabla 7. Se muestran el total de los 86 extractos de hongos endófitos de *C. alata* evaluados por duplicado, probando las concentraciones de 5 y 10mg/mL. De los cuales, 6 extractos metanólicos de micelio y 3 extractos de acetato de etilo del sobrenadante inhibieron el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, mostrando el halo más grande de 8.5 ± 0.70 mm de diámetro el extracto metanólico (Figura 10a), mientras que el de acetato de etilo fue de 3.85 ± 0.21 (Figura 10b) (gráfica 5ab), siendo mejor el extracto metanólico de micelio, con más del doble de diámetro. Se utilizó como control positivo la ampicilina y kanamicina, DMSO al 100% v/v como control negativo DMSO al 5% v/v.

Con respecto a *S. aureus* ATCC 25923, 3 extractos de acetato de etilo del sobrenadante y 12 extractos metanólico de micelio inhibieron su crecimiento, el tamaño de diámetro de los halos más grande de ambos extractos fue de 5.75 ± 0.07 (Figura 11b) y 5.1 ± 0 (Figura 11a) respectivamente (gráfica 6ab), mostrando mejor actividad el extracto de sobrenadante. (Figura 10B). Se utilizó como controles positivos estreptomycin, kanamicina y DMSO al 100% v/v, así como, un control negativo (DMSO al 5%). En cuanto a *P. aeruginosa* ATCC 27853, 3 extractos metanólicos de micelio inhibieron su crecimiento, mostrando el halo más grande un tamaño de 4.55 ± 0.07 mm de diámetro (Figura 12a), mientras que 16 extractos de sobrenadante presentaron actividad antibacteriana, sin embargo, comparando el tamaño de diámetro de halos, el mejor fue del sobrenadante (8.7 ± 0.14 mm) (Figura 12b)(gráfica 7). Como control positivo se utilizó ticarcilina y DMSO al 100% v/v. Respecto a *S. typhi* ATCC 6539, solo dos extractos metanólicos de micelio inhibieron su crecimiento, con un tamaño de halo de 6.1 ± 0 mm de diámetro, mientras que como control positivo se utilizó ampicilina (Figura 13)(Gráfica8).

Tabla 7. Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de *C. alata* contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi* y *P. aeruginosa*.

Id. hongo endófito	REF	Tipo de extracto	REF	Concentración (mg/mL)	Halos de inhibición (mm)-- Promedio +/- desviación estandar			
					<i>E. coli</i> 26922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>
<i>Cercospora</i> sp. (CaLv01)	MH01H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5	6.5±0.70	4.15±0.07		
				10	6.0±0	5.1±0		
	SH01H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante (exometaboloma)	5				
				10	3.35±0.49			
<i>Colletotrichum</i>	MH02H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5	6.0±1.4			
				10	8.5±0.70			
	SH02H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante (exometaboloma)	5				
				10				
<i>Colletotrichum</i>	MH03H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH03H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			2.85±0.07	
				10	3.85±0.21		3.95±0.07	
<i>Diaporthe</i>	MH04H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5	6.5±0.70			
				10				
	SH04H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			5.35±0.07	
				10				
<i>Podospora</i>	MH07H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5	6.5±0.70			
				10	6.5±0.70			
	SH07H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			3.25±0.07	
				10		5.75±0.07	4.25±0.07	
<i>Colletotrichum</i>	MH08H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5	7.5±0.70	2.05±0.07		6.1±0
				10	7.5±0.70	2.5±0.14		
	SH08H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10			3.65±0.07	
	MH09FL	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5	6.5±0.70			

<i>Aerobasidium</i>				10	6.0±0			
	SH09FL	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10			8.7±0.14	
<i>Cladosporium</i>	MH11RZ	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH11RZ	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			5.35±0.07	
				10				
<i>Colletotrichum</i>	MH15H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH15H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			5.25±0.07	
				10				
<i>Diaporthe</i>	MH16H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH16H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			6.45±0.07	
				10				
<i>Fusarium sp.</i>	MH17RA	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	MH17RA	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			8.05±0.07	
				10				
<i>Trematophoma</i>	MH20FR	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH20FR	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5		1.45±0.07		
				10		1.65±0.07		
<i>Xylaria sp</i>	MH21RA	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10			2.15±0.07	
	SH21RA	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			2.4±0.14	
				10			3.65±0.07	
<i>Colletotrichum</i>	MH22RA	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		2.05±0.07	1.75±0.07	
				10		2.3±0	2.15±0.07	
	SH22RA	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				

	MH23RA	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10		4.35±0.07	4.55±0.07	
	SH32RA	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				
<i>Fusarium</i>	H25FL	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		1.8±0		
				10		2.05±0.07		
	SH25FL	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				
<i>Cercospora</i>	MH32H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				2.4±0
	SH32H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				
<i>Colletotrichum</i>	MH33H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH33H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10	2.8±0.14	2.15±0.21		
<i>Periconia</i>	MH34H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		1.6±0.14		
				10		1.75±0.07		
	SH34H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			2.5±0.14	
				10			3.45±0.07	
<i>Trametes sp</i>	MH37RA	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		2±0		
				10		2.25±0.07		
	SH37RA	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				
<i>Fusarium sp</i>	MH38FL	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		2.3±0		
				10		3±0		
	SH38FL	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				
<i>Colletotrichum</i>	MH39H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		1.8±0		
				10		2.1±0		

	SH39H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10				
<i>Colletrotrichum</i>	MH40H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		1.7±0		
				10		1.85±0.07		
	SH40H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			4.35±0.07	
				10				
<i>Periconia ignaria</i>	MH41RA	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5				
				10				
	SH41RA	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			5.55±0.07	
				10				
<i>Pseudocercospora</i>	MH43H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		1.6±0		
				10		2.2±0		
	SH43H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5			3.05±0.07	
				10			6.35±0.07	
<i>Diaporthe</i>	MH44H	ENM	Metanólico de micelio (endometaboloma)	5		2±0		
				10		2.4±0		
	SH44H	EXM	Acetato de etilo del sobrenadante	5				
				10			6.05±0.07	

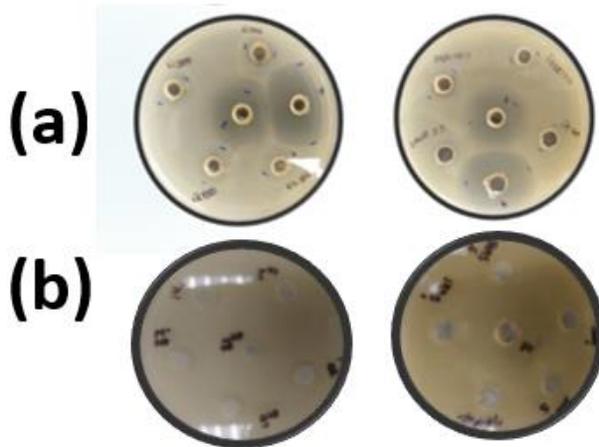


Figura 10. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra *E. coli* ATCC 25922.

