

Universidad de Panamá  
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología  
Escuela de Química

**“Aislamiento de los compuestos bioactivos producidos por el hongo  
*Escovopsioides nivea* 03.Ac aislado de una colonia de hormigas  
*Acromyrmex echinator.*”**

Trabajo de grado para optar por el título de:  
Licenciatura en Química

Belén Zayit Hernández Salazar  
3-748-1442

Asesor: Dr. Humberto Ortega

Panamá, República de Panamá  
2025

---

**Dr. Humberto Ortega**  
**Asesor**  
**Departamento de Química Orgánica**

---

**Dr. Carlos Ríos**  
**Jurado**  
**Departamento de Química Orgánica**

---

**Dr. José Félix**  
**Jurado**  
**Departamento de Química Orgánica**

## Índice general

Índice de figuras .....	5
Índice de tablas .....	6
Lista de abreviaturas y términos .....	7
Agradecimientos .....	8
Dedicatoria.....	9
Resumen .....	10
Introducción .....	11
Marco teórico.....	13
Objetivos .....	17
2.1 Objetivo general.....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
Metodología .....	19
3.1 Equipos, disolventes y materiales utilizados .....	20
3.2 Aislamiento del hongo <i>Escovopsioides nivea</i> 03.Ac .....	20
3.3 Cultivo a gran escala del hongo <i>Escovopsioides nivea</i> 03.Ac .....	21
3.4 Obtención del extracto orgánico.....	22
3.5 Fraccionamiento del extracto orgánico y purificación de los compuestos de interés .....	22
3.6 Bioensayo contra hongos.....	23
3.7 Bioensayo de los compuestos contra bacterias y <i>Candida albicans</i> .....	23
3.7.1 Preparación del estándar de turbidez .....	24
3.7.2 Preparación del inóculo bacteriano .....	24
3.7.3 Siembra de la muestra.....	24
Resultados y discusión .....	25
4.1 Elucidación estructural de los compuestos producidos por <i>Escovopsioides nivea</i> 03.Ac .....	26
4.1.1 Microtecina .....	26
4.1.2 2-furil-hidroximetilcetona.....	27
4.1.3 Crisofanol.....	28
4.1.4 Phycion.....	30
4.2. Bioensayos contra hongos.....	33
4.3 Bioensayos contra bacterias y <i>Candida albicans</i> .....	36
Conclusiones .....	39
Recomendaciones.....	40

Bibliografía.....41  
Anexos.....45

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Microscopía de parte hialina de <i>Escovopsiodes</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> Cultivo a gran escala del hongo <i>Escovopsioides nivea</i> 03.Ac .....	21
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas de los compuestos aislados de <i>Escovopsiodes nivea</i> 03.Ac.....	23
<b>Figura 4.</b> Estructura de la microtecina.....	26
<b>Figura 5.</b> Principales correlaciones observadas en el HMBC y COSY de la microtecina... ..	27
<b>Figura 6.</b> Estructura de la 2-furil-hidroximetilcetona .....	27
<b>Figura 7.</b> Principales correlaciones observadas en el HMBC y COSY del 2-furil- hidroximetilcetona .....	28
<b>Figura 8.</b> Estructura del crisofanol.....	28
<b>Figura 9.</b> Principales correlaciones observadas en el HMBC y COSY del crisofanol....	30
<b>Figura 10.</b> Estructura del physcion.....	30
<b>Figura 11.</b> Principales correlaciones de HMBC de physcion.....	32
<b>Figura 12.</b> Resultados de bioensayos de los compuestos aislados contra <i>Aspergillus</i> <i>brasiliensis</i> .....	33
<b>Figura 13.</b> Resultados de bioensayos de los compuestos aislados contra <i>Escovopsis</i> .....	34
<b>Figura 14.</b> Resultados de bioensayos de los compuestos aislados contra <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> .....	35
<b>Figura 15.</b> Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> .....	36
<b>Figura 16.</b> Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> .....	37
<b>Figura 17.</b> Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra <i>Escherichia</i> <i>coli</i> .....	37
<b>Figura 18.</b> Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> .....	38
<b>Figura 19.</b> Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra <i>Candida albicans</i> .....	38

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Datos experimentales de RMN de la microteicina CD <sub>3</sub> OD a 500( <sup>1</sup> H) y 125( <sup>13</sup> C) MHz comparados con los de la literatura en D <sub>2</sub> O a 400( <sup>1</sup> H) y 100( <sup>13</sup> C) MHz.....	26
<b>Tabla 2.</b> Datos experimentales de RMN de la 2-furil-hidroximetilcetona CD <sub>3</sub> OD a 500( <sup>1</sup> H) y 125( <sup>13</sup> C) MHz comparados con los de la literatura en CDCl <sub>3</sub> a 100( <sup>1</sup> H) y 100( <sup>13</sup> C) MHz.....	28
<b>Tabla 3.</b> Datos experimentales de RMN del crisofanol CDCl <sub>3</sub> a 500( <sup>1</sup> H) y 125( <sup>13</sup> C) MHz comparados con los de la literatura en CDCl <sub>3</sub> a 400( <sup>1</sup> H) y 100( <sup>13</sup> C) MHz .....	29
<b>Tabla 4.</b> Datos experimentales de RMN del physcion CDCl <sub>3</sub> a 500( <sup>1</sup> H) y 125( <sup>13</sup> C) MHz comparados con los de la literatura en CDCl <sub>3</sub> a 300( <sup>1</sup> H) y 75( <sup>13</sup> C) MHz .....	31
<b>Tabla 5.</b> Datos de bioensayos antimicrobianos de compuestos aislados de <i>Escovopsioides nivea</i> 03.A.c .....	36

## Lista de abreviaturas y términos

**AcOEt** = Acetato de etilo

**PDA** = Agar de papa y dextrosa

**cm** = Centímetro

**CDCl<sub>3</sub>** = Cloroformo deuterado

**HPLC** = Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**δ** = Desplazamiento químico

**d** = Doblete

**br d** = Doblete ancho

**dd** = Doble doblete

**ddq** = Doble doblete cuarteto

**ddd** = Doble doblete doblete

**gCOSY** = *Gradient correlation spectroscopy*

**gHSQC** = *Gradient heteronuclear single-quantum correlation*

**gHMBC** = *Gradient heteronuclear multiple-bond correlation*

**gNOESY** = *Gradient Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

**°C** = Grados Celsius

**MHz** = Megahercio

**MeOH** = Metanol

**CD<sub>3</sub>OD** = Metanol deuterado

**μL** = Microlitro

**mg** = Miligramo

**mm** = Milímetro

**m** = Multiplete

**RMN** = Resonancia Magnética Nuclear

**RMN <sup>13</sup>C** = Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

**RMN <sup>1</sup>H** = Resonancia Magnética Nuclear de Protón

**s** = Singulete

**br s** = Singulete ancho

**t** = triplete

## **Agradecimientos**

Al sistema nacional de investigación (SNI) por su contribución al financiamiento de esta tesis.

Al laboratorio de Bioorgánica Tropical por la facilitar las instalaciones, equipos, materiales y reactivos, para realizar los experimentos de esta tesis.

Al Dr. Hermógenes Fernández-Marín por coleccionar la colonia de hormigas y aislar el hongo *Escovopsiodes nivea* 0.3.Ac.

Al Licenciado Ricardo Santamaría y Randy Mojica por ayudar a obtener los espectros de RMN en INDICASAT-AIP.

Al Profesor Daniel Torres por ayudar a obtener el espectro de masas de la microtecnica.

A la Profa. Nivia Ríos por ayudar en los bioensayos.

Al Dr. Humberto Ortega por darme la oportunidad de haber hecho la tesis con él, enseñarme y guiarme en cada experiencia realizada, su paciencia y por ser un buen profesor e investigador.

## **Dedicatoria**

A Dios, por darme la fuerza de seguir adelante cuando yo he dicho que no se puede, por no dejarme sola, todas mis capacidades y destrezas las tengo por él, a mi mamá Beyra y papá Bernabel por su amor, apoyo incondicional en todo, a mi abuela y segunda mamá Sebastiana por sus consejos, oraciones, su amor y que siempre me enseña a cocinar, a mis hermanos Bihayil y Bernabel (hijo), por animarme y quererme como soy, a mis amigos de la universidad (los tiosos) y futuros licenciados en química: Luisa, Iván, Yomairy, Luis y Elissa, por los buenos momentos, por la ayuda de cada uno de ellos y sus ánimos y esa convivencia tanto en la universidad como fuera de ella, por último esta tesis también va dedicada a mi abuelo Florentino (Q.E.P.D) que fue un maravilloso abuelo y papá para mí, siempre agradeceré a Dios por sus cuidados desde que era pequeña y la felicidad que mostraba en su rostro cuando llegaba a su casa a quedarme con él y mi abuela.

## Resumen

El hongo *Escovopsiodes nivea* 03.Ac ha sido identificado recientemente en jardines de hormigas cultivadoras de hongo (Tribu Attini) de género *Atta* y *Acromyrmex* en varias regiones de Brasil. Se ha demostrado que este nuevo micoparásito es antagonista en la relación simbiótica de las hormigas Attini y su hongo de la cual se alimentan (*Leucoagaricus gongylophorus*), sin embargo, se desconocen de los metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Escovopsiodes*, los cuales pueden tener diferentes tipos de actividad biológica.

