



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

“BIOPROSPECCIÓN DE ENDÓFITOS SELECTOS DE MÉXICO”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

Q.F.B. ALEJANDRA ARISTA ROMERO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

INSTITUTO DE QUÍMICA

DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR

INSTITUTO DE BIOLOGÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/0652/2022
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence

Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **10 de octubre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **ARISTA ROMERO ALEJANDRA** con número de cuenta **312094052** con latesis titulada **“BIOPROSPECCIÓN DE ENDÓFITOS SELECTOS DE MÉXICO”**, realizada bajo la dirección del **DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**
Vocal: **DR. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHAVEZ**
Secretario: **DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR**
Suplente: **DRA. RICARDO REYES CHILPA**
Suplente: **DR. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de diciembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química (FQ) y al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCBiol) por contribuir a mi desarrollo profesional durante todos estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado a través de la beca (CVU: 1082453) para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN222220) de la UNAM y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9145) de la FQ por los financiamientos otorgados para la realización de este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, mi más sincera admiración y agradecimiento por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza depositada en mí, la paciencia, las enseñanzas y los retos que me han impulsado a mejorar día a día.

A las Dras. Martha Lydia Macías Rubalcava y Patricia Vélez Aguilar, por los comentarios y aportaciones que enriquecieron este proyecto a lo largo de mis evaluaciones semestrales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Nicholas H. Oberlies de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EEUU, el Instituto de Química, UNAM y la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), FQ, UNAM, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y masas de alta resolución.

Al QFB Alejandro Camacho Cruz del Cepario de la FQ, UNAM y al Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las cepas bacterianas para la realización de ensayos biológicos.

A la Dra. María del Carmen González Villaseñor, del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar los organismos fúngicos objeto de estudio.

A la Dra. Anahí Martínez Cárdenas, por su apoyo en el proceso de identificación taxonómica preliminar de los organismos estudiados.

INDICE

	Página
Lista de figuras	I
Lista de cuadros	III
Lista de abreviaturas	IV
Resumen	V
Abstract	VI
1. Antecedentes	1
1.1 Resistencia antimicrobiana y organismos ESKAPE	1
1.2 Productos naturales de origen fúngico como fuente de antimicrobianos	4
1.3 Hongos endófitos y sus metabolitos	6
1.4 Los manglares	9
1.5 Hongos endófitos de mangle	10
1.6 Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla en Tabasco	12
2. Hipótesis	14
3. Objetivos	14
4. Materiales y métodos	15
4.1 Aislamiento de endófitos	15
4.2 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos	15
4.3 Cultivos en pequeña escala	16
4.4 Preparación de extractos orgánicos	16
4.5 Pruebas de actividad antimicrobiana	17
4.6 Cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos	18
4.7 Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala	19
4.8 Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas y en extractos en pequeña escala	19
4.9 Caracterización de los productos obtenidos	20
4.10 Estudios de metabolómica mediante análisis de redes moleculares	21
5. Resultados y discusión	22
5.1 Acondicionamiento y cultivo de los organismos fúngicos	22
5.2 Identificación molecular preliminar de los hongos endófitos	24
5.3 Evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos	27
5.4 Estudio químico de <i>Fusarium</i> spp. (Centla04 y Centla05)	28
5.4.1 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario	28
5.4.2 Evaluación biológica de extractos en mediana escala y fracciones primarias	31
5.4.3 Separación y purificación de los componentes mayoritarios	32
5.4.4 Caracterización de los compuestos 1 y 2	33
5.4.5 Estudios de metabolómica no dirigida	38
5.5 Estudio químico de <i>Daldinia eschscholtzii</i> (Centla07)	41
5.5.1 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario	41
5.5.2 Evaluación biológica del extracto en mediana escala y fracciones primarias	43
5.5.3 Separación y purificación de los componentes mayoritarios	44
5.5.4 Caracterización de 1 y 2 a partir de Centla07	44
5.5.5 Caracterización del compuesto 3	46
5.5.6 Fraccionamiento primario del extracto en pequeña escala de Centla07	50
5.5.7 Separación y purificación de los componentes mayoritarios	51

5.5.8 Caracterización de los compuestos 4 y 5	52
5.5.9 Estudios de metabolómica no dirigida	57
5.6 Estudio químico de <i>Leptosphaerulina</i> sp. (Centla11)	59
5.6.1 Separación y purificación de los componentes mayoritarios	60
5.6.2 Caracterización del compuesto 6	60
5.6.3 Caracterización del compuesto 7	64
5.6.4 Estudios de metabolómica no dirigida	68
6. Conclusiones	69
7. Perspectivas	70
8. Referencias	71
9. Anexo	80
I. Resumen y cartel presentado en el congreso virtual Vanguard's of Natural Product Research 2021, ASP.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Línea del tiempo del desarrollo de antibióticos y aparición de organismos resistentes	1
2	Mecanismos de resistencia a antibióticos	2
3	Distribución global de la resistencia a antibióticos en 2019	3
4	Medicamentos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019	4
5	Fuentes naturales de antibacterianos aprobados por la FDA	5
6	Antimicrobianos de origen fúngico	6
7	Diversidad estructural de metabolitos producidos por hongos endófitos	8
8	Distribución de manglares en el mundo	10
9	Ubicación geográfica de la RBPC	13
10	Localización exacta del sitio de colecta de las plantas para el aislamiento de los hongos endófitos.	23
11	Ejemplo de cultivos fúngicos en medio APD (A) y de arroz (B)	23
12	Cultivos en medio APD de <i>Fusarium</i> spp. (Centla04 y Centla05)	28
13	Ejemplos de metabolitos producidos por <i>Fusarium</i> sp.	29
14	Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash de los extractos de los hongos <i>Fusarium</i> spp. Centla04 (A) y Centla05 (B)	30
15	Comparación de perfiles cromatográficos por ELSD de los extractos de <i>Fusarium</i> spp. Centla04 (A) y Centla05 (B)	32
16	Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla05-F ₇ (PDA 254 nm)	33
17	Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) de los compuestos 1 (A), 2 (B) y en el UV de 1 (C) y de 2 (D)	33
18	Espectro de RMN ¹ H de la equisetina (1) (600 MHz, CDCl ₃)	35
19	Espectro de RMN ¹³ C de la equisetina (1) (150 MHz, CDCl ₃)	35
20	Estructura química de la equisetina (1)	36
21	Espectro de RMN ¹ H de la <i>epi</i> -equisetina (2) (400MHz, CDCl ₃)	37
22	Espectro de RMN ¹³ C de la <i>epi</i> -equisetina (2) (150 MHz, CDCl ₃)	37
23	Estructura química de la <i>epi</i> -equisetina (2)	38
24	Red molecular de <i>Fusarium</i> sp. (Centla04) con la herramienta MolNetEnhancer	39
25	Red molecular de <i>Fusarium</i> sp. (Centla05) con la herramienta MolNetEnhancer	40
26	Cultivo en medio APD de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07)	41
27	Metabolitos producidos por <i>Daldinia</i> spp.	42
28	Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash del extracto del hongo <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07)	42
29	Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla07-F ₆ (PDA 254 nm)	44
30	Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla07-F ₇ (PDA 200 nm)	44
31	Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) de los compuestos 1 (A), 2 (B) y en el UV de 1 (C) y de 2 (D) aislados de Centla07	45
32	Espectro de RMN ¹ H de 1 (400 MHz, CDCl ₃)	46
33	Espectro de RMN ¹ H de 2 (400 MHz, CDCl ₃)	46
34	Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) (A) y en el UV (B) del compuesto 3	47
35	Espectro de RMN ¹ H de la fusarisetina A (3) (600 MHz, CDCl ₃)	48
36	Estructura química de la fusarisetina A (3)	49

37	Comparación de perfiles por UPLC-HRESIMS-MS/MS de los extractos de los hongos Centla04 (A), Centla05 (B) y Centla07 (C) en mediana escala.	49
38	Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) de 3 en los extractos de <i>Fusarium</i> spp. (Centla04) (A) y Centla05 (B); y Centla07(C)	50
39	Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash del extracto en pequeña escala del hongo <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07)	51
40	Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla07-F ₁ (PDA 254 nm)	52
41	Espectro en ESI+ (A) y en el UV (B) del compuesto 4	52
42	Espectro de RMN ¹ H del 1,8-dimetoxinaftaleno (4) (500 MHz, CDCl ₃)	53
43	Espectro de RMN ¹³ C del 1,8-dimetoxinaftaleno (4) (125 MHz, CDCl ₃)	53
44	Espectro HSQC del 1,8-dimetoxinaftaleno (4) (500 MHz, CDCl ₃)	54
45	Espectro COSY del 1,8-dimetoxinaftaleno (4) (500 MHz, CDCl ₃)	54
46	Espectro HMBC del 1,8-dimetoxinaftaleno (4) (500 MHz, CDCl ₃)	55
47	Estructura química del 1,8-dimetoxinaftaleno (4)	55
48	Espectro de RMN ¹ H del 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (5) (600 MHz, CDCl ₃)	56
49	Espectro en ESI+ (A) y en el UV (B) del compuesto 5	56
50	Estructura química del 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (5)	57
51	Red molecular de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07) con la herramienta MolNetEnhancer	58
52	Cultivo en medio APDde <i>Leptosphaerulina</i> sp. (Centla11)	59
53	Metabolitos producidos por <i>Leptosphaerulina</i> spp.	59
54	Perfil cromatográfico por ELSD del extracto en pequeña escala de <i>Leptosphaerulina</i> sp. (Centla11)	60
55	Separación por HPLC a nivel preparativo (PDA 254 nm) del extracto de <i>Leptosphaerulina</i> sp. (Centla11)	60
56	Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) (A) y en el UV (B) del compuesto 6	61
57	Espectro de RMN ¹ H del diorcinol (6) (500 MHz, CDCl ₃)	62
58	Espectro de RMN ¹³ C del diorcinol (6) (125 MHz, CDCl ₃)	62
59	Espectro HSQC del diorcinol (6) (500 MHz, CDCl ₃)	63
60	Espectro HMBC del diorcinol (6) (500 MHz, CDCl ₃)	63
61	Estructura química del diorcinol (6)	63
62	Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) (A) y en el UV (B) del compuesto 7	64
63	Espectro de RMN ¹ H de la funicina (7) (500 MHz, CDCl ₃)	65
64	Espectro de RMN ¹³ C de la funicina (7) (125 MHz, CDCl ₃)	65
65	Espectro COSY de la funicina (7) (500 MHz, CDCl ₃)	66
66	Espectro HSQC de la funicina (7) (500 MHz, CDCl ₃)	67
67	Espectro HMBC de la funicina (7) (500 MHz, CDCl ₃)	67
68	Estructura química de la funicina (7)	67
69	Red molecular de <i>Leptosphaerulina</i> sp. (Centla11) con la herramienta MolNetEnhancer	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Lista de organismos prioritarios para el desarrollo de antimicrobianos	3
2	Ejemplos de metabolitos bioactivos de hongos endófitos	8
3	Ejemplos de metabolitos bioactivos de hongos endófitos de mangle	12
4	Controles positivos para el ensayo antimicrobiano	17
5	Condiciones de análisis por cromatografía de tipo flash	19
6	Hongos endófitos objeto de estudio con fuente vegetal.	22
7	Resultados de la identificación taxonómica preliminar de los hongos endófitos de manglar	25
8	Resultados del potencial anti-ESKAPE de los extractos en pequeña escala	27
9	Rendimiento de los extractos orgánicos en mediana escala	29
10	Resultados del fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala de <i>Fusarium</i> spp. (Centla04 y Centla05)	30
11	Extractos y fracciones activas contra bacterias ESKAPE	31
12	Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 600MHz, ¹³ C, 150MHz) de la equisetina (1) y <i>epi</i> -equisetina (2)	35
13	Anotación química de metabolitos de <i>Fusarium</i> spp. (Centla04 y Centla05)	38
14	Resultados del fraccionamiento primario del extracto en mediana escala de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07)	42
15	Extractos y fracciones activas de <i>D. eschscholtzii</i> contra bacterias	43
16	Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 600 MHz) de la fusarisetina A (3)	47
17	Resultados del fraccionamiento primario del extracto en pequeña escala de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07)	51
18	Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 500 MHz; ¹³ C ,500 MHz) del 1,8 dimetoxinaftaleno (4)	53
19	Datos de RMN ¹ H (600 MHz) del 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (5)	56
20	Anotación química de metabolitos de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07)	58
21	Datos de RMN ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (500 MHz) del diorcinol (6)	61
22	Datos espectroscópicos de RMN (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 500 MHz) de la funicina (7)	65
23	Anotación química de metabolitos de <i>Leptosphaerulina</i> sp. (Centla11)	68

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico	HSQC	Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple
μg	Microgramo	Hz	Hertz
μL	Microlitro	IDH	Índice de deficiencia de hidrógeno
μm	Micrómetro	ITS	Espaciador de transcripción interno
μM	Micromolar	kV	Kilovolt
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius	m	metro
AcOEt	Acetato de etilo	m	Multiplete
APD	Agar papa dextrosa	m/z	Relación masa-carga
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	MeCN	Acetonitrilo
bp	Pares de bases	MeOH	Metanol
CDCl_3	Cloroformo deuterado	mg	Miligramo
CHCl_3	Cloroformo	MHz	Mega hertz
cm^2	Centímetro cuadrado	min	Minuto
CMI	Concentración mínima inhibitoria	mL	Mililitro
COSY	Espectroscopia de correlación	mm	Milímetro
CV	Volúmenes por columna	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
d	Doblete	MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
Da	Dalton	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
da	Doblete ancho	nm	Nanómetro
dd	Doble de doble	OMS	Organización Mundial de la Salud
dddd	Doble de doble de doble de doble	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DMSO	Dimetilsulfóxido	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
DNP	Diccionario de Productos Naturales	PN	Producto natural
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	ppm	Partes por millón
MS	Espectrometría de masas	psi	Libras por pulgada cuadrada
ESI	Ionización por la técnica de electrospray	RMN	Resonancia magnética nuclear
FDA	Food and Drug Administration	RAM	Resistencia antimicrobiana
g	Gramo	RBPC	Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking	rpm	Revoluciones por minuto
h	hora	s	Singulete
ha	Hectárea	sa	Singulete ancho
HMBC	Conectividad Heteronuclear a Enlaces Múltiples	seg	Segundo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	UV	Espectroscopia en el ultravioleta
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por electrospray	V	Volt
t	Triplete	uma	Unidad de masa atómica
t_R	Tiempo de retención	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana	YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa

RESUMEN

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinario que tiene la finalidad de descubrir metabolitos antimicrobianos a partir de hongos provenientes de sitios poco explorados en México. En este contexto, se realizó el aislamiento de 45 hongos endófitos de las especies *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Tabernaemontana* sp. colectadas en la Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla en Tabasco (RBPC) para su estudio químico biodirigido.

Con base en los resultados de la evaluación preliminar del potencial antimicrobiano de los extractos en pequeña escala de todos los hongos contra una serie de bacterias del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. aerogenes*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacter cloacae*), se seleccionaron dos organismos pertenecientes al género *Fusarium* (Centla04 y Centla05), a partir de los cuales se realizó el aislamiento de los antimicrobianos equisetina (**1**) y su epímero, *epi*-equisetina (**2**). Adicionalmente pudo identificarse la fusarisetina A (**3**) en los extractos de estos organismos.

Por otro lado, la identificación taxonómica preliminar de los organismos de esta colección mediante el análisis de las regiones del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal (ITS) reveló la presencia de algunas especies de géneros poco estudiados con fines de bioprospección. Así, se seleccionaron a las especies *Daldinia eschscholtzii* (Centla07) y *Leptosphaerulina* sp. (Centla11) para su estudio químico, logrando el aislamiento del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) y el 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (**5**) de Centla07 y el diorcinol (**6**) y la funicina (**7**) de Centla11.

Finalmente, se realizaron los estudios de metabolómica de los organismos seleccionados mediante el análisis de sus espectros obtenidos por espectrometría de masas de alta resolución por electrospray (HRESIMS-MS/MS) y la construcción de sus redes moleculares en la plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), mismos que permitieron visualizar la diversidad química de los extractos, contribuyendo a enriquecer el conocimiento químico y biológico de biodiversidad de la RBPC.

ABSTRACT

This work is part of a multidisciplinary research project focused on discovering antimicrobial metabolites obtained from fungal organisms from unexplored sites in Mexico. Thus, 45 endophytic fungi isolated from *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans*, and *Tabernaemontana* sp., collected in the Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla in Tabasco (RBPC), were subjected to an antimicrobial screening for the selection of the active species for bioactive guided chemical study.

Fungal extracts were tested against ESKAPE bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, and *Enterobacter cloacae*). For the scaleup cultures of the most active, *Fusarium* spp. (Centla04 and Centla05), the compounds equisetin (**1**) and its epimer, *epi*-equisetin (**2**), were isolated. Additionally, fusarisetin A (**3**) was identified in the extracts of these organisms.

On the other hand, based on the preliminary taxonomic identification of the fungi using the molecular data of their internal transcription spacer regions of ribosomal DNA (ITS), the species *Daldinia eschscholtzii* (Centla07) and *Leptosphaerulina* sp. (Centla11) were selected for a chemical study due to the lack of previous bioprospection studies on these genera. Thus, the isolation of 1,8-dimethoxynaphthalene (**4**) and 1-hydroxy-8-methoxynaphthalene (**5**) were achieved from *D. eschscholtzii* (Centla07), and diorcinol (**6**) and funicin (**7**) from *Leptosphaerulina* sp. (Centla11).

Finally, the metabolomics analysis of the selected organisms was carried out by molecular networking using the GNPS platform and the HRESIMS-MS/MS data of their extracts. The results allowed visualizing their chemical diversity, which enriches the chemical and biological knowledge of microbial biodiversity of the RBPC.

1. ANTECEDENTES

1.1 Resistencia antimicrobiana y organismos ESKAPE

El fenómeno de la resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad de organismos como bacterias, virus, hongos y parásitos de sobrevivir ante agentes antibióticos a los cuales eran sensibles en un inicio (Jindal *et al.*, 2015). Los primeros casos de RAM se registraron en la primera mitad del siglo XX, con la aparición de la resistencia a las sulfonamidas tan sólo dos años después de su introducción como agente antimicrobiano; posteriormente, se observó resistencia a la penicilina en cepas de *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Watkins & Bonomo, 2016; Uddin *et al.*, 2021). La RAM, que puede ocurrir de manera natural o adquirida, se ha visto incrementada en años recientes (**Figura 1**) como consecuencia del mal uso o uso excesivo de antibióticos y las malas prácticas para el control de infecciones (Jindal *et al.*, 2015; Prestinaci *et al.*, 2015).

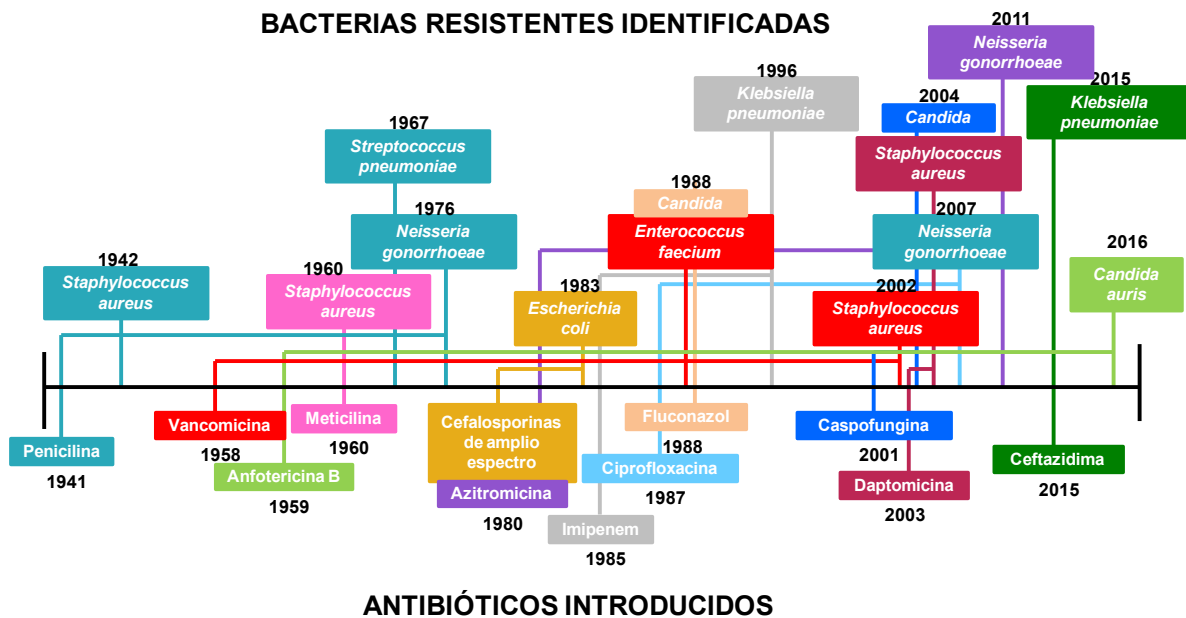


Figura 1. Línea del tiempo del desarrollo de antibióticos y aparición de organismos resistentes.

De acuerdo con la literatura, los mecanismos de resistencia se pueden clasificar en cuatro grupos: inhibición de la captación de fármacos, modificación de dianas farmacológicas, inactivación enzimática y bombas de eflujo, siendo los últimos tres los más comunes en casos de resistencia adquirida (**Figura 2**) (Reygaert, 2018).

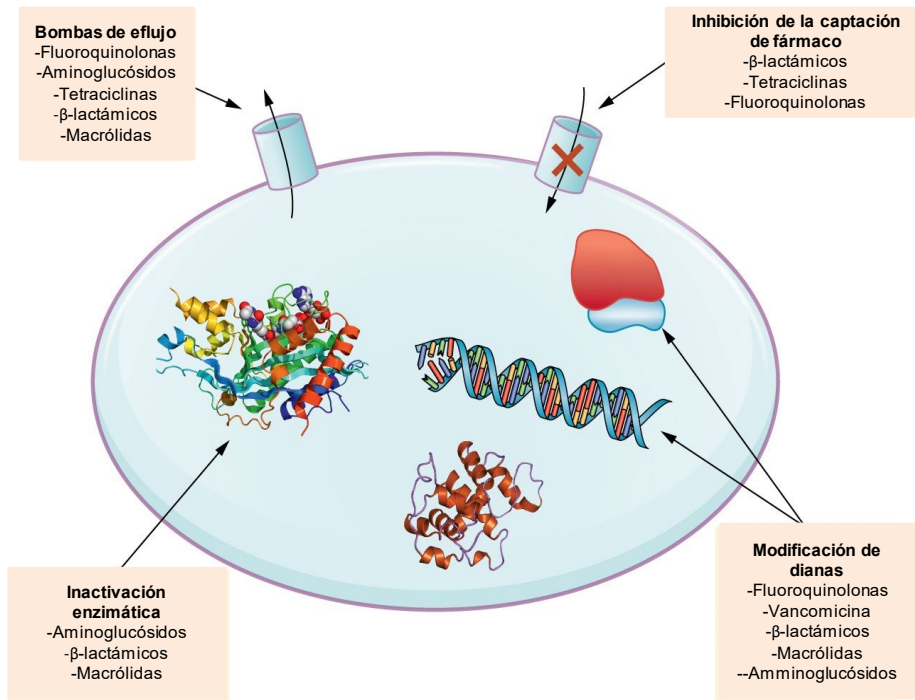


Figura 2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Tan sólo en 2019, según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la RAM fue responsable de 700,000 defunciones en el mundo, mientras que estudios más recientes estiman que esta cifra podría alcanzar los 4.95 millones y que para el año 2050, aumentará a 10 millones, convirtiéndose en uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial (**Figura 3**) (OMS, 2019; Balkhy., 2021; Antimicrobial Resistance Collaborators; 2022). En 2017, la OMS enlistó a los organismos que requieren con mayor urgencia el desarrollo de nuevos antibióticos, clasificándolos en tres categorías: crítica, alta y media (**Cuadro 1**) (Tacconelli *et al.*, 2018). Dentro de estos organismos se encuentran aquellos agrupados dentro del acrónimo ESKAPE, que incluye a *Enterococcus spp.*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter* (Santajit e Indrawattana, 2016; Campos *et al.*, 2020).

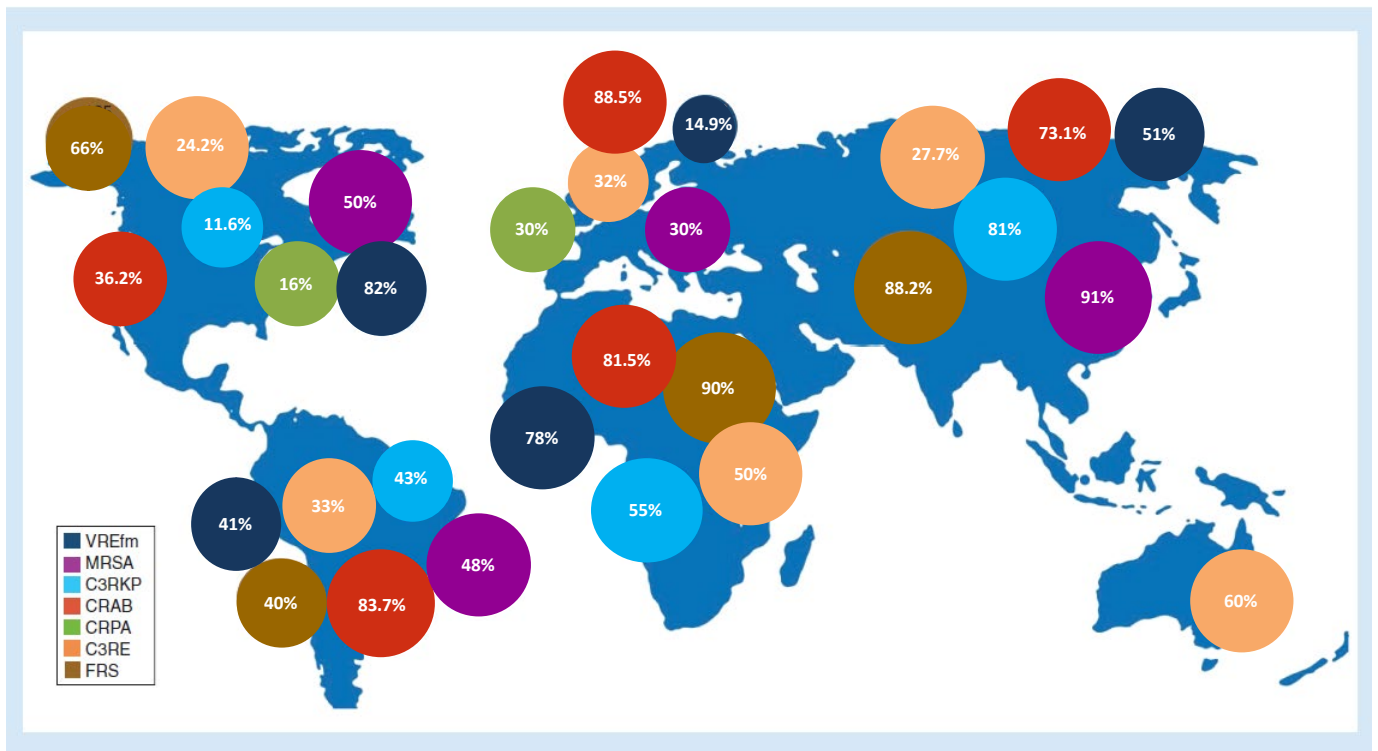


Figura 3. Distribución global de la resistencia a antibióticos en 2019 (porcentaje de incidencia):
 C3RE: *Enterobacter* spp. resistente a cefalosporinas de 3ra. generación; C3RKP: *K.pneumoniae* resistente a cefalosporinas de 3ra. generación; CRAB: *A. baumannii* resistente a carbapenem; CRPA: *P. aeruginosa* resistente a carbapenem; FRS: *Salmonella* resistente a fluoroquinolona; MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina; VREfm: *E. faecium* resistente a vancomicina.

Cuadro 1. Lista de organismos prioritarios para el desarrollo de antimicrobianos	
Nivel de prioridad	Microorganismo
crítica	<i>A. baumannii</i> (resistente a carbapenem) <i>P. aeruginosa</i> (resistente a carbapenem) Enterobacteriaceae (resistente a carbapenem y a cefalosporinas de 3ra. generación) <i>K. pneumoniae</i> (resistente a carbapenem y cefalosporinas de tercera generación)
alta	<i>E. faecium</i> (resistente a vancomicina) <i>S. aureus</i> (resistente a meticilina y vancomicina) <i>Helicobacter pylori</i> (resistente a claritromicina) <i>Campylobacter</i> spp. (resistente a fluoroquinolona) <i>Salmonella</i> spp. (resistente a fluoroquinolona) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (resistente a cefalosporinas de 3ra. generación y a fluoroquinolona)
media	<i>S. pneumoniae</i> (no susceptible a penicilina) <i>Haemophilus influenzae</i> (resistente a ampicilina) <i>Shigella</i> spp. (resistente a fluoroquinolona)

1.2 Productos naturales de origen fúngico como fuente de antimicrobianos

Históricamente, los productos naturales (PNs) han sido una fuente importante para la obtención de compuestos con diversas actividades biológicas, debido a la necesidad de adaptación de los organismos que los producen (Demain y Zhang, 2005). De acuerdo con Newman y Cragg (2020), los PNs contribuyeron en más de 50% al desarrollo de fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en el periodo entre 1981 y 2019 (**Figura 4**).

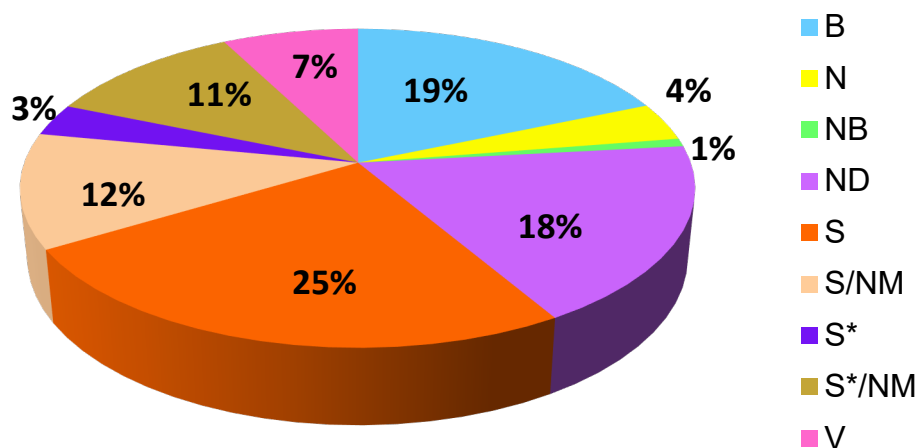


Figura 4. Medicamentos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019. B: biológico; N: PN; NB: PN botánico; ND: derivado de PN; S: sintético; S/NM: sintético que mimetiza un PN; S*: sintético con farmacóforo de PN, S*/NM: sintético con farmacóforo de PN y que mimetiza a un PN; V: vacuna.

Dentro de las actividades biológicas que presentan los PN, la antimicrobiana resulta de especial interés por el aumento de enfermedades infecciosas en años recientes y la falta de tratamientos efectivos para combatirlos. En este sentido, de los medicamentos aprobados por la FDA hasta el año 2016 que se emplean como agentes antimicrobianos, 69% proviene de fuentes naturales, microorganismos en su mayoría y de éstos, casi la mitad se aisló o desarrolló a partir de hongos (**Figura 5**) (Patridge *et al.*, 2016).

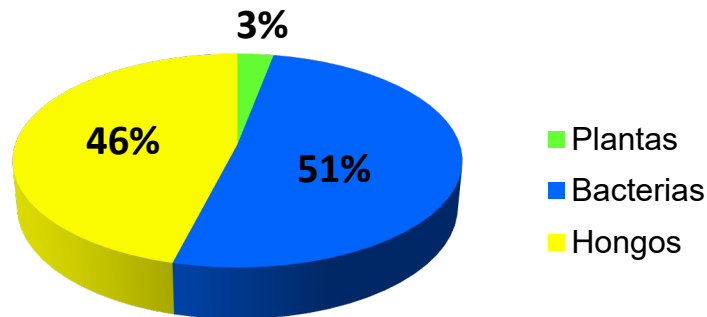


Figura 5. Fuentes naturales de antibacterianos aprobados por la FDA.