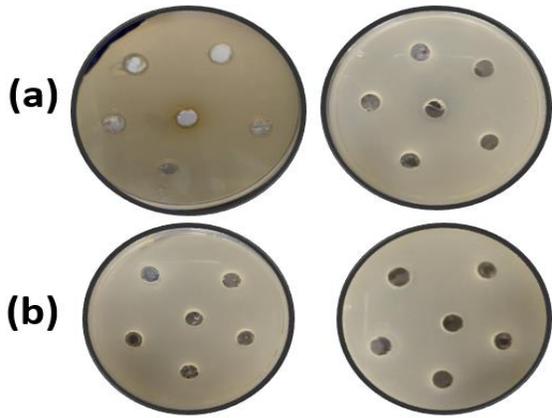


Figura 11. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra *S. aureus* ATCC 25923.

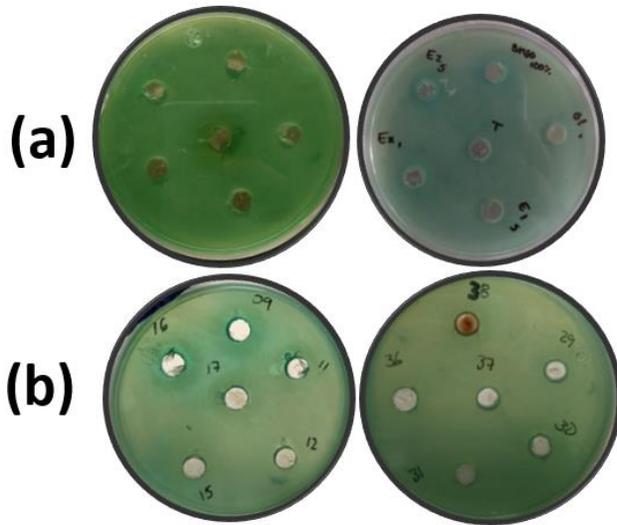


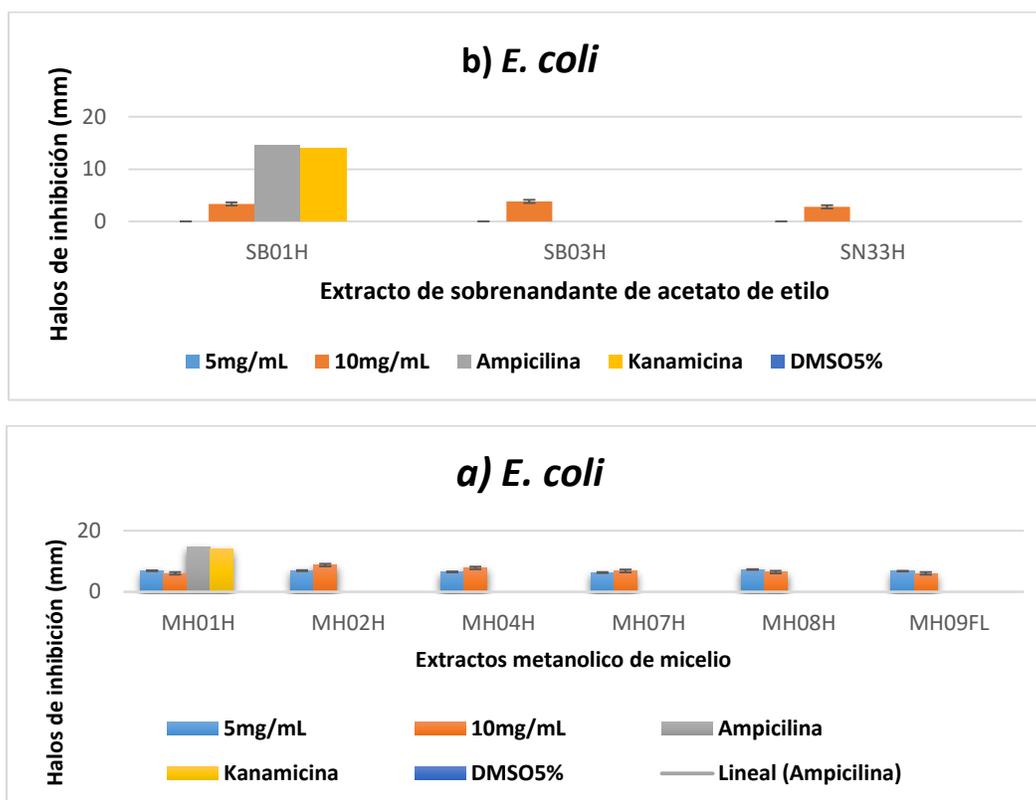
Figura 12. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.



Figura 13. Fotografía que muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico de micelio (a) y acetato de etilo del sobrenadante (b) de hongos endófitos contra *S. typhi* ATCC 6539.

4.4.5 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de *C. alata* contra *E. coli*

En la Gráfica 5a, se muestra la comparación de las concentraciones 5 y 10mg/mL de los extractos metanólico de micelio, arrojando que el extracto metanólico (MH02H) a la concentración de 10mg/mL mostró mejor actividad ($8.7\pm 0.42\text{mm}$), comparada con la concentración de 5mg/mL ($7.25\pm 0.35\text{mm}$) que mostró el extracto metanólico de micelio aislado de hoja (MH08H), los cuales corresponden al género de hongo *Colletotrichum* sp; para ambos extractos. Con respecto a los extractos de sobrenadante de acetato de etilo (Gráfica 5b), la concentración de 10mg/mL ($3.85\pm 0.21\text{mm}$) que corresponde al extracto de sobrenadante (SH03H) del género *Colletotrichum* sp., mostró la mejor actividad, mientras que ningún extracto a la concentración de 5mg/mL tuvo actividad. Por lo tanto, respecto a los resultados arrojados fuer mejor el extracto metanólico de micelio. Respecto a los controles positivos, la ampicilina, arrojó un halo de $14.5\pm 0.28\text{mm}$, la kanamicina mostró un halo de $14\pm 0.5\text{mm}$, mientras que el control negativo DMSO5% no mostró ninguna actividad.



Gráfica 5. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra *E. coli*.