En esta investigación el hongo *Escovopsiodes nivea* 03.Ac fue aislado del jardín de una colonia de la hormiga *Acromyrmex echinator*, colectada en el río Congo, la Chorrera, Panamá. En el laboratorio se cultivó a gran escala (5 L) en el medio de cultivo PDA, se obtuvo el extracto crudo por medio de extracciones sólido-líquido con acetato de etilo, luego se obtuvieron seis fracciones por medio de un cartucho SPE-C18 y un gradiente de metanol-agua y acetona. Se escogieron dos fracciones en base a su perfil químico, para purificar por HPLC los cuatro metabolitos secundarios mayoritarios producidos por el hongo (microtecina, 2-furil-hidroximetilcetona, crisofanol, y physcion.).

La estructura de los cuatro compuestos fue elucidada principalmente por medio de diferentes espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, DEPT-135, gHSQC, gHMBC, gCOSY, gNOESY).

A los cuatro compuestos se le realizaron bioensayos contra diferentes microorganismos: *Escovopsis* sp., dos fitopatógenos (*Fusarium oxysproum* y *Aspergillus brasiliensis*), dos bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), dos bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), y *Candida albicans*. Los cuatro compuestos no tuvieron actividad antifúngica, pero si mostraron actividad antibiótica.

---

## **Introducción**

---

## Introducción

Las hormigas de la tribu Attini cultivan hongos basidiomicetos en un proceso similar a la agricultura humana que evolucionó hace unos 50-60 millones de años (Schultz & Brady, 2008). Estas hormigas pertenecientes a los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Currie, 2001) cultivan principalmente el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* (Mueller, y otros, 2018). Se encargan de cortar activamente material de hojas frescas para alimentar a su hongo mutualista, que proporciona la única fuente de alimento para las larvas de hormigas (Currie, 2001).

Existe un microorganismo más en la relación simbiótica en este ecosistema, un hongo patógeno especializado del género *Escovopsis*, el cual es un parásito del hongo cultivado por las hormigas Attini (*Leucoagaricus*). Hasta ahora, el hongo *Escovopsis* solo se ha encontrado en los jardines de estas hormigas y solo se conocen siete especies, donde la más mencionada ha sido *Escovopsis weberi*. Según un estudio de Currie (2001), el hongo tiene una mayor presencia en los nidos de *Acromyrmex* que en los de *Atta*, con al menos un 70% y un 48% de infección, respectivamente (Zilli & Dos Santos, 2020). El mecanismo de patogenicidad de *Escovopsis* sp. es inhibir y consumir el hongo mutualista de las hormigas mediante una interacción necrotrófica, en la cual produce una sustancia que destruye las hifas del hospedero y luego el parásito se alimenta de los restos de esta degradación. (Currie & Reynolds, 2004).

Además del parásito *Escovopsis* sp., los jardines de hongos de las hormigas Attini albergan otra variedad de microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Schmidt, 2014). Aunque los estudios han revelado la diversidad microbiana asociada a los jardines de hongos, hay pocos conocimientos avanzados sobre el papel de estos microorganismos en este sustrato (Schmidt, 2014). Recientemente, se ha descubierto un nuevo género de hongo filamentosos llamado *Escovopsioides* en los jardines de hongos de las hormigas cortadoras de hojas (Agustín, y otros, 2013). Este nuevo género tiene características morfológicas parecidas a *Escovopsis* sp, sin embargo, se desconoce de sus metabolitos secundarios y su papel ecológico desempeñado en este ecosistema (Schmidt, 2014).

En base a lo que se ha podido encontrar en la literatura, en esta investigación decidimos estudiar los metabolitos secundarios producidos por *Escovopsiodes nivea* 0.3.Ac para explorar sus actividades biológicas.

---

## **Capítulo 1**

---

### **Marco teórico**

### 1.1 Relación simbiótica entre los organismos

Simbiosis se entiende en su significado más amplio como vida en común entre diferentes organismos vivos, en este caso entre: hormiga, hongo, parásito y bacteria (Madigan, 2009). Entre las hormigas, los hongos que cultivan y las bacterias asociadas a ellas existe un mutualismo, que es un tipo de relación simbiótica en la que todas las especies que participan salen beneficiadas (Madigan, 2009). El otro tipo de relación simbiótica que se da es el parasitismo; simbiosis en la cual una de las especies que participa se beneficia a costa del resto, en este caso suele ser un hongo que además es patógeno (parásito que causa enfermedad) (Madigan, 2009).

### 1.2 Organismos en la relación simbiótica: Hormigas attine (Tribu Attini)

Las hormigas de la tribu Attini únicamente se encuentran en el continente americano. Todas las hormigas attine se conocen como cultivadoras de hongos, pero a los géneros *Acromyrmex* y *Atta* se les conoce de manera común como hormigas cortadoras de hojas (Currie, 2001). Las colonias de estas hormigas han sido descritas como superorganismos, ya que los trabajadores individuales realizan diversas actividades necesarias para el funcionamiento de la colonia, al igual que las células en organismos superiores. Dentro de la colonia las hormigas tienen diferentes funciones (Currie, 2001). La reina se encarga de atender al jardín de hongos en su etapa incipiente y participa en la reproducción. Las obreras realizan tareas como búsqueda de comida, limpieza del nido, cuidado de las crías y defensa contra atacantes. Los machos únicamente participan en la reproducción muriendo después del vuelo nupcial (Currie, 2001).

Las hormigas cultivadoras de hongos se dividen en dos clados: attine superiores y attine inferiores. Hay 5 géneros que forman los attine superiores y son los más desarrollados evolutivamente. Los 7 géneros restantes son attine inferiores (Currie, 2001).

### 1.3 Hongos mutualistas

Los hongos que establecen la relación mutualista con las hormigas pertenecen al orden Agaricales, dentro de la división Basidiomycota (Currie, 2001).

La identificación de los géneros específicos que participan en el mutualismo no fue posible hasta el desarrollo de técnicas moleculares. Con estas tecnologías se descubrió que la mayoría de los hongos pertenecen a la familia Lepiotaceae, concretamente a la tribu Leucoprineae, esta tribu está compuesta por dos géneros: *Leucocoprinus* y *Leucoagaricus*. Los miembros de esta familia son en su mayoría especies tropicales que están especializados en la descomposición de restos (Currie, 2001).

Aunque la mayoría de hormigas cultivan hongos de la familia Lepiotaceae, existen algunas especies de hormigas del género *Apterostigma* que cultivan hongos de la familia Tricholomataceae (Currie, 2001).

Además de los hongos que establecen las relaciones mutualistas con las hormigas existen otros hongos filamentosos no mutualistas que están presentes en las colonias de las

hormigas, actuando como patógenos de los hongos cultivados. Los hongos no mutualistas más comunes son hongos necrótrofos pertenecientes al género *Escovopsis* (Currie, 2001).

#### 1.4 Actinomicetos

Las bacterias que participan en esta simbiosis son actinomicetos, grupo que pertenece al filo Actinobacteria (Madigan, 2009). Se denominaron actinomicetos debido a que durante mucho tiempo se pensó que estas bacterias eran hongos ya que forman redes de filamentos ramificados, denominados micelios; análogos a los formado por hongos filamentosos, pero con las dimensiones propias de las bacterias; además, la mayoría producen esporas (Madigan, 2009).

Actinobacteria es el segundo grupo principal de las bacterias grampositivas, con alto contenido GC (guanina y citosina). Es un grupo muy grande y suelen presentar morfología bacilar o filamentosa, y son principalmente aerobias. Sus hábitats principales son el suelo y la materia vegetal. La mayoría son comensales inofensivos. Muchas tienen gran importancia económica por producir antibióticos o productos fermentados derivados de la leche (Madigan, 2009).

Los siguientes géneros son los actinomicetos simbioses más estudiados de las hormigas attine y su jardín de hongos: *Pseudonocardia*, *Streptomyces* y *Amycolatopsis*.

#### 1.5 Relación simbiótica

El hongo mutualista es la única fuente de alimento de las larvas de las hormigas y de las reinas, mientras que las obreras, además de alimentarse de estos hongos, suplementan su alimentación con savia de las plantas (Currie, 2001). Las hormigas proporcionan condiciones de crecimiento óptimo a las granjas o jardines de hongos (Currie, 2001). Y el papel de los actinomicetos en esta relación mutualista sería proteger los jardines frente a patógenos; pero, además, se cree que producen compuestos promotores del crecimiento del hongo y que protegen a las hormigas al representar una barrera contra insectos y hongos patógenos (Currie, Scott, Summerbell, & Malloch, 1999).

#### 1.6 Hongos antagonistas: *Escovopsis* y *Escovopsiodes nivea*

son aquellos hongos o micoparásitos que devastan la colonia, infectando el hongo simbiote de las hormigas attini provocando que este muera y por ende las hormigas mueren de inanición, existen hongos parásitos como *Escovopsis*, Moller (1893) fue el primero en observar hongos que luego serían descritos en este género, donde realizó dibujos de los microcaracteres morfológicos de varias especies de este género (Moeller, 1893), es un parásito especializado que utiliza mecanismos tanto químicos como físicos para atacar a su huésped (Marfetán, Romero, & Folgarait, 2015) (Marfetán, Romero, & Folgarait, 2015) (Schmidt, y otros, 2016), son especializados y potencialmente virulentos en las colonias de hormigas Attini (Currie & Reynolds, 2004). La especie más estudiada de este género es *Escovopsis weberi* (de Man, Stajich, Kubicek, & Gerardo, 2016). Se ha descubierto que este micoparásito produce los

alcaloides terpeno-indólicos shearinina, que afectan el comportamiento de las hormigas, dicetopiperazinas para combatir las bacterias defensivas y otras moléculas pequeñas que inhiben el cultivar fúngico (Batey, Greco, Hutchings, & Wilkinson, 2020). Las bacterias mutualistas *Pseudonocardia* y *Streptomyces* producen antifúngicos depsipéptidos y macrólidos poliénicos activos contra *Escovopsis* spp. El metaboloma del nido de hormigas se complica aún más por la competencia entre bacterias defensivas, que producen antibacterianos activos incluso contra especies estrechamente relacionadas (Batey, Greco, Hutchings, & Wilkinson, 2020).