Los hongos son organismos eucariontes que representan el segundo grupo con mayor diversidad de especies en el mundo y cumplen con importantes funciones en el ecosistema como la de descomponer materia orgánica, además de poder existir como mutualistas o patógenos de otros organismos (Wu *et al.*, 2019). De acuerdo con reportes recientes, se estima que la diversidad fúngica se encuentra entre las 2.2 y 3.8 millones de especies, sin embargo sólo se ha descrito alrededor del 7% de ellas (Hawksworth y Lücking, 2017).

En este sentido, estos organismos representan una fuente importante en términos de bioprospección. Algunos metabolitos fúngicos que han sido empleados en la clínica para el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyen a la penicilina aislada en 1929 por Alexander Fleming a partir de *Penicillium chrysogenum*, el ácido fusídico de *Fusidium coccineum* o la griseofulvina de *P. griseofulvum*. Adicionalmente, algunos otros compuestos han servido como base para el desarrollo de medicamentos como la caspofungina desarrollada a partir de la pneumocandina B de *Glarea lozoyensis* y la ceftarolina a partir de la cefalosporina de *Acremonium chrysogenum* (**Figura 6**) (Butler, 2004; Xu *et al.*, 2015; Abdel-Razek *et al.*, 2020).

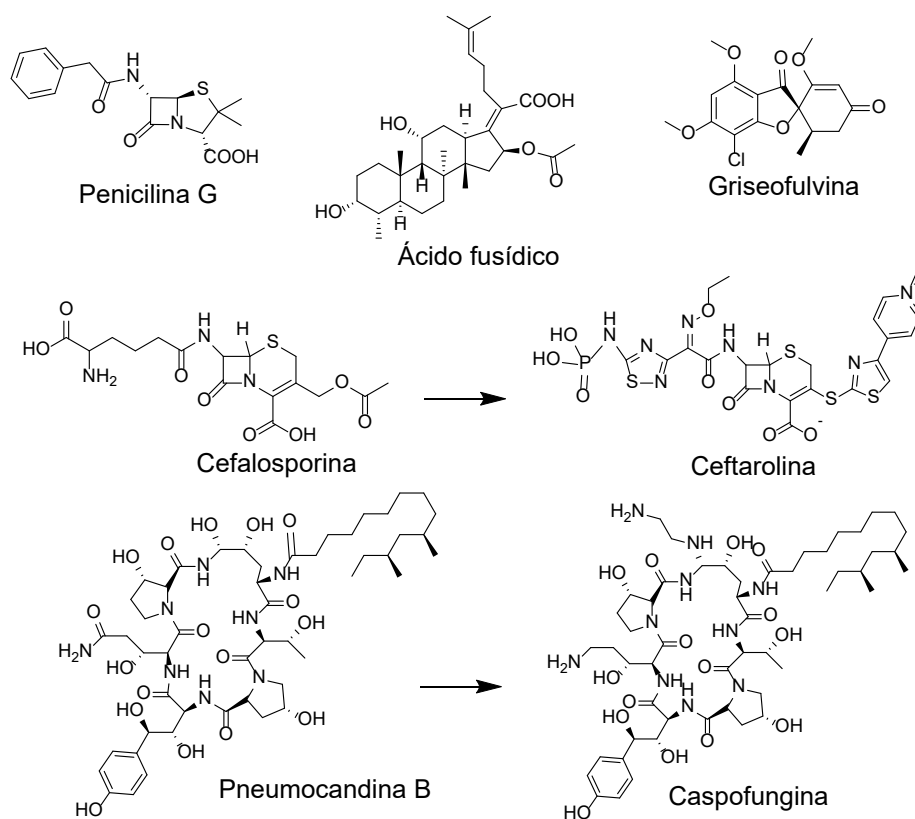


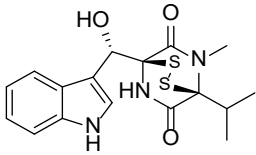
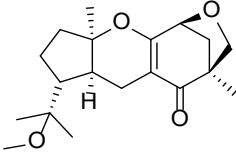
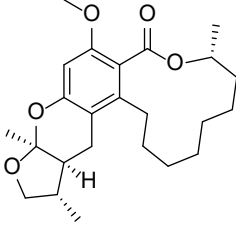
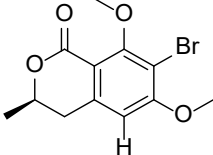
Figura 6. Antimicrobianos de origen fúngico.

1.3 Hongos endófitos y sus metabolitos

El término endófito se deriva del griego *endon* (dentro) y *phyton* (planta) y hace referencia a aquellos microorganismos que colonizan tejidos internos de las plantas en estructuras como las raíces, flores, tallos, frutos o semillas y no causan daño aparente a su hospedero formando parte del ecosistema natural de especies vegetales (Wen *et al.*, 2022; Tiwari y Bae, 2022). Los hongos endófitos, constituyen un gran porcentaje de la diversidad fúngica inexplorada a pesar de haber sido encontrados en todo tipo de plantas, siendo de mayor abundancia en ecosistemas como los bosques templados y tropicales (Rajamanikyam *et al.*, 2017; Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2021), donde se han encontrado principalmente especies pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Asteromella*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Xylaria* (Arnold y Lutzoni, 2007; Unterseher, 2011); sin embargo, la diversidad de estos organismos, puede variar de acuerdo con las condiciones ambientales o el estado fisiológico de la planta (Baron y Gigobelo, 2022). Algunas especies de endófitos pueden colonizar diversos organismos mientras que algunas otras se limitan a una sola especie o tejido vegetal (Bamisile *et al.*, 2018).

La relación establecida entre los hongos endófitos y su hospedero puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis. En el primer caso, la presencia del hongo afecta de manera positiva la fisiología de su hospedero protegiéndolo contra la invasión de herbívoros, patógenos y brindándole capacidad de adaptarse ante el estrés abiótico mediante tres mecanismos, los cuales pueden ser directos (a través de la producción de enzimas o metabolitos con actividad directa contra patógenos), indirectos (a través del incremento o inducción en la producción de mecanismos de defensa propios de la planta) o ecológicos (por la ocupación del nicho ecológico o la predación). Por otro lado, la planta provee al endófito de un hábitat y nutrientes (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2022).

Los hongos endófitos se han estudiado por más de cien años, siendo descritos por primera vez a partir de la especie *Lolium temulentum* L. en 1998 (Wen *et al.*, 2022). Uno de los mayores descubrimientos dentro de este campo de estudio fue el del hongo *Taxomyces andreanae*, endófito del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) y productor de paclitaxel, causando que los micólogos e investigadores en el área de PNs prestaran mayor atención a los organismos endófitos pues han mostrado ser capaces de producir sustancias bioactivas que en muchos casos resultan similares a las que se han aislados a partir de plantas (Tiwari y Bae, 2022). Estos compuestos poseen una amplia diversidad estructural, incluyendo alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos y compuestos fenólicos, además de presentar diversas actividades biológicas entre las que se incluyen la antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, antimalárica y antitumoral (**Cuadro 2**) Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Tan sólo entre 2011 y 2021, se reportaron 220 nuevos metabolitos producidos por estos organismos que presentaban estructuras químicas diversas o que eran exclusivas de endófitos, predominando aquellos compuestos de naturaleza terpénica (**Figura 7**) (Wen *et al.*, 2022).

Cuadro 2. Ejemplos de metabolitos bioactivos de hongos endófitos ^a				
Compuesto	Estructura	Endófito	Hospedero	Actividad
Faesfaona A		<i>Phaeosphaeria fuckelii</i>	<i>Phlomis umbrosa</i>	antifúngica
Guignardona P		<i>Guignardia mangiferae</i>	<i>Smilax glabra</i>	citotóxica
Lasiodiplactona A		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Acanthus ilicifolius</i>	inhibición de α -glucosidasa
Palmaerona C		<i>Lachnum palmae</i>	<i>Przewalskia tangutica</i>	antimicrobiana

^aWen *et al.*, 2022.

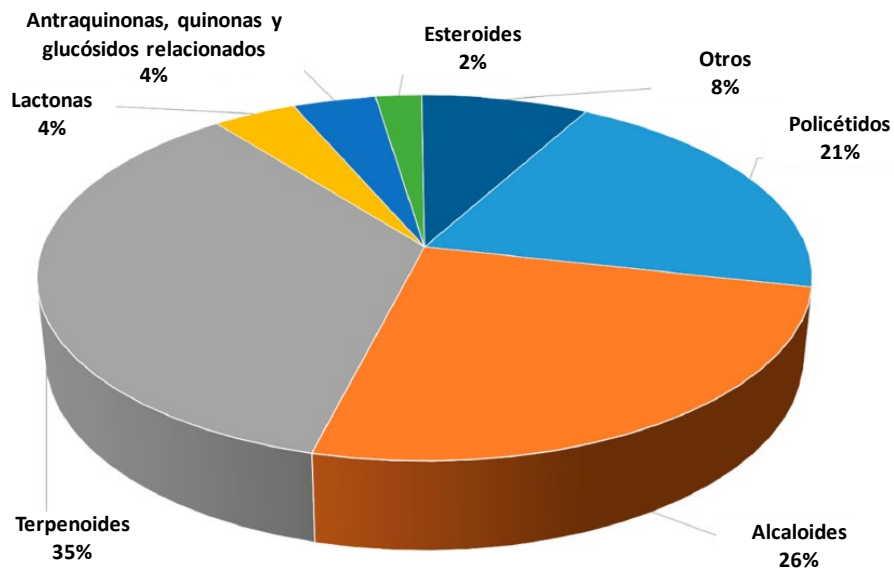


Figura 7. Diversidad estructural de metabolitos producidos por hongos endófitos.

1.4 Los manglares

Los manglares son ecosistemas intercostales que cubren entre el 60 y 70% de las zonas tropicales o subtropicales y se componen principalmente por una o varias especies de mangle. Se caracterizan por presentar condiciones de salinidad variable, mareas extremas, vientos fuertes, altas temperaturas y suelos fangosos con baja disponibilidad de oxígeno (Thatoi *et al.*, 2013; CONAFOR, 2018), condiciones que se modifican de acuerdo con el relieve, tipo de sustrato, grado de inundación y a las perturbaciones naturales y humanas presentes en el área (Ellison *et al.*, 1999).

La importancia de estos ecosistemas radica en su papel como protectores y estabilizadores de las zonas costeras, al fungir como barreras naturales que detienen la erosión, controlan inundaciones, protegen contra huracanes, retienen contaminantes, capturan carbono, además de generar nutrientes que son exportados por las mareas a las aguas marinas y son aprovechados por otros ecosistemas. Adicionalmente, los manglares representan un nicho importante para una amplia variedad de especies tanto vegetales como animales. Sin embargo, estos ecosistemas se han visto amenazados en años recientes por el desarrollo de actividades antropogénicas en las zonas costeras, provocando una disminución de alrededor de 35% de los manglares del mundo en el periodo entre los años de 1980 y 2000 (Acosta-Velázquez, 2011; Carugati *et al.*, 2018).

Alrededor del mundo existen más de 50 especies de mangle pertenecientes a 20 géneros y 16 familias, siendo el continente asiático el que alberga a la mayor cantidad de manglares del mundo (**Figura 8**) (Kathiresan y Bingham, 2001). México se encuentra entre los cinco países con mayor extensión de manglares con el 5% de la cobertura total del mundo, predominando en la región de la Península de Yucatán. Las especies que habitan en México son el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), el mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), mangle negro (*Avicennia germinans*) y mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*), todas ellas incluídas en la lista de especies protegidas. Adicionalmente, se han descrito dos especies más, *R. harrisoni* y *A. bicolor*, que se ubican únicamente en los estados de Chiapas y Oaxaca, con poblaciones muy reducidas (CONAFOR, 2018).

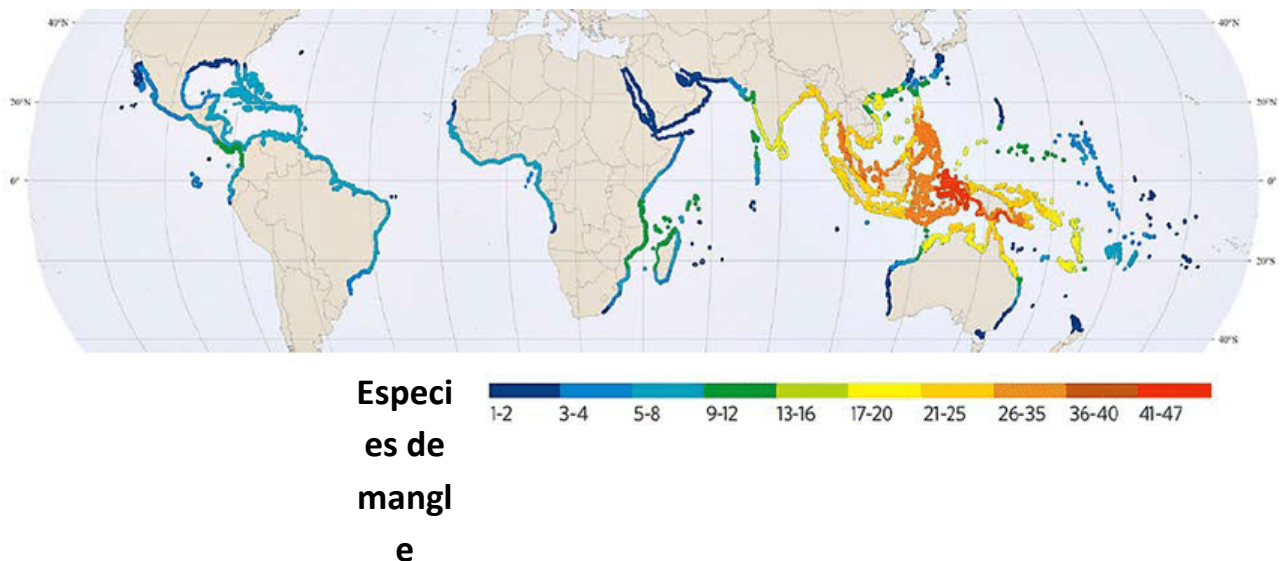


Figura 8. Distribución de manglares en el mundo.

En cuanto a la biodiversidad de los manglares en nuestro país, además de las especies de mangle mencionadas anteriormente, se encuentran algunas otras especies vegetales con menor resistencia a la salinidad, dentro de las cuales se incluyen las conocidas como zapote (*Manilkara zapota*), la palma tasiste (*Acoeraphe wrightii*), el palo de agua (*Pachira aquatica*) además de diversas especies de bromelias (*Achmaea bracteata* y *Bromelia pinguin*) y de orquídeas (*Encyclia cochleata*, *Epidendrum* spp. y *Brasavola nosada*). Por otro lado, las raíces de los manglares sirven como sustrato para especies de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), erizos y esponjas, además de especies comerciales de cangrejos (*Callinectes* spp.), camarones y langostinos (*Macrobrachium* spp.) y peces de los géneros *Arius*, *Mugil*, *Eucinostomus*, *Diapterus* y *Centropomus*. Dentro de las aves que suelen habitar en estos ecosistemas se enlistan las garzas azul, roja y morada (*Egretta caerulea*, *E. rufescens*, *E. tricolor* respectivamente) y otras especies consideradas para protección especial como la aguililla negra (*Buteogallus anthracinus*), la cigüeña (*Mycteria americana*) y el tecolotito manglero (*Megascops cooperi*). Con respecto a otras especies de fauna, se encuentran varias especies de iguanas (*Ctenosaura* spp.), cocodrilos de río (*Crocodylus acutus*) y mamíferos como los mapaches, monos y especies de jaguares (CONABIO, 2009).

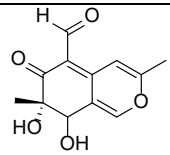
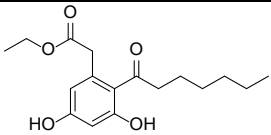
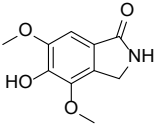
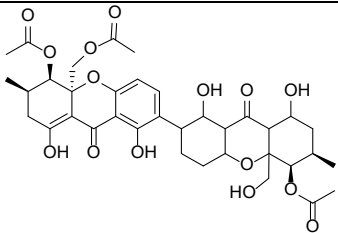
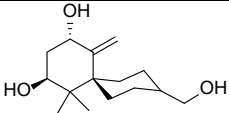
1.5 Hongos endófitos de mangle

Los microorganismos también forman parte importante del ecosistema de los manglares por su participación activa en la transformación de nutrientes en estos ambientes, donde las bacterias y los hongos representan alrededor del 91% del microbioma de los manglares, mientras que las algas y protozoarios representan el 7 y 2%, respectivamente (Thatoi *et al.*, 2013).

Con respecto a la distribución geográfica, el Océano Pacífico alberga al mayor número de hongos endófitos descritos, seguido del Océano Índico y finalmente el Atlántico (Devadatha *et al.*, 2020). Sin embargo, la diversidad de especies fúngicas que habitan en estos ecosistemas está determinada por numerosos factores, tales como la variedad de especies vegetales y la extensión del manglar, la disponibilidad de tejido para colonizar, el tiempo de exposición a las mareas, la presión hidrostática, la luz, los niveles de oxígeno, pH y los contaminantes presentes en la zona, ocasionando que la distribución vertical de endófitos en cada especie vegetal sea variable (Cheng *et al.*, 2009; Kumaresan, 2017).

Diversos estudios realizados con fines de conocer la diversidad fúngica en los manglares del mundo han mostrado que el grupo con mayor presencia es el de los Ascomicetos. Algunos géneros previamente descritos como endófitos de las diversas especies de mangle en el mundo incluyen a *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Emericella*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Hypocrea*, *Leptosphaerulina*, *Neosartorya*, *Nodulisporium*, *Nigrospora*, *Penicilium*, *Phoma*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma* y *Xylaria* (Banerjee, 2011; Cadamuro *et al.*, 2021; Kiti *et al.*, 2021)

Los hongos endófitos de manglar representan el segundo grupo más largo de hongos marinos estudiados y han resultado de gran interés en años recientes por su habilidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas del ecosistema (Cheng *et al.*, 2009; Jeewon *et al.*, 2019), lo que los convierte en candidatos idóneos para el aislamiento de metabolitos de interés farmacéutico (Imhoff, 2016; Deshmukh, *et al.*, 2020). En el **Cuadro 3** se muestran algunos ejemplos de los metabolitos aislados a partir de estas fuentes naturales.

Cuadro 3. Ejemplos de metabolitos bioactivos de hongos endófitos de mangle ^a				
Compuesto	Estructura	Endófito	Hospedero	Actividad
7-Epiaustdiol		<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Kandelia candel</i>	Antibacteriana
Citosporona B		<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Excoecaria agallocha</i>	Antifúngica
Emerimidina A		<i>Emericella</i> sp.	<i>Aegiceras corniculatum</i>	Antiviral
Dicerandrol D		<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Avicennia marina</i>	Antimalárica
Acaciicolinol D		<i>Pseudolagarobasidium acaciicola</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Citotóxica

^a Deshmukh *et al.*, 2020.

Los estudios de microorganismos endófitos de mangle se han centrado en manglares del sureste de Asia, mientras que la diversidad microbiana en manglares de América se encuentra aún inexplorada a profundidad (Demers *et al.*, 2018).

1.6 Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla en Tabasco

Ubicada al noreste del estado de Tabasco y abarcando 302,706 ha que representan el 12% de la superficie de la entidad, la Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla (RBPC) representa el área de humedales más amplia en Norteamérica, albergando uno de los sistemas hidrológicos más grandes de México donde se incluyen los ríos Usumacinta y Grijalva y la Laguna de Términos (**Figura 9**) (SEMARNAT, 2016).

Este sistema se encuentra sobre la llanura formada por los ríos mencionados anteriormente, convirtiendo a la zona en un terreno fácilmente inundable con una altitud que no rebasa los 10 m sobre el nivel del mar. El clima de la RBPC se caracteriza por ser cálido húmedo y subhúmedo con lluvias abundantes en verano, con un periodo seco entre marzo y abril y uno relativamente seco en julio y agosto, manteniendo una temperatura promedio de 25.9 °C (Carabias *et al.*, 2000).

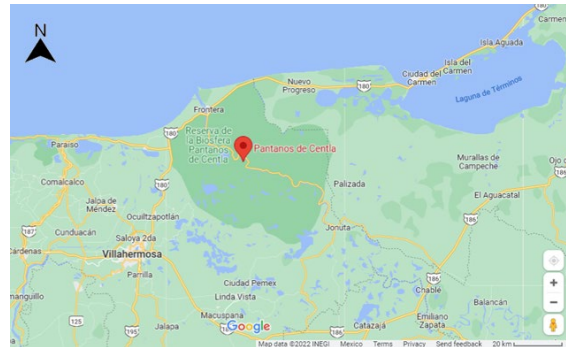


Figura 9. Ubicación geográfica de la RBPC.

La estructura del manglar en esta región se compone por elementos característicos del estado de Tabasco, encontrando en mayor cantidad ejemplares de *R. mangle* a la orilla de ríos y lagunas costeras de la Reserva. Esta especie es la que controla mejor los efectos provocados por las mareas y la alta concentración de sal y puede encontrarse asociada a otros organismos vegetales, principalmente de los géneros *Cithrexyllum*, *Dalbergia*, *Chrysobalanus* e *Inga*. Por otro lado, *A. germinans*, es la segunda especie de mayor abundancia en la zona y se establece como una línea por detrás del mangle rojo sin asociaciones con otras plantas. Finalmente *L. racemosa* y *C. erectus* se ubican en las zonas de menor salinidad (Carabias *et al.*, 2000).

Las actividades productivas que se realizan en la RBPC son la ganadería, industria del petróleo, pesca y agricultura, sin embargo son éstas mismas las principales amenazas debido al cambio de uso de suelo y la contaminación por las actividades antropogénicas, por lo que a partir del año 1992, esta región entró en la lista de áreas naturales protegidas de México (Guerra-Martínez, 2008).

A la fecha, existen diversos reportes centrados principalmente en explorar la biodiversidad de la RBPC, sin embargo, ninguno de ellos ha estudiado la comunidad microbiana, y menos aún

la diversidad de organismos fúngicos endófitos con fines de bioprospección, por lo que este trabajo representa el primer estudio de esta naturaleza.

2. HIPÓTESIS

El estudio químico de hongos endófitos de los manglares de Centla, Tabasco, seleccionados con base en estudios biológicos y de metabolómica preliminares, permitirá el descubrimiento de metabolitos secundarios con una diversidad química estructural inusual y/o con actividad antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto consiste en descubrir nuevos PNs biodinámicos a partir de especies fúngicas endófitas aisladas de manglares de los humedales de Centla, Tabasco. Para el cumplimiento de éste, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Aislar y acondicionar una serie de taxones fúngicos obtenidos a partir de muestras vegetales recolectadas en los humedales de Centla, Tabasco.
2. Identificar los hongos endófitos mediante ensayos moleculares.
3. Preparar los cultivos en pequeña escala y obtener los extractos orgánicos de cada cepa.
4. Realizar los ensayos biológicos y de metabolómica dirigida y no dirigida sobre los extractos para la selección de las especies más adecuadas para los estudios químicos biodirigidos y/o que contengan metabolitos potencialmente novedosos.
4. Cultivar en mediana escala a las especies seleccionadas y realizar el fraccionamiento, separación y purificación de metabolitos secundarios de interés mediante el empleo de técnicas de vanguardia en el área de los PNs.
5. Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales y establecer su potencial biológico con los ensayos pertinentes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento de endófitos

Los organismos fúngicos endófitos fueron obtenidos a partir de muestras de hojas de las especies *R. mangle*, *A. germinans* y *Tabernaemontana* sp., recolectadas en la región de la RBPC, en el estado de Tabasco, México. Todas las hojas, se lavaron con jabón y agua; posteriormente, se fragmentaron en cuadros de aproximadamente 0.5 cm² los cuales fueron desinfectados con alcohol al 96% (10 seg) y transferidos a un recipiente con hipoclorito de sodio al 70% (30 seg). Finalmente, los fragmentos se lavaron con agua destilada estéril y se inocularon en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) con los antibióticos penicilina (0.6 mg/mL) y estreptomycin (0.3 mg/mL) (Jena y Tayung, 2013). Una vez observado el crecimiento fúngico, los 45 organismos obtenidos se transfirieron a cajas de Petri con APD. Este trabajo fue realizado por la Dra. María del Carmen González Villaseñor, del Instituto de Biología, UNAM, en colaboración con la M. en C. Marian Ariadna López Lobato de la Facultad de Química, UNAM.

4.2 Caracterización taxonómica de los organismos fúngicos

La identificación taxonómica preliminar de los hongos estudiados se realizó mediante el análisis de las regiones del espaciador de transcripción interno del ADN ribosomal (ITS), para lo cual los organismos se cultivaron en APD; una vez observado el crecimiento del micelio, éste se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 25 mL de medio líquido YESD, compuesto por 2% peptona de soya, 2% dextrosa y 1% extracto de levadura, donde permaneció por 78 h en agitación constante (110 rpm) a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizó la extracción del ADN genómico empleando el Protocolo Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research). El ADN obtenido se empleó para realizar la amplificación de las regiones ITS por PCR empleando los iniciadores ITS-1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Raja *et al.*, 2017). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL: PureTaqTMReady-To-GoTM (General Electric) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) de acuerdo con el siguiente programa: 95°C por 5 min, 35 ciclos (94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 45 s) y 72°C por 8 min para el paso final de

elongación. Para confirmar la amplificación de dichas regiones, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al (1.2%) con el colorante SYBR Safe Stain (Invitrogen) como revelador. Los productos finales de PCR se purificaron empleando el kit SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la cantidad de ADN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un equipo BioDrop μ LITE+. Las regiones amplificadas fueron secuenciadas por el método Sanger en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los resultados de dicha secuenciación fueron analizados mediante los softwares FinchTV (versión 1.4.0) y Seaview y se realizó su análisis BLAST con las secuencias descritas en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI, EE.UU) considerando porcentajes de cobertura y similitud mayores al 95 y 80%, respectivamente. Este procedimiento se llevó a cabo en colaboración de la investigadora posdoctorante Dra. Anahí Martínez Cárdenas.

4.3 Cultivos en pequeña escala

El acondicionamiento de los 45 hongos endófitos se realizó mediante la transferencia de los organismos a cajas de Petri con APD, los cuales fueron cultivados a temperatura ambiente hasta observar un crecimiento uniforme. Posteriormente, los cultivos fueron transferidos a un medio líquido YESD (15 mL), en donde permanecieron entre 5 y 7 días a temperatura ambiente y en agitación constante (110 rpm). Cada inóculo fue transferido a un medio de arroz estéril (15 g de arroz y 30 mL de agua) por duplicado, y se dejó crecer por 21 días a temperatura ambiente con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 h (Villanueva-Silva *et.al.*,2021).

4.4 Preparación de extractos orgánicos

A partir de los cultivos obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvieron los extractos orgánicos empleando la técnica de maceración (60 mL de CHCl_3 -MeOH (1:1)), fragmentado del medio y agitación a 100 rpm por 8 h. Transcurrido este tiempo, los cultivos se filtraron al vacío y la biomasa se lavó con 50 mL de la mezcla CHCl_3 - MeOH (1:1). Al filtrado obtenido se adicionaron 60 mL de CHCl_3 y se agregó agua destilada hasta completar un volumen final de 200 mL. La mezcla se mantuvo en agitación por 30 min y posteriormente se transfirió a un embudo de separación; la fase acuosa fue sometida a un segundo reparto con 60 mL de CHCl_3 y las fases orgánicas se reunieron y concentraron a

presión reducida. El extracto seco se resuspendió en 60 mL de una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se desengrasó con 40 mL de *n*-hexano mediante un reparto. Finalmente, la fase de MeCN-MeOH (1:1) se llevó a sequedad a presión reducida (Villanueva-Silva *et.al.*,2021).

4.5 Pruebas de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de todos los extractos en pequeña escala se determinó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) contra un conjunto de microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE donde se incluyeron *E. faecalis* sensible a vancomicina (VSEF, ATCC29212), *E. faecalis* resistente a vancomicina (VREF, ATCC51299), *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA, ATCC25923), *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, ATCC43300), *K. aerogenes* (ATCC13048), *K. pneumoniae* (ATCC700603), *A. baumannii* (ATCC17978), *A. baumannii* cepa 564 resistente a distintos antibióticos, *P. aeruginosa* (ATCC27853) y *E. cloacae* (ATCC700323) (Balouri *et al.*, 2016; Fajardo-Hernández *et al.*, 2022). Los organismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM y el Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM. Como medios de cultivo se emplearon los caldos Müeller-Hinton para todos los organismos excepto *A. baumannii*, para el cual se empleó Luria Bertani. Los controles positivos empleados se presentan en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Controles positivos para el ensayo antimicrobiano.	
Microorganismo	Antibiótico
VSEF	Vancomicina
VREF	Vancomicina
MSSA	Ampicilina
MRSA	Vancomicina
<i>K. aerogenes</i> ATCC13048	Gentamicina
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	Gentamicina
<i>A. baumannii</i> ATCC17978	Gentamicina
<i>A. baumannii</i> cepa 564	Gentamicina
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Gentamicina
<i>E. cloacae</i> ATCC 700323	Gentamicina

Las muestras fueron evaluadas por duplicado a las concentraciones finales de 20 µg/mL y 200 µg/mL de extracto y 2% de DMSO. La suspensión de los microorganismos de prueba se ajustó aproximadamente a 1x10⁸ células/mL (0.5% del estándar turbidimétrico de McFarland)

(Villanueva-Silva *et al.*, 2021). Todos los microorganismos fueron incubados por 24 h a 37°C con las muestras de prueba; una vez transcurrido este tiempo se adicionaron 10 µL de la solución reveladora de MTT (5 mg/mL en MeOH) a cada pozo y la placa se incubó por 30 min más a 37°C. Los resultados se determinaron mediante el cambio de color del revelador de amarillo a morado de forma visual.

La evaluación cualitativa del potencial anti-ESKAPE de los extractos obtenidos en mediana escala, así como de las fracciones primarias se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente en este punto, con excepción de *E. faecalis* ATCC51299 debido a la pérdida de viabilidad de la cepa. Adicionalmente, se llevó a cabo la evaluación cuantitativa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano, para lo cual, la absorbancia de los pozos se leyó en un espectrofotómetro BioRad modelo iMark a una longitud de 490 y 608 nm utilizando el software Microplate Manager 6 (versión 6.3, BioRad). Posteriormente, el porcentaje de inhibición se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = 100 - \left(\frac{Abs_{células+muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{células+DMSO} - Abs_{blanco}} \times 100 \right)$$

4.6 Cultivos en mediana escala y obtención de los extractos orgánicos

Como criterios para la selección de organismos para realizar el estudio químico correspondiente se consideraron los resultados del ensayo de actividad anti-ESKAPE, la complejidad de los perfiles cromatográficos y los rendimientos obtenidos de los extractos en pequeña escala, así como la identificación taxonómica preliminar. En este sentido, se seleccionaron los organismos Centla04 y Centla05 por mostrar importante actividad antimicrobiana, así como Centla07 y Centla11 considerando la identificación taxonómica. Posteriormente, se realizaron los cultivos en escala 5x y se llevó a cabo la correspondiente obtención de extractos empleando la metodología descrita en el inciso 4.4 para los hongos Centla04, Centla05 y Centla07, en este caso preparando 10 matraces Erlenmeyer con 10 g de arroz y 20 mL de agua cada uno.