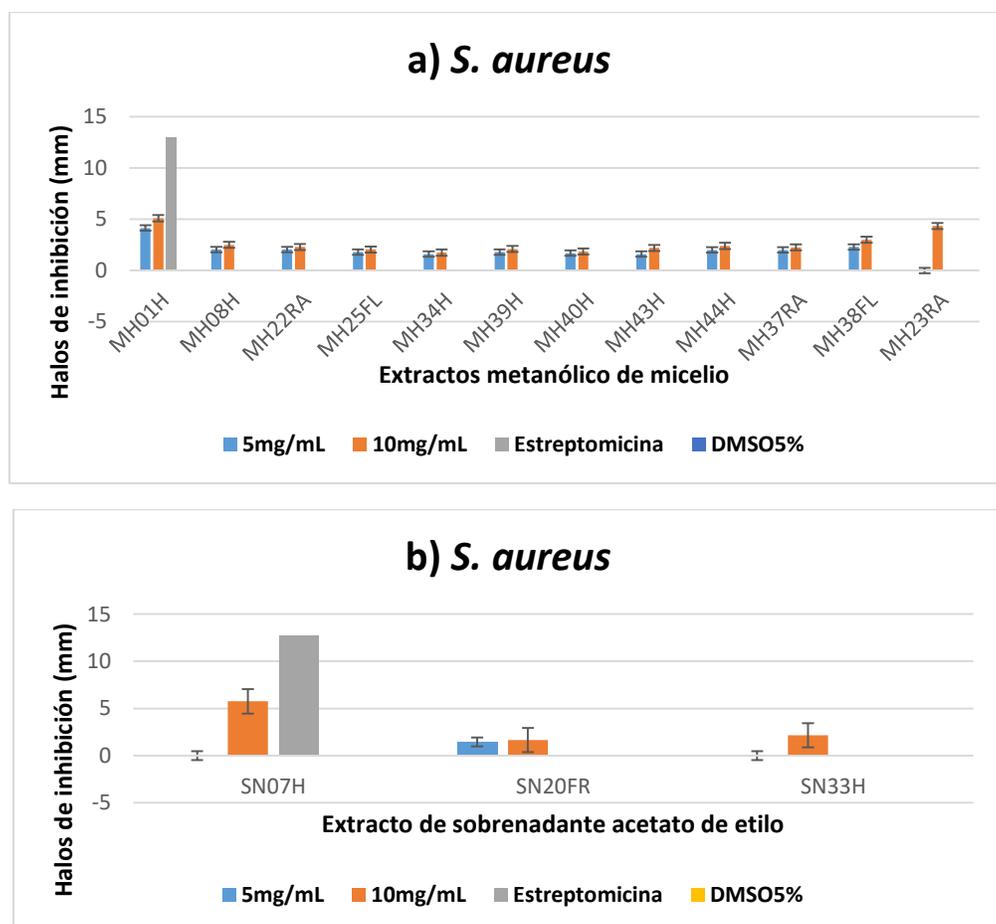
Tabla 8. En cuanto al análisis estadístico de los extractos de micelio y sobrenadante contra *E. coli*, no hay diferencias significativas entre las concentraciones 5mg/mL y 10mg/MI del extracto metanólico de micelio, así mismo, tampoco hay diferencias entre ambas concentraciones del extracto acetato de etilo; sin embargo, si hay diferencias significativas comparando los controles con los extractos metanólico de micelio y acetato de etilo del sobrenadante.

Tabla 8. Comparación de media (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en *E. coli*.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	7.55	2	MH08H
A	6.9	2	MH02H
A	6.85	2	MH01H
A	6.75	2	MH09FL
A	6.5	2	MH04H
A	6.2	2	MH07H
B	14.5	2	Ampicilina
B	14	2	Kanamicina
C	0	2	SH01H
C	0	2	SH03H
C	0	2	SH33H

4.4.6 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de *C. alata* contra *S. aureus*

Con respecto a *S. aureus*, (gráfica 6a) se muestra la comparación de las concentraciones 5 y 10mg/mL de los extractos metanólico de micelio, arrojando que el extracto MH01H a la concentración de 10mg/mL mostró mejor actividad (5.1 ± 0.07 mm), comparada con la concentración de 5mg/mL (4.15 ± 0.07 mm) que mostró el mismo extracto, el cual corresponde al género de hongo *Cercospora* sp; por otro lado, los extractos de sobrenadante de acetato de etilo (Gráfica 6b), el género *Podospora*, del extracto SH07H de la concentración de 10mg/mL (5.75 ± 0.07 mm) mostró la mejor actividad, mientras que el extracto a la concentración de 5mg/mL (1.45 ± 0.07 mm) SN20FL mostró mejor actividad, corresponde al género (*Trematophoma*). Los extractos metanólicos de micelio, fueron mejores respecto a los de sobrenadante, sin embargo, el halo mayor lo presentó el extracto de sobrenadante. Respecto a los controles positivos, la Estreptomocina arrojó un halo de 14.9 ± 0.09 mm y 12.7 ± 0.14 mm respectivamente; sin embargo, el control negativo DMSO5% no mostró actividad.



Gráfica 6. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

Tabla 9. Respecto a *S. aureus*, se observa que hay diferencias significativas en las medias de los extractos de micelio y sobrenadante; sin embargo, entre el extracto MH08H y MH22RA no hay diferencias significativas, así mismo, entre el extracto MH25FL y MH39H no hay diferencias significativas, entre los extractos de acetato de etilo de sobrenadante, si hay diferencias significativas. Comparando los controles con los extractos metanólico de micelio y acetato de etilo del sobrenadante, se observa que hay diferencias significativas.

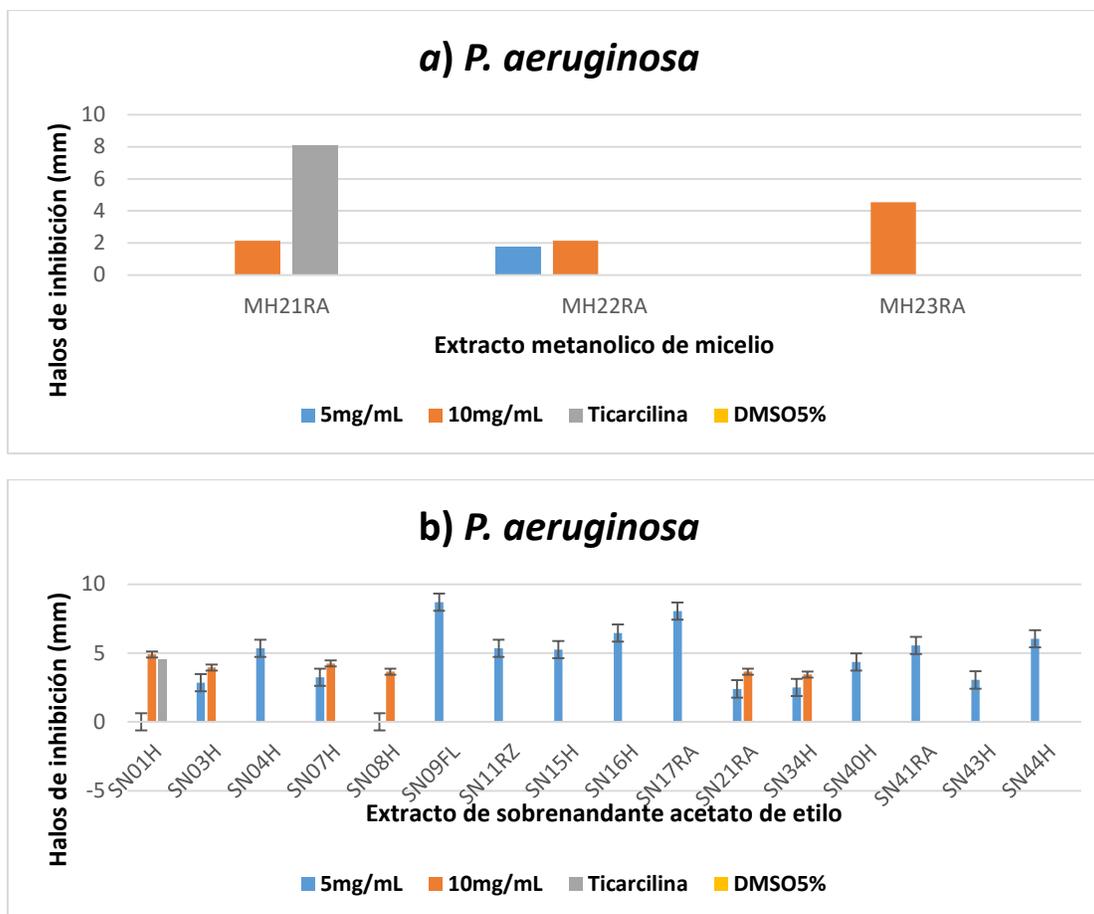
Tabla 9. Comparación de medias (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en *S. aureus*.