Recientemente, un nuevo género de hongo, *Escovopsioides* (Ascomycota: Hypocreales), fue descrito de jardines de hongos de las hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex niger*, *Acromyrmex subterraneus molestans* y *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, se ha descrito este hongo con micelio aéreo blanco, como algodón, con producción de cadenas de clamidosporas que se unen en cuerdas o hebras plateadas blancas como la nieve (Agustín J. , y otros, 2013). *Escovopsioides* comparte algunas características morfológicas con *Escovopsis* pero difiere en otras tales como vesículas terminales con fiálides largas (lageniformes) e hifas con aleuroconidios. El análisis molecular indica que *Escovopsioides* está filogenéticamente relacionado con *Escovopsis* (Agustín J. , y otros, 2013). El descubrimiento de este hongo abrió nuevas ventanas de investigación sobre la simbiosis hormiga-hongo attino. En primer lugar, no se sabe nada sobre la diversidad y taxonomía de *Escovopsioides* (Osti & Rodríguez, 2018). Hasta ahora, solo se ha descrito una especie (*E. nivea*) de un rango geográfico muy estrecho (“Mata do Paraíso”, Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil); sin embargo, es probable que otras especies del género aún esperen ser descubiertas (Osti & Rodríguez, 2018).

---

## Capítulo 2

---

### Objetivos

## 2.1 Objetivo general

- Aislar y evaluar la actividad biológica de los compuestos producidos por el hongo *Escovopsioides nivea* 03.Ac

## 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar a gran escala el hongo *Escovopsioides nivea* 03.Ac en PDA.
- Realizar extracciones con acetato de etilo para obtener el extracto crudo.
- Fraccionar el extracto crudo por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE-C18) y purificar los compuestos con el HPLC.
- Establecer la estructura química de los compuestos por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios contra diferentes hongos y bacterias.

---

## **Capítulo 3**

---

### Metodología

### 3.1 Equipos, disolventes y materiales utilizados

El disolvente para la extracción del extracto orgánico fue acetato de etilo (grado ACS). Para el fraccionamiento y purificación de los compuestos se utilizó acetona, metanol y agua tipo uno.

Para el cultivo a gran escala del hongo se utilizó una autoclave Thermo Scientific Harvey SterileMax (modelo: ST75925), una cámara de flujo laminar (Telstar, modelo AV100), y una incubadora BOD (Precision™), y para la extracción un Sonicador/Baño Ultrasonido digital con calentador de 9.5 L CPX5800H-E Branson Ultrasonics CPX952538R, todos ubicados en el laboratorio de Bioorgánica Tropical de los edificios gemelos.

Para secar el cultivo del hongo se utilizó el Liofilizador de Sobremesa FreeZone 8 Litros, labconco, ubicado en el laboratorio 202 de los edificios gemelos.

Para secar los disolventes al vacío se usó un Rotavapor R-215 Buchi, y un SpeedVac (SC210A Speedvac® plus) ubicados en el laboratorio 219 y 212 de los edificios gemelos.

Para el fraccionamiento del extracto crudo obtenido a gran escala se utilizó un cartucho de SPE-C18 (45 µm, 10 g/70 Chromabond) y un colector de Vacío (Chromabond para 12 posiciones, Macherey Nagel), ubicados en el laboratorio 219 de los edificios gemelos.

Para el aislamiento de los compuestos se utilizó un HPLC (Waters®, Delta 600) y una columna: Xterra C18 (10 µm, 250 x 10 mm), ubicados en el laboratorio 208 de los edificios gemelos.

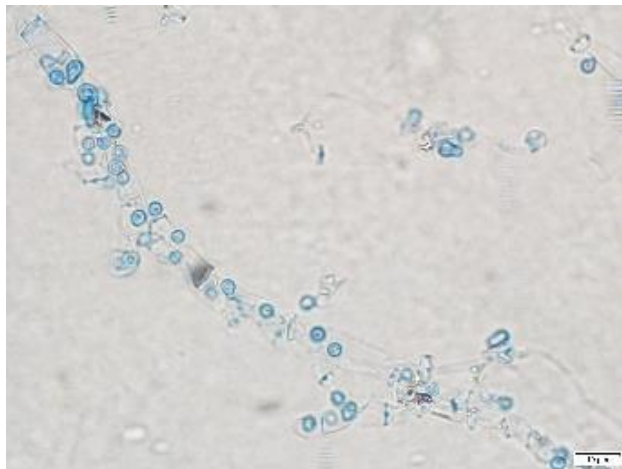
Los datos de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, gHSQC, gHMBC, gCOSY y gNOESY fueron adquiridos en el Resonancia Magnética Nuclear de 500 MHz de marca JEOL, ubicado en el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).

### 3.2 Aislamiento del hongo *Escovopsioides nivea* 03.Ac

Para el aislamiento del hongo se tomaron muestras del jardín de una colonia de la hormiga *Acromyrmex echinator* colectada en el río Congo, la Chorrera, Panamá. Se tomaron pedazos del jardín de hongos con una pinza estéril. Se mantuvieron en contenedores de plástico esterilizados con ultravioleta, luego se sembraron en un medio de cultivo de PDA (39 g por litro de agua destilada), utilizando fragmentos pequeños 0.5–1 cm de diámetro, y se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 14 días. Los platos se revisaron en busca de hongos y se sub-cultivaron en nuevos platos de PDA cuando se hizo visible el crecimiento del hongo. Este proceso fue realizado por el laboratorio del Dr. Hermógenes Fernández-Marín del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).

*Escovopsioides nivea* fue identificado molecularmente por medio de fotografías microscópicas donde se realizaron placas frescas para la observación de su estructura por medio de tinción de azul de lactoglicerol que ayuda a observar con más claridad la estructura,

el cual mostró un micelio hialino con carencia de pigmentación, se utilizó un microscopio de luz con cámara DP73 OLYMPUS BX53, el método fue realizado en el laboratorio del Dr. Hermógenes Fernández-Marín del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP).



**Figura 1.** Microscopía de parte hialina de *Escovopsioides* (Vega-Gibbs, 2022)

### 3.3 Cultivo a gran escala del hongo *Escovopsioides nivea* 03.Ac

Para el cultivo a gran escala se utilizaron 20 matraces Erlenmeyer de 1L con 250 mL de medio de cultivo PDA (**Figura 2**). Cada matraz fue inoculado con esporas del hongo para ser incubado a 26°C en oscuridad durante 14 días.



**Figura 2.** Cultivo a gran escala del hongo *Escovopsioides nivea* 03.Ac

### 3.4 Obtención del extracto orgánico

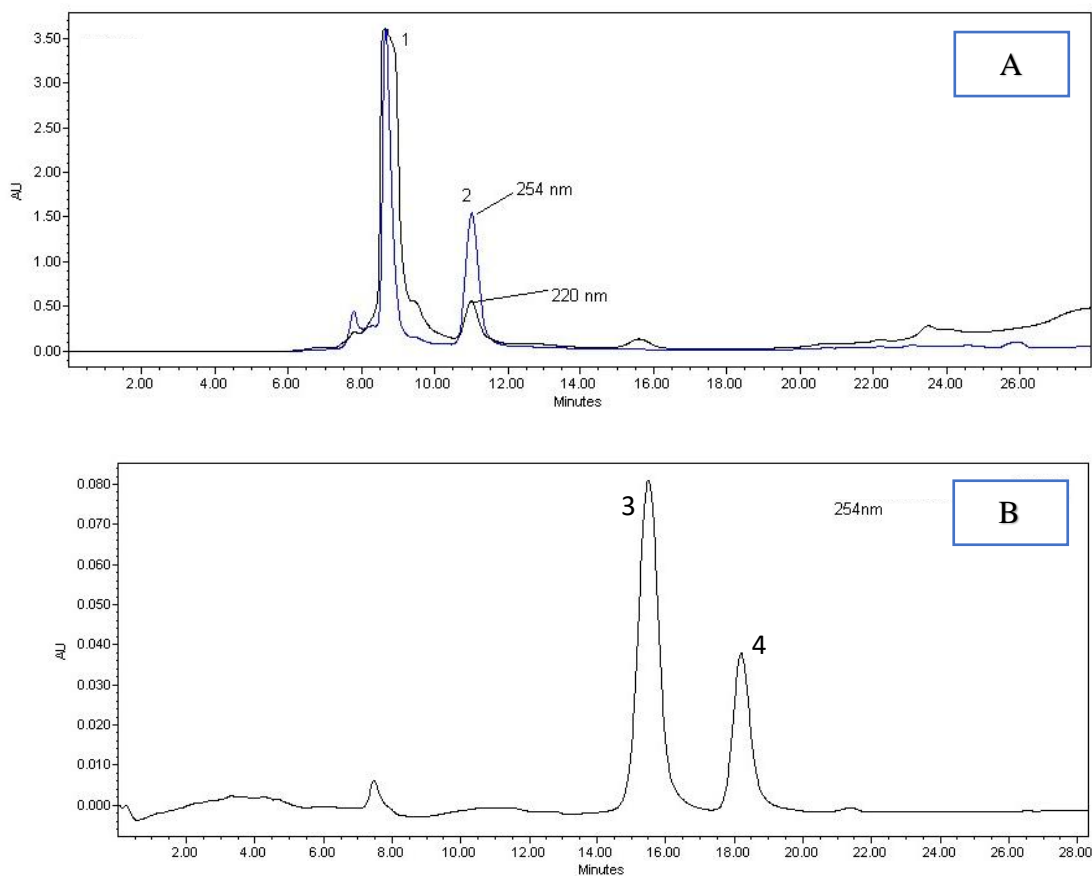
Todo el material cultivado en los matraces se distribuyó en 8 bolsas de ziploc para ser congeladas y luego liofilizadas durante 3 días. El material seco se colocó en dos vasos químicos de 1 L, se les vertió acetato de etilo hasta cubrir por completo el contenido, fueron sonicados durante 10 minutos, y luego se filtró el disolvente para secarlo al vacío con un rotavapor y obtener el extracto orgánico. Esta extracción sólido-líquido se repitió 12 veces, obteniendo 3.6 g del crudo.