4.7 Fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala

El fraccionamiento primario de los extractos en mediana escala, así como de algunos en pequeña escala, se realizó mediante cromatografía en columna de tipo flash, en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen (Teledyne ISCO), equipado con una bomba binaria y los detectores de UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel, Teledyne) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre diferentes mezclas de *n*-hexano, CHCl₃, AcOEt y MeOH. Las condiciones empleadas para el fraccionamiento de cada extracto se presentan en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Condiciones de análisis por cromatografía de tipo flash.						
Extracto	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de equilibrio	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Volúmenes por columna (CV)
Centla04	0.36	12.0	2.0	10	30.0	54.9
Centla05	0.49	12.0	2.0	10	30.0	58.1
Centla07 (PE)	0.29	12.0	2.0	10	30.0	76.7
Centla07 (ME)	0.81	12.0	2.0	10	30.0	56.1

4.8 Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones activas y en extractos en pequeña escala

Con base en los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos en mediana escala y sus respectivas fracciones primarias, así como la complejidad observada mediante el análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítico de los extractos en pequeña escala, se seleccionaron algunas fracciones y extractos para la separación de sus componentes mediante la HPLC a nivel preparativo. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp.) equipado con un detector PDA ($\lambda_{\text{máx}}$ 190-500 nm) y otro de ELSD (ganancia 100, presión de N₂ 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de 75±5°C). El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizaron empleando el programa Empower versión 3.0 (Waters). La obtención de los perfiles cromatográficos y la optimización de las condiciones analíticas para la separación y purificación de los constituyentes presentes en las muestras, se realizó en columnas Kinetex y Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 4.6 mm,

Phenomenex) y con una fase móvil compuesta por ácido fórmico acuoso (0.1%) y MeCN y diferentes gradientes. Una vez establecidas las condiciones óptimas con una resolución tal que permitiera el aislamiento de los compuestos presentes en las fracciones, se escaló el sistema de análisis a nivel preparativo empleando columnas Kinetex o Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 21.2 mm, Phenomenex).

4.9 Caracterización de los productos obtenidos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, mono- y bidimensionales (1D y 2D) se registraron en los equipos VARIAN VNRMS 400, Bruker Avance III o JEOL ECA-500. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y se empleó CDCl₃ como disolvente para los registros. Los espectros de masas (MS) se registraron en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (UPLC; Acquity, Waters) con detector de PDA, acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución de ionización por electrospray (HRESIMS-MS/MS; Q Exactive, ThermoFisher Scientific) en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-). Todos los análisis se registraron a una temperatura de 40°C empleando una columna Acquity BEH C₁₈ (1.7 µm, 2.1 × 10 mm, Waters) y una mezcla binaria de MeCN (A)-ácido fórmico (0.1%) (B), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% A e incrementando la composición hasta 100% A durante 8 min, manteniendo composición isocrática por 1.5 min y regresando a condiciones iniciales en 0.5 min. La detección se realizó mediante un barrido desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm. Las condiciones del espectrómetro de masas en ESI+ fueron: temperatura del capilar: 275°C y 4.5 kV de voltaje para la fuente, 20 V para el voltaje del capilar y 95 V para la lente del tubo; y en ESI-: temperatura del capilar: 275°C y 3.5 kV de voltaje para la fuente, 42 V para el voltaje del capilar y 110 V para la lente del tubo. Se empleó N₂ como gas acarreador a 25 unidades arbitrarias de flujo, y el control del instrumento y el análisis de datos se realizaron con el programa Xcalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific). Para cada uno de los análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de Dioxano- MeOH (1:1).

El registro de los espectros de RMN y MS se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM, el Instituto de Química, UNAM y en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

4.10 Estudios de metabolómica mediante análisis de redes moleculares

Para complementar el estudio de la diversidad química de las especies seleccionadas, se realizó el análisis de los extractos obtenidos mediante la construcción de redes moleculares, para lo cual, los archivos de espectros de masas de alta resolución (HRESIMS-MS/MS) fueron comparados con los depositados en la plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS; www.gnps.ucsd.edu). Previamente, los archivos fueron convertidos a formato mzML empleando el software ProteoWizard MsConvert (3.0.20239). Para dicho análisis, la tolerancia empleada para la masa de iones precursores y de iones fragmentados se ajustó a 0.01 y 0.02 Da, respectivamente (Martínez-Cárdenas *et al.*, 2021).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de especies fúngicas aisladas de áreas poco exploradas de México y tiene como objetivo contribuir al conocimiento científico de la diversidad fúngica endófito de manglares en la RBPC en Tabasco, México. En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos del acondicionamiento de los organismos objeto de estudio, así como de su identificación taxonómica preliminar y de la evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala. Posteriormente, se describirán los resultados correspondientes al estudio químico de las especies fúngicas seleccionadas.

5.1 Acondicionamiento y cultivo de los organismos fúngicos

Se realizó la resiembra en condiciones axénicas de 45 organismos fúngicos endófitos (**Cuadro 6**) aislados de las especies *R. mangle*, *A. germinans* y *Tabernaemontana* sp. colectadas en la RBPC, en el estado de Tabasco, México La ubicación exacta donde se obtuvieron las especies vegetales es 18° 36' 45.2" N, 92° 41' 3.3" O (**Figura 10**). Todos los organismos fueron cultivados en cajas Petri con APD, a partir de los cuales se realizaron los preinóculos en medio YESD y subcultivo en pequeña escala en medio sólido para la obtención de los extractos orgánicos correspondientes (**Figura 11**).

Cuadro 6. Hongos endófitos objeto de estudio con fuente vegetal.			
Clave interna	Especie vegetal	Clave interna	Especie vegetal
Centla01a	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla20b	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla01b	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla21	<i>Avicennia germinans</i>
Centla02	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla22	<i>Tabernaemontana</i> sp.
Centla03	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla23	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla04	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla24	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla05	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla25a	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla06	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla25b	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla07	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla25c	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla08a	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla26	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla08b	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla27	<i>Tabernaemontana</i> sp.
Centla09	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla28	<i>Tabernaemontana</i> sp.
Centla10	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla29	<i>Tabernaemontana</i> sp.

Centla11	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla30	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla12	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla31a	<i>Tabernaemontana</i> sp.
Centla13	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla31b	<i>Tabernaemontana</i> sp.
Centla14	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla32	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla15	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla33	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla16	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla34	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla17	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla35	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla18	<i>Tabernaemontana</i> sp.	Centla36	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla19a	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla37	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla19b	<i>Rhizophora mangle</i>	Centla38	<i>Rhizophora mangle</i>
Centla20a	<i>Rhizophora mangle</i>		



Figura 11. Ejemplo de cultivos fúngicos en medio APD (**A**; 5 días) y de arroz (**B**; 21 días).

5.2 Identificación molecular preliminar de los hongos endófitos

La identificación taxonómica preliminar de los organismos fúngicos se llevó a cabo mediante el análisis de las regiones ITS del ADN ribosomal, las cuales fueron comparadas con la base de datos del GenBank mediante un análisis tipo BLAST. Los organismos provenientes de *R. mangle*, fueron identificados en su mayoría como especies del género *Fusarium*. Adicionalmente se encontraron taxones de los géneros *Hortaea* y en menor proporción de *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Leptosphaerulina*, *Lophiostoma*, *Pestalotiopsis*, *Celoporthe*,

Curvularia y *Penicillium*. Por otro lado, de *A. germinans* se aisló únicamente un hongo el cual fue identificado dentro del género *Paraphoma*. Finalmente, como endófitos de la especie *Tabernaemontana*, se identificaron organismos de los géneros *Colletotrichum*, *Neoanthostomella*, *Fusarium* y dos hongos de la familia Didymellaceae (**Cuadro 7**).

Estos resultados coinciden con las descripciones previas de la diversidad de endófitos en estos géneros de mangle y en especies de *Tabernaemontana* (Wanderley-Costa, *et al.*, 2012; De Souza-Sebastianes *et al.*, 2013; Zhou y Xu, 2018; Bhavana *et al.*, 2020).

Cuadro 7. Resultados de la identificación taxonómica preliminar de los hongos endófitos de manglar					
Clave interna	Resultado BLAST	Consenso seq (bp)	% de cobertura	Número de acceso de referencia	% de similitud/identidad
Centla01a	<i>Leptosphaerulina</i> sp.	574/645	95%	MK336534.1	88.99%
Centla01b	<i>Fusarium</i> sp.	585/585	99%	MK334366.1; MN882828.1	99.80% con <i>F. equiseti</i> y <i>F. incarnatum</i>
Centla03	<i>Fusarium</i> sp.	574/574	99%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.80% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla04	<i>Fusarium</i> sp.	546/546	99%	KY523100.1; MH879584.1; KX929311.1	99.80% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla05	<i>Fusarium</i> sp.	573/574	99%	KY523100.1; MH879584.1; KX929311.1	99.80% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla06	<i>Fusarium</i> sp.	586/589	99%	KY523100.1; MN882828.1	99.49% con <i>F. equiseti</i> y 98.98% con <i>F. incarnatum</i>
Centla07	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	591/601	97%	KU304335.1	98.34%
Centla08a	<i>Hortaea</i> sp.	571/574	99%	FJ755827.1	99.48%
Centla08b	<i>Hortaea</i> sp.	570/574	97%	FJ755827.1	99.30%
Centla09	<i>Fusarium</i> sp.	574/575	97%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.80% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla10	<i>Fusarium</i> sp.	585/589	99%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.80% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla11	<i>Leptosphaerulina</i> sp.	573/645	95%	MK336534.1	88.84%
Centla12	<i>Fusarium</i> sp.	572/573	99%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.80 con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla13	<i>Fusarium</i> sp.	574/574	99%	MT558597.1; MN882829.1; KX515859.1	99.48% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla14	<i>Fusarium</i> sp.	576/577	99%	MT558597.1; MN882829.1; KX515859.1	99.48% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla15	<i>Fusarium</i> sp.	587/587	99%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.83% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla16	<i>Fusarium</i> sp.	586/587	99%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.83% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla17	<i>Fusarium</i> sp.	587/587	99%	KY523100.1; MN882828.1; MH574897.1	99.83% con <i>F. equiseti</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>F. verticillioides</i>
Centla18	Didymellaceae	579/583; 566/570	95-99%	MW036299.1; GU592001.1	99.31% con <i>Allophoma</i> sp. y 99.30% con <i>Didymella bryoniae</i>
Centla19a	<i>Hortaea</i> sp.	571/575	97%	FJ755827.1	99.30%
Centla19b	<i>Hortaea</i> sp.	581/588	99%	FJ755827.1	98.81%
Centla20a	<i>Hortaea</i> sp.	563/565	97%	FJ755827.1	99.13%
Centla21	<i>Paraphoma</i> sp.	585/647	89%	LR993310.1	Alinea 99.3% con <i>Paraphoma fimeti</i>

Centla22	<i>Fusarium</i> sp.	587/590	99%	MT771309.1	99.3%
Centla23	<i>D. eschscholtzii</i>	600/611	98%	KU304335.1	98.20%
Centla24	<i>D. eschscholtzii</i>	605/617	99%	KU304335.1	98.06%
Centla25a	<i>Fusarium</i> sp.	571/575	97%	MK733980.1	99.3%
Centla25b	<i>Colletotrichum</i> sp.	588/590	95%	MT434660.1; MK790660.1	99.66% con <i>C. siamense</i> y <i>C. tropicale</i>
Centla25c	<i>Colletotrichum</i> sp.	608/618	99%	MK514508.1; KR445673.1	98.54% con <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. siamense</i>
Centla26	<i>Lophiostoma</i> sp.	509/522	87%	LC412114.1	97.51%
Centla27	<i>Didymellaceae</i>	578/584	98%	MW036299.1; MF580997.1	98.97% con <i>Allophoma</i> sp. y 99.64% <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
Centla28	<i>Fusarium</i> sp.	586/589	99%	HQ631005.1	99.49%
Centla29	<i>Neanthostomella</i> sp.	564/580	94%	NR174847.1	97.00%
Centla30	<i>Fusarium</i> sp.	580/589	97%	HQ631005.1	98.96%
Centla31a	<i>Colletotrichum</i> sp.	613/617	99%	MT476807.1; MK514517.1; OM967141.1	99.35% con <i>C. aenigma</i> , <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. siamense</i>
Centla31b	<i>Colletotrichum</i> sp.	611/617	99%	MT476807.1; OM967141.1	99.03% con <i>C. aenigma</i> y <i>C. siamense</i>
Centla32	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	582/592	100%	MT093657.1	98.31%
Centla33	<i>Celoporthe eucalypti</i>	613/743	94%	MH864462.1	82.5%
Centla34	<i>Curvularia hawaiiensis</i>	609/617	100%	MN053866.1	98.70%
Centla35	<i>Fusarium</i> sp.	570/576	97%	MT771309.1	98.96%
Centla36	<i>Colletotrichum</i> sp.	629/636	98%	KX578794.1; MF670585.1; JX258679.1	98.36% con <i>C. karstii</i> , <i>C. boninense</i> y <i>C. gloeosporioides</i>
Centla37	<i>Penicillium rubens</i>	611/614	97%	MT957547.1	99.51%
Centla38	<i>Fusarium</i> sp.	586/591	97%	MK733980.1	99.15%

5.3 Evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos

El potencial anti-ESKAPE de los extractos obtenidos en pequeña escala, así como de los exudados producidos por los hongos Centla07, Centla09, Centla10 y Centla17, se estableció mediante el ensayo descrito en el inciso 4.5. Como criterio de actividad se consideró la inhibición parcial o total de las muestras en cualquiera de las concentraciones evaluadas, en al menos uno de los microorganismos de prueba. Los extractos de los hongos Centla04 y Centla05 mostraron una importante actividad sobre los organismos Gram (+). Adicionalmente, algunos otros extractos mostraron inhibición parcial a 200 µg/mL sobre MRSA y VSEF, tal como se muestra en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Resultados del potencial anti-ESKAPE de los extractos en pequeña escala.									
Extracto	Peso (mg)	VSEF	MRSA	MSSA	Extracto	Peso (mg)	VSEF	MRSA	MSSA
Centla01a	173.1				Centla20b	24.0			
Centla01b	214.6				Centla21	76.0			
Centla02	119.5				Centla22	58.9			
Centla03	305.8				Centla23	246.9			
Centla04	226.4				Centla24	215.8			
Centla05	151.7				Centla25a	252.4			
Centla06	352.6				Centla25b	179.4			
Centla07	311.2				Centla25c	148.5			
Centla08a	66.0				Centla26	224.5			
Centla08b	47.0				Centla27	83.7			
Centla09	281.1				Centla28	150.2			
Centla10	379.1				Centla29	114.2			
Centla11	113.6				Centla30	36.6			
Centla12	99.1				Centla31a	121.7			
Centla13	397.7				Centla31b	72.4			
Centla14	113.2				Centla32	90.0			
Centla15	81.0				Centla33	18.6			
Centla16	277.5				Centla34	40.7			
Centla17	333.8				Centla35	48.7			
Centla18	141.1				Centla36	35.4			
Centla19a	90.7				Centla37	88.6			
Centla19b	70.8				Centla38	83.6			
Centla20a	29.4								
Control positivo CMI (µg/mL)		3.75	1.25	100.0					
Ningún extracto presentó actividad contra VREF, <i>K. aerogenes</i> (ATCC13048), <i>K. pneumoniae</i> (ATCC700603), <i>A. baumannii</i> (ATCC17978), <i>A. baumannii</i> cepa 564, <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853) o <i>E. cloacae</i> (ATCC700323).									
Criterios de inhibición									
	Inhibición total a 200 µg/mL y 20 µg/mL de extracto					Inhibición parcial a 200 µg/mL y 20 µg/mL de extracto			
	Inhibición total a 200 µg/mL de extracto					Inhibición parcial a 200 µg/mL de extracto			
	Sin actividad								

5.4 Estudio químico de *Fusarium* spp. (Centla04 y Centla05)

5.4.1 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario

Con base en los resultados de la actividad antimicrobiana (**Cuadro 8**) se seleccionaron a los organismos *Fusarium* spp. (Centla04 y Centla05) para continuar con su estudio químico (**Figura 12**).

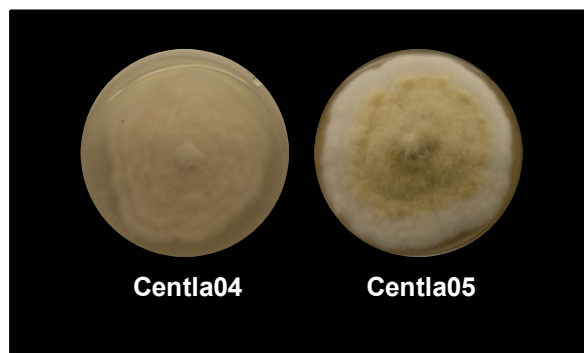


Figura 12. Cultivos en medio APD de *Fusarium* spp. (Centla04 y Centla05).

El género *Fusarium*, compuesto por casi 10 mil especies, es uno de los más importantes y mejor conocidos debido a su amplia distribución alrededor del mundo (Summerell et al., 2010). Algunos organismos pertenecientes a este género han sido descritos como patógenos de plantas como el maíz, trigo, plátano, jitomate y mango, entre otros, además de ser productores de metabolitos secundarios con gran diversidad química estructural y actividades biológicas, por lo que han sido ampliamente estudiados a lo largo de los años dado su impacto económico y en temas de salud. Algunos ejemplos de estos productos bioactivos son la fusanolona B, que tiene actividad contra *Vibrio parahaemolyticus*; la sonaninaftoquinona, un agente citotóxico contra diversas líneas celulares; la fusariumina B y el fusopoltido A, descritos con actividad antiinflamatoria; la esclerotiamida B que posee actividad insecticida; y la beauvericina K y el fusaristerol A, que actúan contra *Candida albicans* (**Figura 13**) (Toghueo, 2020, Wei y Wu, 2020).

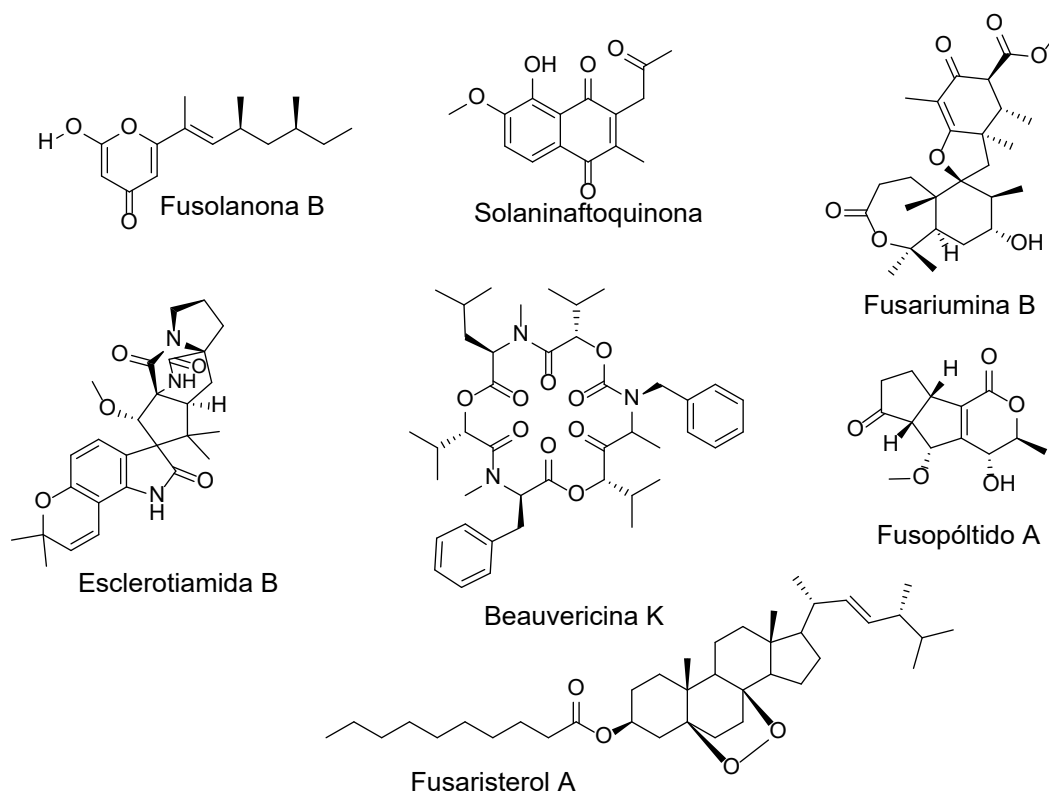


Figura 13. Ejemplos de metabolitos producidos por *Fusarium* spp.

Una vez preparados los extractos orgánicos de los cultivos en mediana escala de ambos organismos (**Cuadro 9**), de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 4.4, se realizó el fraccionamiento primario obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 14** y el **Cuadro 10**.

Cuadro 9. Rendimiento de los extractos orgánicos en mediana escala.	
Organismo	Cantidad (mg extracto/100g de arroz)
<i>Fusarium</i> sp.(Centla04)	384.1
<i>Fusarium</i> sp. (Centla05)	514.6

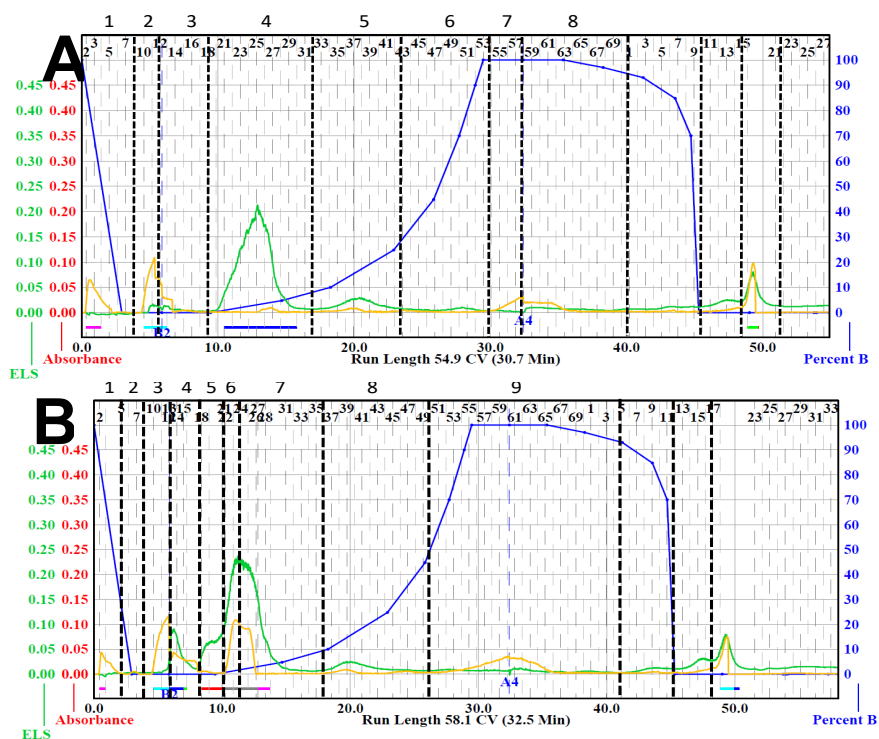


Figura 14. Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash de los extractos de los hongos *Fusarium* spp. Centla04 (A) y Centla05 (B). Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELSD y PDA, respectivamente, y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl₃-AcOEt-MeOH).

Centla04		Centla05	
Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
1 (1-8)	1.2	1 (1-4)	1.1
2 (9-11)	1.7	2 (5-8)	1.0
3 (12-17)	4.7	3 (9-12)	0.9
4 (18-31)	117.6	4 (13-17)	13.3
5 (32-42)	31.1	5 (18-21)	36.8
6 (43-53)	26.3	6 (22-23)	64.2
7 (54-57)	8.2	7 (24-35)	102.1
8 (58-69)	21.7	8 (36-49)	40.7
9 (70-79)	17.3	9 (50-74)	77.0
10 (80-84)	30.6	10 (75-81)	17.5
11 (85-92)	52.6	11 (82-86)	33.5
12 (93-97)	3.9	12 (87-103)	70.4
Cantidad recuperada	316.9 (87.1%)	Cantidad recuperada	458.5 (93.2%)

5.4.2 Evaluación biológica de extractos en mediana escala y fracciones primarias

Una vez realizado el fraccionamiento primario de los extractos en escala 5x, se llevó a cabo la evaluación del potencial anti-ESKAPE de los extractos y sus fracciones primarias empleando el mismo ensayo descrito previamente. Como criterio de inclusión en los ensayos se consideró un peso mínimo de 3.0 mg para las fracciones. Los resultados cualitativos y cuantitativos de esta evaluación se presentan en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11. Extractos y fracciones activas contra bacterias ESKAPE.*						
Organismo	Extracto o fracción	% inhibición				VSEF
		MRSA		MSSA		
		200 µg/mL	20 µg/mL	200 µg/mL	20 µg/mL	
Centla04	Extracto	100	88.8	93.2	74.8	
	F3	60.8	54.1	43.1	23.9	
	F4	72.8	64.1	79.1	47.8	
	F5	100	98.2	94.6	97.8	
	F6	100	98.0	91.6	88.5	
	F7	42.3	32.3	56.1	37.9	
	F8	100	55.6	97.7	40.0	
	F9	100	74.4	97.2	57.9	
	F10	100	100	97.3	96.3	
	F11	100	100	98.4	97.4	
	F12	68.4	63.8	53.1	44.0	
	Centla05	Extracto	99.9	97.8	96.4	96.1
F4		41.4	13.6	61.0		
F5		65.6	23.6	76.7	40.0	
F6		100	83.6	97.4	88.6	
F7		100	83.0	96.8	86.4	
F8		100	93.4	97.9	72.0	
F9		93.6	33.1	94.0	51.9	
F10		100	21.1	91.8	29.1	
F11		100	70.6	93.8	93.2	
F12		100	100	98.1	96.9	
	Control positivo CMI (µg/mL)	2.5		400.0		3.7
*No se observó actividad de ningún extracto o fracción sobre <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853), <i>K. aerogenes</i> (ATCC 13048), <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603) o <i>E. cloacae</i> (ATCC 700323).						
Criterios de inhibición						
	Inhibición >90%				Inhibición total a 200 µg/mL de extracto	
	Inhibición total a 200 µg/mL y 20 µg/mL de extracto				Inhibición parcial a 200 µg/mL de extracto	
	Sin actividad					

5.4.3 Separación y purificación de los componentes mayoritarios

El análisis por HPLC de los extractos de los hongos Centla04 y Centla05, reveló una gran similitud entre ellos (**Figura 15**), por lo que se decidió continuar con el aislamiento de los metabolitos a partir de la especie Centla05.

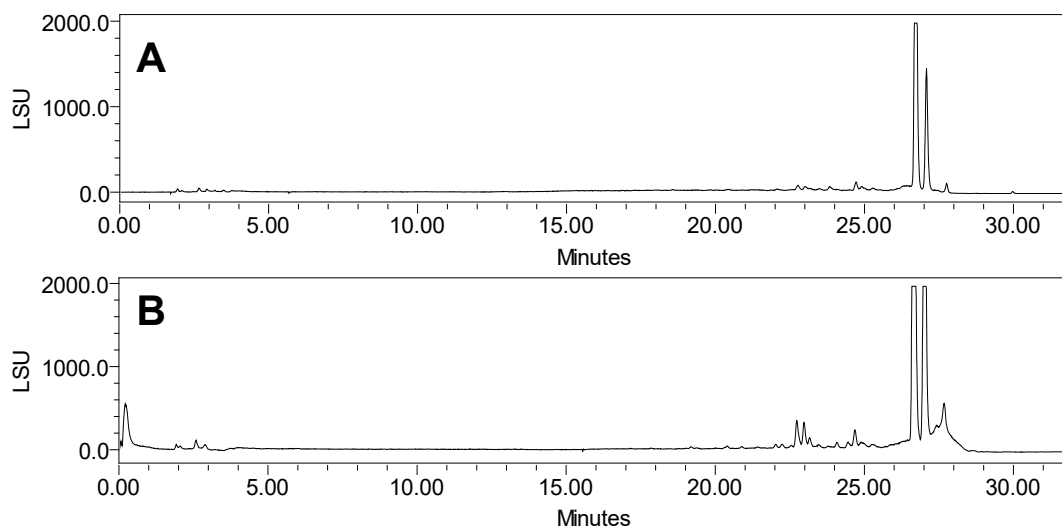


Figura 15. Comparación de perfiles cromatográficos por ELSD de los extractos de *Fusarium* sp. (Centla04 (**A**) y Centla05 (**B**)). Gradiente de elución: isocrático 5 min 15% de MeCN, gradiente 15 a 100% de MeCN en 15 min, 5 min 100% MeCN (en ácido fórmico acuoso 0.1%) e isocrático 7 min 15% MeCN; tiempo de corrida, 32 min; flujo, 1 mL/min; columna Kinetex.

Con base en los resultados de la evaluación del potencial antimicrobiano de las fracciones primarias, se seleccionaron aquellas que presentaron mayor actividad para su análisis por HPLC a nivel analítico y la separación de los metabolitos mediante HPLC a nivel preparativo. A partir de dicho análisis se seleccionó a la fracción F₇ para el aislamiento de los compuestos **1** (9.0 mg, $t_R=8.8$ min) y **2** (12.4 mg, $t_R=9.7$ min) (**Figura 16**).

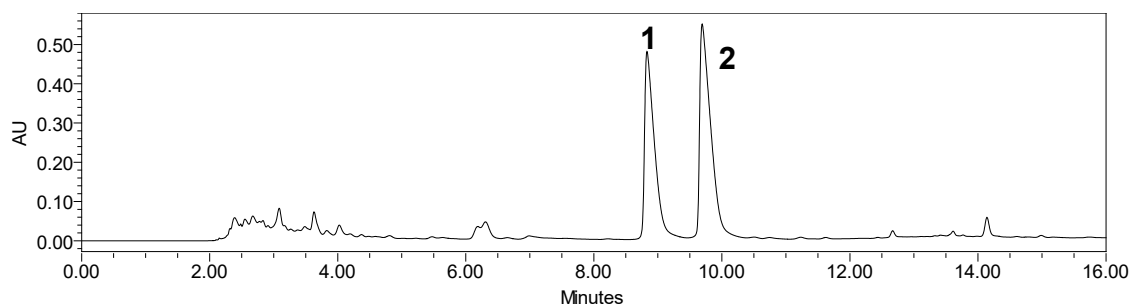


Figura 16. Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla05-F₇ (PDA 254 nm). Gradiente de elución: 30% ácido fórmico acuoso (0.1%) y 70% MeCN a 100% MeCN en 10 min, flujo de 21.24 mL/min; columna Kinetex.

5.4.4 Caracterización de los compuestos 1 y 2

La fórmula molecular de tanto de **1**, como de **2**, se estableció como C₂₂H₃₁NO₄ con base en los iones en m/z 374.2325 [M+H]⁺ y 372.2180 [M-H]⁻ (calculado para C₂₂H₃₂NO₄, $\Delta=-0.2$ ppm, IDH=8) obtenidos por HRESIMS (**Figura 17**).

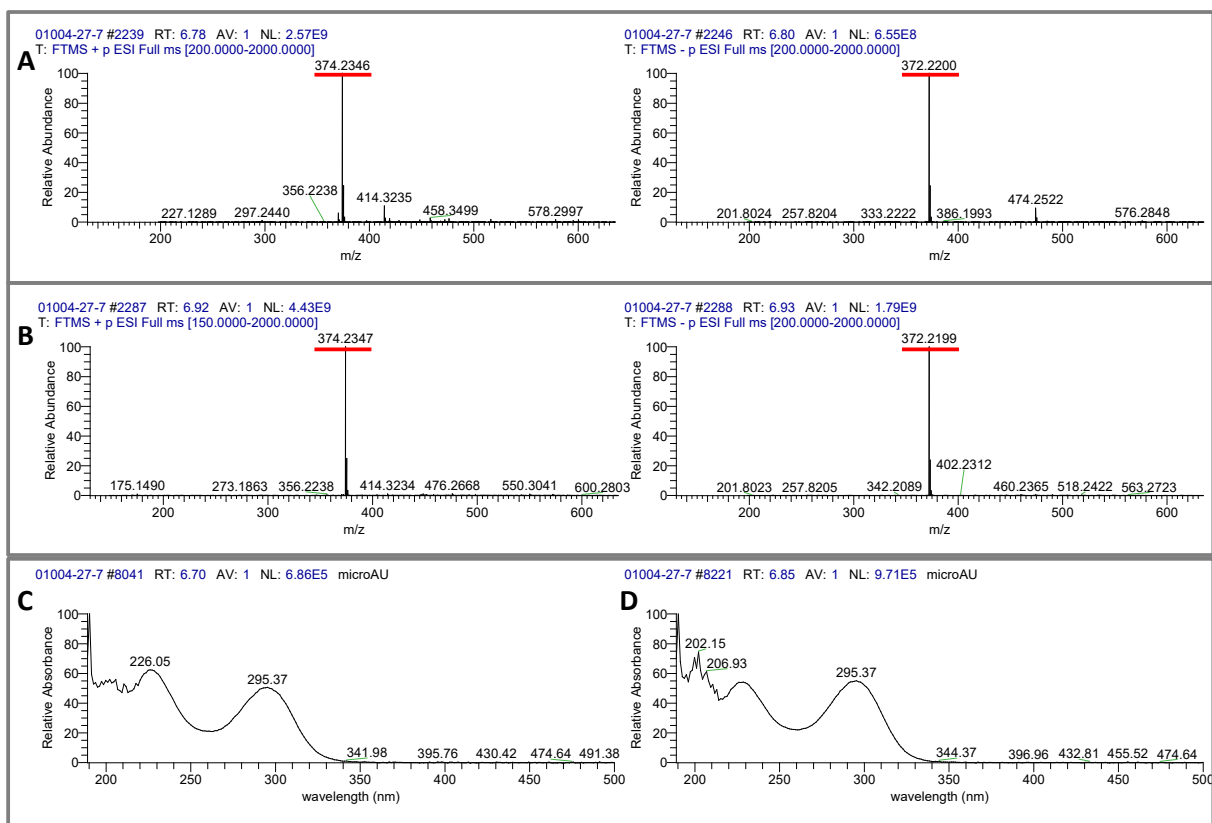


Figura 17. Espectros en ESI⁺ (izquierda) y ESI⁻ (derecha) de los compuestos **1** (A), **2** (B) y en el UV de **1** (C) y de **2** (D).