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
B	4.15	2	MH07H
D	2.05	2	MH08H
D	2.05	2	MH22RA
EF	1.8	2	MH25FL
GF	1.6	2	MH34H

EF	1.8	2	MH39H
F	1.7	2	MH40H
GF	1.6	2	MH43H
ED	2	2	MH44H
ED	2	2	MH37RA
C	2.3	2	MH38FL
H	0	2	SH07H
G	1.45	2	SH20H
H	0	2	SH33H
A	12.7	2	Estreptomicina
H	0	2	DMSO5%

4.4.7 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de *C. alata* contra *P. aeruginosa*

(Gráfica 7a) al evaluar los extractos metanólico de micelio contra *P. aeruginosa*, se encontró que el extracto MH23RA a la concentración de 10mg/mL mostró el mejor halo de inhibición (4.55 ± 0.07 mm), el cual corresponde al género (*Colletrotrichum*), mientras que a la concentración de 5mg/mL, no hubo actividad, sin embargo, la 5 y 10mg/mL de los extractos de sobrenadante de acetato de etilo, arrojó los halos de inhibición más grandes (8.7 ± 0.14 mm y 4.9 ± 0.14 mm respectivamente), los cuales corresponde al extracto SN09FL Y SN01H del género de hongo *Cercospora* sp. y *Aerobasidium* respectivamente (gráfica 7b). Al evaluar ambos extractos, el mejor fue el de sobrenadante, cabe mencionar algunos extractos no pudieron ser evaluados a la concentración de 10mg/mL por falta de extracto; sin embargo, a la concentración de 5mg/mL tuvieron actividad, lo cual se espera que a la concentración de 10mg/mL habrá actividad y con un halo más grande. Respecto a los controles positivos, se utilizó ticarcilina la cual mostró un halo de $8.7.9 \pm 0.09$ mm y 4.55 ± 0.07 mm respectivamente, mientras tanto, el control negativo DMSO5% no mostró actividad.



Gráfica 7. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*.

Tabla 10. Entre el extracto metanólico de micelio (MH23RA y MH21RA) y el extracto de acetato de etilo del sobrenadante (SH01H y SH08H) no hay diferencias significativas, mientras que entre los extracto acetato de etilo del sobrenadante (SN04H, SN11RZ, SN41RA y SN15H) no hay diferencias con respecto a la media. Por otro lado, no hay diferencias significativas entre el extracto SN16H y SN44H en ambas concentraciones, (SN21RA y SN34H) no hay diferencias entre sus medias. Mientras que el control positivo y el extracto SN40H, no hay diferencias entre sus medias. Sin embargo, para el resto de los extractos de acetato de etilo y sobrenadante, se observan las diferencias entre las medias.

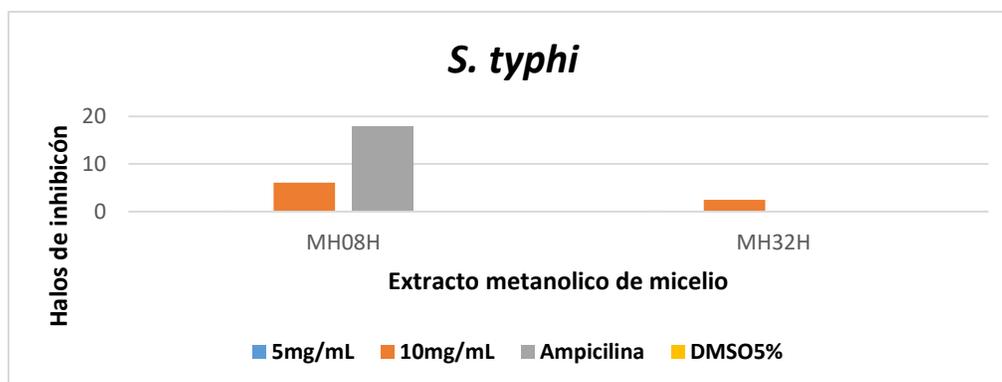
Tabla 10. Comparación de medias (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en *P. aeruginosa*.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
K	0	2	MH23RA
K	0	2	MH21RA
J	1.75	2	MH22RA

K	0	2	SN01H
H	2.85	2	SN03H
E	5.35	2	SN04H
G	3.25	2	SN07H
K	0	2	SN08H
A	8.7	2	SN09FL
E	5.35	2	SN11RZ
E	5.25	2	SN15H
C	6.45	2	SN16H
B	8.5	2	SN17RA
L	2.4	2	SN21RA
L	2.5	2	SN34H
F	4.35	2	SN40H
E	5.5	2	SN41RA
GH	3.05	2	SN43H
C	6.05	2	SN44H
F	4.55	2	Ticarcilina

4.4.8 Actividad antibacteriana de extractos del exo y endo-metaboloma de hongos endófitos de *C. alata* contra *S. typhi*.

Por otro lado, el extracto metanólico de micelio inhibió el crecimiento de *S. typhi*, el extracto MH08H que corresponde al género *Colletrotrichum* sp. a la concentración de 10mg/mL (6.1 ± 0) arrojó el halo con el tamaño más grande, comparado con el MH23H (2.45 ± 0), el cual corresponde al género *Cercospora*. El control positivo utilizado fue ampicilina, el halo arrojado fue de 17.9 ± 0 , mientras que el control negativo, DMSO5% no tuvo actividad (Gráfica 8).



Gráfica 8. Comparación de halos de inhibición de extractos metanólico (a) y acetato de etilo (b) (micelio y sobrenadante) con actividad antibacteriana contra *S. typhi*.

Tabla 11. Con respecto a los extracto metanólico de micelio y el control (Ampicilina), el análisis estadístico arrojó que hay diferencias significativas. Sin embargo, ambos extractos metanólico de micelio no muestran diferencias en ambas concentraciones.

Tabla 11. Comparación de medias (Tukey) de los extractos metanólico de micelio, acetato de etilo del sobrenadante y controles en *S. typhi*.

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
B	0	2	MH08H
B	0	2	MH32H
A	14.5	2	Ampicilina

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las enfermedades infecciosas, son la causa principal de muertes en el mundo. En la actualidad, un factor preocupante, es el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, siendo esto un problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) priorizó la investigación de nuevos antibióticos para el tratamiento de los patógenos multiresistentes. Por tal motivo es necesaria una búsqueda de nuevos nichos y hábitats de agentes antimicrobianos potencialmente eficaces (OMS, 2016). Se sabe que las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar péptidos y metabolitos secundarios. En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa frente a la depredación por microorganismos, insectos o herbívoros. Microorganismos como los hongos, especialmente los endófitos, han despertado el interés de muchos científicos en los últimos años por la interacción que realizan con las plantas y su implicación en la biodiversidad (Jamil *et al.*, 2007). Por otro lado, actualmente se están realizando experimentos en plantas superiores y extrayendo micelios con propiedades biológicas de sus hongos endófitos, puesto que se ha observado que la interacción de la planta y sus hongos endófitos, pueden producir metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, quinonas, esteroides isocumarina entre otras, por lo que ha alcanzado una gran proyección propia de sus aplicaciones (Kusari S. H., 2012).