### 3.5 Fraccionamiento del extracto orgánico y purificación de los compuestos de interés

El extracto crudo (3.6g) se fraccionó por extracción en fase sólida utilizando un cartucho de SPE-C18 (45  $\mu\text{m}$ , 10 g/70 Chromabond). Por cada gramo de extracto se realizó el siguiente gradiente: 100 mL (20% MeOH-H<sub>2</sub>O, *F1*: 269.8 mg); 100 mL (40% MeOH-H<sub>2</sub>O, *F2*: 30.3 mg); 100 mL (60% MeOH-H<sub>2</sub>O, *F3*: 41.8 mg); 100 mL (80% MeOH-H<sub>2</sub>O, *F4*: 53.8 mg); 100 mL (100% MeOH, *F5*: 46.9 mg); 100 mL (100% acetona, *F6*: 307 mg).

La fracción *F1* se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C18 (10  $\mu\text{m}$ , 250 x 10 mm), con un gradiente de A (20% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 20% B; min 10-20, gradiente de 20% a 100% B; min 20-25, flujo isocrático de 100% B; min 25-26, gradiente de 100% a 20% B; min 26-30, flujo isocrático de 20% B. Se obtuvieron dos fracciones: *F1.1* (min 8, **microtecina**: 17.8 mg) y *F1.2* (min 11, **2-furil-hidroximetilcetona**: 4.1 mg).

La fracción *F6* se inyectó en un HPLC, utilizando una columna (XTerra) C18 (10  $\mu\text{m}$ , 250 x 10 mm), con un gradiente de A (20% MeOH-H<sub>2</sub>O) a B (100% MeOH), a un flujo de 1.5 mL/min: min 0-10, un flujo isocrático de 95% B; min 10-20, gradiente de 95% a 100% B; min 20-25, flujo isocrático de 100% B; min 25-26, gradiente de 100% a 95% B; min 26-30, flujo isocrático de 95% B. Se obtuvieron dos fracciones: *F6.1* (min 15, **crisofanol**: 3.3 mg), *F6.2* (min 18, **physcion**: 2.4 mg).



**Figura 3.** Cromatogramas de los compuestos aislados de *Escovopsis nivea* 03.Ac: A) 1. microteicina, 2. 2-furil-hidroximetilcetona, 3. crisofanol, 4. physcion

### 3.6 Bioensayo contra hongos

Se utilizó una cepa del hongo *Escovopsis* sp. y de dos fitopatógenos (*Aspergillus brasiliensis* y *Fusarium oxysporum*). Se cultivó previamente cada hongo en un plato Petri en medio PDA. Un pedazo de agar con esporas de cada hongo se colocó en la mitad de un plato Petri con PDA. Las fracciones (0.1 mg) o compuestos (0.05 mg) se colocaron directamente en el agar con una micropipeta a 3 cm del hongo inoculado. Para el control positivo se utilizó Nistatina (0.05 mg). Los platos Petri se incubaron a 26 °C en la oscuridad y luego se monitoreo durante una semana para revisar si había un halo de inhibición.

### 3.7 Bioensayo de los compuestos contra bacterias y *Candida albicans*

Los compuestos y fracciones también fueron probados contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, utilizando la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por la técnica Kirby Bauer (difusión en agar).

### **3.7.1 Preparación del estándar de turbidez**

Para preparar el estándar de turbidez se agregó 0.5 mL de BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (1.175 %) a 99.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N (1%), y se mezcló en constante movimiento para mantener la suspensión. Luego se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro cuya absorbancia a 625 nm tenía que estar entre 0.08 y 0.10 para establecer el estándar a 0,5 de Mcfarland. Se mantuvo la solución en oscuridad a 22-26 °C (Hudzicki, 2009; Jorgensen and Ferraro, 2009).

### **3.7.2 Preparación del inóculo bacteriano**

El microorganismo de referencia se incubó en platos Petri con agar tripticasa de soya (TSA). Antes de cumplir las 24 horas de incubación se tomaron de 3 a 5 colonias para suspender en 9 mL de solución salina estéril, luego se procedió a comparar visualmente con el tubo solución Mcfarland, utilizando de contra fondo la tarjeta Wickerham; esta suspensión contuvo aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  (Hudzicki, 2009).

### **3.7.3 Siembra de la muestra**

Se esparcieron 100 µL del inóculo en platos Petri de Mueller-Hinton Agar. Se distribuyo homogéneamente con ayuda de un esparcidor estéril, y luego se dejó secar el inóculo a temperatura ambiente dentro de la cámara de flujo laminar durante 15 min para lograr una mayor fijación (Jorgensen and Turnidge, 2015).

Las fracciones (0.1 mg) o compuestos (0.05 mg) se colocaron directamente sobre el agar con una micropipeta. La Nistatina (0.05 mg) se utilizó como control positivo contra *Candida albicans* y la Ciprofloxacina (0.02 mg) contra bacterias. Los platos Petri se incubaron a 37 °C durante la noche y luego se observaron visualmente en busca de zonas de inhibición (Adnani et al., 2015).

---

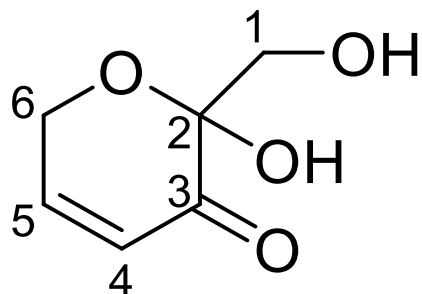
## **Capítulo 4**

---

### Resultados y discusión

## 4.1 Elucidación estructural de los compuestos producidos por *Escovopsioides nivea* 03.Ac

### 4.1.1 Microtecina



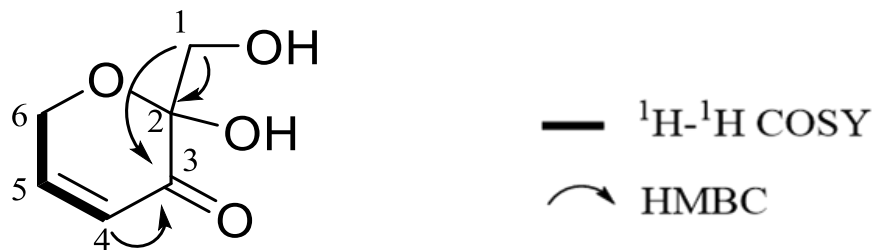
**Figura 4.** Estructura de la microtecina

La microtecina (**Figura 4**) se obtuvo como un sólido amorfo sin color. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  presentó seis señales [ $\delta_{\text{C}}$  64.85 (C-1), 96.88 (C-2), 193.22 (C-3), 125.58 (C-4), 150.43 (C-5), 61.08 (C-6)] (**Anexo 1**). A través de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC se dedujo la presencia de dos metilenos [ $\delta_{\text{H}}$  3.52 (H-1<sup>a</sup>) y 3.92 (H-1<sup>b</sup>); y  $\delta_{\text{H}}$  4.37 (H-6<sup>a</sup>) y 4.67 (H-6<sup>b</sup>)], dos metinos [ $\delta_{\text{H}}$  6.07 (H-4) y 7.20 (H-5)], un carbono carbonílico de cetona (C-3), y un carbono cuaternario (C-2) (**Anexos 2 y 3**). La estructura plana fue establecida a través de las correlaciones observadas en los espectros de gCOSY y gHMBC (**Figura 5, Anexo 4 y 5**). Los datos experimentales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la **microtecina** se muestran en la **Tabla 2** y se compararon con los de la literatura. El espectro de masas mostró la presencia de una molécula cationizada  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 167$  correspondiente a la fórmula  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4\text{Na}$  (**Anexo 6**).