El análisis detallado de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (**Figuras 18 y 19 y Cuadro 12**) permitió identificar los siguientes grupos de señales:

- En δ_{H} 3.63 (dd, $J= 4.5, 4.5$), 5.19 (s), 5.26 (m) y 5.40 (s), se observaron señales atribuibles a protones vinílicos H-5, H-14, H-13 y H-4, respectivamente.
- En δ_{H} 0.89 (m), 1.05 (m), 1.11 (dddd, ($J=12.1, 12.1, 12.1, 3.2$), 1.80 (m), 1.97 (m), 3.88 (m) y 4.02 (d, $J=11.5$) señales de cuatro grupos metileno (H-7, H-9, H-10 y H-6').
- En δ_{H} 3.05 una señal simple de un $N\text{-CH}_3$ en la posición 7'.
- En δ_{H} 1.50 (m), 1.68 (m), 1.82 (m), 3.33 (brs), 3.63 (dd, $J=4.5, 4.5$), y un grupo de señales atribuibles a los metinos H-8, H-11, H-6, H-3, H-5'.
- Tres señales de grupos metilo H-16, H-12 y H-15 con desplazamientos en δ_{H} 0.92 (d, $J= 6.5$), 1.45 (s) y 1.54 (d, $J= 5.8$) respectivamente.
- En δ_{C} 199.3 (C-1), 190.7 (C-4') y 177.3 (C-2') tres señales correspondientes a tres carbonos base oxígeno.
- Cuatro señales en δ_{C} 131.1 (C-14), 130.1 (C-4), 127.2 (C-13), 126.7 (C-5) atribuibles a cuatro carbonos de tipo vinílico.
- Una señal atribuible a un carbono vinílico en posición alfa a un carbonilo (C-3') en δ_{C} 100.1.
- Un conjunto de señales de metinos en δ_{C} 66.8 (C-5'), 48.9 (C-2), 45.1 (C-3), 40.1 (C-11) y 38.8 (C-6).
- En δ_{C} 60.6 (C-6'), 42.4 (C-7), 35.8 (C-9) y 28.4 (C-10) cuatro señales de cuatro grupos metileno
- En δ_{C} 27.5 (C-7'), 22.6 (C-16), 18.1 (C-15) y 14.1 (C-12) se observaron señales de cuatro grupos metilo dentro de la molécula.

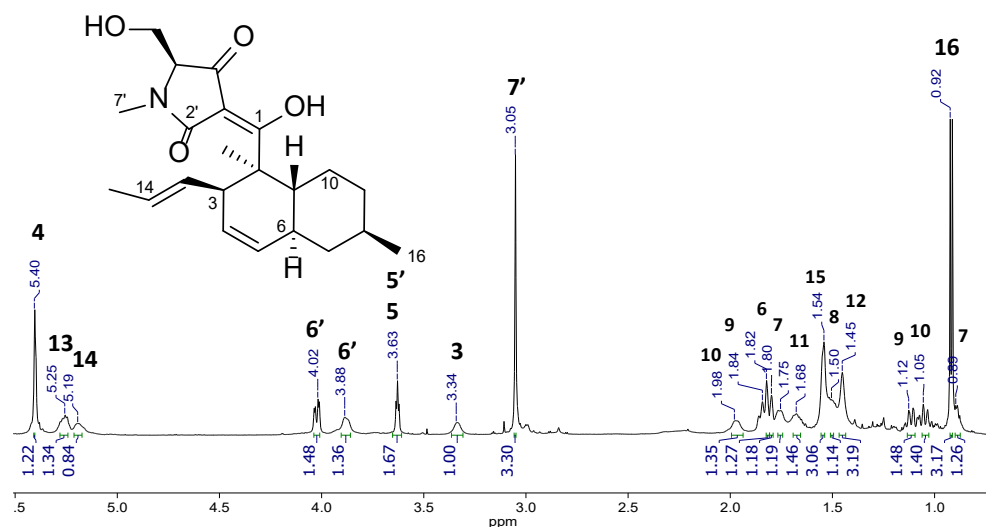


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de la equisetina (1) (600 MHz, CDCl_3).

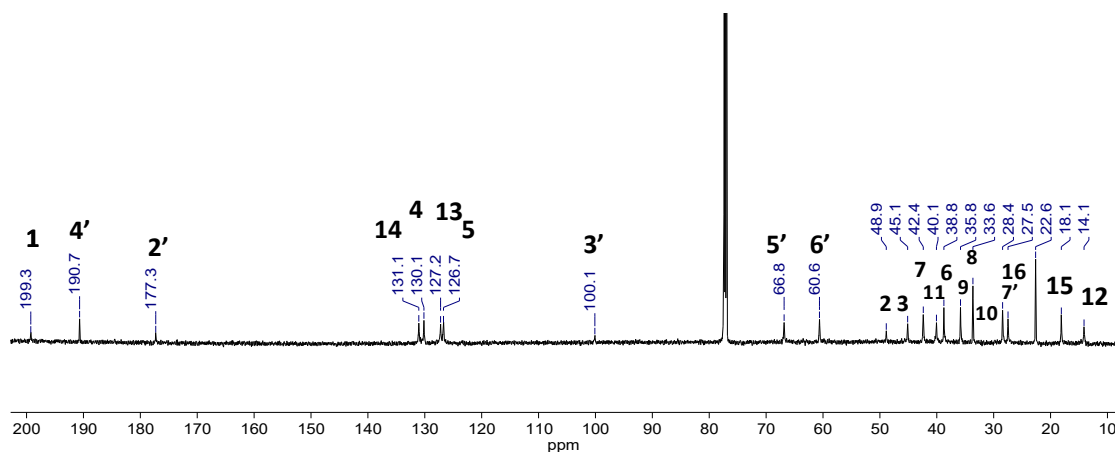


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C de la equisetina (1) (150 MHz, CDCl_3).

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 600 MHz, ^{13}C , 150 MHz) de la equisetina (1) y <i>epi</i> -equisetina (2)							
Posición	1 ^a		Equisetina ^b		2 ^a		Epi-equisetina ^c
	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)	δ_H , mult. (J en Hz)
1	199.3		199.3		199.1		
2	48.9		49.0		48.8		
3	45.1	3.33, sa	45.2	3.32, sa	45.0	3.35	
4	130.1	5.40, s	130.2	5.36, m	130.0	5.40, sa	5.44-5.40, m
5	126.7	3.63, dd (4.5, 4.5)	126.8	3.61, dd (4.0, 4.0)	126.7	3.66, s	
6	38.8	1.82, m	38.8	1.82, m	38.6	1.81, m	2.00-1.75, m
7	42.4	0.89, m 1.80, m	42.4	0.88, m 1.79, m	42.4	0.89, s 1.81, m	0.93-0.85, m 2.00-1.75, m
8	33.6	1.50, m	33.7	1.48, m	33.6		
9	35.8	1.11, dddd (12.1, 12.1, 12.1, 3.2)	35.9	1.09, dddd (12.5, 12.5, 12.5, 3.5)	35.8	1.07, m 1.81, m	2.00-1.75, m 1.17-1.05, m

		1.97, m		1.96, m			
10	28.4	1.05, m 1.97, m	28.5	1.04, m 1.96, sa	28.4	1.07, m 1.81, m	2.00-1.75, m 1.17-1.05, m
11	40.1	1.68, m	40.1	1.66, m	40.0	1.81, m	2.00-1.75, m
12	14.1	1.45, s	14.2	1.43, sa	14.2	1.47, s	1.52, s
13	127.2	5.26, m	127.3	5.23, m	127.1	5.25, m	5.25, m
14	131.1	5.19, m	131.1	5.18, m	131.0	5.17, m	5.17, m
15	18.1	1.54, d (5.8)	18.2	1.52, da (4.6)	18.0	1.53, d (8.0)	1.52, d (7.0)
16	22.6	0.92, d (6.5)	22.7	0.90, d (6.3)	22.6	0.92, d (6.5)	0.95, d (6.0)
2'	177.3		177.4		177.1		
3'	100.1		100.2		100.4		
4'	190.7		190.7		190.9		
5'	66.8	3.63, dd (4.5, 4.5)	66.9	3.61, dd (4.0, 4.0)	66.3	3.66, s	
6'	60.6	3.88, m 4.02, d (11.5)	60.7	3.85, da (8.0) 4.01, da (10.8)	60.4	4.05, d (8.9) 3.83, d (8.8)	3.86, d (9.6) 3.85, d (9.6)
7'	27.5	3.05, s	27.5	3.03, s	27.6	3.04, s	3.02, s

^aCDCl₃ y δ en ppm; ^bKato *et al.* (2015); ^cChen *et al.* (2021).

El análisis de los espectros antes descritos, así como la revisión en la literatura, permitieron identificar al compuesto **1** como la equisetina (**Figura 20**) (Kato *et al.*, 2015). Este producto natural, fue por primera vez descrito en 1979 como un metabolito producido por la especie *F. equiseti*, el cual ha mostrado actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *S. aureus*, MRSA, enterococos resistentes a vancomicina y *Neisseria perflava* así como actividad inhibitoria del quórum sensing de *P. aeruginosa* (Vesonder *et al.*, 1979; Ratnaweera *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2021), además de antiparasitaria contra *Trypanosomabrucei* (Patham *et al.*, 200). Adicionalmente, este compuesto derivado del ácido tetrámico fue descrito como un inhibidor de la enzima VIH-integrasa (Singh *et al.*, 1998).

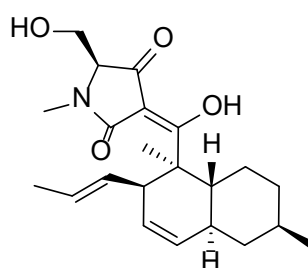


Figura 20. Estructura química de la equisetina (**1**).

Por otro lado, el análisis de RMN de ¹H del compuesto **2** (**Figuras 21 y 22 y Cuadro 12**), mostró similitud con los grupos de señales previamente descritos para **1**, difiriendo principalmente en el desplazamiento δ_H 4.05 (d, *J* = 8.9) y 3.83, (d, *J* = 8.8) correspondiente a

la señal del metileno H6'. La comparación de estos desplazamientos, con lo descrito en la literatura permitió confirmar la identidad de **2** como la *epi*-equisetina (**Figura 23**) (Chen *et al.*, 2021). Este compuesto al igual que su epímero **1**, ha sido descrito con actividad inhibitoria contra la VIH-integrasa y como un agente fitotóxico contra diversas especies vegetales (Wheeler *et al.*, 1999).

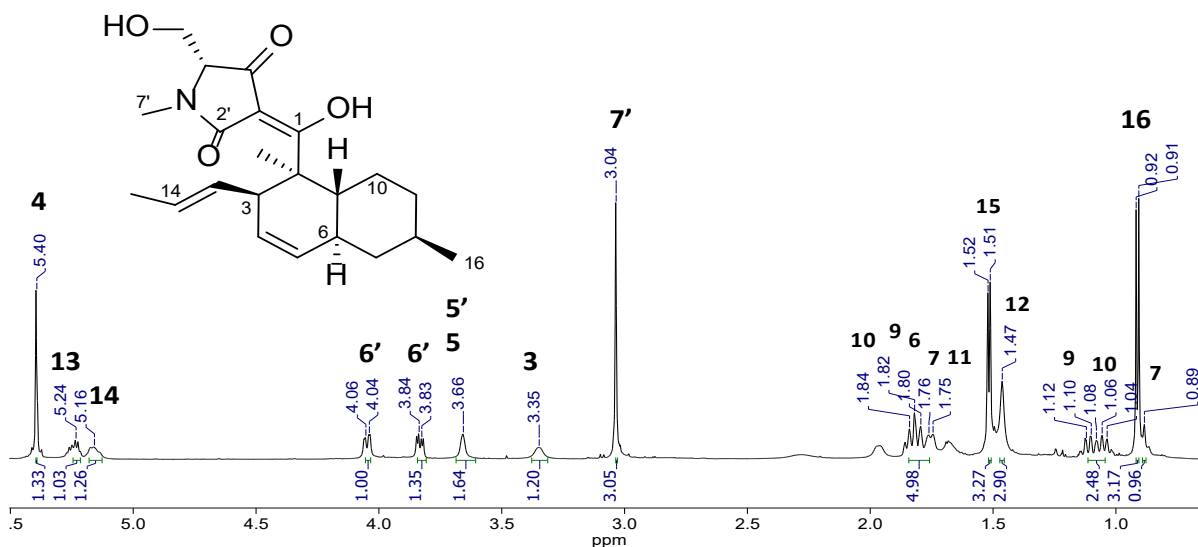


Figura 21. Espectro de RMN ¹H de la *epi*-equisetina (**2**) (600 MHz, CDCl₃).

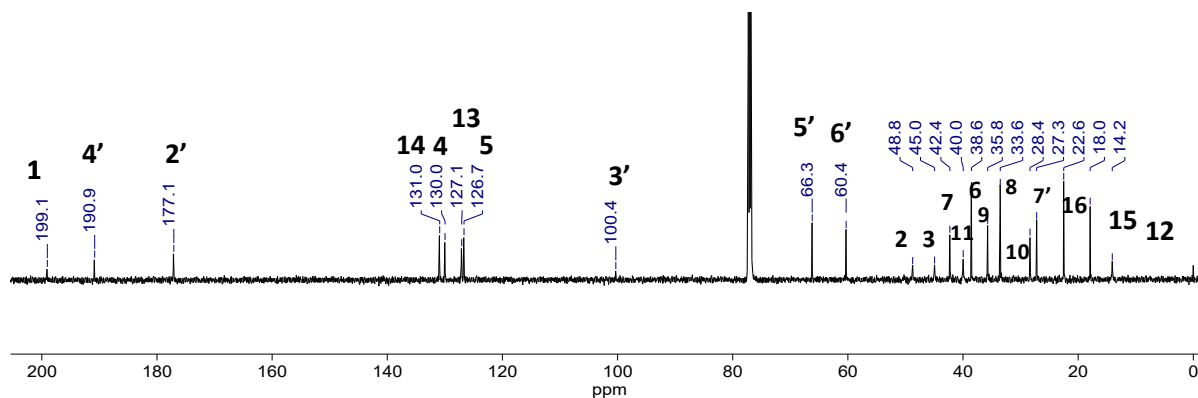


Figura 22. Espectro de RMN ¹³C de la *epi*-equisetina (**2**) (150 MHz, CDCl₃).

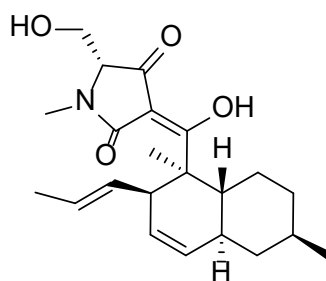


Figura 23. Estructura química de la *epi*-equisetina (**2**).

5.4.5 Estudios de metabolómica no dirigida

El análisis de la red molecular del extracto del hongo *Fusarium* sp. (Centla04) reveló que el principal grupo químico presente en este extracto corresponde a moléculas de naturaleza lipídica, seguido de ácidos grasos y en menor proporción compuestos nitrogenados, derivados de esteroide y compuestos de tipo macrólida (**Figura 24**). Esta red se conformó por 332 nodos agrupados en 37 clústeres, dentro de los cuales se logró confirmar la presencia de los compuestos **1** y **2**, este último anotado de manera manual, además de evidenciar otros ocho compuestos (**Cuadro 13**) dentro de los cuales se identificó el 4-acetilpirenoforol, descrito como agente antimicrobiano, antifúngico y antiálgico (Zhang *et al.*, 2008); el peróxido de ergosterol, un metabolito ampliamente distribuido entre organismos fúngicos que ha mostrado actividad biológica como agente antiviral, citotóxico, antiparasitario y antituberculoso (Kahlos *et al.*, 1989; Nam *et al.*, 2001; Ramos-Ligonio *et al.*, 2012), el verrucarol, un agente con actividad antifúngica (Schappert *et al.*, 1986) y la monacolina L, que se ha descrito como inhibidor de la síntesis de colesterol (Endo *et al.*, 1985).

Cuadro 13. Anotación química de metabolitos de <i>Fusarium</i> spp. (Centla04 y Centla05).						
Compuesto	Extracto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula molecular	Masa exacta ^e	Masa calculada (ppm)
4-Acetilpirenoforol ^c	Centla04	355.1770	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₆ O ₇	355.1784	-3.9
Peróxido de ergosterol ^c	Centla04 y Centla05	429.3370	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	429.3360	2.3
Citreoantrasteroide B ^c	Centla04	393.3150	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₄₀ O	393.3154	-1.0
Fusarisetina A ^{a,b}	Centla04 y Centla05	388.2120	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₁ NO ₅	388.2131	-2.8
Chokol H ^c	Centla04 y Centla05	239.2010	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	239.1999	4.5
Verrucarol ^c	Centla04	267.1590	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	267.1591	-0.3
Ácido <i>trans</i> -anhidrotrispórico C ^c	Centla04	289.1800	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	289.1799	0.3
Equisetina ^{a,c}	Centla04 y Centla05	374.2330	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ NO ₄	374.2326	1.0

<i>Epi</i> -equisetina ^{a,b}	Centla04 y Centla05	374.2330	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ NO ₄	374.2326	0.5
Monacolina L ^c	Centla04 y Centla05	305.2110	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	305.2107	0.9
Pallidorosetina A ^c	Centla05	390.2280	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ NO ₅	390.2133	-3.4
Pallidorosetina B ^c	Centla05	406.2220	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ NO ₆	406.2237	-0.5
Microsferona B ^c	Centla05	434.1820	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₇ NO ₈	434.1822	-4.3
Icosólido a1 ^c	Centla05	713.4650	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₄ N ₄ O ₁₀	713.4657	-0.9

^aCompuesto aislado, ^bAnotación manual, ^cAnotación por GNPS, ^dValor en GNPS, ^eValor en análisis UPLC-HRESIMS-MS/MS.

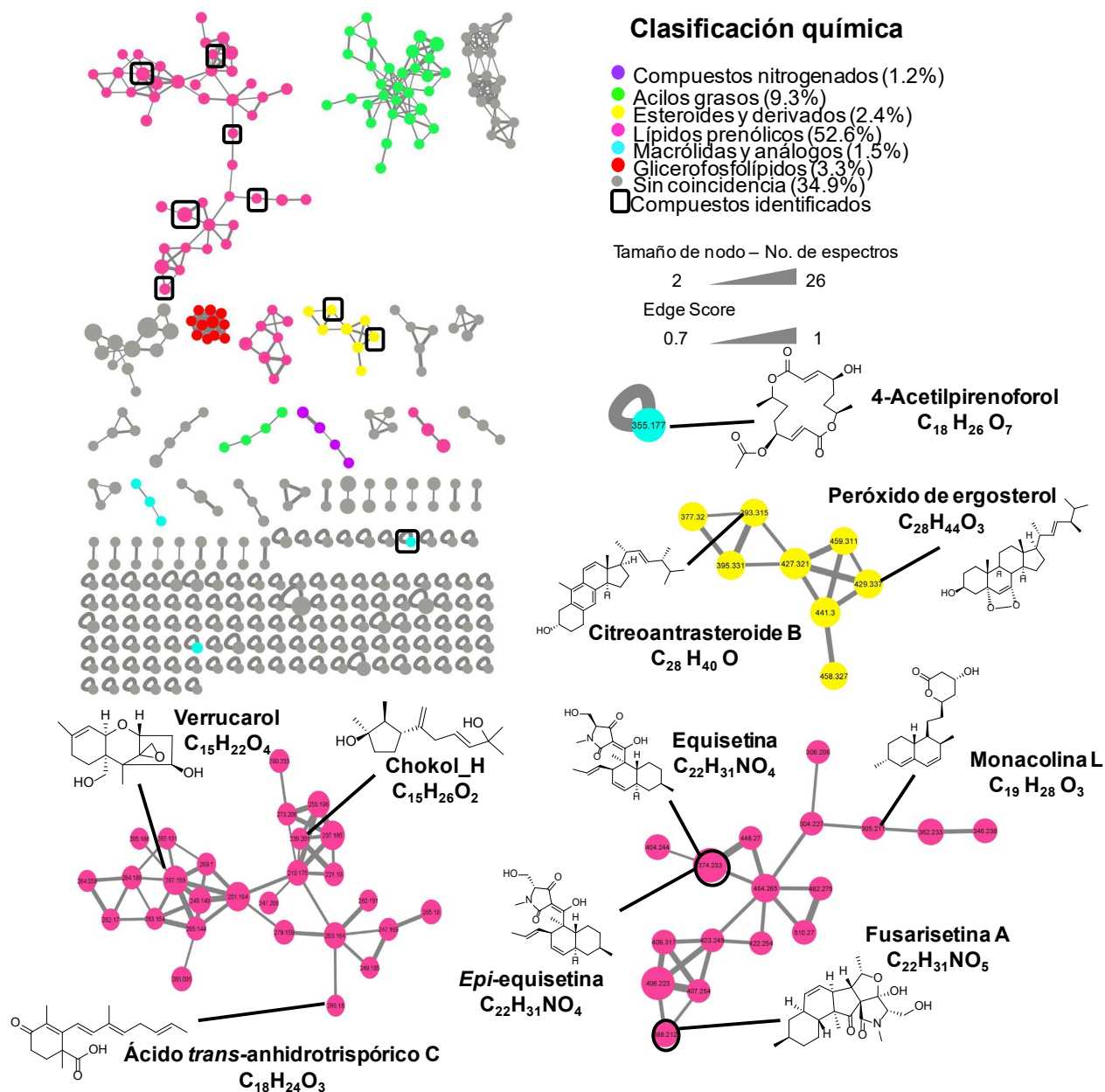


Figura 24. Red molecular de *Fusarium* sp. (Centla04) con la herramienta MolNetEnhancer. Los nodos que presentan el contorno coloreado corresponden a las moléculas anotadas manualmente.

Por otro lado, la red molecular de *Fusarium* sp. (Centla05) evidenció la presencia de los mismos grupos químicos observados en la red del hongo Centla04 (**Figura 25**). Los metabolitos anotados en esta red coinciden con los identificados en Centla04, con la adición del icosalido A, con actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* y *E. faecalis* (Boros *et al.*, 2006); las pallidorosetinas A y B; y la microsferona B (**Cuadro 13**).

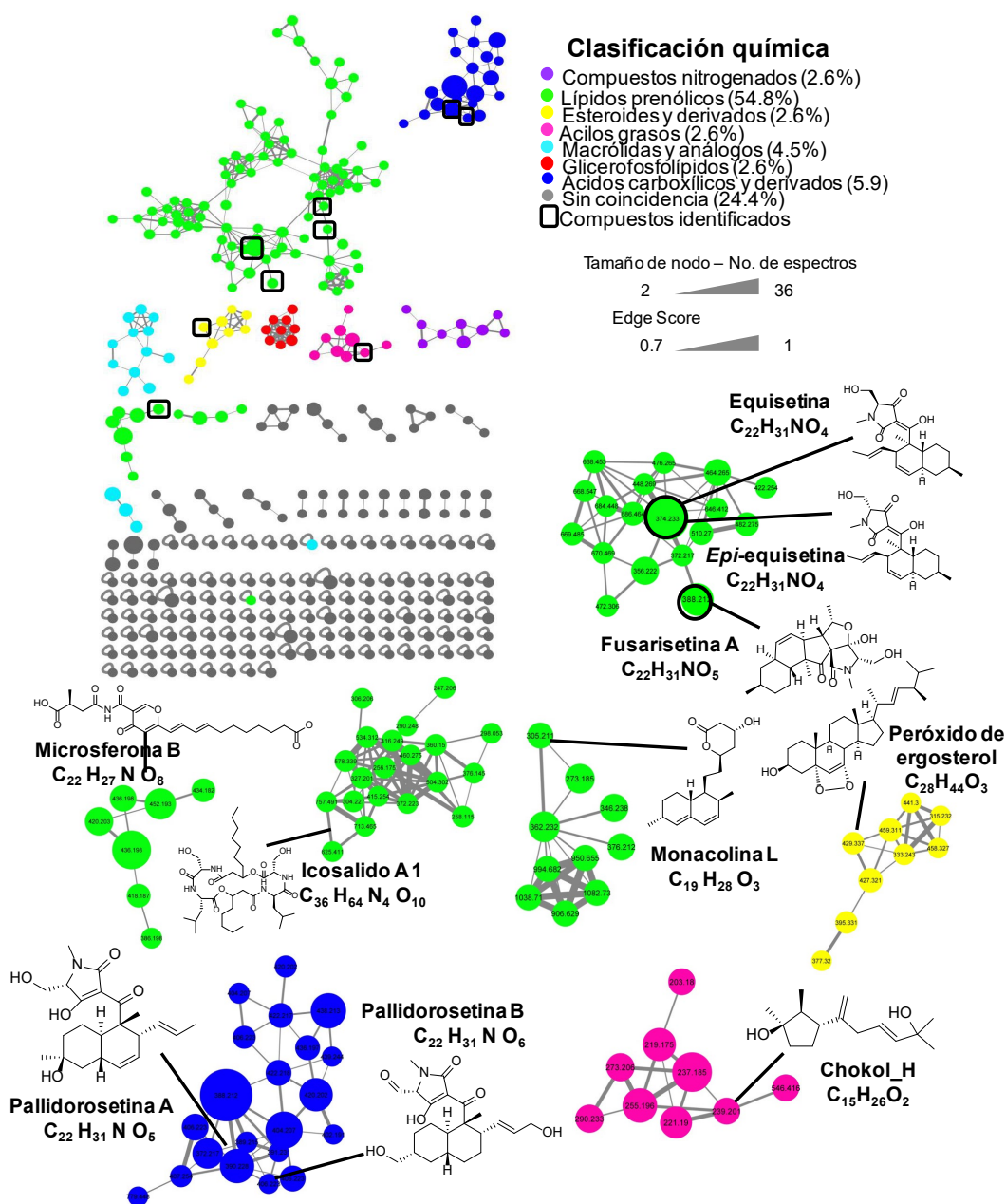


Figura 25. Red molecular de *Fusarium* sp. (Centla05) con la herramienta MolNetEnhancer. Los nodos que presentan el contorno coloreado corresponden a las moléculas que fueron anotadas manualmente.

5.5 Estudio químico de *Daldinia eschscholtzii* (Centla07)

5.5.1 Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario

El organismo Centla07 (**Figura 26**) fue identificado de manera preliminar como la especie *Daldinia eschscholtzii*. De acuerdo con la literatura, las 48 especies identificadas de este género se encuentran distribuidas principalmente en regiones tropicales. De éstas, 15 se han reportado en nuestro país (Stadler *et al.*, 2014; Barbosa-Reséndiz *et al.*, 2020). La mayoría de las especies son endófitas o patógenas latentes en plantas leñosas y se han descrito como productoras de compuestos con diversidad estructural y actividades biológicas variadas (Stadler *et al.*, 2014; Wutthiwong *et al.*, 2021) (**Figura 27**). Por ejemplo, se han aislado compuestos como la 8-*O*-metilnodulisporina y la nodulisporina H, ambos con actividad antimicrobiana contra organismos Gram(+) (Liao *et al.*, 2019); la epoxicitocalsina Q con actividad antimalárica (Isaka *et al.*, 2000); el concentricólido descrito como agente anti-VIH (Qin *et al.*, 2006); la childinasterona A, compuesto citotóxico (Zhao *et al.*, 2017); la daldiquinona que presenta actividad antiangiogénesis (Kamauchi *et al.*, 2018); el dalesconol A, un inmunosupresor (Wen *et al.*, 2009) y el 5-hidroxi-8-metoxi-2-metil-4*H*-cromen-4-ona y el 5-metoxi-2-metilcroman-4-ol, ambos agentes fitotóxicos aislados de *D. eschscholtzii* (Flores-Reséndiz *et al.*, 2021). Sin embargo, la mayoría de los metabolitos conocidos del género *Daldinia*, se han aislado a partir de *D. concentrica*, por lo que se decidió continuar con el estudio químico de la especie *D. eschscholtzii* (Centla07).

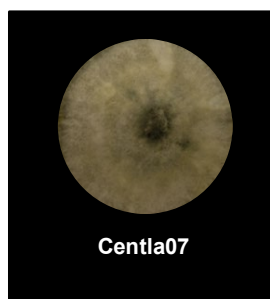


Figura 26. Cultivo en medio APD de *D. eschscholtzii* (Centla07).

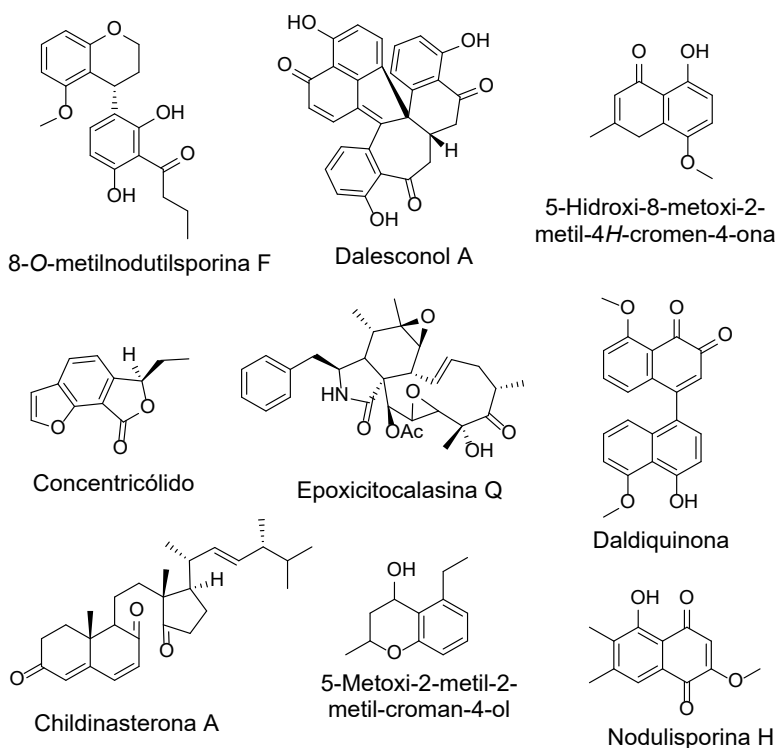


Figura 27. Metabolitos producidos por *Daldinia* spp.

Una vez obtenido el extracto orgánico en mediana escala (835.9 mg) se realizó su fraccionamiento primario obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 28** y el **Cuadro 14**.