Para el desarrollo de principios activos, se debe iniciar con el análisis biológico, la formulación de la dosis, seguida por estudios clínicos para establecer la seguridad, eficacia y perfil farmacológico de las nuevas drogas (Iwu *et al.*; 1999).

Actualmente existen diferentes métodos de laboratorio que pueden ser usados para determinar en condiciones *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes bacterianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado (Rahman, *et al.*; 2011).

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados en tres grupos principalmente: método de difusión, métodos de dilución y bioautografía (Rios *et al.*; 1998)

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios, y tiene la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles, además de su simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar enormes cantidades de microorganismos y facilidad de interpretar los resultados (Balouri *et al.*; 2016), la desventaja que se tiene con los discos, es la composición de papel filtro Whatman, ya que interviene con algunos compuestos, puesto que se compone de celulosa con

muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofilia, e interviene con compuestos catiónicos, impidiendo que sean absorbidos y difundidos en el agar (Valgas *et al*; 2007).

Por otro lado, la ventaja del método de dilución radica en el aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual permite diferenciar entre un efecto bactericida y bacteriostático (Balouri *et al.*, 2016) Los métodos de microdilución son útiles para determinar la MIC, con un gran número de muestras. En lo que respecta a la bioautografía, es una herramienta útil como técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, la desventaja que tiene es que los solventes ácidos o demasiados alcalinos pueden permanecer en las placas de TLC, inhibiendo ellos el crecimiento bacteriano (Nostros *et al.*, 2000). Por todo lo mencionado respecto a los métodos, en este ensayo se optó por utilizar el método de difusión en agar, considerando las pequeñas adaptaciones metodológicas a protocolos estandarizados como el CLSI, pero asegurando un enfoque experimental preciso; sin embargo, en ocasiones es difícil hacer una comparación apropiada de la efectividad de los extractos, puesto que existen diferencias en la metodología.

Cabe mencionar que otro punto importante es la concentración de las bacterias usadas para el estudio de susceptibilidad, que ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala Mac. Farland, evitando así un crecimiento exhaustivo y que proporcione resultados errados, lo cual puede variar en la respuesta del extracto vegetal, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de este para inhibir el crecimiento del microorganismo (Wiegand *et al*; 2008), por esta razón en el presente estudio se utilizó este patrón de referencia.

Recientemente diversos estudios han demostrado que los compuestos aislados de *Crescentia cujete*, y *Crescentia alata* presentan actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas e incluso algunas levaduras (Morales, 2017) (Campos & Vazquez, 2004).

En lo que respecta a los hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth, existe un primer estudio reportado (Morales-Aguilar *et al* 2017); el cual demuestra que en los extractos metanólicos de micelio de hongos endófitos contra *E. coli* 25922 a una concentración de 500µg/mL y 1000µg/mL presentan actividad antibacteriana. Así mismo Flores-Vallejo *et al*, 2017 evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de 43 cepas seleccionadas de diferentes partes de tejido de *C. alata* y las cepas de los hongos endófitos aislados de *C. alata* han sido identificadas mediante secuencias de ADNr como espaciadores internos transcritos (ITS2). Tomando en cuenta la identificación de género de estas cepas, los extractos utilizados en este trabajo que tuvieron actividad antibacteriana fueron: *Periconia igniaria*, *Trematophoma sp.*, *Colletotrichum theobromicola*, *Trametes villosa*, *Fusarium*

decemcellulare y *Colletotrichum gigasporum*, *Cercospora* sp., *Diaporthe* sp., *Podospora*, *Aerobasium*, *Xylaria* sp., *Cladosporium* sp. y *Pseudocercospora* sp.; cabe mencionar que estos géneros de hongos endófitos ya han sido aislados en gran variedad de especies vegetales medicinales, y se ha reportado que presentan actividad antibacteriana (Chutima & Sakon, 2018) (Machoa & Jeffrey, 2017) (Sousa *et al.*, 2016).

Respecto a los extractos metanólicos de micelio, estos inhibieron el crecimiento de 4 bacterias, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*.

Tran *et al.*, en 2010 aisló hongos endófitos de tres especímenes de *Acacia* (*A. baileyana* y *A. floribunda*), determinó la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, los hongos endófitos pertenecían al género *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium* sp. y *Sordariomycetes*, de los cuales *Aureobasidium pullulans* y *Chaetomium globosum* inhibió el crecimiento de *E. coli*, sin embargo, ninguno de los hongos pudo inhibir el crecimiento de *S. aureus*., se realizó la comparación con el presente estudio y se encontró que el género *Aureobasidium* aislado de *C. alata* inhibe el crecimiento de *E. coli*, sin embargo, los halos que se reportan en el presente estudio son de 6.5mm, mientras que el mismo género de hongo aislado de *A. floribunda* mostró un halo de 30mm, cabe mencionar que hay diferencias en la metodología, puesto que Tran *et al.*, en 2010 utilizó otro medio de cultivo (caldo oxoide), el tamaño de los pozos fue de 12mm de diámetro, además que colocó 200µl del extracto en cada pozo, por lo que se dificulta hacer una comparación apropiada de la efectividad que tienen los extractos.

Por otro lado, Hema *et al.*, en 2015 aisló 21 hongos endófitos de la planta *B. rubra*, los cuales son *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Cercospora* sp., *Cladosporium* sp., *Corynespora* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. y *Monilia* sp., determinó su actividad antibacteriana, contra bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y Gram negativas (*E. coli* y *S. typhi*). El género *Cladosporium* sp. inhibió el de *S. typhi*, con tamaños de halo de inhibición de 18 mm, mientras que el género *Cercospora* sp. no inhibió el crecimiento de ninguna de las bacterias probadas. Comparando con el presente estudio, el género *Cercospora* sp. aislado de *C. alata*, inhibió el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, mostrando halos de inhibición del tamaño de 2.4 a 6.5mm, así mismo, el género *Cladosporium* sp. inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* (5.35mm); sin embargo, existen diferencias en la metodología, ya que se utilizó para este estudio el método de difusión en pozos en agar MH, mientras que Hema *et al.*, en 2015 utilizaron difusión con discos miceliales de 6mm en agar nutritivo, lo cual pudiera diferir en los resultados al momento de comparar.

(Tanapichatsakul *et al.*, 2018) evaluaron la actividad antibacteriana de siete géneros de hongos endófitos aislados de la planta medicinal *Melodorum fruticosum* contra nueve bacterias, *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *V. cholera*, *B. cereus* y *V. parahaemolyticus*. Los generos fueron *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Greeneria* y *Nigrospora*, para el ensayo se utilizó el método de difusión en disco. El género *Diaporthe* presentó la mayor actividad antibacteriana contra las 9 bacterias.