**Tabla 1.** Datos experimentales de RMN de la microtecina  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500( $^1\text{H}$ ) y 125( $^{13}\text{C}$ ) MHz comparados con los de la literatura en  $\text{D}_2\text{O}$  a 400( $^1\text{H}$ ) y 100( $^{13}\text{C}$ ) MHz

No.	Tipo	Experimentales		Literatura*	
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)
1	$\text{CH}_2$	64.85	3.52, d (11.4) 3.92, d (11.4)	63.20	3.66, d (11.6) 3.97, d (11.6)
2	C	96.88	---	96.03	---
3	C	193.22	---	193.68	---
4	CH	125.58	6.07, ddd (1.7, 2.3, 10.4)	124.21	6.22, ddd (2.0, 2.0, 10.4)
5	CH	150.43	7.20, ddd (1.7, 4.0, 10.4)	152.11	7.38, ddd (2.0, 4.0, 10.4)
6	$\text{CH}_2$	61.08	4.37, ddd (1.7, 4.0, 19.3) 4.67, ddd (1.7, 2.3, 19.3)	60.77	4.53, ddd (2.0, 4.0, 19.8) 4.73, ddd (2.0, 2.0, 19.8)

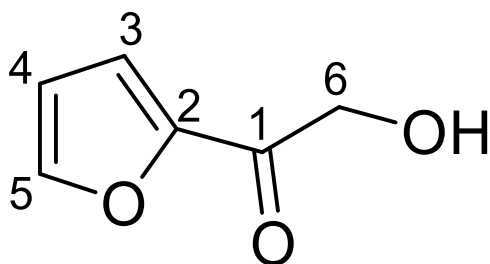
\*(Broberg, Kenne, & Pedersén, 1996)



**Figura 5.** Principales correlaciones observadas en el HMBC y COSY de la microtecin

La microtecin se ha reportado de hongos tales como *Corticium caeruleum* y de diferentes especies del género *Morchella* (Baute, Deffieux, & Baute, 1986), y del alga roja *Gracilariopsis lemaneiformis* (Broberg, Kenne, & Pedersén, 1996). Ha sido descrito con actividad antibacteriana de 100-200 ppm contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, incluyendo *Pseudomona aeruginosa*, pero es inactiva contra levaduras y moho. También presentó citotoxicidad contra algunas líneas celulares de mamíferos (Fiskesund, y otros, 2008).

#### 4.1.2 2-furil-hidroximetilcetona



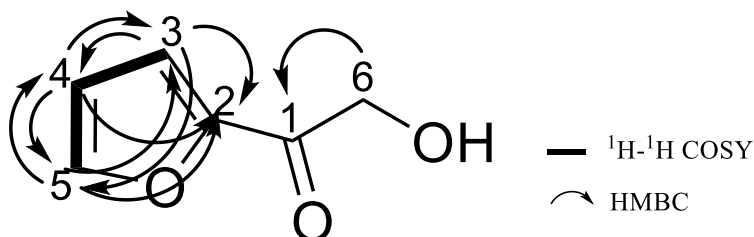
**Figura 6.** Estructura de la 2-furil-hidroximetilcetona

La 2-furil-hidroximetilcetona (**Figura 6**) se obtuvo como un sólido amorfo marrón. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  presentó seis señales correspondientes a los siguientes carbonos [ $\delta_{\text{C}}$  189.5 (C-1), 151.9 (C-2), 148.6 (C-3), 119.0 (C-4), 113.4 (C-5), 65.8 (C-6)] (**Anexo 7**). A través de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC se dedujo la presencia de un metileno [ $\delta_{\text{H}}$  4.69 (H-6)], tres metinos [ $\delta_{\text{H}}$  7.39 (H-3), 6.65 (H-4) y 7.79 (H-5)], un carbono carbonílico de cetona (C-1), y un carbono terciario  $sp^2$  (C-2) (**Anexos 8 y 9**). La estructura plana fue establecida a través de las correlaciones observadas en los espectros de gCOSY y gHMBC (**Figura 7**, **Anexo 10 y 11**). Los datos experimentales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 2-furil-hidroximetilcetona se muestran en la **Tabla 3** y se compararon con los de la literatura.

**Tabla 2.** Datos experimentales de RMN de la 2-furil-hidroximetilcetona CD<sub>3</sub>OD a 500(<sup>1</sup>H) y 125(<sup>13</sup>C) MHz comparados con los de la literatura en CDCl<sub>3</sub> a 100(<sup>1</sup>H) y 100(<sup>13</sup>C) MHz

No.	Tipo	Experimentales		Literatura*	
		δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J, Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> , mult. (J, Hz)
1	C	189.5		187.7	---
2	C	151.9		150.0	---
3	CH	148.6	7.39, dd (0.5, 3.6)	147.2	7.26, d (3.6)
4	CH	119.0	6.65, dd (1.7, 3.6)	118.0	6.55, m
5	CH	113.4	7.79, dd (0.8, 1.6)	112.6	7.59, s
6	CH <sub>2</sub>	65.8	4.69, s	65.2	4.69, s

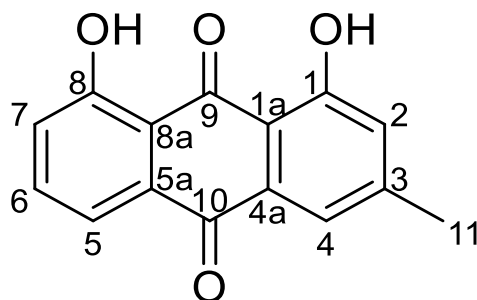
\*(Yang, y otros, 2019)



**Figura 7.** Principales correlaciones observadas en el HMBC y COSY del 2-furil-hidroximetilcetona

La 2-furil-hidroximetilcetona ha sido identificada de la *Rhizoctonia solani* (T & Herret, 1971), es un patógeno vegetal transmitido por el suelo con una considerable diversidad en morfología, rango de hospedantes y agresividad (Oyetunde & Bradley, 2017), y del hongo *Morchella* sp, la cual es un hongo comestible raro famoso con alto valor medicinal y económico que muestran gran potencial en alimentación, productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos (Yang, y otros, 2019). Además, la 2-furil-hidroximetilcetona ha sido reportada con una fuerte actividad antioxidante por medio del método de DPPH (Yang, y otros, 2019).

#### 4.1.3 Crisofanol



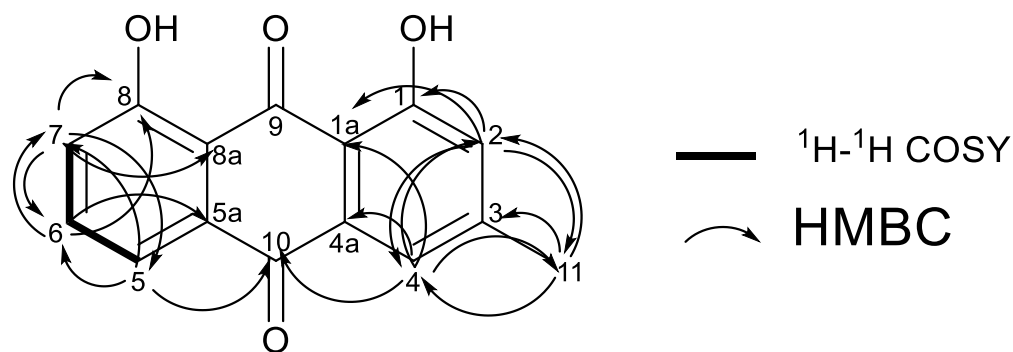
**Figura 8.** Estructura del crisofanol

La antraquinona crisofanol (**Figura 8**) se obtuvo como un sólido amorfo rojizo. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  presentó quince señales [ $\delta_{\text{C}}$  162.8 (C-1), 113.8 (C-1<sup>a</sup>), 124.5 (C-2), 149.5 (C-3), 121.5 (C-4), 133.4 (C-4<sup>a</sup>), 120.0 (C-5), 137.1 (C-6), 133.7 (C-5<sup>a</sup>), 124.7 (C-7), 162.5 (C-8), 116.0 (C-8<sup>a</sup>), 192.7 (C-9), 182.1 (C-10), 22.4 (C-11)] (**Anexo 12**). Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC mostraron ocho señales asignadas para 5 metinos [ $\delta_{\text{H}}$  7.82 (H-5), 7.29 (H-7), 7.10 (H-2), 7.65 (H-4) y 7.67 (H-6)], un metilo [ $\delta_{\text{H}}$  2.46 (H-11)] y dos hidroxilos fenólicos [ $\delta_{\text{H}}$  12.0 (OH-1) y 12.1 (OH-8)] (**Anexo 13 y 14**). La estructura plana fue establecida a través de las correlaciones observados en los espectros de gCOSY y gHMBC (**Figura 9, Anexo 15 y 16**). Los datos experimentales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del crisofanol se muestran en la **Tabla 4** y se compararon con los de la literatura.