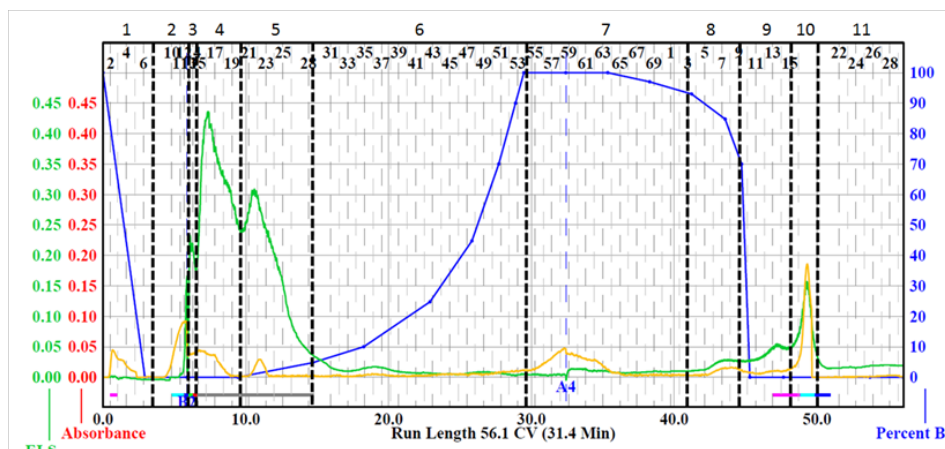







Figura 28. Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash del extracto del hongo *D. eschscholtzii* (Centla07) Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELSD y PDA respectivamente y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl₃-AcOEt-MeOH).

Cuadro 14. Resultados del fraccionamiento primario del extracto en mediana escala de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07).			
Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
1 (1-7)	0.8	7 (55-72)	89.8
2 (8-12)	3.3	8 (73-78)	27.0
3 (13-14)	13.7	9 (79-83)	46.7
4 (15-19)	194.9	10 (84-89)	99.8
5 (20-27)	141.8	11 (90-99)	12.9
6 (28-54)	108.4	Cantidad recuperada	649.1 (79.1 %)

5.5.2 Evaluación biológica del extracto en mediana escala y fracciones primarias

Una vez obtenidas las fracciones primarias, se seleccionaron aquellas con peso mayor a 3.0 mg para ser evaluadas en el ensayo de actividad biológica. Los resultados cualitativos y cuantitativos de esta evaluación se presentan en el **Cuadro 15**. Cabe mencionar que en este punto se hizo evidente un cambio importante en la actividad tanto del extracto en mediana escala como sus fracciones primarias en comparación con lo observado en la evaluación del extracto en pequeña escala. A pesar de esto se decidió continuar con el estudio químico de las dos fracciones más activas (Centla07-F₆ y Centla07-F₇).

Cuadro 15. Extractos y fracciones activas de <i>D. eschscholtzii</i> contra bacterias ESKAPE.*						
Organismo	Extracto o fracción	% inhibición				VSEF
		MRSA		MSSA		
		200 µg/mL	20 µg/mL	200 µg/mL	20 µg/mL	
Centla07	Extracto	91.9	10.3	91.9	51.0	
	F2	32.9	20.9	50.1	32.3	
	F3	10.5	9.0	4.9	3.4	
	F4	63.9	35.0	58.4	37.7	
	F5	81.3	50.5	71.6	42.8	
	F6	100	92.5	94.9	87.1	
	F7	100	100	97.6	97.0	
	F8	30.1	22.8	40.9	39.6	
	F9	63.0	38.9	54.2	33.2	
	F10	89.0	87.6100	97.4	86.0	
	F11	33.2	9.2	50.6	26.6	
	Control positivo CMI (µg/mL)		2.5		400.0	3.7
*No se observó actividad de ningún extracto o fracción sobre <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853), <i>K. aerogenes</i> (ATCC 13048), <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603) o <i>E. cloacae</i> (ATCC 700323).						
Criterios de inhibición						
	Inhibición >90%		Inhibición total a 200 µg/mL de extracto			
	Inhibición total a 200 µg/mL y 20 µg/mL de extracto			Inhibición parcial a 200 µg/mL de extracto		
	Sin actividad					

5.5.3 Separación y purificación de compuestos mayoritarios

A partir del análisis de las fracciones primarias por HPLC a nivel analítico y del resultado de la evaluación biológica, se seleccionó a las fracciones F₆ y F₇ para la separación de los metabolitos presentes en ellas (**Figura 29 y 30**), obteniendo así, a partir de la F₆ dos productos que fueron caracterizados también como equisetina (**1**) (5.2, t_R= 7.1 min) y *epi*-equisetina (**2**) (6.1mg, t_R= 7.6 min), además del compuesto **3** (1.7mg, t_R= 6.5 min).

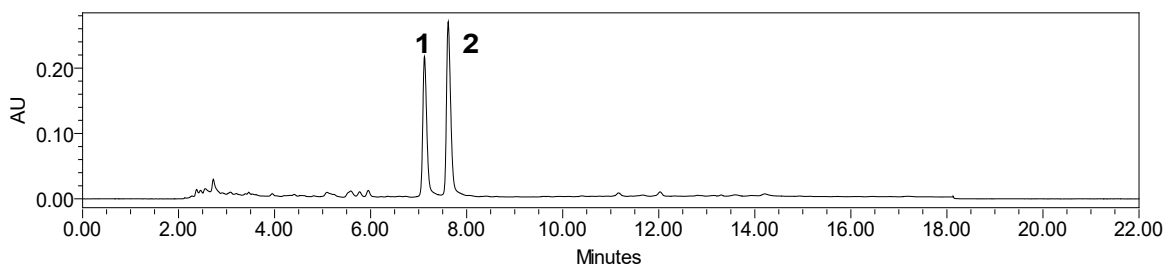


Figura 29. Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla07-F₆ (PDA 254 nm). Gradiente de elución: 30% ácido fórmico acuoso (0.1%) y 70% MeCN a 100% MeCN en 10 min, flujo de 21.24 mL/min; columna Kinetex.

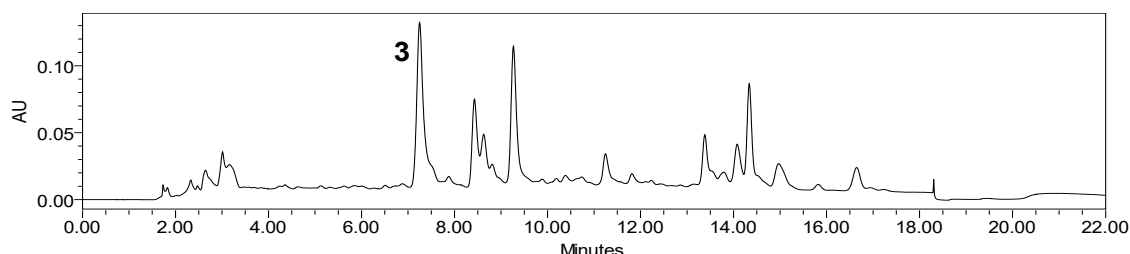


Figura 30. Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla07-F₇ (PDA 200 nm). Gradiente de elución: 40% ácido fórmico acuoso (0.1%) y 60% MeCN a 100% MeCN en 10 min, flujo de 21.24 mL/min; columna Gemini.

5.5.4 Caracterización de 1 y 2 aislados a partir de Centla07

El análisis por HRESIMS de los compuestos aislados a partir de la fracción Centla07-F₆ (**Figura 31**) mostró iones en m/z 374.2345 [M+H]⁺ y 372.2198 [M-H]⁻ con patrones de fragmentación y espectros de UV similares a los observados para los compuestos **1** y **2**, mostrados previamente en la sección 5.4.4 y obtenidos de los hongos *Fusarium* spp. (Centla04

y Centla05). Para ambos compuestos se llevaron a cabo experimentos de RMN de ^1H , cuyos resultados se presentan en las figuras 32 y 33, donde se observaron las mismas señales en desplazamiento similares descritos anteriormente para los compuestos 1 y 2, confirmando así la identidad de ambas moléculas.

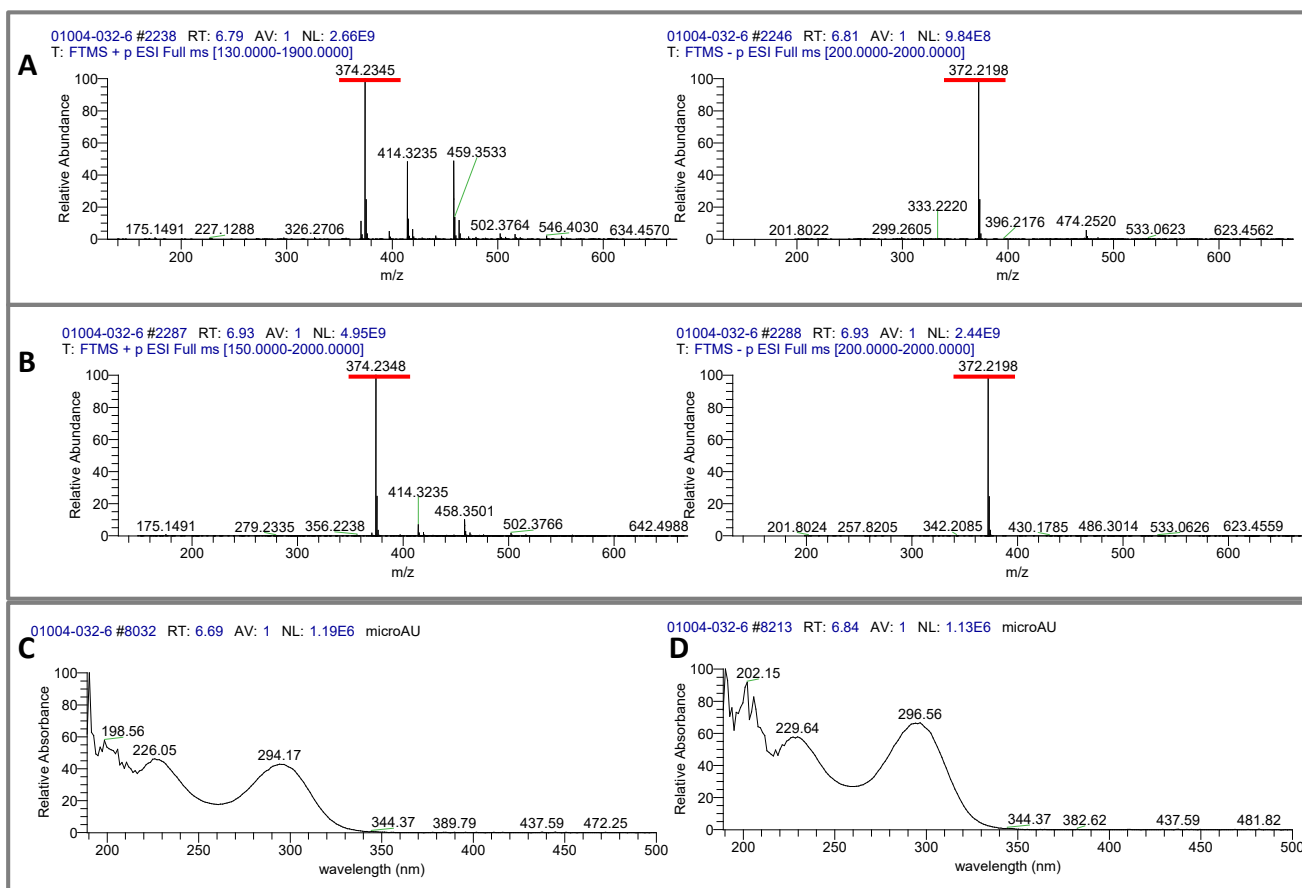


Figura 31. Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) de los compuestos 1 (A), 2 (B) y en el UV de 1 (C) y de 2 (D) aislados de Centla07.

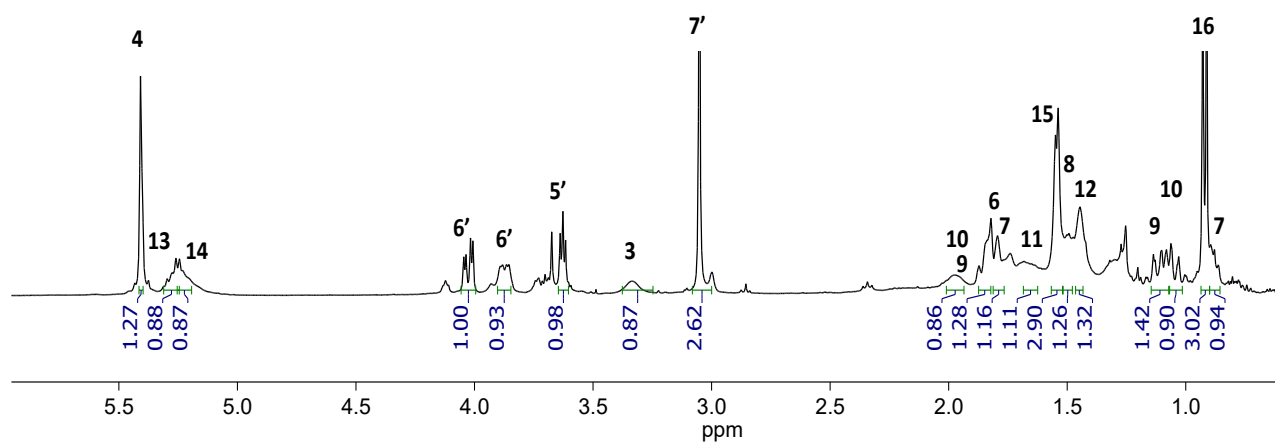


Figura 32. Espectro de RMN ^1H de **1** (400MHz, CDCl_3).

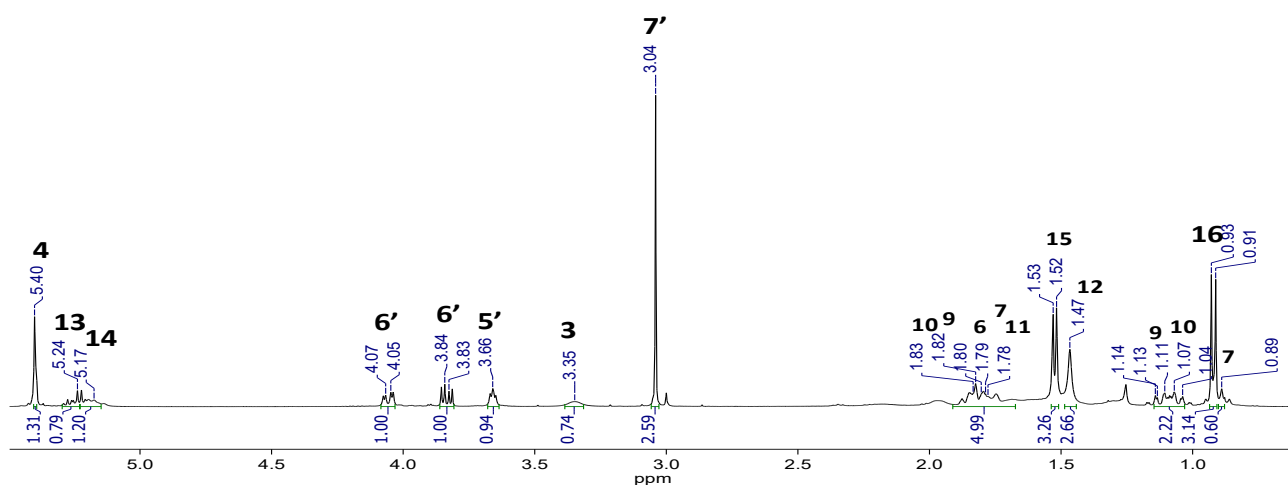


Figura 33. Espectro de RMN ^1H de **2** (400MHz, CDCl_3).

5.5.5 Caracterización del compuesto **3**

La fórmula molecular de **3** se estableció como $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_5$ con base en los iones en m/z 390.2293 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 388.2153 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_5$, $\Delta=4.2$ ppm, IDH=8) obtenidos por HRESIMS (Figura 34).

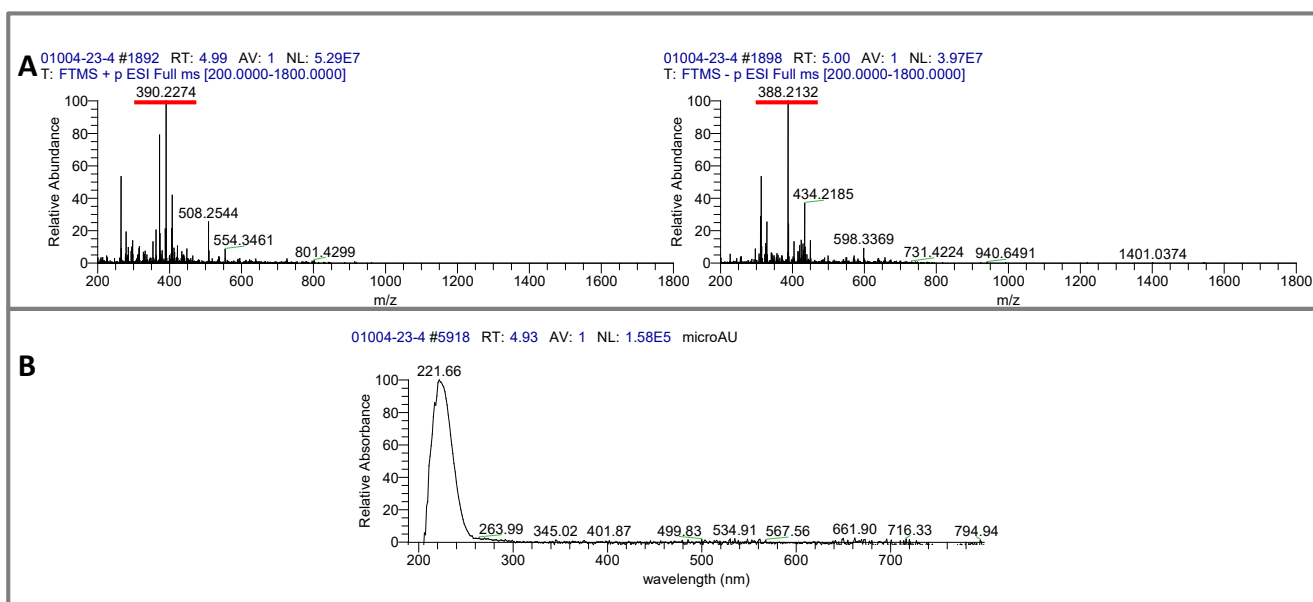


Figura 34. Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) **(A)** y en el UV **(B)** del compuesto **3**.

En el espectro de RMN ^1H (**Cuadro 16** y **Figura 35**) se observaron las siguientes señales:

- En δ_{H} 5.54 (d, $J=9.8$) y 5.73 (ddd, $J=9.9, 4.8, 2.5$) dos conjuntos de señales de hidrógenos vinílicos en H-9 y H-8, respectivamente.
- Siete señales de metinos (H-15, H-12, H-10, H-7, H-6, H-3 y H-5), dos de ellos en posición alfa a heteroátomo, en δ_{H} 1.10 (m), 1.56 (m), 1.85 (m), 2.56 (dd, $J=11.0, 4.7$), 2.9 (dd, $J=10.9, 5.7$), 3.57 (dd, $J=5.6, 2.7$) y 4.39 (m), respectivamente.
- En δ_{H} 1.56 (m) una señal de un metileno (H-14), además de un conjunto de dos metilenos diastereotópicos (H-13 y H-18) en δ_{H} 1.73 (m), 1.03 (m), 3.93 (dd, $J=11.8, 5.9$), 3.97 (dd, $J=11.9, 2.3$).
- En δ_{H} 0.90 (d, $J=6.8$), 0.99 (s) y 1.47 (d, $J=6.5$), tres señales correspondientes a tres grupos metilo en las posiciones 21, 22 y 20, respectivamente. Además de una señal simple en δ_{H} 2.93 de un grupo N-CH_3 .

Cuadro 16. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 600 MHz) de la fusarisetina A (3).		
Posición	3^a	Fusarisetina A^b
	δ_{H} , mult. (J en Hz)	δ_{H} , mult. (J en Hz)
3	3.57, dd (5.6, 2.7)	3.57, dd (5.6, 2.5)
5	4.39, m	4.41-4.34, m
6	2.98, dd (10.9, 5.7)	2.96, dd (10.9, 5.7)
7	2.56, dd (11.0, 4.7)	2.58, dd (10.9, 4.8)

8	5.73, ddd (9.9, 4.8, 2.4)	5.73, ddd (10.0, 4.8, 2.5)
9	5.54, d (9.8)	5.54, d (10.0)
10	1.85, m	1.89-1.79, m
11		0.88-0.81, m
12	1.56, m	1.51-1.39, m
13	1.73, m	1.77-1.69, m
	1.03, m	1.05-0.95, m
14	1.56, m	1.59-1.52, m
15	1.10, m	1.15-1.05, m
18	3.97, dd (11.9, 2.8) 3.93, dd (11.8, 5.9)	3.96, dd (12.0, 2.5) 3.91, dd (12.0, 5.6)
19	2.93, s	2.93, s
20	1.47, d (6.5)	1.47, d (6.5)
21	0.90, d (6.8)	0.90, d (6.5)
22	0.99, s	0.98, s

^aCDCl₃ y δ en ppm.; ^bLiu, C. *et al.*, (2016).

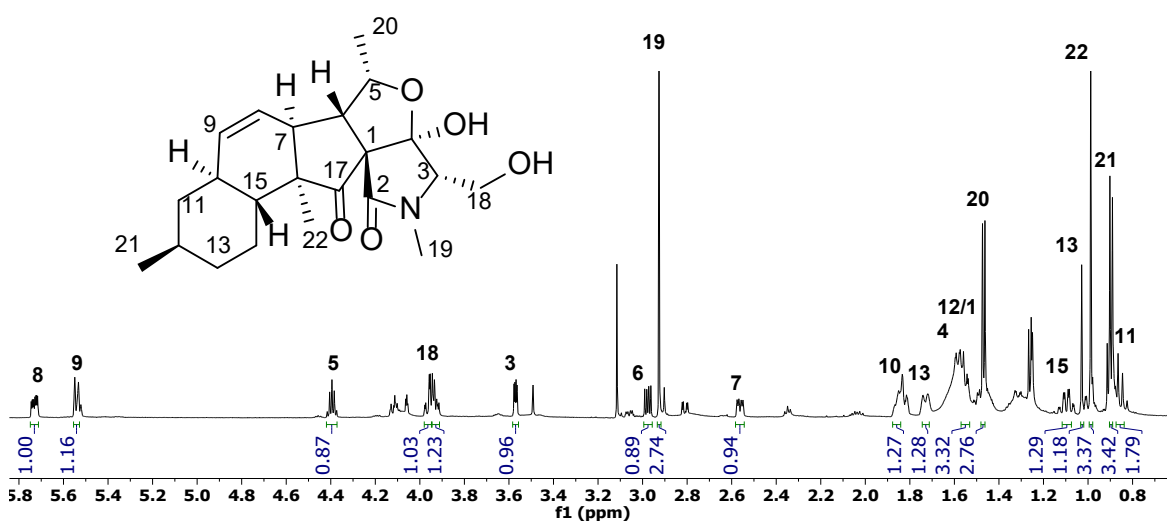


Figura 35. Espectro de RMN ¹H de la fusarisetina A (**3**) (600 MHz, CDCl₃).

Estos desplazamientos observados y lo descrito en la literatura, permitieron caracterizar a **3** como la fusarisetina A (**Figura 36**) (Liu *et al.*, 2016), misma que se describió por primera vez en 2011 como un metabolito producido por *Fusarium* sp. FN080326 y que presenta actividad como un inhibidor de la morfogénesis acinar (Jang *et al.*, 2011). Posteriormente, se aisló a partir de *F. equiseti* D39 mostrando inhibición de la migración celular y actividad fitotóxica contra *Amaranthus retroflexus* y *Lactuca sativa* (Zhao *et al.*, 2019).

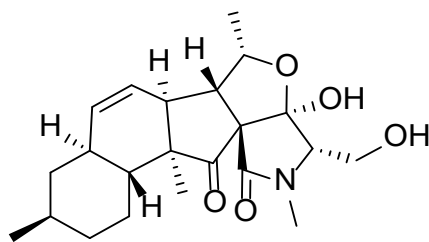


Figura 36. Estructura química de la fusarisetina A (**3**).

Debido a que los compuestos **1-3** aislados a partir del extracto en mediana escala del hongo Centla07 han sido previamente descritos como metabolitos del género *Fusarium*, además del cambio evidente en la actividad antimicrobiana del extracto en mediana escala (inactivo en pequeña escala y muy activo en mediana) y fracciones primarias, se propuso que el cultivo de este organismo pudo haberse contaminado con alguno de los hongos Centla04 o Centla05. Para corroborar esta hipótesis, se resembró nuevamente el organismo Centla07 en medio APD, confirmándose una morfología característica del género *Fusarium*. De manera paralela, se realizó la comparación de los perfiles cromatográficos por UPLC-HRESIMS-MS/MS de los cultivos en mediana escala de Centla04, Centla05 y Centla07, observando una similitud muy evidente entre ellos (**Figura 37**).

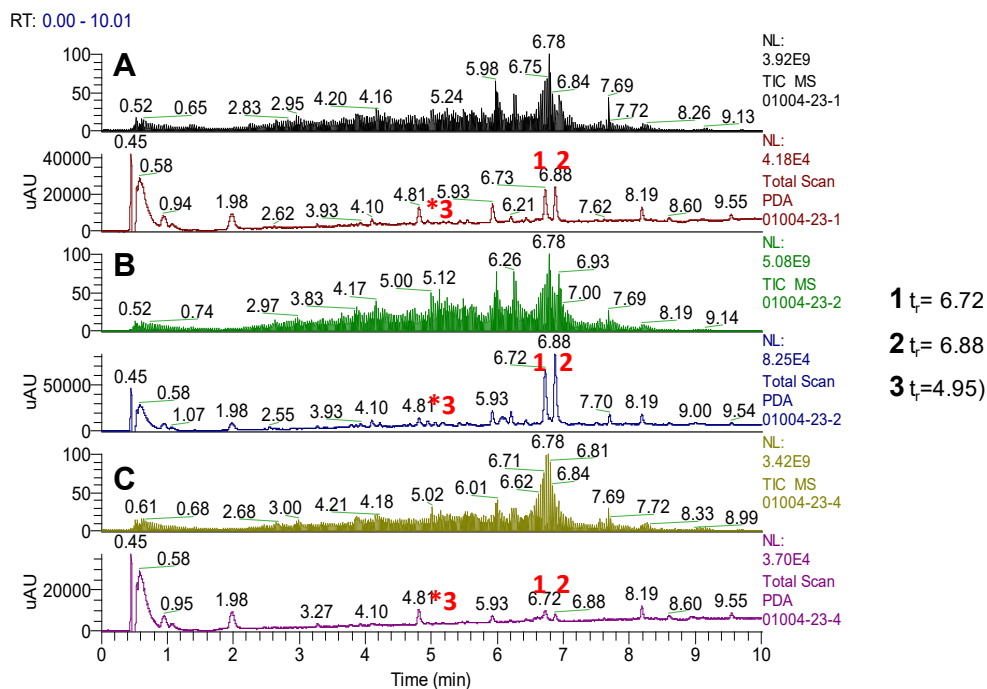


Figura 37. Comparación de perfiles por UPLC- HRESIMS-MS/MS de los extractos de los hongos Centla04 (**A**), Centla05 (**B**) y Centla07 (**C**) en mediana escala.

Finalmente, la presencia de **3** en los extractos de Centla04 y Centla05 también se confirmó mediante los análisis de HRESIMS-MS/MS (**Figura 38**) y de redes moleculares, como se muestra en la sección 5.4.5.

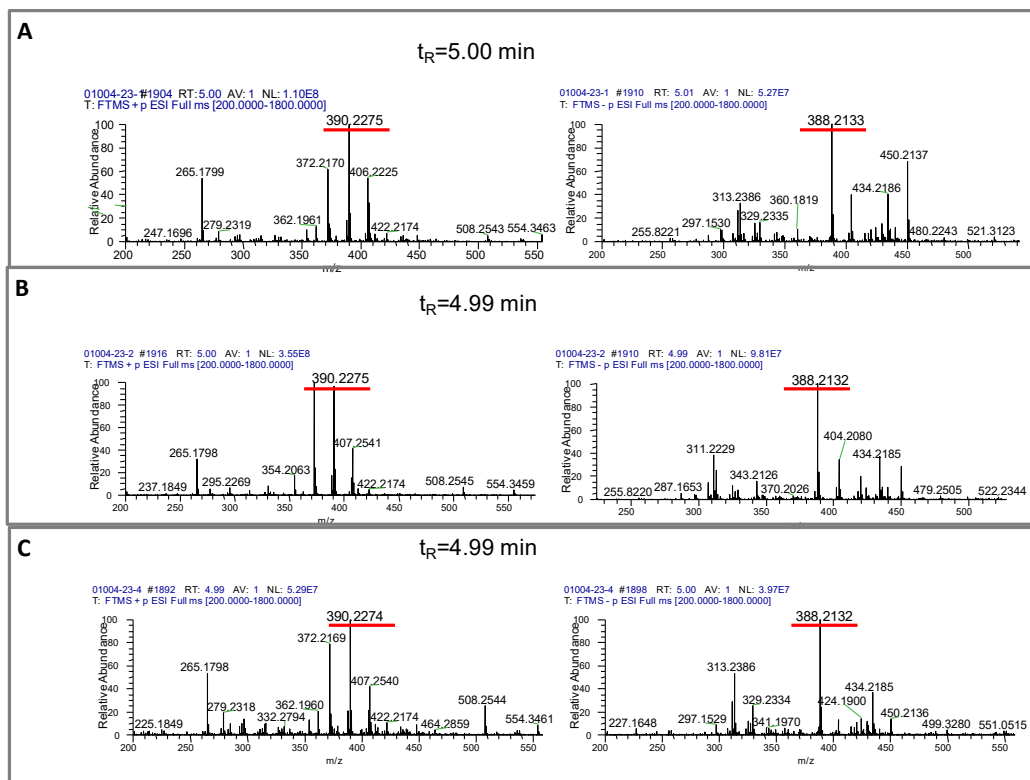


Figura 38. Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) de **3** en los extractos de *Fusarium* spp. (Centla04) (**A**); Centla05 (**B**) y Centla07(**C**).

5.5.6 Fraccionamiento primario del extracto en pequeña escala de Centla07

A pesar de lo descrito en la sección anterior, se decidió continuar con el estudio de la especie *D. eschscholtzii*, pero a partir del extracto obtenido a partir del cultivo en pequeña escala (311.2 mg), mismo que fue fraccionado de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 4.7. Los resultados de este fraccionamiento se muestran en la **Figura 39** y el **Cuadro 17**.

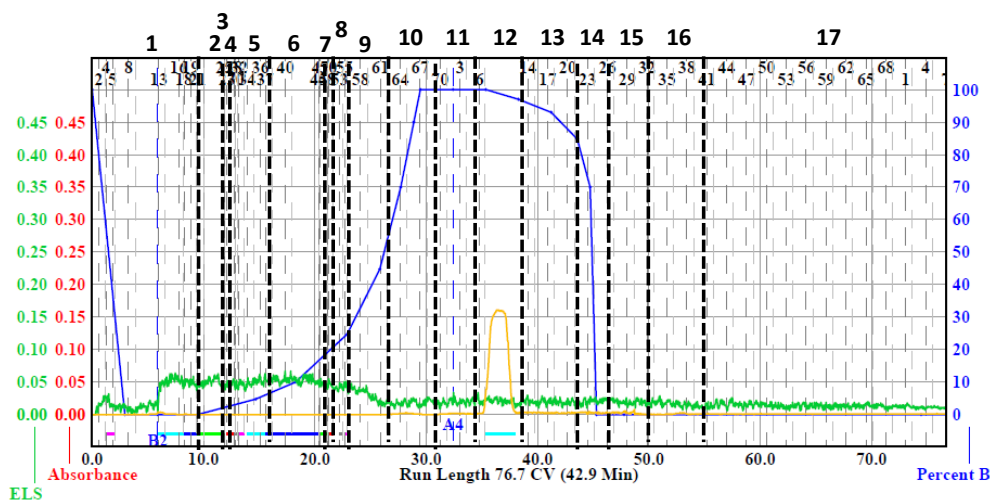


Figura 39. Fraccionamiento por cromatografía en columna tipo flash del extracto en pequeña escala del hongo *D. eschscholtzii* (Centla07). Las líneas verdes y amarillas corresponden a los detectores ELS y PDA respectivamente y la línea azul al gradiente de elución empleado (Hex-CHCl₃-AcOEt-MeOH).