En otro estudio Wang *et al.*, en 2007 aisló de la hoja de *Quercus variabilis* 67 hongos endófitos, algunos de estos fueron identificados como; *Alternaria* sp., *Fusarium*, *Colletotrichum* sp., determinaron su actividad antibacteriana contra *E. coli*, *P. fluorescens* y *B. subtilis*, los halos que mostro el género *Alternaria* sp. frente a *E. coli* fueron de 10 a 20mm, mientras que para *P. fluorescens* los halos fueron superior a 20mm. El género *Colletotrichum* inhibió el crecimiento de *B. subtilis*, los halos tuvieron un tamaño de 10 a 20mm, por otro lado, *Fusarium* inhibió el crecimiento tanto de *P. fluorescens* y *B. subtilis*, con un tamaño de halos de más de 20mm. Comparando estos resultados con el presente estudio, el género *Colletotrichum* sp., inhibió el crecimiento tanto de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* con un tamaño de halos de 6.0, 2.5, 3.95 respectivamente. Sin embargo, la metodología utilizada fue con discos de papel, por lo que al comparar con este estudio, se observa que los extractos de *C. alata* presentaron halos más pequeños. Pero recordemos que se ha reportado que la actividad de los hongos endófitos varía en cada especie de planta que fueron aislados, además de las condiciones ambientales en las que se encuentra.

Arivudainambi *et al.*, en 2011 evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos, acetato de etilo y hexano de hongos endófitos aislados de las hojas de *V. negundo*, reportando que el extracto metanólico produjo una zona de inhibición contra *S. aureus* (21.6mm), *B. subtilis* (18.3), *P. aeruginosa* (17.6mm) y *E. coli* (18.6mm), mientras que el extracto de acetato de etilo tuvo un efecto inhibitorio moderado para todas las bacterias, con halos de que fueron de 11.6-16.6mm; sin embargo, el extracto hexanico presentó un efecto inhibitorio bajo comparado con los otros (halos de 9.6-11-6mm). Por otro lado, Hastuti *et al*; en 2018 realizó una investigación del sobrenadante de hongos endófitos aislados de la planta medicinal *Hedychium acuminatum* Roscoe, los cuales a la especie *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum alienum*, *C. aotearoa*, *C. gloeosporioides* y *Aspergillus parasiticus*, determinando su actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *B. subtilis*, encontró que hubo diferencias en los tamaños de diámetro de los halos de inhibición entre cada especie. Siendo el género *Fusarium oxysporum* quien presentó la mayor actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis* (0.338mm y 0.498mm respectivamente) comparada con las otras especies de hongo, por otro lado, en el

presente estudio se encontró que el género *Colletrotrichum* aislado del sobrenadante acetato de etilo, inhibe el crecimiento de *S. aureus* (3.95) y *P. aeruginosa* (4.35mm). Sin embargo, la metodología es distinta, por lo que hace incomparable los resultados.

Por otro lado, Vellingiri *et al.*, en 2015 determinaron la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Aegle marmelos*, contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. epidermidis* y *Siguella* sp., utilizando el método de difusión en pozos en AMH, a cada pozó se le colocó 40µL, el diámetro se midió después de 24 hrs, el género *Cladosporium* inhibió el crecimiento de todas las bacterias probadas, el halo presentó diámetros de 0.5-2.3mm, así mismo, el género *Alternaria* inhibió el crecimiento de todas las bacterias, sin embargo, mostró halos más pequeños 1-1.5mm. En el estudio de los hongos de *C. alata*, el género *Cladosporium* sp. del extracto de acetato de etilo del sobrenadante, inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* (5.35mm), sin embargo, otros géneros de hongos de *C. alata*, muestran mejor tamaño halos comparados con los hongos aislados de *A. marmelos*.

Macho *et al.*, en 2017 determinó la actividad antibacteriana del hongo endófito del género *Trametes versicolor*, frente a las cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus*. El hongo inhibió el 60% de de *P. aeruginosa* y el 20% a *S. aureus*. El valor de la CMI fue de 250mg/mL y 3.9mg/mL respectivamente, al comparar estos resultados con el presente estudio, el hongo endófito *Trametes* sp. aislado de *C. alata*, solo inhibió el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, la metodología utilizada en ambos estudios es diferente, puesto que es más sensible el método de CMI que el de difusión en pozos.

Verma *et al.*, en 2011 evaluó la actividad antibacteriana del hongo endófito *Periconia* sp. aislado de *Piper longum*, demostrando la capacidad que tiene de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, con concentraciones inhibitorias de 2.64ug/mL. El hongo *Periconia ignaria* aislado de *C. alata*, mostró actividad contra *P. aeruginosa*, la metodología en ambos estudios es distinta, lo que hace que haya diferencias al comparar los resultados.

Con respecto al hongo endófito del género *Xylaria*, fue aislado de la corteza de un árbol (no mostró nombre de la especie vegetal), se determinó su actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, utilizando el método de antibiogramas, difusión en disco. Se reportó diámetros de inhibición de (8, 16 y 10 mm respectivamente) (Mogollon *et al.*, 2013), los resultados obtenidos en el presente estudio no concuerdan totalmente con los encontrados, puesto que el género *Xylaria* sp. aislado de *C. alata*, inhibió a *P. aeruginosa* (3.65mm), el cual fue aislado de rama, los resultados obtenidos de ambos estudios no concuerdan.

En las fuentes consultadas no existen reportes de referencia sobre la actividad antibacteriana que presentan los extractos de hongos endófitos aislados de *C. alata*,

contra bacterias como *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* y *S. agalactiae*, que nos permitan comparar los resultados no favorables obtenidos, no obstante, varios autores (Monggoot-S *et al.*, 2018, Atiphasaworn *et al.*, 2017) han evaluado la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de otras especies de plantas, frente a estas bacterias, demostrando así la capacidad su capacidad, cabe mencionar que diversos factores como el estado fisiológico de la planta y las condiciones ambientales, pueden determinar el tipo de interacción y repercutir en la respuesta antibacteriana que tienen los hongos endófitos frente a las bacterias, puesto que pueden cambiar el comportamiento y la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios.

El tipo de interacción que se establece entre el endófito y la planta está, por tanto, controlado esencialmente por los genes de ambos y modulado por el ambiente (Moricca *et al.*, 2008). Se debe tomar en cuenta que las rutas metabólicas de los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana tienden a ser ramificadas y a interaccionar unas con otras. Una enzima puede catalizar reacciones con múltiples productos, y estos a su vez pueden servir de sustratos para nuevas relaciones, lo cual podría explicar la gran variedad de metabolitos encontrados (Waltkinson *et al.*, 2016).

La mayoría de los hongos endófitos que presentaron actividad antibacteriana, fueron aislados de la hoja, sin embargo, se sabe muy poco acerca de la distribución de los hongos endófitos en cada uno de los tejidos de la planta. La preferencia por tejidos vegetales también puede interpretarse como la capacidad de cada especie por ciertos sustratos específicos. Cabe mencionar que la principal fuente de las plantas son las hojas, donde se lleva a cabo la fotosíntesis, en la cual se sintetizan productos (mezcla de azúcares, aminoácidos, sales y agua) (Margulis & Sagan, 2008). Además, es posible que la microbiota aérea en distintas localidades se deba a que el endófito, pueda dispersarse por el aire, teniendo un acceso más rápido por las hojas a que la raíz.