**Tabla 3.** Datos experimentales de RMN del crisofanol  $\text{CDCl}_3$  a 500( $^1\text{H}$ ) y 125( $^{13}\text{C}$ ) MHz comparados con los de la literatura en  $\text{CDCl}_3$  a 400( $^1\text{H}$ ) y 100( $^{13}\text{C}$ ) MHz

No.	Tipo	Experimentales		Literatura*	
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)
1	C	162.8	---	162.7	---
1a	C	113.8	---	113.7	---
2	CH	124.5	7.10, d (0.76)	124.3	7.05, brs
3	C	149.5	---	149.3	---
4	CH	121.5	7.65, brs	121.3	7.60, brs
4a	C	133.4	---	133.2	---
5	CH	120.0	7.82, dd (7.5, 1.0)	119.9	7.78, d (7.9)
6	CH	137.1	7.67, dd (8.4, 7.6)	136.9	7.65, t
5a	C	133.7	---	133.6	---
7	CH	124.7	7.29, dd (8.4, 7.6)	124.5	7.26, d (7.9)
8	C	162.5	---	162.4	---
8a	C	116.0	---	115.8	---
9	C	192.7	---	192.4	---
10	C	182.1	---	181.8	---
11	CH <sub>3</sub>	22.4	2.46, s	22.2	2.44, s
	OH-1	---	12.0, s	---	11.9, s
	OH-8	---	12.1, s	---	12.0, s

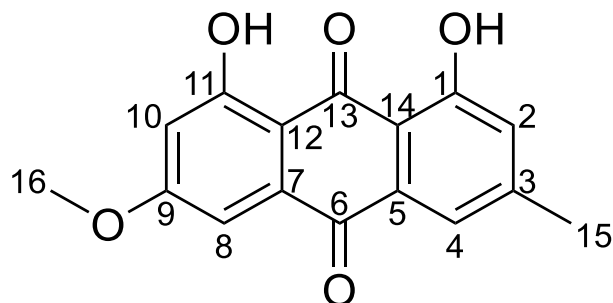
\*(Li, Gong Shi, Peng Zhang, & Zhong Zhang, 2000)



**Figura 9.** Principales correlaciones observadas en el HMBC y COSY del crisofanol

El crisofanol ha sido reportado de la planta *colubrina greggii* a partir de una extracción metanólica realizada a sus raíces (García-Sosa, Villarreal-Alvarez, Lübben, & Peña-Rodríguez, 2006), también de la *Picramnia sp*, *Podocarpus macrostachys*, *Picramnia latifolia*, *Picramnia magnifolia*, *Picramnia parvifolia*, *Picramnia xalapensis*, *Picramnia gracilis*, *Picramnia antidesma*, y *Picramnia polyantha*, (Hernández Medel & Méndez Ventura, 2023). También se ha reportado de la planta *Chamaecrista nigricans* (una especie endémica de la India) (Tangavelou, Viswanathan, Balakrishna, & A, 2018), la cual es considerada como un hepatoprotector (Ling Zhao, Jia-Bo, Guang-De, Montaña Li, & Xiao-He, 2009), y reductor de lípidos (Chen, y otros, 2015). En cuanto a la actividad biológica del crisofanol se ha reportado que tiene una buena actividad contra *Bacillus subtilis* (zona de inhibición: 9,0 mm) y poco activa frente a *Staphylococcus aureus* (zona de inhibición: 3,0 mm) y *Candida albicans* (zona de inhibición: 2,0 mm) (García-Sosa, Villarreal-Alvarez, Lübben, & Peña-Rodríguez, 2006), tiene actividad contra *Enterococcus faecalis* (Ramírez-Cárdenas, Isaza-Mejía, & Pérez-Cárdenas, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a partir de extractos etanolicos de propóleos donde la actividad se asocia a la presencia del crisofanol (Martínez-Galán, 2009), Además, se ha observado que esta antraquinona se produce cuando representantes de la especie *Trichoderma polysporum* se ponen en contacto con el hongo *Fomes annosus* y *Fusarium spp*, con los cuales muestran una acción antagónica (Donnelly & Sheridan, 1986).

#### 4.1.4 Physcion



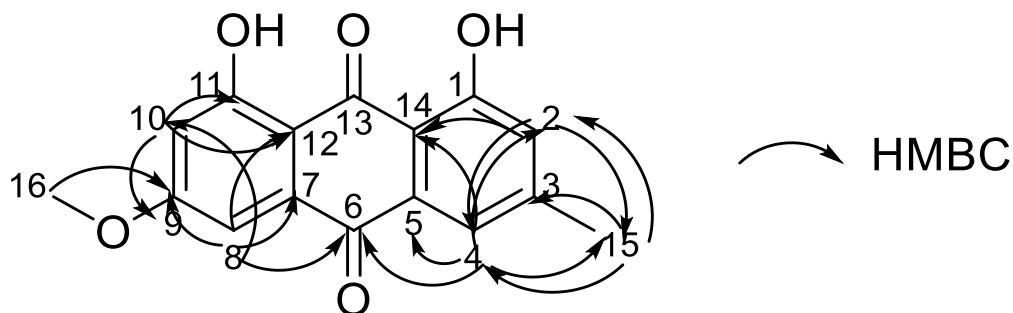
**Figura 10.** Estructura del physcion

Al igual que el crisofanol (**Figura 8**), el compuesto physcion (**Figura 10**), es un derivado de antraquinona y también se le conoce como parietina, se obtuvo como un sólido amorfo anaranjado. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  presento dieciséis señales [ $\delta_{\text{C}}$  162.6 (C-1), 124.6 (C-2), 148.6 (C-3), 121.4 (C-4), 135.3 (C-5), 182.2 (C-6), 133.3 (C-7), 108.3 (C-8), 166.6 (C-9), 106.9 (C-10), 165.3 (C-11), 110.3 (C-12), 190.8 (C-13), 113.8 (C-14), 22.3 (C-15), 56.2 (C-16)] (**Anexo 17**). Los espectros RMN  $^1\text{H}$  y gHSQC mostraron ocho señales asignadas para 4 metinos [ $\delta_{\text{H}}$  7.08 (H-2), 7.62 (H-4), 7.36 (H-8), 6.68 (H-10)], un metilo [ $\delta_{\text{H}}$  2.44 (H-15)], un metoxilo [ $\delta_{\text{H}}$  3.93 (H-16)] y dos hidroxilos fenólicos [ $\delta_{\text{H}}$  12.1 (OH-1) y 12.3 (OH-11)] (**Anexo 18 y 19**). La estructura plana fue establecida a través de las correlaciones observadas en los espectros de gCOSY y gHMBC (**Figura 11, Anexo 20 y 21**). Los datos experimentales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del physcion se muestran en la **Tabla 5** y se compararon con los de la literatura.

**Tabla 4.** Datos experimentales de RMN del physcion  $\text{CDCl}_3$  a  $500(^1\text{H})$  y  $125(^{13}\text{C})$  MHz comparados con los de la literatura en  $\text{CDCl}_3$  a  $300(^1\text{H})$  y  $75(^{13}\text{C})$  MHz

No.	Tipo	Experimentales		Literatura*	
		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J, Hz)
1	C	162.6	---	162.5	---
2	CH	124.6	7.08, d (1.5)	124.4	7.08, d (1.5)
3	C	148.6	---	148.4	---
4	CH	121.4	7.62, d (1.2)	121.2	7.62, d (1.2)
5	C	135.3	---	135.2	---
6	C	182.2	---	181.9	---
7	C	133.3	---	133.2	---
8	CH	108.3	7.36, d (2.4)	108.1	7.36, d (2.4)
9	C	166.6	---	166.5	---
10	CH	106.9	6.68, d (2.4)	106.7	6.68, d (2.4)
11	C	165.3	---	165.1	---
12	C	110.3	---	110.2	---
13	C	190.8	---	190.7	---
14	C	113.8	---	113.6	---
15	$\text{CH}_3$	22.3	2.44, s	22.3	2.45, s
16	$\text{OCH}_3$	56.2	3.93, s	56.0	3.94, s
	OH-1	---	12.1, s	---	12.1, s
	OH-11	---	12.3, s	---	12.3, s

\*(Castro Mandujano, Pastor de Abram, & Collantes Díaz, 2011)



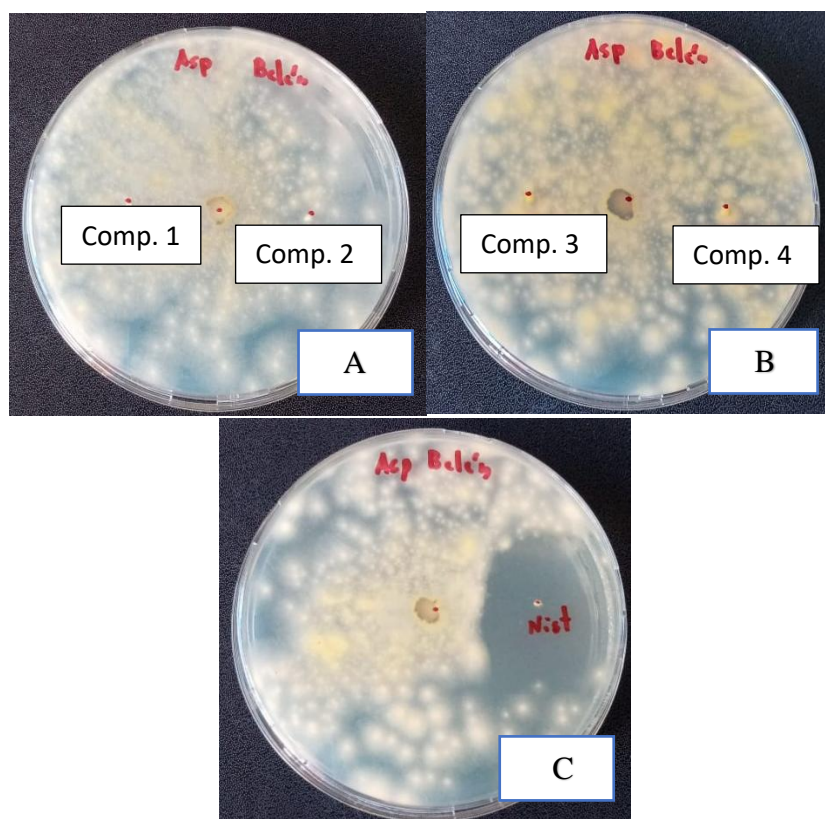
**Figura 11.** Principales correlaciones de HMBC de physcion