Cuadro 17. Resultados del fraccionamiento primario del extracto en pequeña escala de *D. eschscholtzii* (Centla07).

Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
1 (1-20)	43.9	10 (62-67)	38.9
2 (21-22)	11.8	11 (68-75)	16.3
3 (23-24)	27.5	12 (76-81)	10.7
4 (25-27)	2.4	13 (82-91)	6.7
5 (28-37)	4.2	14 (92-95)	8.1
6 (38-45)	1.3	15 (96-101)	34.6
7 (46-48)	0.3	16 (102-110)	13.0
8 (49-55)	0.7	17 (111-147)	14.6
9 (56-61)	6.9	Cantidad recuperada	241.9 (83.4%)

5.5.7 Separación y purificación de compuestos mayoritarios

Tras el análisis por UPLC-MS de las fracciones obtenidas, se seleccionó a la fracción F₁ para la separación de los compuestos mediante HPLC a nivel preparativo, proceso que permitió la purificación de **4** (4.0 mg, t_R= 7.6 min) y **5** (3.2 mg, t_R=8.3 min) (**Figura 40**).

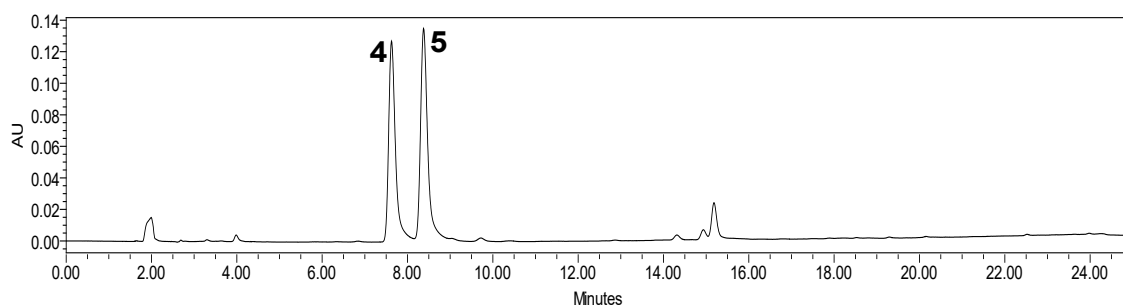


Figura 40. Separación por HPLC a nivel preparativo de la fracción Centla07-F₁ (PDA 254 nm). Gradiente de elución: 40% ácido fórmico acuoso (0.1%) y 60% MeCN a 100% MeCN en 15 min, flujo de 21.24 mL/min, columna Gemini.

5.5.8 Caracterización de los compuestos 4 y 5

La fórmula molecular de **4** se estableció como C₁₂H₁₂O₂ con base en el ion con *m/z* 189.0553 [M+H]⁺ (calculado para C₁₂H₁₃O₂, Δ=0.8 ppm, IDH=7) obtenido por HRESIMS (**Figura 41**). El análisis de los espectros de RMN ¹H y ¹³C mostró:

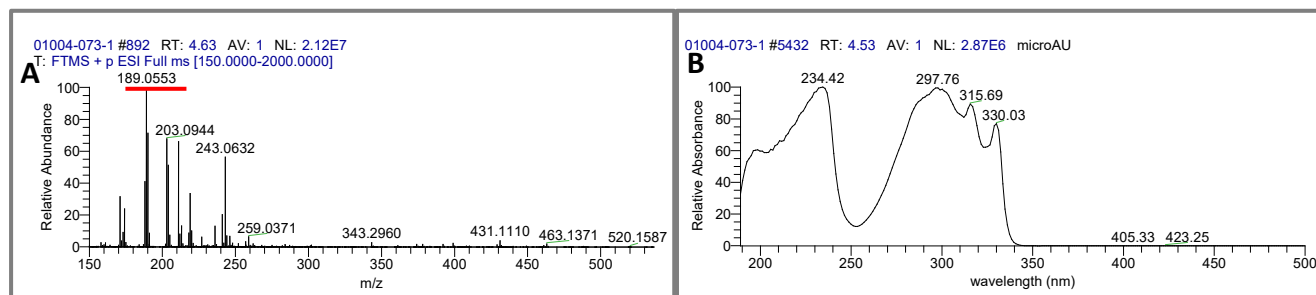


Figura 41. Espectro en ESI+ (**A**) y en el UV (**B**) del compuesto **4**.

El análisis de los espectros de RMN ¹H y ¹³C (**Cuadro 18** y **Figuras 42** y **42**) mostró:

- En δ_H 6.85 (dd, *J*=7.2, 1.6), 7.36 (dd, *J*=8.2, 7.1) y 7.40 (dd, *J*=8.1, 1.6) grupos de señales dobles de tres hidrógenos aromáticos (H-2/7, H-3/6 y H-4/5).
- Una señal simple en δ_H 3.98 de un O-CH₃ en la posición 1/8.
- En δ_C 157.1 (C-1/8) una señal de un carbono unido a un heteroátomo.
- Un conjunto de señales entre δ_C 137.4-106.1 correspondientes a carbonos aromáticos (C-2/7, C-3/6, C-4/5, C-4a y C-8a).
- En δ_C 56.6 una señal de un O-CH₃ en la molécula.

Cuadro 18. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) del 1,8 dimetoxinaftaleno (**4**).

Posición	4^a				1,8-Dimetoxinaftaleno^b	
	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)	COSY (^1H - ^1H)	HMBC (^{13}C - ^1H)	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)
1/8	157.2			1/8-OMe, 2/7, 3/6, 4/5	157.1	
2/7	106.3	6.85, dd (7.2, 1.6)	1/8-OMe	1/8-OMe, 3/6, 4/5	106.1	6.84, dd (7.3, 1.5)
3/6	126.5	7.36, dd (8.2, 7.1)		2/7	126.3	7.41-7.32, m
4/5	121.0	7.40, dd (8.1, 1.6)	3/6, 2/7	2/7, 3/6	120.8	
4a	137.5			3/6, 4/5	137.4	
8a	117.7			2/7	117.5	
1/8-OMe	56.6	3.98, s			56.4	4.03, s

^a CDCl_3 y δ en ppm; ^bYang, Y. *et al.* (2008)

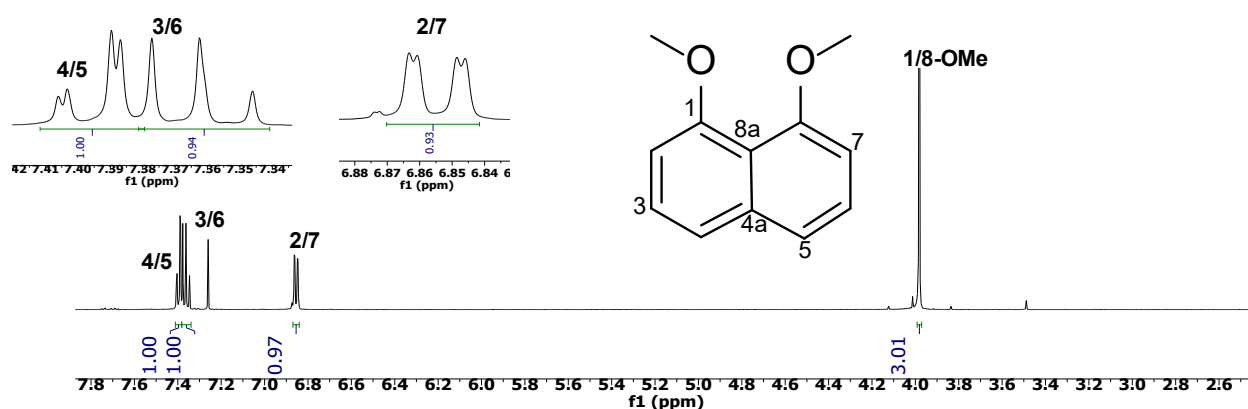


Figura 42. Espectro de RMN ^1H del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) (500 MHz, CDCl_3).

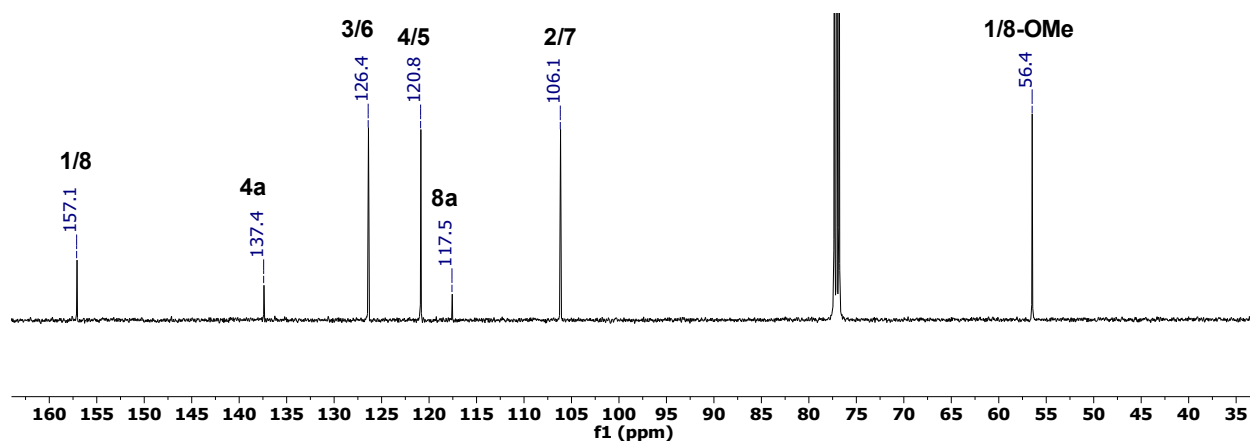


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) (125 MHz, CDCl_3).

Dado que el número de Hs y Cs observados en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C corresponden únicamente a la mitad de los planteados en la fórmula molecular, se propuso la

posibilidad de que el compuesto **4** tuviera una estructura simétrica. Las evidencias descritas anteriormente y las correlaciones observadas en experimentos de HSQC, COSY y HMBC (**Figuras 44, 45 y 46**), así como lo descrito en la literatura, permitieron caracterizar a **4** como el 1,8-dimetoxinaftaleno (**Figura 47**) (Yang *et al.*, 2008).

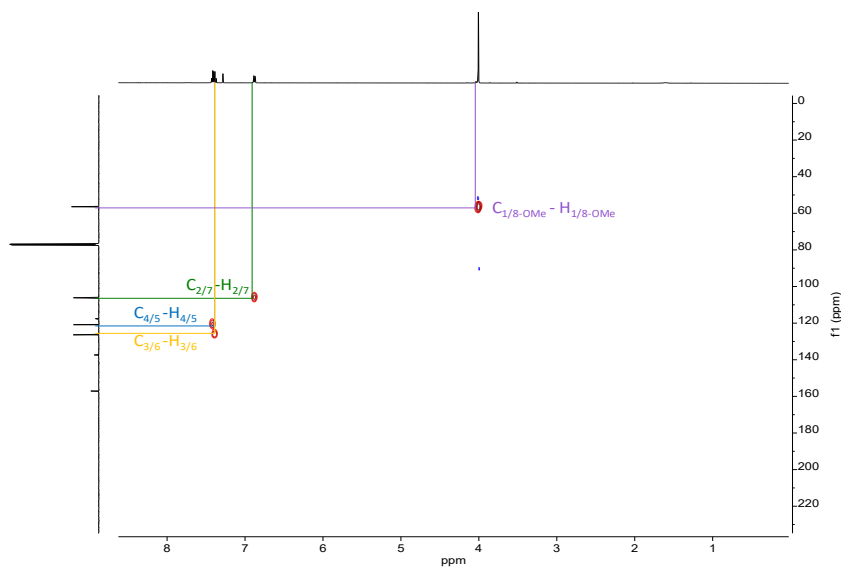


Figura 44. Espectro HSQC del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) (500MHz, CDCl₃).

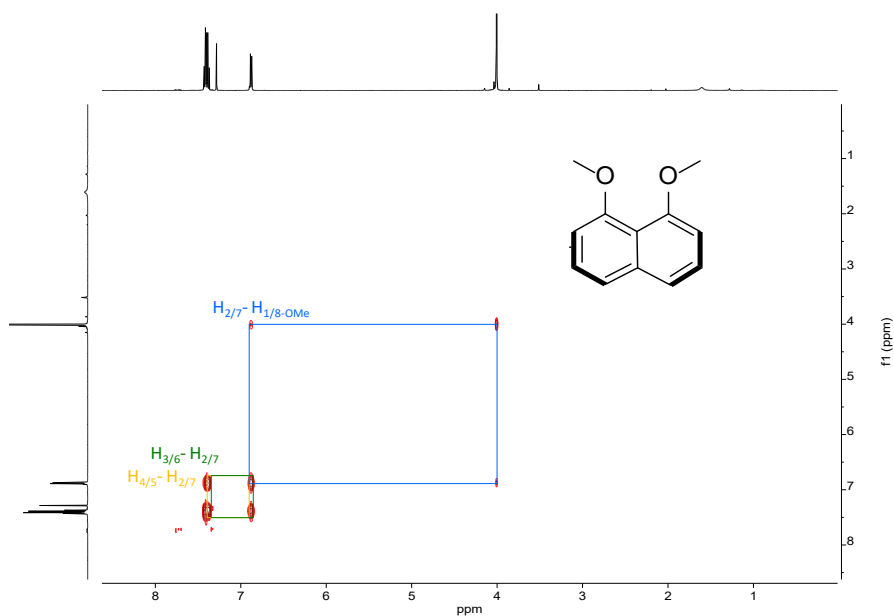


Figura 45. Espectro COSY del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) (500 MHz, CDCl₃).

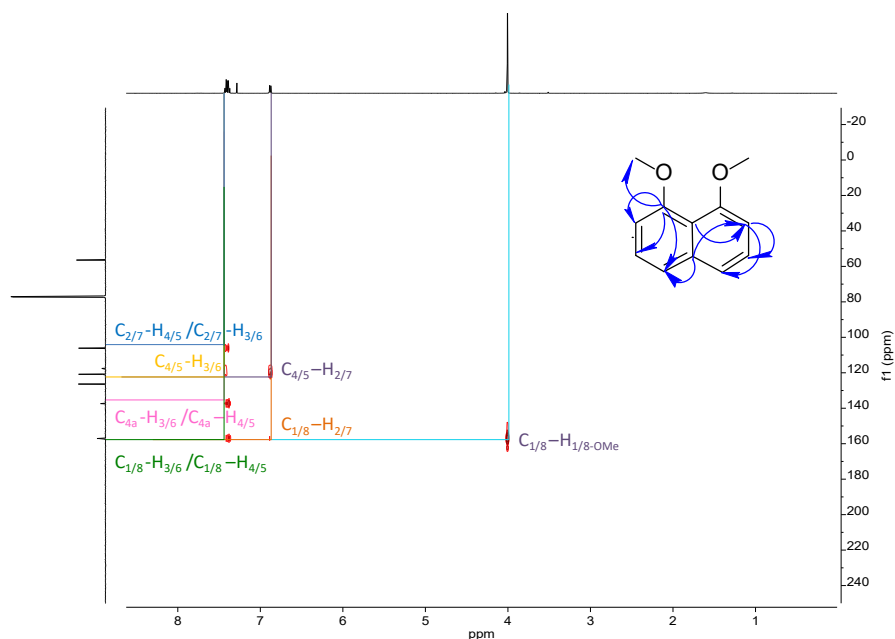


Figura 46. Espectro HMBC del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) (500 MHz, CDCl_3).

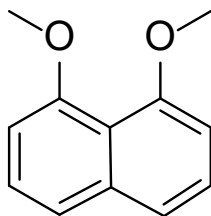


Figura 47. Estructura química del 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**).

Por otro lado, para el compuesto **5** se observaron señales similares a las descritas para el compuesto **4** en el espectro de RMN ^1H (**Figura 48** y **Cuadro 19**), presentando como diferencias una señal observada en δ_{H} 7.31 (t, $J=8.0$) que mostró una integración para 2H (H-4 y H-5) y en δ_{H} 9.31 una señal simple correspondiente a un grupo hidroxilo.

El análisis por HRESIMS de **5** (**Figura 49**) permitió establecer la fórmula molecular preliminar $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2$ con base en el ion en m/z 175.0788 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2$, $\Delta=2.5$ ppm, IDH=7). Esta información, en conjunto con los desplazamientos descritos anteriormente y lo descrito en la literatura permitieron caracterizar a este compuesto como el 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (**Figura 50**) (Banerjee *at al.*, 2010).

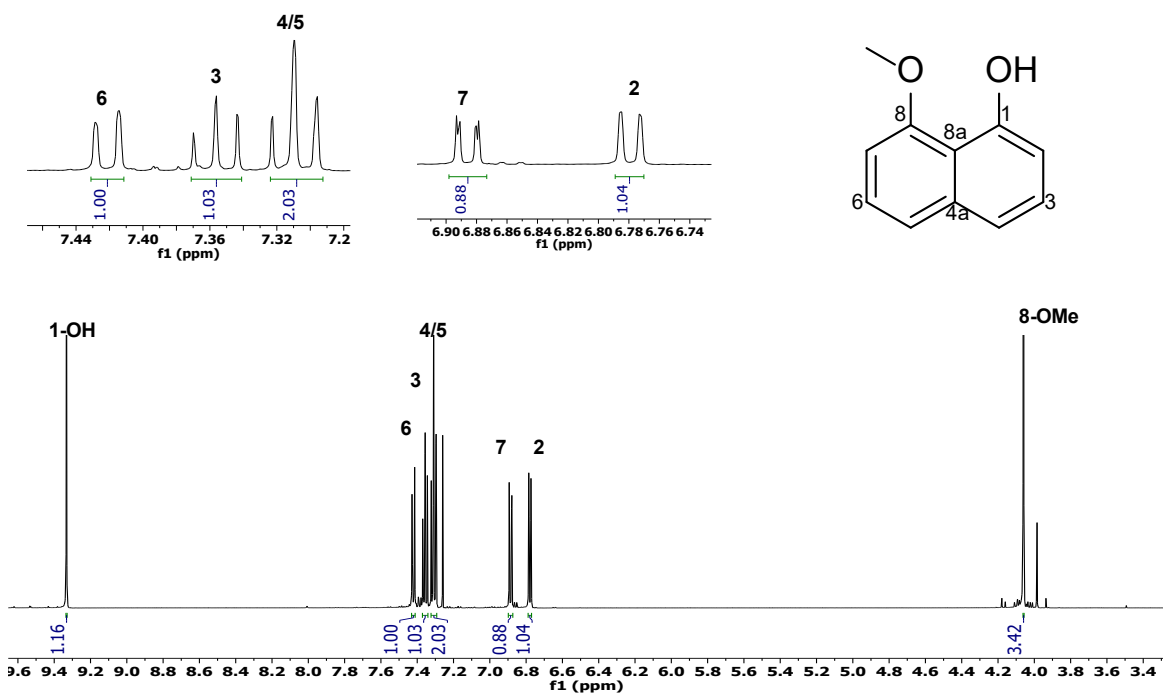


Figura 48. Espectro de RMN ^1H del 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (**5**) (600 MHz, CDCl_3).

Cuadro 19. Datos de RMN ^1H (600 MHz) del 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (**5**).

Posición	5^a	1-hidroxi-8-metoxinaftaleno^b
	δ_{H} , mult. (J en Hz)	δ_{H} , mult. (J en Hz)
2	6.78, d (7.5)	6.77 (7.8, 0.5)
3	7.32, d (8.3)	7.42-7.21, m
4	7.31, t (8.0)	7.42-7.21, m
5	7.31, t (8.0)	7.42-7.21, m
6	7.36, t (7.8)	7.42-7.21, m
7	6.89, dd (7.4, 1.3)	6.87, dd (8.7, 1.4)
1-OH	9.33, s	9.31, s
8-OMe	4.06, s	4.03, s

^a CDCl_3 y δ en ppm; ^bBanerjee, A.K. *et al.* (2010).

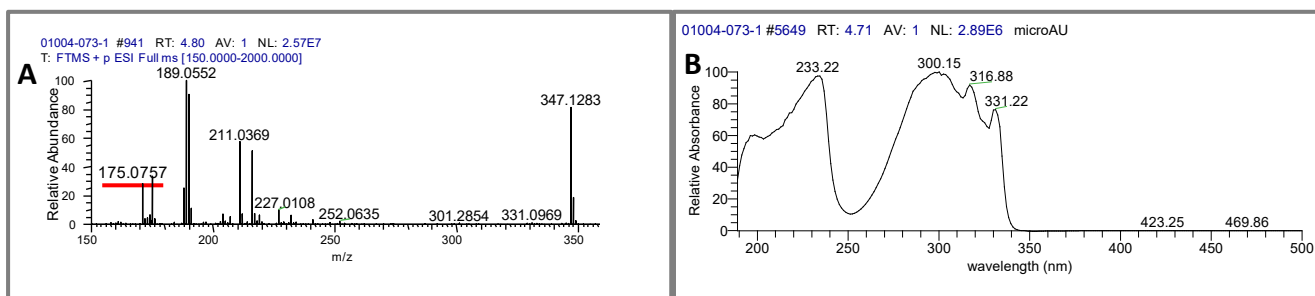


Figura 49. Espectro en ESI+ (**A**) y en el UV (**B**) del compuesto **5**.

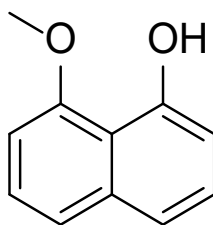


Figura 50. Estructura química del 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno (**5**).

Ambos compuestos, **4** y **5**, fueron por primera vez descritos en 1960 como metabolitos de la especie *D. concentrica* (Allport y Bu'lock, 1960), y posteriormente fueron aislados a partir de *Sporothrix* sp. y *D. eschscholtzii*, endófitos de los mangles *Kandelia candel* y *Bruguiera sexangula*, respectivamente (Wen *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2017). Estos productos han mostrado actividad como antimicrobianos contra *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Nematospora coryli*; nematocidas contra *Caenorhabditis elegans* y *Meloidogyne incognita* y citotóxicos contra la línea celular L1210 de leucemia murina (Anke *et al.*, 1995). Adicionalmente **4** ha mostrado efecto anti-hiperglicémico (Rauf *et al.*, 2014).

5.5.9 Estudios de metabolómica no dirigida

La red molecular de *D. eschscholtzii* se formó por 252 nodos, agrupados en 7 clústeres de los cuáles, menos de la mitad fue clasificado químicamente (**Figura 51**). El análisis correspondiente evidenció la presencia de glicerofosfolípidos principalmente y en menor medida se identificaron compuestos oxigenados, acilos grasos, lípidos prenólicos y derivados de isoindol. En este caso, únicamente dos compuestos fueron anotados de manera automática por el GNPS, el 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno, aislado y caracterizado durante este proyecto, y un compuesto de tipo citocalasina previamente descrito como metabolito de *Daldinia* sp. (Buchanan *et al.*, 1995). Adicionalmente, se realizó la anotación manual del 1,8-dimetoxinaftaleno, descrito previamente (**Cuadro 20**).

Cuadro 20. Anotación química de metabolitos de <i>D. eschscholtzii</i> (Centla07).					
Compuesto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula molecular	Masa exacta ^e	Masa calculada (ppm)
12,18-dihidroxi-16,18-dimetil-10-fenil[11]citocalasa-6,13,19-trien-1,21-diona ^c	450.2650	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₃₅ NO ₄	450.2663	-2.9
1,8-dimetoxinaftaleno ^{a,c}	377.2120	[2M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	377.2119	0.3
1-hidroxi-8-metoxinaftaleno ^{a,b}	349.1840	[2M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ O ₂	349.1848	-2.3

^aCompuesto aislado, ^bAnotación manual, ^cAnotación por GNPS, ^dValor en GNPS, ^eValor en análisis UPLC-HRESIMS-MS/MS

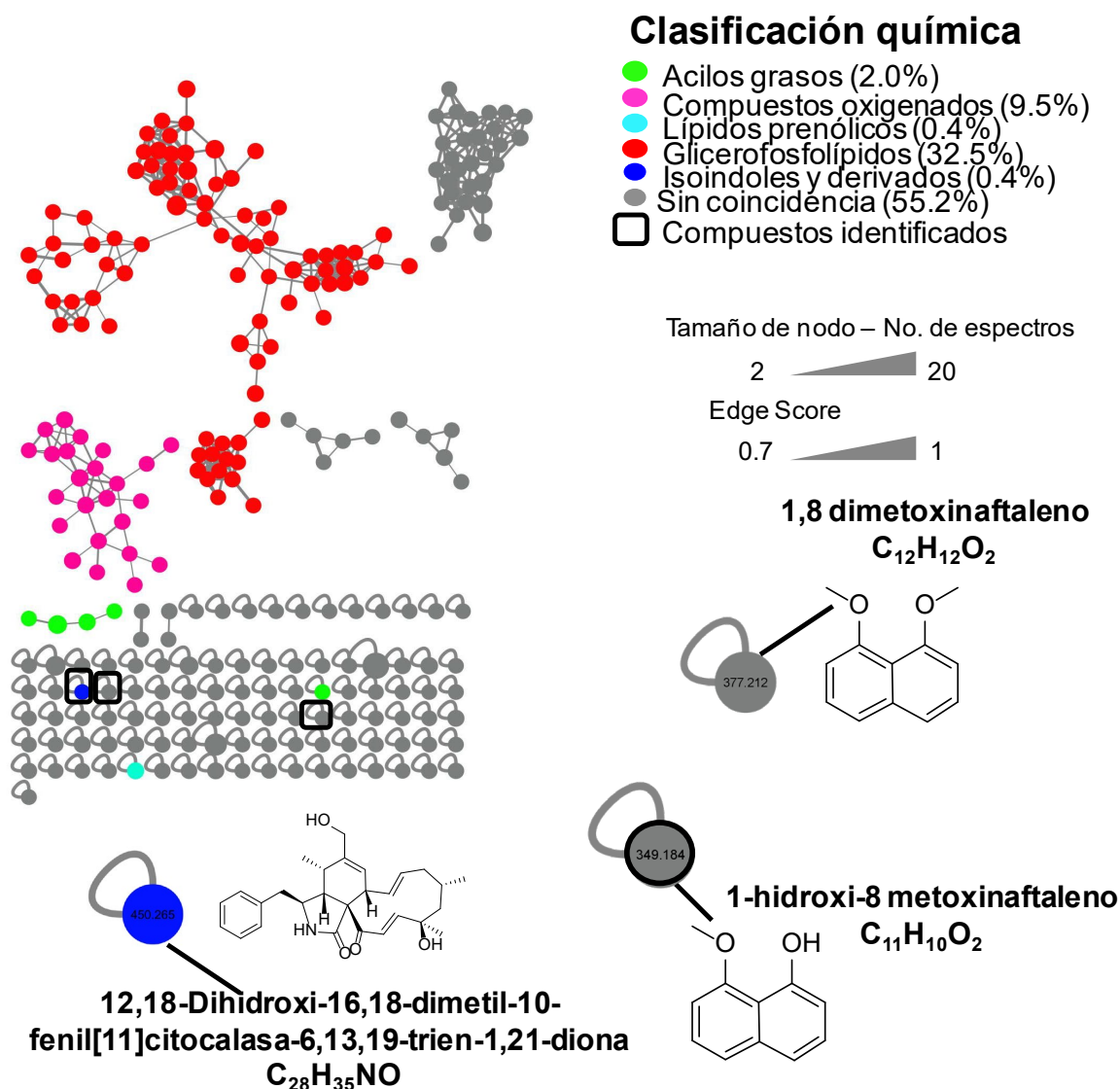


Figura 51. Red molecular de *D. eschscholtzii* (Centla07) con la herramienta MolNetEnhancer. Los nodos que presentan el contorno coloreado corresponden a las moléculas anotadas manualmente.

5.6 Estudio químico de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11)

Durante la identificación taxonómica preliminar, se identificó el organismo Centla11 (**Figura 52**) como una especie perteneciente al género *Leptosphaerulina*. De acuerdo con la revisión en la base de datos del Diccionario de Productos Naturales (DNP), únicamente han sido descritos 16 metabolitos producidos por especies de este género, entre ellos, algunos con actividad biológica como las diaporteininas A y B, con actividad contra *M. tuberculosis* (Dettrakul *et al.*, 2003) y el ácido leptosnaftóico y la leptospiranonaftazarina A, ambos con actividad contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *B. subtilis* (Cui *et al.*, 2017). Dentro de los compuestos aislados a partir de este género, también se encuentran algunos con núcleos estructurales únicos, tal es el caso de la leptotiazinona B que posee un núcleo de tipo benzo[1,4]tiazin-2-ona que hasta el 2018 no había sido descrito para PNs (Zhang *et al.*, 2018) (**Figura 53**), por lo que se seleccionó al organismo Centla11 para continuar con su estudio químico.



Figura 52. Cultivo en APD de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11).

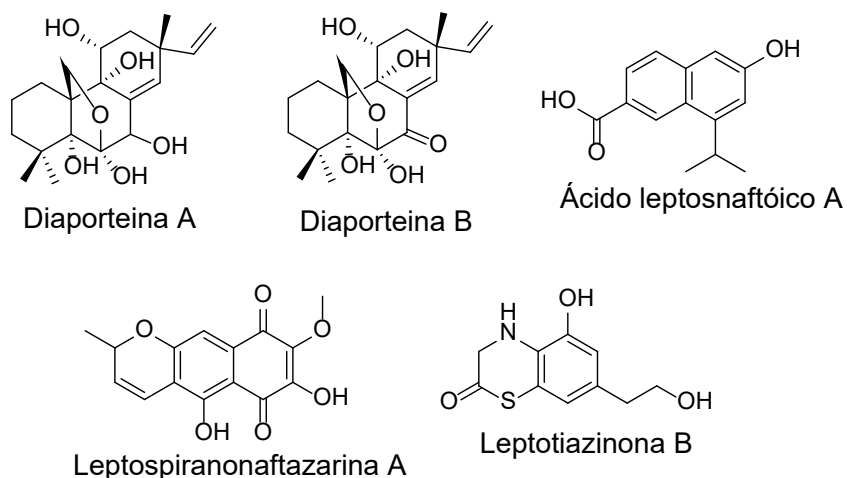


Figura 53. Metabolitos producidos por *Leptosphaerulina* spp.

5.6.1 Purificación de metabolitos secundarios

El análisis por HPLC a nivel analítico del extracto obtenido en pequeña escala de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11), reveló la presencia de dos compuestos mayoritarios (**Figura 54**), los cuales fueron separados mediante HPLC a nivel preparativo, obteniéndose 2.0 mg de **6** ($t_R = 4.8$ min) y 1.5 mg de **7** ($t_R = 8.4$ min) (**Figura 55**).

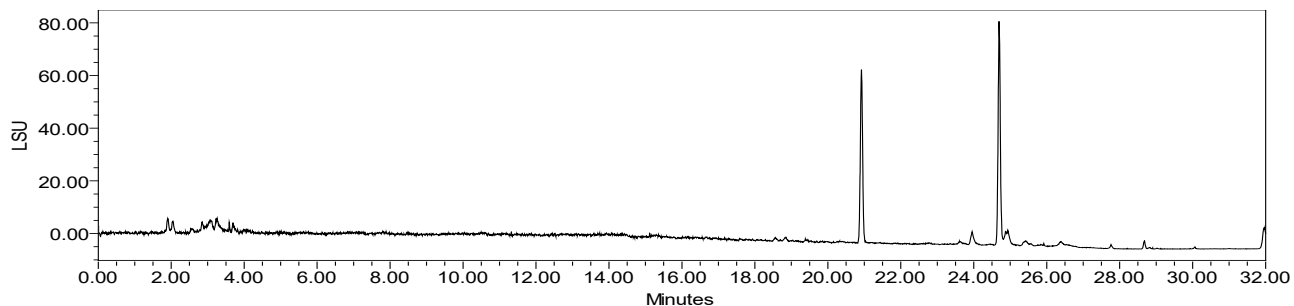


Figura 54. Perfil cromatográfico por ELSD del extracto en pequeña escala de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11).