VI. CONCLUSIÓN

- Este es el primer estudio que identifica hongos endófitos de *C. alata* cuyos extractos producen un efecto antibacteriano contra bacterias sensibles a antibióticos.
- De los 43 extractos metanólicos de hongos endófitos aislado de *C. alata*, 6 inhibieron el crecimiento de *E. coli*, 12 de *S. aureus*, mientras que para *S. typhi* y *P. aeruginosa*, 2 y 3 extractos inhibieron su crecimiento respectivamente.
- De los 43 extractos de sobrenadante aislados de *C. alata*, 3 inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que 16 inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa*.
- Hongos de los géneros *Colletotrichum* sp. (aislado de hoja) y *Cercospora* sp. (aislado de hoja) fueron los que inhibieron el crecimiento bacteriano de 4 de las 7 bacterias probadas.
- Los extractos metanólicos de micelio no inhibieron el crecimiento de las bacterias *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* y *S. agalactiae*.
- Los extractos de sobrenadante no inhibieron el crecimiento de las bacterias *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* y *S. typhi*.
- Los hongos endófitos del genero *Pseudocercospora* sp., *Cladosporium* sp., *Diaporthe* sp., *Trematophoma* sp. no han sido reportados con actividad antibacteriana contra las bacterias de *P. aeruginos*, *S. typhi* y *S. aureus* respectivamente. Siendo esté el primer estudio reportado.
- Los extracto metanólico de micelio presentan ligeramente mejor actividad antibacteriana comparada con los extractos de acetato de etilo del sobrenadante.
- Los resultados de este trabajo representan la primera fase de un programa de identificación de productos naturales contra bacterias resistentes a fármacos.

5.1 Perspectivas

- Se realizará el ensayo para determinar la CMI de las cepas que hayan presentado mayor actividad antibacteriana, esto por el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton.
- Se determinarán aquellos compuestos responsables de la actividad antibacteriana de las cepas con menor CMI por el método de Bioautografía.

REFERENCIAS

- Aguilar, C. A. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: información etnobotánica. *Botánica Médica*.
- Arivudainambi, U. E., Anand, T. D., Shanmugaiah, V., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2011). Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 340-345.
- Atiphasaworn, P., Monggoot, S., Gentekaki, E., Brooks, S., & Pripdeevech, P. (2017). Antibacterial and Antioxidant Constituents of Extracts of Endophytic Fungi Isolated from *Ocimum basilicum* var. *thrysiflora* Leaves. *Current microbiology*, 10(74), 1185-1193.
- Balouri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 71-79.
- Bauer, A., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (2000). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Brown, E., & Wright, G. (2016). Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature*, 336-433.
- Campos, Y., & Vazquez, S. (Julio de 2004). Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de la pulpa de el fruto *Crescentia Alata* (Morro) en bacterias de origen gastrointestinal. San Salvador, El Salvador.
- Castillo-Machalskis, I., D Armas, H., Malaver, N., & Núñez, M. (2007). Actividad antibacteriana de extractos de hongos endófitos aislados de raíces del mangle *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en Venezuela. *Revista de biología tropical*, 3-4(55), 761-765.
- Cates R., P. B. (2013). Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. *Journal of Medicinal Plants*, 2616-2627.
- Chizmar, F. C. (2009). *Plantas Comestibles de Centro América*. Costa Rica: INBio.
- Chutima, T., & Sakon, M. (2018). Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. *Current Microbiology*, 476-483.
- CONABIO. (12 de Noviembre de 2017). Obtenido de <http://www.cnf.gob.mx:8090/snif/portal/?searchword=crescentia&searchphrase=>

any&limit=20&ordering=newest&view=search&Itemid=99999999&option=com_search

- De la Rosa, F. M., & Prieto, P. J. (2003). *Microbiología en Ciencias de la Salud* (Vol. 2). Madrid: Elsevier España.
- Debbab, A. A., Edrada-Ebel, R., Mueller, W. E., Mosaddak, M., Hakikj, A., & Proksch, P. (2009). Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2(13), 229-234.
- Diario Oficial de la Federación. (2014). *Programa Regional de Desarrollo del Sur-Sureste*. Ciudad de México.
- Didier, H. B. (Julio de 1995). La colección de PLANTAS MEDICINALES más importante de América Latina. *Ciencias*(039), 46-48.
- Encarnación, D. R., & Cortés, A. R. (1998). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales de Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology*, 33-37.
- Ferreira, M. C., Cantrell, C. L., Wedge, D. E., Gonçalves, V. N., Jacob, M. R., Khan, S., & Rosa, L. H. (2017). Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia Gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochemical systematics and ecology*, 71, 163-169.
- Flores-Vallejo, R. (2017). Aislamiento de hongos endófitos de la especie medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth, productores de compuestos antiinflamatorios y caracterización preliminar de endo y exometabolima secundario. *Tesis de maestría sin publicar*. Cuernavaca, Morelos: Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- Frieden, T. (2013). ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States. *U.S. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention*. United States.
- Gamboa-Gaitán, M. A. (2006). Hongos endófitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta biológica colombiana*(11), 3-20.
- Geilfus, F. (1987). *El árbol al servicio del agricultor: manual de agroforestería para el desarrollo rural* (Vol. 2). Santo Domingo, Lima, República Dominicana: Enda-Caribe.
- Hastuti, U. S., Rahmawati, D., Sari, R. Y., Fitri, R. D., & Al Asna, P. (2018). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from a medicinal plant, *Hedychium acuminatum* Roscoe. *AIP Conference Proceedings*.
- Hema, P., Murali, M., Thriveni, M. C., Prathibha, M., Jayaramu, S. C., & Amruthesh, K. N. (2015). Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Endophytic Fungi

- Isolated from *Vasella rubra* L.-A Medicinal Plant. *Journal of Pure and Applied microbiology*, 9(4), 2971-2978.
- Herrera, P. J. (2005). La Medicina en la Época Precolombina . *Academia de Medicina*, 113-116.
- Iwu, M., Duncan, A. R., & Okunji, C. O. (1999). New Antimicrobials of Plant Origin. *Perspectives on new crops and new uses*, 457.
- Jamil, A., Shahid, M., & Ashraf, M. (2007). Screening of some medicinal plants for isolation of antifungal proteins and peptides. *Journal of Botany*, 211-221.
- Kalantar, E., Deopurkar, R., & Kapadnis, B. (2010). Antimicrobial activity of indigenous strains of *Aureobasidium* isolated from *santalum album* leaves. . *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 59-64.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 19(7), 792-798.
- Lagunas-Castro, M., López-Monteón, A., Ramos-Ligonio, A., Espinoza, C., & Trigos, A. (2015). Actividad antibacteriana de extractos metanol; cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 87-94.
- Liu, Y. H., Hu, X. P., Li, W., Cao, X. Y., Yang, H. R., Lin, S. T., & Li, C. F. (2016). Antimicrobial and antitumor activity and diversity of endophytic fungi from traditional Chinese medicinal plant *Cephaloataxus hainanensis* Li. *Genet Mol Res*, 2.
- Lozoya, X. (2000). La medicina prehispánica. *Un siglo de las ciencias de la salud en México* . México.
- Luján, C. G. (2006). Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Torreón, Coahuila, México.
- Machoa, A. J., & Jeffrey, R. (2017). Actividad antibacteriana de extractos fungicos de *Trametes versicolor* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J. A., de Pinho, P. G., & Baptista, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 46.
- Margulis, L., & Sagan, D. (2008). El proceso de nutrición en las plantas. En A. Joaquin, *Fundamentos de fisiología vegetal* (págs. 242-258). MCGRAW HILL EDUCATION.
- Mendoza, M. A. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina* , 18-27.