El physcion ha sido reportado en *Caloplaca saxicola* (Hoffm.) la cual es un líquen crustáceo areolado en el centro y hacia los márgenes formando lóbulos anaranjados (Castro Mandujano, Pastor de Abram, & Collantes Díaz, 2011), también ha sido aislado de plantas de especies del género *Picramnia* como *P. sellowii*, *P. ramiflora*, *P. macrostachys*, también se ha aislado de una especie del género *Vismia* llamado *Vismia rubescens* (Buitrago-Díaz, Rojas-Vera, & Velasco-Carrillo, 2020), en el cual el physcion mostró efectividad contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida parapsilosis* y *Cryptococcus neoformans* (Tamokou, Tala, Wabo, Kuate, & Tane, 2009). También, ha sido reportado de la planta *Chamaecrista nigricans* (Tangavelou, Viswanathan, Balakrishna, & A, 2018) y se ha demostrado que este compuesto es antiinflamatorio y anticancerígeno (Subhalakshmi, Madhushree, Patra, & Banasri, 2010). También ha sido producido por un hongo llamado *Aspergillus chevalieri* BYST01 que se relaciona simbióticamente con las termitas (Zhang, Jiang, Un, Jiang, & Zhang, 2024) y del hongo *Aspergillus glaucus* (Gibaja, 1998) no se sabe con exactitud pero los extractos etanolicos de *Xanthoria parietina* tiene actividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, este líquen produce physcion y estas actividades antibióticas podrían deberse a este compuesto (Mendili, Essghaier, Seaward, & Khadhri, 2021)

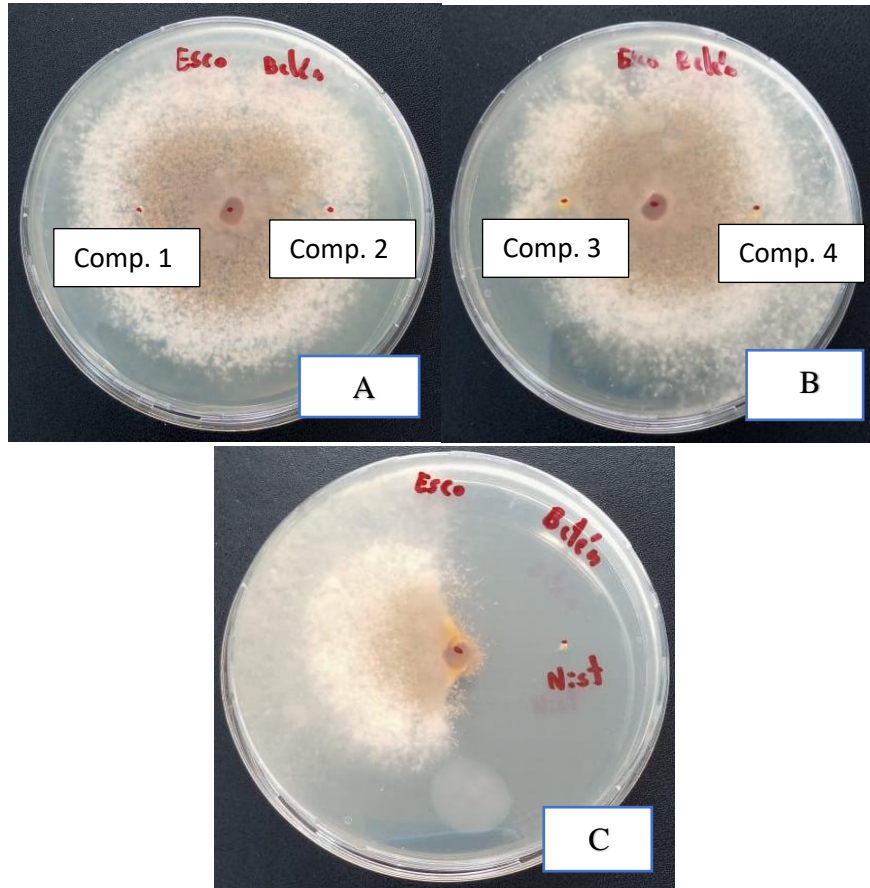
Tanto el crisofanol (**Figura 8**) y physcion (**Figura 10**) se relacionan con un compuesto conocido llamado emodina, debido a su base estructural de la antraquinona sobre todo del grupo de las 1,8-dihidroxi-antraquinonas sustituidos en las posiciones C-3 y C-6 con grupos funcionales como metilo, metoxilo e hidroxilo (Gibaja, 1998), la emodina es producida de la especie *Escovopsis weberi* del género *Escovopsis* tiene la capacidad de inhibir el hongo alimento *Leucoagaricus gongylophorus* de las hormigas de la tribu attini (Dhodary, Schilg, Wirth, & Spiteller, 2018) y también fue activa contra los simbioses microbianos *Streptomyces* (Hutchings & Wilkinson, 2023), entonces si la emodina tiene esta actividad antifúngica frente al hongo alimento de las hormigas de la tribu attini y hacia las bacterias simbioses de estas hormigas, se podría suponer que el crisofanol y physcion podrían tener estas mismas funciones ecológicas, ya que estas dos últimas tienen mucha similitud estructural, pero esta hipótesis estaría pendiente por demostrar.

## 4.2. Bioensayos contra hongos

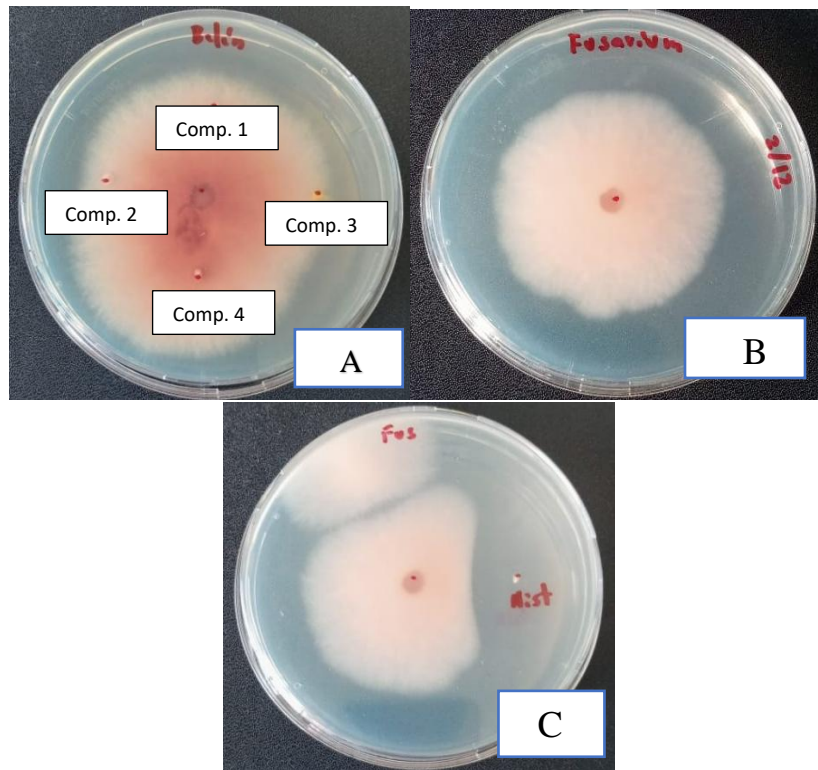
Se realizó un bioensayo de los compuestos obtenidos del hongo *Escovopsioides nivea* 03.Ac contra los hongos: *Aspergillus brasiliensis* (**Figura 12**), *Escovopsis* (**Figura 13**), *Fusarium oxysporum* (**Figura 14**). Ninguno de los cuatros compuestos aislados fueron activos contra estos hongos.



**Figura 12.** Resultados de bioensayos de los compuestos aislados contra *Aspergillus brasiliensis*: A) compuestos 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroximetilcetona). B) compuestos 3 (crisofanol), 4 (phycion). C) Control positivo (Nistatina).



**Figura 13.** Resultados de bioensayos de los compuestos aislados contra *Escovopsis*: A) compuestos 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroximetilcetona). B) compuestos 3 (crisofanol), 4 (phycion). C) Control positivo (Nistatina)



**Figura 14.** Resultados de bioensayos de los compuestos aislados contra *Fusarium oxysporum*: A) compuestos aislados 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroximetilcetona), 3 (crisofanol), 4 (phycion). B) Control negativo (*Fusarium oxysporum*). C) Control positivo (Nistatina).