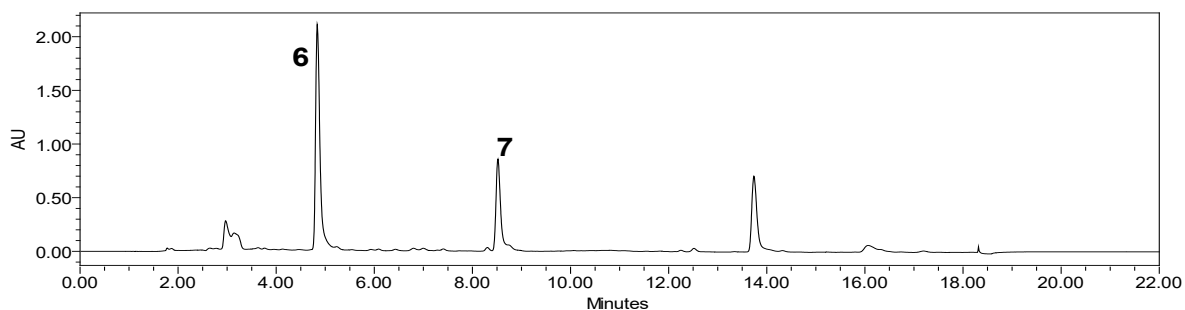


Figura 55. Separación por HPLC a nivel preparativo (PDA 254 nm) del extracto de *Leptosphaerulina* sp. Gradiente de elución: 40% ácido fórmico acuoso (0.1%) y 60% MeCN a 100% MeCN en 10 min, flujo de 21.24 mL/min.

5.6.2 Caracterización del compuesto 6

La fórmula molecular de **6** se dedujo como $C_{14}H_{14}O_3$ con base en los iones en m/z 231.1022 $[M+H]^+$ y 229.0869 $[M-H]^-$ (calculado para $C_{14}H_{13}O_3$, $\Delta = -0.5$ ppm, IDH=8) obtenidos en el análisis por HRESIMS (**Figura 56**).

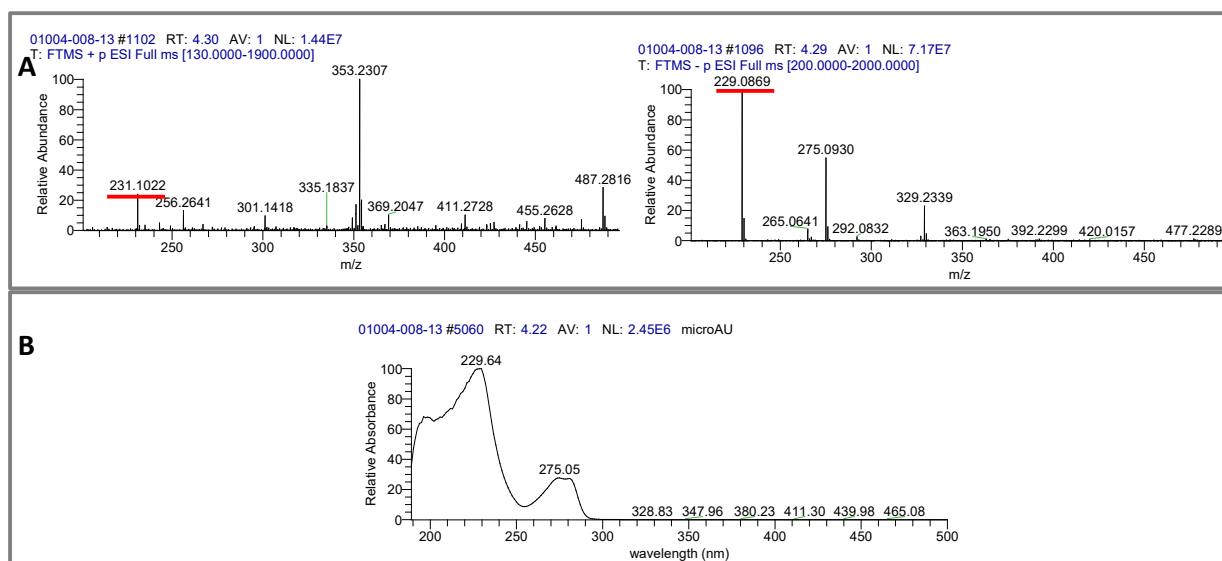


Figura 56. Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) (A) y en el UV (B) del compuesto **6**.

El conjunto de señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (**Cuadro 21** y **Figuras 57** y **58**) se resume a continuación:

- Un grupo de señales de hidrógenos aromáticos, dos en δ_{H} 6.30 (t, $J=2.0$) correspondiente a H-4/4' y H-6/6' y una señal múltiple en δ_{H} 6.42 atribuible a la posición 2/2'.
- En δ_{H} 2.27 una señal simple de un grupo metilo.
- En el espectro de carbono se observaron dos señales en δ_{C} 158.2 (C-1/1') y 156.6 (C-3/3') que corresponden a carbonos aromáticos unidos a un heteroátomo.
- Un conjunto de carbonos aromáticos entre δ_{H} 141.0 y 103.4 correspondientes a las posiciones 2/2', 4/4', 5/5' y 6/6'.
- En δ_{C} 21.4 una señal de un grupo metilo.

Cuadro 21. Datos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del diorcinol (6).					
Posición	6^a			Diorcinol^b	
	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J en Hz)	HMBC (^{13}C - ^1H)	δ_{C}	δ_{H} , mult. (J en Hz)
1/1'	158.2		2, 4, 6	157.9	
2/2'	103.6	6.30, t (2.0)	4,6	103.4	6.29, br s
3/3'	156.6		2, 4	156.3	
4/4'	112.3	6.42, m	2, 7	112.2	6.40, br s
5/5'	141.1		7	141.0	
6/6'	111.3	6.42, m	2, 4, 7	111.2	6.40, br s
7/7'	21.6	2.27, s	4	21.4	2.24, br s

^a CDCl_3 y δ en ppm; ^bSánchez, J. *et al* (2009),

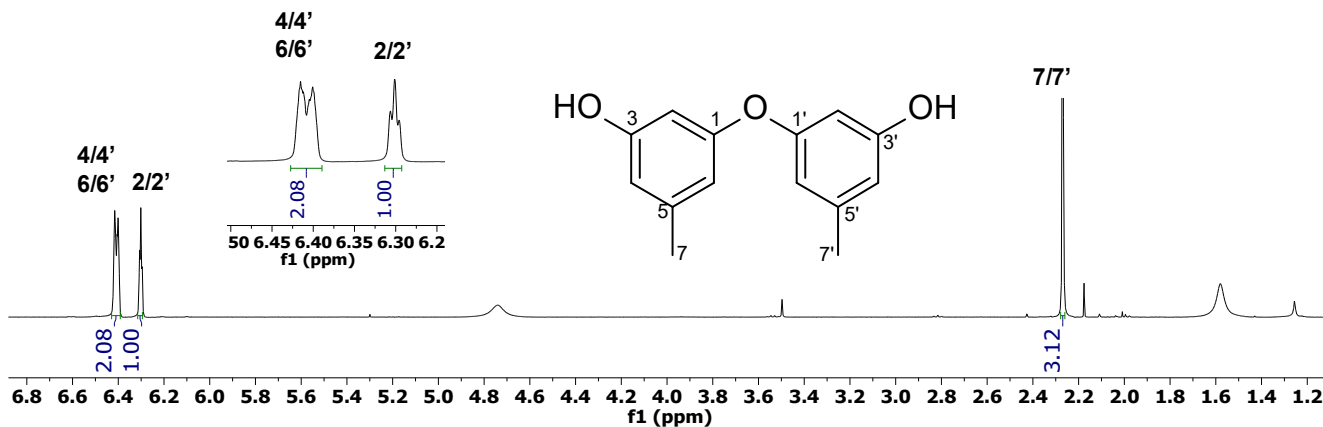


Figura 57. Espectro de RMN ^1H del diorcinol (**6**) (500 MHz, CDCl_3).

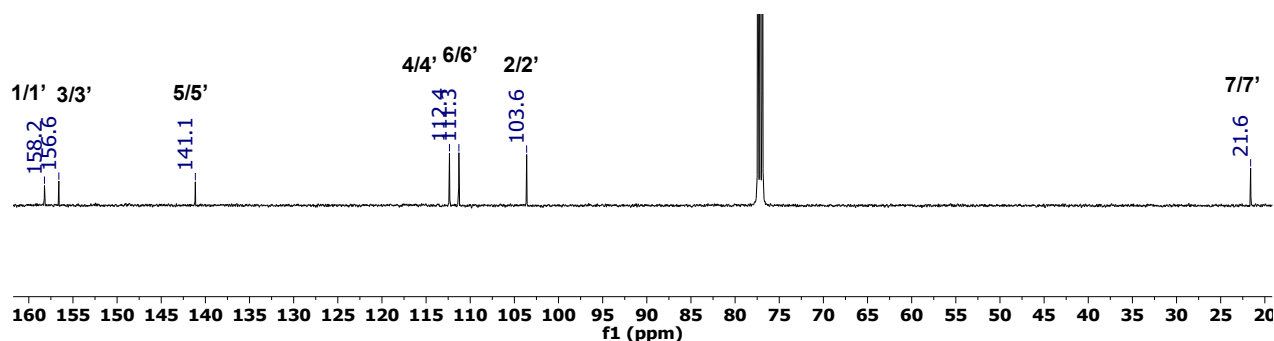


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C del diorcinol (**6**) (125 MHz, CDCl_3).

Estas señales observadas corresponden a la mitad de los átomos de H y C de la fórmula molecular propuesta, indicando la posibilidad de una estructura simétrica. Los desplazamientos anteriormente descritos, así como las correlaciones observadas en los experimentos de HSQC y HMBC (Figuras 59 y 60) y lo descrito en la literatura, permitieron caracterizar a **6** como el diorcinol (Figura 61) (Sánchez *et al.*, 2009). Este compuesto ha sido descrito en especies de *Aspergillus*, *Cordyceps*, *Emericella*, *Hypocrea*, *Phoma* y *Penicillium* y tiene actividad contra *Plasmodium falciparum*, *M. tuberculosis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Vibrio anguillarum*, *V. parahemolyticus* y *P. putida*, contra el virus del herpes simple tipo I, y como agente citotóxico contra líneas celulares de carcinoma de piel, cáncer de mama, pulmón y contra células Vero. (Bunyapaiboonsri *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013; Ebrahim *et al.*, 2016). Cabe mencionar, que no se encontraron reportes previos del aislamiento de ese compuesto a partir de especies del género *Leptosphaerulina*.

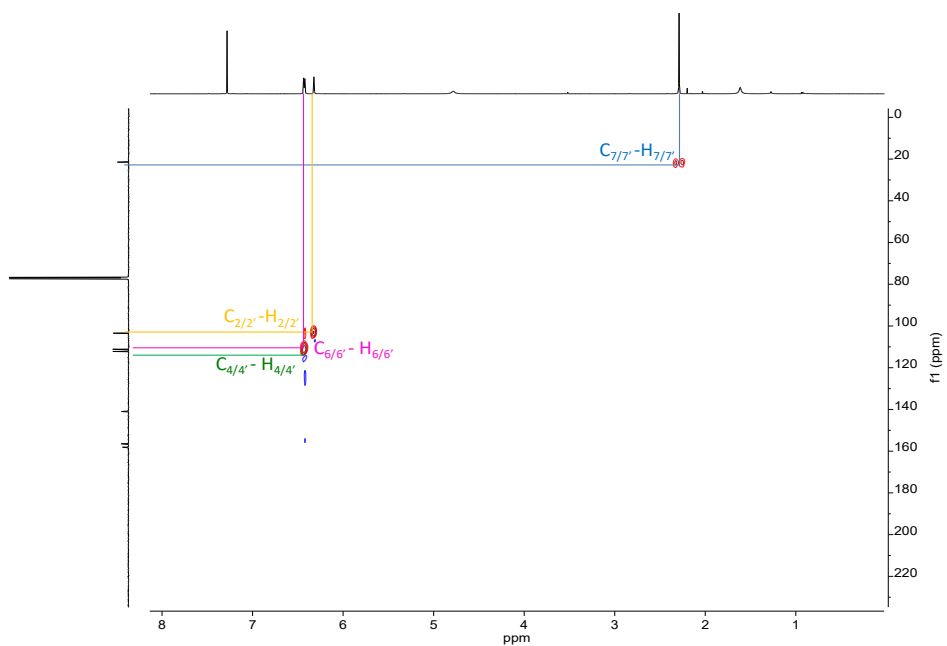


Figura 59 Espectro HSQC del diorcinol (6) (500 MHz, CDCl₃).

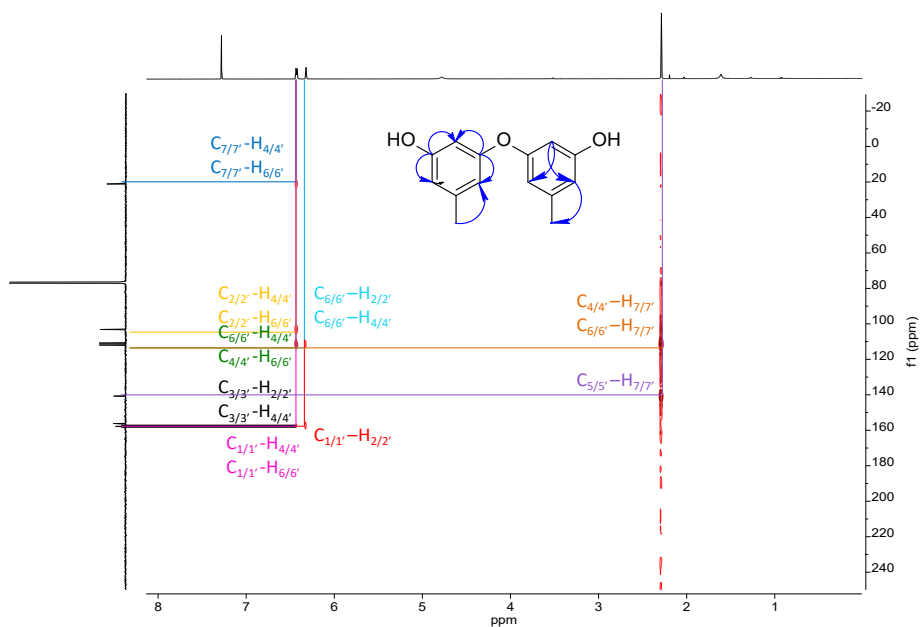


Figura 60. Espectro HMBC del diorcinol (6) (500 MHz, CDCl₃).

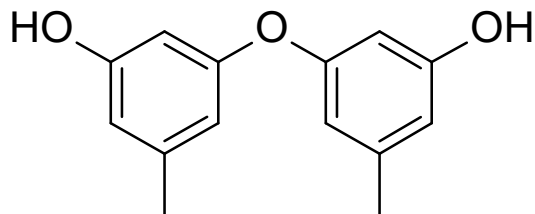


Figura 61. Estructura química del diorcinol (6).

5.6.3 Caracterización del compuesto 7

La fórmula molecular de este producto se estableció como $C_{17}H_{18}O_5$ con base en los iones en m/z 303.1233 $[M+H]^+$ y 301.1091 $[M-H]^-$ (calculada para $C_{17}H_{19}O_5$, $\Delta=2.0$ ppm, IDH=9) observados en el análisis por HRESIMS (**Figura 62**).

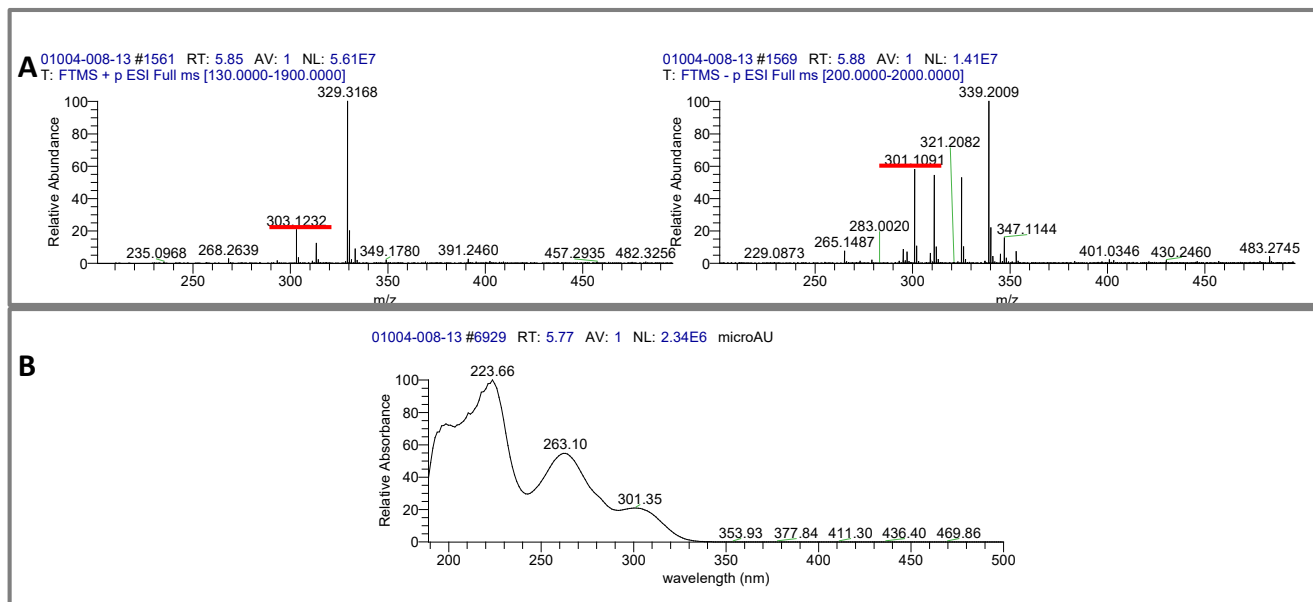


Figura 62. Espectros en ESI+ (izquierda) y ESI- (derecha) (**A**) y en el UV (**B**) del compuesto 7.

El análisis detallado de los espectros de RMN 1H y ^{13}C (**Figuras 63 y 64 y Cuadro 22**) permitió identificar las señales que se describen a continuación:

- En δ_H 11.40 una señal de un grupo hidroxilo.
- Un conjunto de señales de hidrógenos de tipo aromático en δ_H 6.36 (d, $J=2.6$), 6.38 (s, 2H), 6.48 (s) y 6.50 (s) correspondientes a los protones H-6, H-2, H-4, H-4' y H-2'.
- Una señal cuádruple de un metino base oxígeno en δ_H 4.43 (q, $J=7.1$).
- En δ_H 1.40 (t, $J=7.0$), 2.30 (s) y 2.50 (s) tres señales de grupos metilo.
- En δ_C 171.7 se observó una señal característica de un grupo éster en la posición 8.
- Cuatro señales de carbonos de tipo aromático en δ_C 165.2 (C-5), 162.3 (C-5'), 156.7 (C-1) y 156.1 (C-1').
- En δ_C 143.8 (C-3), 141.4 (C-3'), 113.7 (C-4'), 113.1 (C-2), 112.6 (C-2'), 107.3 (C-4), 105.1 (C-6) y 103.4 (C-6').

- En δ 61.6 una señal atribuible a un carbono en posición alfa a un heteroátomo (C-9).
- Tres señales en δ 24.6 (C-7), 21.6 (C-7') y 14.4 (C-10) correspondientes a tres grupos metilo.

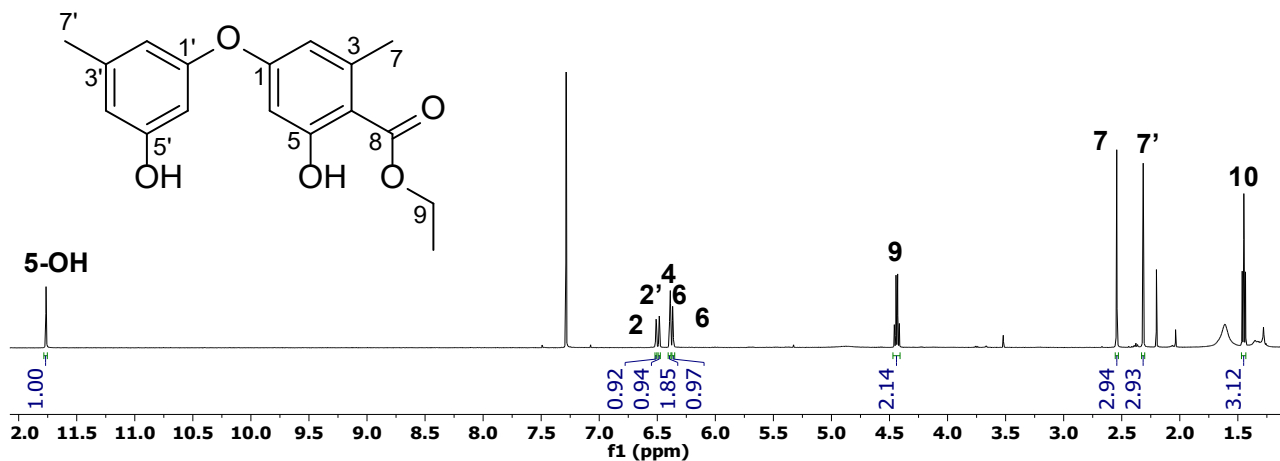


Figura 63. Espectro de RMN ^1H de la funicina (7) (500 MHz, CDCl_3).

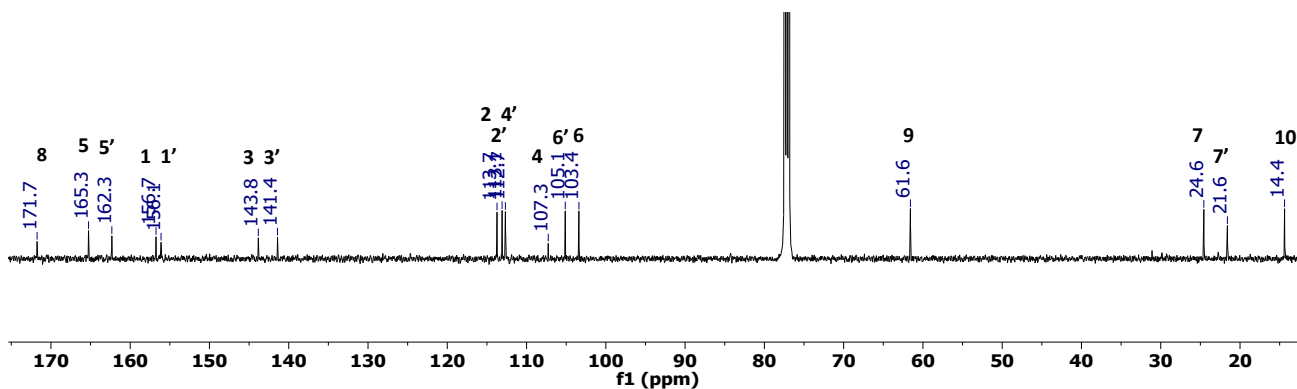


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C de la funicina (7) (125 MHz, CDCl_3).

Cuadro 22. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) de la funicina (7).

Posición	7 ^a				Funicina ^b	
	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)	COSY (^1H - ^1H)	HMBC (^{13}C - ^1H)	δ_c	δ_H , mult. (J en Hz)
1	162.3			2, 5-OH	162.4	
2	113.1	6.38, sa		6, 7	113.2	6.38, sa
3	143.8			7	143.9	
4	107.3			2, 6, 7, 5-OH	107.2	
5	165.2			5-OH	165.0	
6	105.1	6.36, d (2.6)		2, 5-OH	105.2	6.38, br
7	24.6	2.50, s		2	24.4	2.46, s
8	171.7			9, 5-OH	171.8	
9	61.6	4.43, q (7.1)	10	10	61.6	4.36, q (7.0)

10	14.4	1.44, t (7.1)		9	14.3	1.40, t (7.0)
1'	156.7			6'	157.0	
2'	112.6	6.50, s		4', 6', 7'	112.8	6.42, s
3'	141.4			2', 7'	141.3	
4'	113.7	6.48, s		2', 6', 7'	113.4	6.42, s
5'	156.1			6'	156.0	
6'	103.4	6.38, sa		2', 4'	103.4	6.38, sa
7'	21.6	2.30, s		2', 4'	21.5	2.24, s
5-OH		11.7, s				11.40, s

^aCDCl₃ y δ en ppm; ^bHamasaki, T. *et al* (1980).

El análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos antes descritos, aunado a las correlaciones observadas en experimentos de RMN HSQC, COSY y HMBC (**Figuras 65, 66 y 67**) y lo descrito en la literatura, permitieron identificar al compuesto **7** como la funicina (**Figura 68**) (Hamasaki *et al.*, 1980). Este compuesto ha sido aislado de especies del género *Aspergillus*, por lo que este trabajo representa el primer aislamiento de este compuesto a partir del género *Leptosphaerulina*. Con respecto a su actividad biológica, la funicina, conocida también como etericina B, ha sido descrita como agente antimicrobiano contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Shigella flexneri* y *P. aeruginosa* (König *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2016).

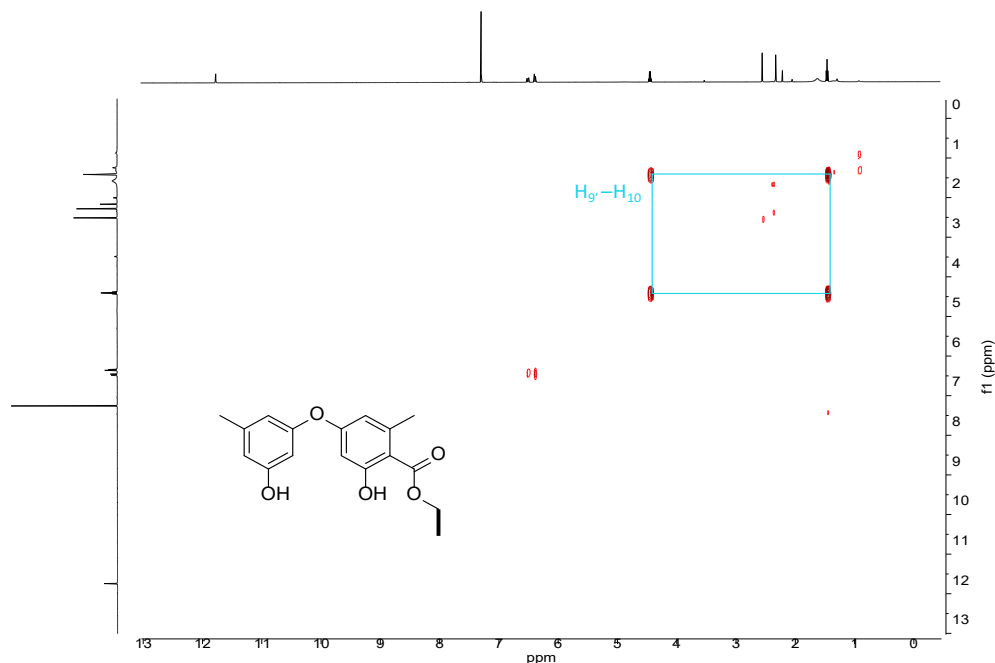


Figura 65. Espectro COSY de la funicina (**7**) (500 MHz, CDCl₃).

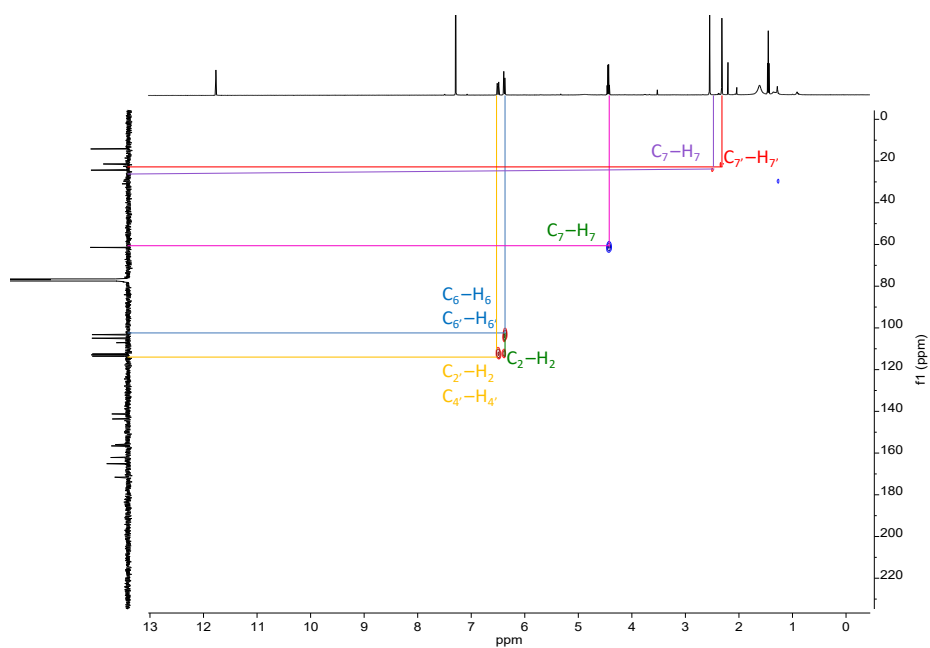


Figura 66. Espectro HSQC de la fucicina (**7**) (500 MHz, CDCl_3).

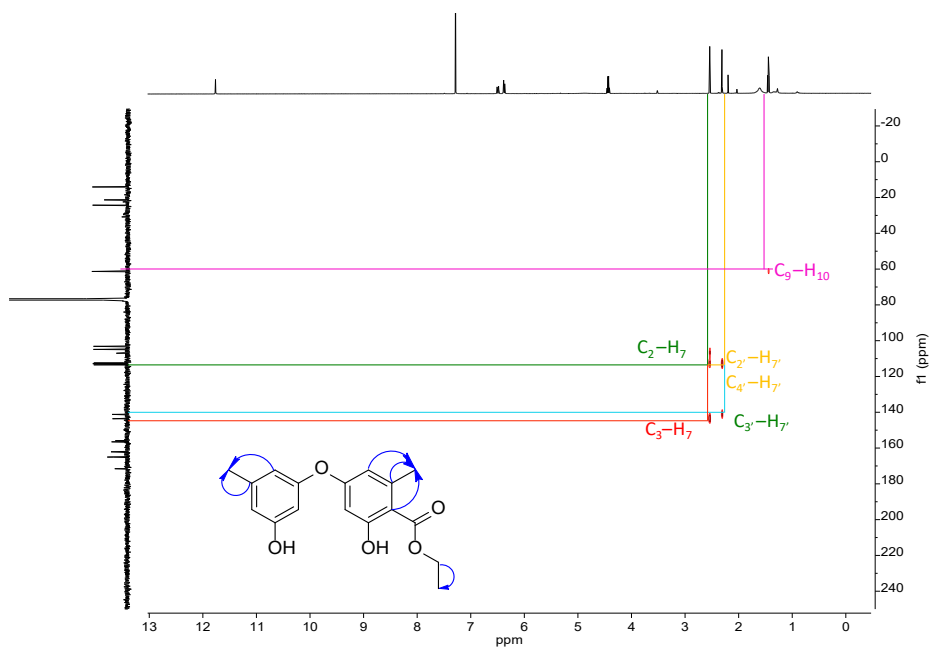


Figura 67. Espectro HMBC de la fucicina (**7**) (500 MHz, CDCl_3).

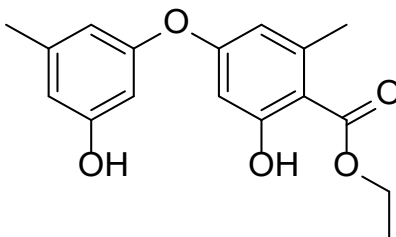


Figura 68. Estructura química de la fucicina (**7**).

5.6.4 Estudios de metabolómica no dirigida

El análisis de la red molecular de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11) mostró que de los 147 nodos que la conforman, únicamente 62 se agruparon en 17 clústeres que pertenecen a los derivados de isocumarinas y glicerofosfolípidos (**Figura 69**). En esta red, se realizó la anotación manual de las moléculas **6** y **7** (**Cuadro 23**) debido a que no fueron identificadas mediante GNPS, lo cual podría deberse a que la plataforma no contiene información suficiente de los metabolitos producidos por este hongo o bien, que no se hayan incorporado a esta base de datos.