- Mochoa, A. J., Ochavano, T., & Jeffrey, R. (2017). Actividad antibacteriana de los extractos fúngicos de *Trametes Versicolor* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmaceutical Research*.
- Mogollo, I. (2013). ANÁLISIS QUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO XYLARIA. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75-83.
- Molina, L. J. (16 de Octubre de 2017). *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html>
- Monggoot, S., Pichaitam, T., Tanapichatsakul, C., & Pripdeevech, P. (2018). Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of *Mitrephora wangii*. *Archives of microbiology*, 6(200), 951-959.
- Morales, A. M. (Abril de 2017). Actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth en el estado de Morales, México.20. *Tesis de Licenciatura sin publicar*. Cuernavaca, Morelos.
- Moricca, S., & Ragazzi, A. (2008). Fungal endophytes in Mediterranean oak forest: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*, 380-386.
- Murillo, A. I., Encarnación, D., & Franzblau, S. (2001). Compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica aislados de recursos naturales de Baja California Sur, México. *Pharmaceutical Biology*, 445-449.
- Nasimiyu, V. W., Wagara, I. N., Obonyo, M. A., & Matasyoh, J. C. (2018). Isolation, identification and bioactivity of fungal endophytes from selected Kenyan medicinal plants. *African Journal of Microbiology Research*, 405-412.
- Nostos, A., Germano, M., D'Angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 379-385.
- OMS. (Septiembre de 2016). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Pío-León, J. F., Díaz-Camacho, S. P., & López-López, M. A. (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.
- Pool-Chalé, M. R. (2014). La jícara y sus usos tradicionales en Yucatán, una vasija hecha del fruto de *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Desde el Herbario CICY*, 116-118.

- Rahman, A.-U., Choudhary, M. I., & Thomsen, W. J. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*. London: Academic Press.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodología para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 14(42), 263-268.
- Ramirez, R. (2006). Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales. *Boletín Micológico*, 49-53.
- Rastrelli, L., Lauro, M., Marzocco, S., Sorrenetino, R., & Sorrenetino, U. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sciences*, 523-534.
- Rios, J., Recio, M. C., & Villar, A. (1998). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 127-149.
- Rodríguez, R., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New Phytol.*
- Rodríguez-García, A. (2011). Elaboracion de biopelículas a base de quitosán y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos peridotopatógenos. (*Doctoral dissertation Universidad Autónoma de Nuevo León*).
- Rojas, G., Levaro, J., & Navarro, V. (2000). Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 97-101.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Saldoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, A., Armendariz-Guillen, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2(16), 132-146.
- Shah, A., Rather, M. A., Hassan, Q. P., Aga, M. A., Mushtaq, S., Shah, A. M., & Ahmad, Z. (2017). Discovery of anti-microbial and anti-tubercular molecules from *Fusarium solani*: an endophyte of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of applied microbiology*, 112(5), 1168-1176.
- Sharma, A., Flores, V. R., Cardoso, T., & Villarreal, M. L. (2016). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 55-64.

- Sierra-García, I. N., Romero-Tabarez, M., & Orduz-Peralta, S. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Actualidades Biológicas*, 34(96), 5-19.
- Solares, A. F. (2004). Etnobotánica y usos potenciales del Cirian (*Crescentia alata*, H.B.K.) en el estado de Morelos. *Polibotánica* (18), 13-31.
- Sousa, J. P., Aguilar-Pérez, M. M., Arnold, A. E., Rios, N., Coley, P. D., Kursar, T. A., & Cubilla-Rios, L. (2016). Chemical Constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. *Journal of applied microbiology*, 126(6), 1501-1508.
- Suaste-Gomez, E. (2006). Antecesoros en el devenir de la técnica y medicina en México. *Cinvestav*, 26-36. México.
- Tanapichatsakul, C., Monggoot, S., Gentekaki, E., & Pripdeevech, P. (2018). Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Current microbiology*, 75(4), 476-483.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología*(36(1)), 663-672.
- Tayung, K., Barik, B. P., Jan, D. K., & Deka, 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.
- Torres, L. O., Perez, M., & Contreras, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Universitat Barcelona.
- Tran, H. B., McRae, J. M., Lynch, F., & Palombo, E. A. (2010). Identification and bioactive properties of endophytic fungi isolated from phyllodes of *Acacia* species. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 377-382.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., & Elza, S. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 369-378.
- Valladares, C. M., Ríos, G. Y., Váldez, E. M., & Aldana, L. L. (2014). Actividad biológica de *Crescentia alata* (Lamiales: Bignoniaceae) Fracciones de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomólogo*, 770-777.
- Verma, V. C., Lobkovsky, E., Gange, A. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L. *The Journal of antibiotics*, 427-435.

- Viesca, T. C. (1997). Medicina Prehispánica de México. *Departamento de Historia y Filosofía de la Medicina*, 490-499. Obtenido de www.facmed.unam.mx/sms/temas/2010/09_sep_2k10.pdf
- Wang, F. W., Jiao, R. H., Cheng, A. B., Tan, S. H., & Song, Y. C. (2007). Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 79-83.
- Wang, Y., Gloer, J., Scott, J., & Malloch, D. (1993). Appenolides AC: three new antifungal furanones from the coprophilous fungus *Podospora appendiculata*. *Journal of natural products*, 3(56), 341-344.
- Watkinson, S., Boddy, L., & Money, N. (2016). Mutualistic Symbiosis Between Fungi and Autotrophs. En S. Watkinson, *The Fungi* (págs. 141-187). Londres: Elsevier.
- Wiegand, I., Kai, H., & Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 163-175.
- Wilson, D. (1995). Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274-276.
- Zamora S., G. J., Bonilla, G., Aguilar, H., & Harvey, C. A. (2001). Cómo utilizar los frutos de Guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*), guácimo (*Guazuma ulmifolia*), genízaro (*Pithecellobium saman*) y jícaro (*Crescentia alata*) en alimentación animal. *Agrofestería en las Américas*, 49-49.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 19/Agosto/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor)
M. en B. Rosario del Carmen Flores Vallejo (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ashutosh Sharma

Tesis: "Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth.

Alumno que la presenta a revisión: **GUADALUPE FLORES ARROYO**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 19/Agosto/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor)
M. en B. Rosario del Carmen Flores Vallejo (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ashutosh Sharma

Tesis: "**Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth.**"

Alumno que la presenta a revisión: **GUADALUPE FLORES ARROYO**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

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
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a

22 Agosto / 19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor)
M. en B. Rosario del Carmen Flores Vallejo (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ashutosh Sharma

Tesis: "Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth.

Alumno que la presenta a revisión: **GUADALUPE FLORES ARROYO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. ASHUTOSH SHARMA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor)
M. en B. Rosario del Carmen Flores Vallejo (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ashutosh Sharma

Tesis: "Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth.

Alumno que la presenta a revisión: **GUADALUPE FLORES ARROYO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


Rosario del Carmen Flores Vallejo.

M. en B. ROSARIO DEL CARMEN FLORES VALLEJO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 19/Agosto/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor)
M. en B. Rosario del Carmen Flores Vallejo (Co Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ashutosh Sharma

Tesis: "Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth.

Alumno que la presenta a revisión: **GUADALUPE FLORES ARROYO**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. MARIA LUISA VILLARREAL ORTEGA