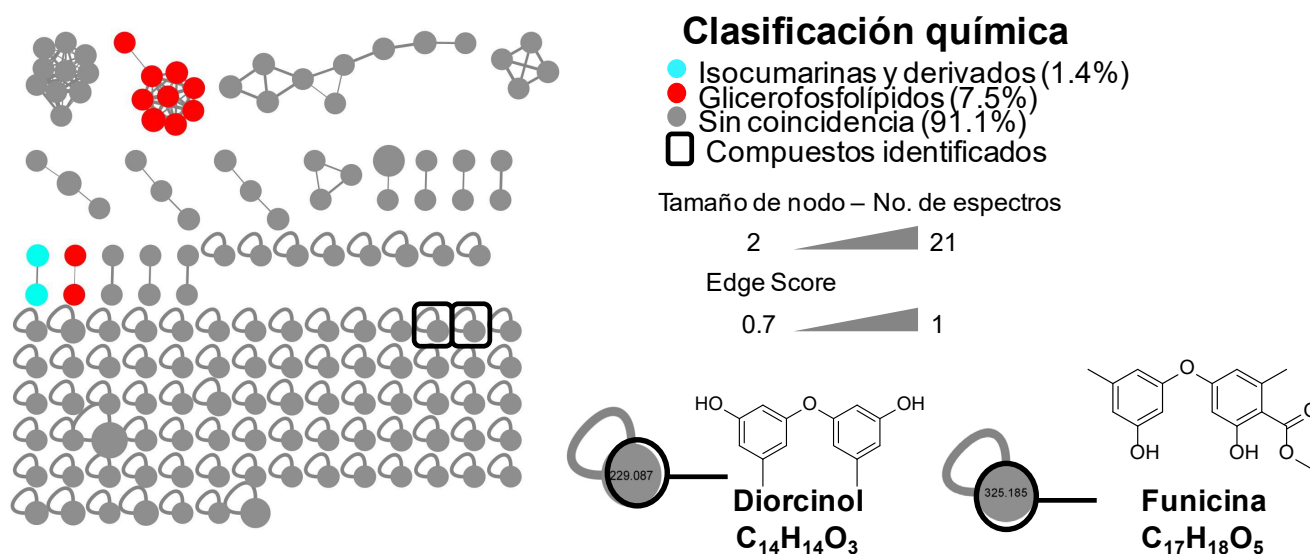


Figura 69. Red molecular de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11) con la herramienta MolNetEnhancer.

Cuadro 23. Anotación química de metabolitos de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11).

Compuesto	Ion observado (m/z) ^d	Aducto	Fórmula molecular	Masa exacta ^e	Masa calculada (ppm)
Diorcinol ^{a,b}	229.0870	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	229.0869	0.4
Funicina ^{a,b}	325.1850	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	325.1846	3.3

^aCompuesto aislado, ^bAnotación manual, ^cAnotación por GNPS, ^dValor en GNPS, ^eValor en análisis UPLC-HRESIMS-MS/MS

6. CONCLUSIONES

1. Se realizó el acondicionamiento de 45 organismos fúngicos endófitos de las especies *R. mangle*, *A. germinans* y *Tabernaemontana* sp. obtenidas en la RBPC, mismos que fueron identificados taxonómicamente de manera preliminar mediante el análisis de la región ITS. La diversidad fúngica de esta colección incluyó diversas especies de *Fusarium*, además de especies de *Colletotrichum*, *Hortaea*, *Daldinia*, *Leptosphaerulina*, *Lophiostoma*, *Pestalotiopsis*, *Celoportha*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Paraphoma* y de la familia Didymellaceae.
2. La evaluación del potencial anti-ESKAPE de los extractos orgánicos fúngicos, su identificación taxonómica preliminar, los rendimientos y la complejidad de los perfiles cromatográficos, permitió la seleccionar cuatro organismos para continuar con su estudio químico.
3. El estudio de las especies *Fusarium* spp. (Centla04 y Centla05) permitió el aislamiento de la equisetina (**1**) y la *epi*-equisetina (**2**) a partir de las fracciones activas. Adicionalmente fue posible identificar la presencia de la fusarisetina (**3**) en los extractos de estos organismos.
4. A partir de *D. eschscholtzii* (Centla07) se obtuvieron los compuestos 1,8-dimetoxinaftaleno (**4**) y 1-hidroxi-8-metoxinaftaleno(**5**).
5. El estudio químico de *Leptosphaerulina* sp. (Centla11) permitió el aislamiento de diorcinol (**6**) y funicina (**7**), los cuales no han sido previamente descritos como metabolitos de especies de este género.
6. Los estudios de metabolómica no dirigida de los organismos permitieron identificar la presencia de algunas entidades químicas que no fueron aisladas en el laboratorio. Adicionalmente se realizó la anotación manual de algunos compuestos caracterizados durante este proyecto, y que es una contribución importante a la base de datos del GNPS.
7. Finalmente, los resultados de este proyecto contribuyen al conocimiento de la diversidad fúngica y química de la RBPC, Tabasco, representando el primer estudio de esta naturaleza en la zona. Por otra parte, se demuestra que los organismos endófitos de manglares de nuestro país representan candidatos potenciales para la obtención de metabolitos bioactivos.

7. PERSPECTIVAS

1. Continuar con el estudio químico de las especies *D. eschscholtzii* (Centla07) y *Leptosphaerulina* sp. (Centla11) por haber demostrado ser organismos productores de compuestos biactivos y de los cuales existen pocos estudios de bioprospección.
2. Identificar a nivel de especie al hongo *Leptosphaerulina* sp. (Centla11).
3. Cultivar en mediana escala aquellos organismos que hayan sido identificados como géneros o especies con pocos reportes previos para realizar su estudio químico.
4. Contruir las redes moleculares de los organismos de esta colección con la finalidad de conocer la diversidad química de la RBPC.
5. Establecer el posible mecanismo de acción de los compuestos caracterizados durante este estudio en su actividad como agentes antimicrobianos.

8. REFERENCIAS

- Abdel-Razek, A.S., El.Naggar, M.E., Allam, A., Morsy, O.M y Othman, S.I., **2008**, Microbial natural products in drug discovery, *Processes*, 8(470), 1-19.
- Acosta-Velázquez, J., Cerdeida-Estrada, S., Rodríguez-Zuñiga, T., Díaz-Gallegos, J., Troche-Souza, S., Cruz-I., Ressler, R. y Jiménez, R., **2009**, Assessing a nationwide spatial distribution of mangrove forest for Mexico: an analysis with high resolution images, CONABIO, 33rd International Symposium on Remote Sensing on Environment, Stressa, Italy.
- Allport, D.C. y Bu'lock, J.D., **1960**, Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*, *J. Chem. Soc.*, 654-662.
- Anke, H., Stadler, M., Mayer, A y Stenet, O., **1995**, Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and ascomycetes, *Canad. J. Bot.*, 73(1), 932-939.
- Antimicrobial Resistance Collaborators, **2022**, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *Lancet*, 399 (10325), 629-655.
- Arnold, E.A. y Lutzoni, F., **2007**, Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?, *Ecology*, 88 (3), 541-549.
- Balkhy, H.H., **2021**, World Health Organization: Update on AMR, WHO. Sitio web: <https://www.hhs.gov/sites/default/files/who-update-amr.pdf>.
- Balouiri, M., Sadiki, M. e Ibsouda, S.K., **2016**, Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review, *J. Pharm. Anal.*, 6, 71-19.
- Bamisile, B.S., Dash, C.K., Akutse, K., Keppanan, R. y Wang, L., **2018**, Fungal endophytes: beyond herbivore management, *Front. Microbiol.*, 9, 1-11.
- Banerjee, D., **2011**, Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants, *Res. J. Microbiol.*, 6(1), 54-62.
- Banerjee, A., Bedoya, L., Adherian, M., Vera, W., Cabrera, E. y Kariney, E., **2010**, Transformation of 5-methoxy-1-tetralone into 8-methoxy-1-tetralone, *J. Chem. Res.*, 34(9), 522-524.
- Barbosa-Reséndiz, A., Valenzuela, R., Sánchez-Flores, M., Bautista-Hernández, S., Cobos-Villagrán, A., Pérez-Valdespino, A., Espinoza-Mellado, M., Martínez-Pineda, M. y Raymundo, T., **2020**, El género *Daldinia* (Sordariomycetes, Ascomycota) en México, *Acta Bot. Mex.*, 127, 1-32.
- Baron, N.C. y Rigobelo, W.C., **2022**, Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture, *Mycology*, 13(1), 39.55.

- Bhavana, N.S., Prakash, H.S. y Nalini, M.S., **2020**, Fungal endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), their molecular characterization, L-asparaginase and antioxidante activities, *JJBS*, 13(4), 543-550.
- Boros, C., Smith, C., Vasina, Y., Che, Y., Dix, Y.C., Darveaux, B. y Pearce, C., **2006**, Isolation and identification of the icosalides-cyclic peptolides with selective antibiotic and cytotoxic activity, *J. Antibiot.*, 59, 486-494.
- Buchanan, M., Hashimoto, T. y Asakawa, Y., **1995**, Cytochalasins from a *Daldinia* sp. Of fungus, *Phytochemistry*, 41(3), 821-828.
- Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Intereya, K. y Kocharin, K., **2007**, New diphenyl ethers from the insect pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 1861, *Chem. Pharm. Bull.*, 55(2), 304-307.
- Butler, M.S., **2004**, The role of natural product chemistry in drug discovery, *J. Nat. Prod.*, 67, 2141-2153.
- Cadamuro, R.D., Agustini Da Silveira, I.M., Silva, I.T., Cabral, A.C., Robl, D., Pergaud, L., Alvez, S., Lorenzo, J.M., Rodríguez-Lázaro, D., Trichel, H., Steindel, M. y Fongaro, G., **2021**, Bioactive compounds from mangrove endophytic fungus and their uses for microorganism control, *J. Fungi*, 7, 1-19.
- Campos, J.C.M., Antunes, L.C.M. y Ferreira, R.B.R., **2020**, Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options, *Future Microbiol.*, 1-30.
- Carabias, L., Provencio, E., De la Maza, J. y Romero, J.C., **2000**, Programa de manejo Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla, México, Instituto Nacional de Ecología, 1ª edición, México, p. 9-110.
- Carugati, L., Gatto, B., Rastelli, E., Lo Martire, M., Coral, C., Greco, S. y Danovaro, R., **2018**, Impact of mangrove forests degradation on biodiversity and ecosystem functioning, *Sci. Rep.*, 8, 1-11.
- Chen, M., Shao, C., Fu, X., Xu, R., Zheng, J., Zhao, D., She, Z y Wang, C., **2013**, *J. Nat. Prod.*, 76, 547-553.
- Chen, S., Liu, D., Zhang, Q., Guo, P., Ding, S., Shen, J., Zhu, K. y Lin, W., **2021**, A marine antibiotic kills multidrug-resistant bacteria without detectable high-level resistance, *Infect. Dis.*, 7, 884-893.
- Cheng, Z.S., Pan, J.H., Tang, W.C., Chen, Q.J. y Lin, Y.C., **2009**, Biodiversity and biotechnical potential of mangrove-associated fungi, *J. For. Res.*, 20(1), 63-72.

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), **2009**, Manglares de México: Extensión y distribución, *CONABIO*, 2ª edición, México, 15-25.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), **2018**, Manglar, riqueza de especies, sitio web: <https://www.gob.mx/conafor/articulos/manglar-riqueza-de-especies?idiom=es>
- Cui, H., Liu, Y., Ding, M., Zhang, Z., Liu, H., Huang, X. y She, Z., **2017**, New pyranonaphthazarin and 2-naphthoic acid derivatives from the mangrove endophytic fungus *Leptosphaerulina* sp. SKS032, *Phytochem. Lett.*, 20, 214-217.
- Demain, A.L. y Zhang, L., **2005**, Natural Products: Drug discovery and therapeutic medicine, Humana Press, Estados Unidos de América, 1a edición, p. 3-7.
- Demers, D.H., Knestrick, M.A., Fleeman, R., Tawfik, R., Azhari, A., Souza, A., Vesely, B., Netherton, M., Gupta, R., Colon, B.L., Rice, C.A., Rodríguez-Pérez, M.A., Rohde, K.H., Kyle, D.E., Shaw, L.N. y Baker, B.J., **2018**, Exploitation of mangrove endophytic fungi for infectious disease drug discovery, *Mar. Drugs*, 16, 1-11.
- Deshmukh, S.K., Agrawal, S., Prakash, V., Gupta, M.K. y Reddy, M.S., **2020**, Anti-infectives from mangrove endophytic fungi, *S.Afr. J. Bot*, 134, 237-263.
- DeSouza-Sebastianes, D.L., Romao-Dumaresq, A., Teixeira, P., Harakava, R., Azevedo, J.L., Soares, I. y Pizzirani-Kleiner, A.A., **2013**, Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangroves forests, *Curr. Genet.*, 59, 153-166.
- Dettrakul, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Nopichai, S., Suyarnsestakorn, C., Tanticharoen, M. y Thebtaranonth, Y., **2003**, Antimycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 1253-1255.
- Devadatha, B., Jones, E.B.G., Pang, K.L., Abdel-Wahab, M.A., Hyde, K.D., Sakayaroj, K.D., Bahkali, A.H., Calabon, M.S., Sarma, V.V., Sutreong, S. y Zhang, S.N., **2020**, Occurrence and geographical distribution of mangrove fungi, *Fungal Divers.*, 106, 137-227.
- Ebrahim, W., El-Neketi, M., Lewald, L., Orfali, R., Lin, W., Rehberg, N., Kalscheuer, R., Daletos, G. y Proksch, P., **2016**, Metabolites from the fungal endophyte *Aspergillus austroafricanus* in axenic culture and in fungal-bacterial mixed cultures, *J. Nat. Prod.*, 79, 914-922.
- Ellison, A.M., Farnsworth, E.J. y Merkt, R.E., **1999**, Origins of mangrove ecosystems and the mangrove biodiversity anomaly, *Glob. Ecol. Biogeogr.*, 8, 95-115.
- Endo, A., Hasumi, K. y Negishi, S., **1984**, Monacolins J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*, *J. Antibiot.*, 38(3), 420-422.

- Fajardo-Hernández, C.A., Tuglak, F.S., Flores-Bocanegra, L., Prieto-Davó-A., Wan, B., Ma, R., Qader, M., Villanueva-Silva, R., Martínez-Cárdenas, A., López-Lobato, M.A., Hematian, S., Franzblau, S.G., Raja, H.A., García-Contreras, R. y Figueroa, M., **2022**, Insights into the chemical diversity of selected fungi from the Tza Itzá Cenote of the Yucantan Peninsula, *ACS Omega*, 7, 12171-12185.
- Flores-Reséndiz, M., Lappe-Oliveras, P. y Macías-Rubalcava, M.L., **2021**, Mitochondrial damage produced by phytotoxic chromenone and chromanone derivatives from endophytic fungus *Daldinia eschscholtzii* strain GsE13, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 4225-4239.
- Guerra-Martínez, V. y Ochoa-Gaona, S., **2008**, Evaluación del Programa de Manejo de la Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla en Tabasco, México, *Universidad y Ciencia*, 24(2), 135-146.
- Hamasaki, T., Kimura, Y., Hatsuda, Y. y Sugawara, S., **1980**, Isolation and structure of funicin, antimicrobial substance produced by *Aspergillus funiculosus*, *Agric. Biol. Chem.*, 44(6), 1357-1360.
- Hawksworth, D.L. y Lücking, R., **2017**, Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species, *Microbiol. Spectr.*, 1-17.
- Imhoff, J.F., **2016**, Natural products from marine fungi: still an underrepresented resource, *Mar. Drugs*, 14, 1-19.
- Isaka, M., Jaturapat, A., Kladwang, W., Punya, J., Lertwerawat, Y., Tanticharoen, M. y Thebtaranonth, Y., **2000**, Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC1067, *Planta med.*, 66, 473-476.
- Jang, J., Asami, Y., Jang, J., Kim, S., Moon, D., Shin, K., Hashizume, D., Muroi, M. y Saito, T., Oh, H., Kim, B., Osada, H. y Ahn, J., **2011**, Fusarisetin A, an acinar morphogenesis inhibitor from a soil fungus, *Fusarium* sp. FN080326, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 6865-6867.
- Jeewon, R., Luckhun, A.B., Bhojroo, V., Sadeer, N.B., Mahomoodally, M.F., Rampadarath, S., Puchooa, D., Sarma, V.V., Durairajan, S. y Hyde, K.D., **2019**, Pharmaceutical potential of marine fungal endophytes, *Endophytes and Secondary Metabolites*, Springer, Suiza, p. 1-23.
- Jena, S.K. y Tayung, K., **2013**, Endophytic fungal communities associated with two ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India and their antimicrobial prospective, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3(4), 7-12.
- Jindal, B.A.K, Pandya, M. K y Khan, M.I.D., **2015**, Antimicrobial resistance: a public health challenge, *Med. J. Armed Forces India*, 71, 178-181.

- Kahlos, K., Kangas, L. y Hiltunen, R., **1989**, Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*, *Planta Med.*, 55, 389-390.
- Kamauchi, H., Shiraishi, Y., Kojima, A., Kawazoe, N., Kinoshita, K. y Koyama, K., **2018**, Isoindolinones, phtalides and a naphtoquinone from the fruiting body of *Daldinia concentrica*, *J. Nat. Prod.*, 81, 1290-1294.
- Kathiresan, K. y Bingham, B.L., **2001**, Biology of mangroves and mangrove ecosystems, *Adv. Mar. Biol.*, 40, 81-251.
- Kato, N., Nogawa, T., Hirota, H., Jan, J., Takahashi, S., Ahn, J.S. y Osada, H., **2015**, A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30, 1-6.
- Kiti, H.M., Munga, C.N., Odalo, J.O., Guyo, P.M., Kibiti, C.M., **2021**, Diversity of mangrove fungal endophytes from selected mangrove species of coastal Kenya, *WIO J. Mar. Sci.*, 20(1), 125-136.
- Kjer, J., Debbad, A., Aly, A.H. y Proksch, P., **2010**, Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products, *Nature Protocols*, 5(3), 479-490.
- König, W.A. y Krause, R., **1980**, Metabolic products of microorganisms. The structure of ethericin B, a new diphenylether antibiotic, *J. Antibiot.*, 33(11), 1270-1274
- Liao, H., Shao, T., Mei, R., Huang, G., Zhou, X., Zheng, C. y Wang, C., **2019**, Bioactive secondary metabolites from the culture of the mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ004, *Mar. Drugs*, 17(710), 1-9
- Liu, C., Zeng, Z., Chen, R., Jiang, X., Wnag, Y. y Zhang, Y., **2016**, Total synthesis of (+)-fusarisetin A driven by a one-pot four-reaction process, *Org. Lett.*, 18(3), 624-627.
- Martínez-Cárdenas, A., Cruz-Zamora, Y., Fajardo-Hernández, C.A., Villanueva-Silva, R., Cruz-García, F., Raja, H.A. y Figueroa, M., **2021**, Genome mining and molecular networking-based metabolomics of the marine facultative *Aspergillus* sp. MEXU 27854, *Molecules*, 26 (17), 5362-5375.
- Nam, K.S., Jo, Y.S., Kim, Y. H., Hyun, J.W. y Kim, H.W., **2000**, Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*, *Life Sci.*, 69, 229-237.
- Newman, D.J. y Cragg, G.M., **2020**, Natural products s sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.*, 83, 770-803.
- Patham, B., Duffy, J., Lane, A., Davis, R., Wipf, P., Fewell, S., Brodsky, J. y Mensa-Wilmot, K., **2009**, Post-traductional import of protein into the endoplasmic reticulum of a trypanosome:

- an *in vitro* system for discovery of anti-trypanosomal chemical entities, *Biochem. J.*, 419, 507-517.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S. y Hoyer, D., **2016**, An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives, *Drug Discov. Today*, 21(2), 204-408
 - Prestinaci, F., Pezzotti, P. y Pantosi A., **2015**, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon, *Pathog. Glob. Health*, 109 (7), 309-319.
 - Qin, X., Dong, Z., y Liu, J., **2006**, Concentricolide, an anti-HIV agent from the ascomycete *Daldinia concentrica*, *Helv. Chim. Acta*, 89, 127-133.
 - Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J. y Oberlies, N.H., **2017**, Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community, *J. Nat. Prod.*, 80, 756-770.
 - Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R. y Upadhyayula, S.M., **2017**, Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 60, 1-26.
 - Ramos-Ligonio, A., López-Monteón-A. y Trigos, A., **2011**, Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*, *Phytother. Res.*, 26, 938-943.
 - Ratnaweera, P.B., Dilip de Silva, E., Williams, D.E. y Andersen, R.J., **2015**, Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp., *Complement. Altern. Med.*, 15(220), 1-7.
 - Rauf, A., Subhan, H., Abbasi, R., Adhikari, B., Shah, A., Rana, U., Abbas, Q., Qureshi, I., Hussain, H., Mazhar, K., Badshah, A., Kraatz, H. y Shah, A., **2014**, Biological activity, pH dependent redox behavior and UV-Vis spectroscopic studies of naphthalene derivatives, *J. Photochem. Photobiol. Biol.*, 140, 173-181.
 - Reygaert, W.C., **2018**, An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria, *AIMS Microbiol.*, 4(3), 482-501.
 - Rodríguez-Mendoza, C.A., Hernández, L.R., Pérez-Armendáriz, B. y Juárez, Z.N., **2021**, Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones, *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24, 1-14.
 - Sánchez J.F., Chiang, Y., Szewczyk, E., Davidson, A., Ahuja, M., Oakley, C.E., Bok, J.W., Keller, N., Oakley, B.R. y Wang, C. C. C., **2010**, Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*, *Mol. Biosyst.*, 6(3), 587-593.
 - Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y.K.M., Ulloa-Benitez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C. y Macías-Rubalcava, M.L., **2013**, Hongos

- endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina, *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.
- Santajit, S. e Indrawattana, N., **2016**, Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens, *Biomed Res. Int.*, 1-8.
 - Schappert, K.t., Koshinsky, H.A. y Khachatourians, G.G., **1986**, Growth inhibition of yeast by T-2, HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol, diacetoxyscirpenol, verrucarol, verrucarín A and roridin A mycotoxins, *Int. J. Toxicol.*, 5(2), 181-185.
 - Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), **2016**, Reserva de la Biósfera Pantanos de Centla, Tabasco, Sitio web: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/reserva-de-la-biosfera-pantanos-de-centla-tabasco?idiom=es>
 - Singh, S.B., Zink, D., Goetz, M.A., Dombrowski, A.W., Polishook, J.D. y Hazuda, D.J., **1998**, Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase, *Tetrahedron Lett.*, 39, 2243-2246.
 - Stadler, M., Laesoe, T., Fournier, J., Decock, C., Shmieschek, B., Tichy, H. y Persoh, D., **2014**, A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae), *Stud. Mycol.*, 77, 1-143.
 - Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E. y Leslie J.F., **2010**, Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review, *Fungal Divers.* 44, 3-13.
 - Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ovellette, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Thevretzbacher, U. y Magrini, N., **2017**, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *Lancet Infect. Dis.*, 1-10.
 - Thatoi, H., Behera, B.C., Mushra, R.R. y Dutta, S.K., **2013**, Biodiversity and biotechnical potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review, *Ann. Microbiol.*, 63, 1-19.
 - Tiwari, P. y Bae, H., **2020**, Endophytic fungi: key insights, emerging prospects, and challenges in natural product drug discovery, *Microorganisms*, 10(360), 1-43.
 - Toghueo, R.M.K., **2020**, Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites, *Mycology*, 11(1), 1-20.
 - Uddin, T.M., Chakraborty, A.J., Khusro, A., Zidan, B.M.R., Mitra, S., Emran, T.B., Dhama, K., Ripon, K.H., Gajdács, M., Sahibzada, M.U.K., Hossain, J. y Koirala, N., **2021**, *J. Infect. Public Health*, 14, 1750-1766.

- Unterseher, M., **2011**, Diversity of fungal endophytes in temperate forest trees, *Endophytes of forest trees: biology and applications*, Springer Sciences, 1^a edición, p.31-46.
- Vesonder, R.F., Tjarks, L.W., Rohwedder, W., Burmeister, H. y Laugal, J.A., **1979**, Equisetin, an antibiotic from *Fusarium equiseti* NRRL5537, identified as a derivative of N-methyl-2,4-pyrrolidone, *J. Antibiot.*, 32(7), 759-761.
- Villanueva-Silva, R., Vélez, P., Riquelme, M., Fajardo-Hernández, C.A., Martínez-Cárdenas, A., Arista-Romero, A., Wan, B., Ma, Rui, Qader, M., Franzblau, S. y Figueroa, M., **2021**, Chemical diversity and antimicrobial potential of cultivable fungi from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico, *Molecules*, 26 (23), 7328-7344.
- Wanderley-Costa, I.P.M., Costa-Maia, L. y Cavalcanti, M.A., **2016**, Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of Northeast Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, 1165-1173.
- Watkins, R.R. y Bonomo, R.A., **2016**, Overview: Global and local impact of antibiotic, *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 30, 313-322.
- Wei, J. y Wu, B., **2020**, Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*, *Fitoterapia*, 146, 1-20.
- Wen, J., Okyere, S.K., Wang, S., Wnag, J., Xie, L., Ran, Y. y Hu, Y., **2022**, Endophytic fungi: an effective alternative source of plant-derived bioactive compounds for pharmacological studies, *J. Fungi*, 8 (205), 1-45.
- Wen, L., Cai, X., Xu, F., She, Z., Chan, W., Vrijmoed, L., Jones, E. y Lin, Y., **2008**, Three metabolites from the mangrove endophytic fungus *Sporothrix* sp. 4335 from the South China Sea, *J. Org. Chem.*, 74, 1093-1098.
- Wheeler, M.H., Stipanovic R.D. y Puckhaber, L.S., **1999**, Phytotoxicity of equisetin and *epi*-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*, *Mycol. Res.*, 8, 967-973.
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X. y Xiang, M., **2019**, Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequence of fungi, *Mycology*, 10(3), 127-140.
- Wu, Z., Wang, Y., Liu, D., Proksch, P., Yu, S. y Lin, W., **2016**, Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*, *Tetrahedron*, 72(1), 50-57.
- Wutthiwong, N., Suthiphasilp, V., Pintatum, A., Suwannarach, N.m Kumla, J., Lumyong, S., Maneerat, T., Charoensup, R., Cheenpracha, S., Limtharakul, T., Pyne, S.G. y Laphoojhieo, S., **2021**, Daldiniaeschone A, a rare tricyclic polyketide having a chromone unit fused to a δ -lactone and its symmetrical biphenyl dimer, daldiniaeschone B, from an endophytic fungus *Daldinia eschscholtzii* SDBR-CMUNKC745, *J. Fungi*, 7(358), 1-12.

- Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W. y Wang, Q., **2015**, Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi, *Mar. Drugs*, 13, 3479-3513.
- Yang, L., Liao, H., Bai, M., Huang, G., Luo, Y., Niu, Y., Zheng, C. y Wang, C., **2017**, One new cytochalasin metabolite isolated from a mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ001, *Nat. Prod. Res.*, 32(2), 208-213.
- Yang, Y., Lowry, M., Xu, X., Escobedo, J., Sibrian-Vázquez, M., Wong, L., Schowalter, C., Jensen, T., Fronczek, F., Warner, I. y Strongin, R., **2008**, seminaphthofluorones are a family of water-soluble, low molecular weight, NIR-emitting fluorophores, *PNAS*, 105 (26), 8829-8834.
- Zhang, M., Wang, M., Zhu, X., Yu, W. y Gong, Q., **2018**, Equisetin as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biotechnol. Lett.*, 40, 865-870.
- Zhang, P., Jia, C., Lang, J., Shen, H., Li, J., Chen, S. y Liu, L., **2018**, Leptothiazinones A and B, two new benzothiazinones from a marine-derived fungus *Leptosphaerulina chartarum* 3608, *Phytochemistry Letters*, 27, 55-58.
- Zhang, W., Krohn, K., Egold, H., Draeger, S. y Schulz, B., **2008**, Diversity of antimicrobial pyrenophorol derivatives from an endophytic fungus, *Phoma* sp., *European Journal of Organic Chemistry*, 4320-4328.
- Zhao, D., Han, X., Wang, D., Liu, M., Gou, J., Peng, Y., Liu, J., Cao, F. y Zhang, C., **2019**, Bioactive 3-decalinoyltetramic acids derivatives from a marine-derived strain of the fungus *Fusarium equiseti* D39, *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-28.
- Zhao, Z., Chen, H., Huang, Y., Zhang, S., Li, Z., Feng, T. y Liu, J., **2017**, Bioactive polyketides and 8,14-seco-ergosterol from fruiting bodies of the ascomycete *Daldinia childiae*, *Phytochemistry*, 142, 68.75.
- Zhou, J. y Xu, J., **2018**, Chemistry and biodiversity of *Rhizophora*-derived endophytic fungi, *Mangrove ecosystem ecology and function*, IntechOpen, 185-166, <https://doi.org/10.5772/intechopen.70152>.

9. ANEXO

I. Resumen y cartel presentado en el congreso virtual Vanguard of Natural Product Research 2021, ASP.

P-090 – Anti-ESKAPE Potential of Endophytic Fungi from Mangroves in Tabasco, Mexico

Alejandra Arista-Romero¹, María del Carmen Gonzalez², and Mario Figueroa¹. ¹Facultad de Química and ²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico.

Mangroves are salt-tolerant forest ecosystems with a unique microbial diversity. The Pantanos de Centla Biosphere Reserve (PCBR) in Tabasco, Mexico, is an unexplored niche of unique fungal species with bioprospecting potential in medicine and agriculture. In this work, the organic extracts (CHCl₃-MeOH) from solid axenic cultures (moist rice) of 45 endophytic fungi isolated from mangroves of the PCBR were tested against a set of ESKAPE bacteria. From these, the strains with internal codes PC4 and PC5 showed significant activity at 20 and 200 µg/mL against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (methicillin resistant), and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Scaled-up (10x) cultures of the active strains were submitted for bioactive compounds isolation.



Anti-ESKAPE Potential of Endophytic Fungi from Mangroves in Tabasco, Mexico

Alejandra Arista-Romero¹, María del Carmen González², and Mario Figueroa¹. ¹Facultad de Química and ²Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico.

As part of our continuing search for novel antimicrobial compounds, the CHCl₃-MeOH extracts from the axenic solid (moisture rice) cultures of 45 endophytic fungi isolated from *Rhizophora mangle* collected in the Pantanos de Centla Biosphere Reserve (PCBR) in Tabasco, Mexico (Figure 1), were tested against a set of ESKAPE bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*).¹



Figure 1. Geographical location of sampling site in the PCBR.

Extracts from strains with internal codes PC4 and PC5 (Figure 2) showed significant anti-ESKAPE activity, in particular against *S. aureus*, MRSA, and *E. faecalis* (Table 1). The fungal identification of both strains was assessed by nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) barcoding.² BLAST analysis revealed that strains PC4 and PC5 belongs to the *Fusarium* genera. Chemical study on the scaled-up (10x) cultures of the active strains for active compounds isolation is ongoing.

References. ¹Chávez-Jacobo V.M, 2020, *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol.*, 23, 1-11. ²Lücking R, et al., 2020, *IMA Fungus*, 11(14), 1-32.

Acknowledgements. This work was supported by grants from UNAM-DGAPA IN222220 and UNAM-PAIP 5000-9145.



Figure 2. (A) *Rhizophora mangle* and (B) fungal cultures of active *Fusarium* strains in PDA.

Table 1. Anti-ESKAPE activity of extracts of endophyte *Fusarium* strains.

Extract	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 43300	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
PC4	4	5	5	2
PC5	3	3	3	1
Positive control	Ampicillin	Ampicillin	Vancomycin	Vancomycin
MIC (µg/mL)	25	100	1.5	3.75

Inhibition criteria	
5	Total inhibition at 200 and 20 µg/mL
4	Total inhibition at 200 µg/mL and partial at 20 µg/mL
3	Total inhibition at 200 µg/mL
2	Partial inhibition at 200 and 20 µg/mL
1	Partial inhibition at 200 µg/mL