### 4.3 Bioensayos contra bacterias y *Candida albicans*

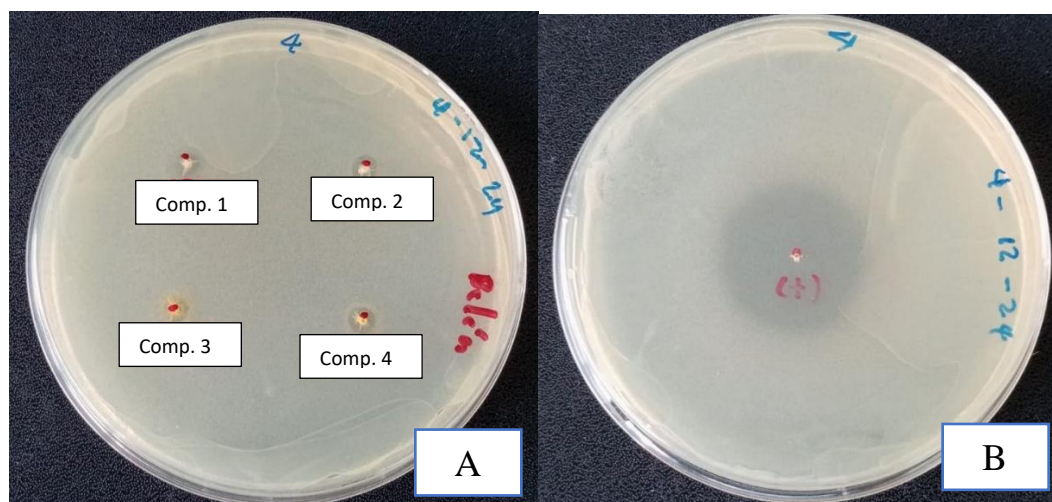
La microtecina y el 2-furil-hidroximetilcetona presentaron halos pequeños de inhibición contra todas las cepas del bioensayo (**Figura 15 a 19**), en el caso del crisofanol y phycion mostraron halos de inhibición contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, pero fueron inactivos con *Staphylococcus aureus*.

Estos resultados coinciden con la literatura, solo que en el caso del 2-furil-hidroximetilcetona, su información sobre bioensayos antibacterianos es desconocida y según la literatura, el crisofanol y phycion presentan actividad contra *Staphylococcus aureus*, pero se desconoce su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*.

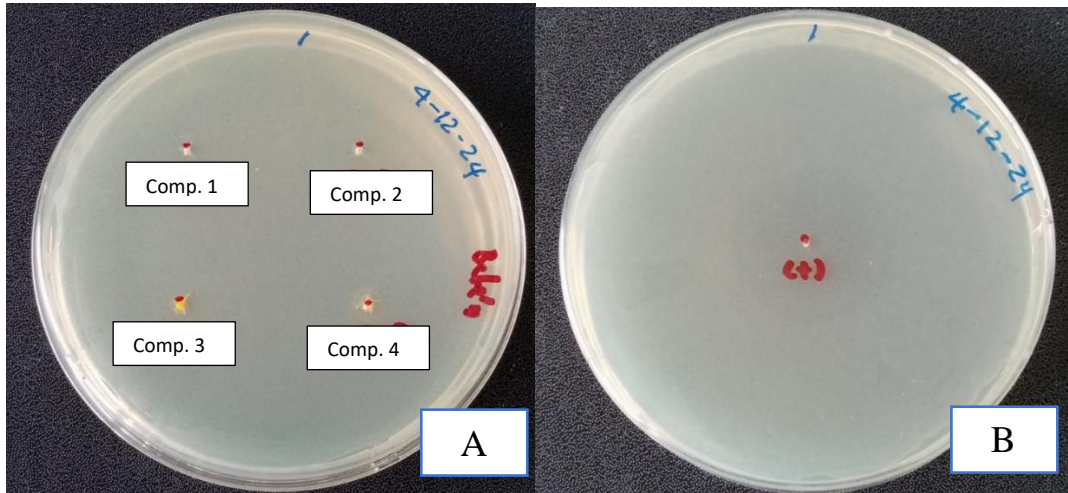
**Tabla 5.** Datos de bioensayos antimicrobianos de compuestos aislados de *Escovopsioides nivea* 0.3.A.c.

N°	Compuesto	Actividad antibacteriana				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
1	Microtecina	+	+	+	+	+
2	2-furil-hidroximetilcetona	+	+	+	+	+
3	Crisofanol	-	+	+	+	+
4	Phycion	-	+	+	+	+

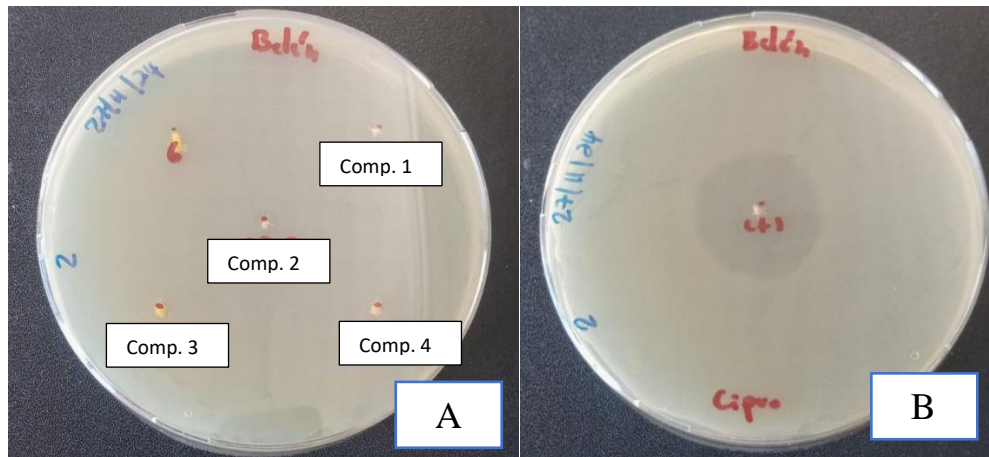
\*Presencia de halo de inhibición (+); Ausencia de halo de inhibición (-)



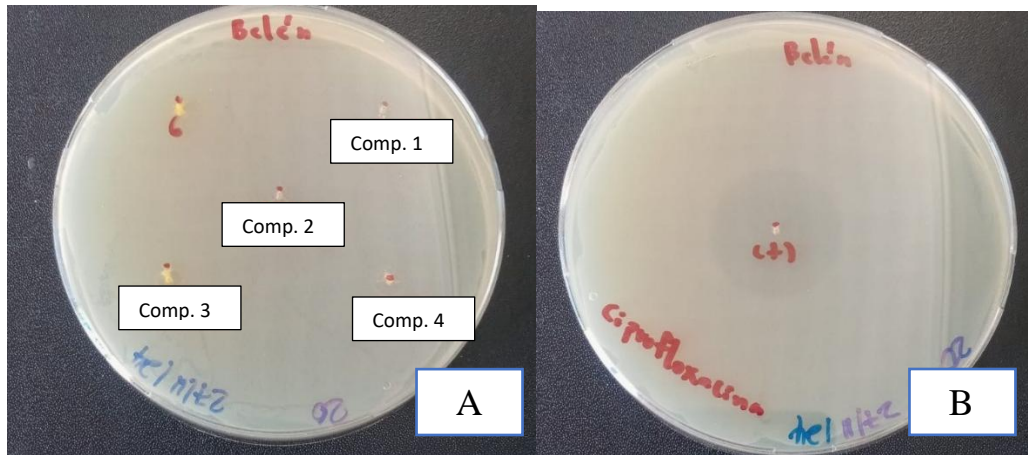
**Figura 15.** Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra *Pseudomonas aeruginosa*: A) 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroximetilcetona), 3 (crisofanol), 4 (phycion). B) Control positivo de *Pseudomonas aeruginosa*



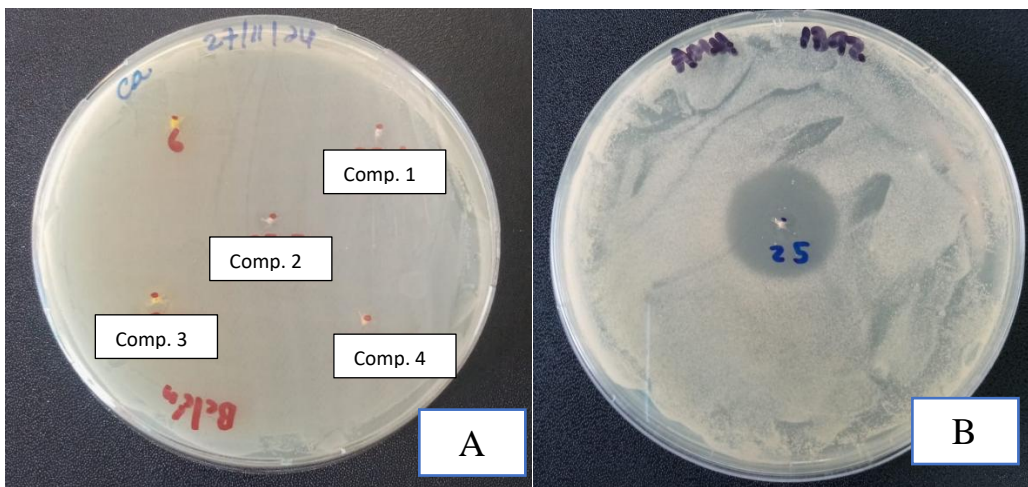
**Figura 16.** Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra *Staphylococcus aureus*: A) 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroxiacetona), 3 (crisofanol), 4 (phycion). B) Control positivo de *Staphylococcus aureus*



**Figura 17.** Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra *Escherichia coli*: A) compuestos 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroxiacetona), 3 (crisofanol), 4 (phycion). B) Control positivo de *Escherichia coli*



**Figura 18.** Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra *Enterococcus faecalis*: A) compuestos 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroximetilcetona), 3 (crisofanol), 4 (phycion). B) Control positivo de *Enterococcus faecalis*



**Figura 19.** Resultados del bioensayo de los compuestos aislados contra *Candida albicans*: A) 1 (microtecina), 2 (2-furil-hidroximetilcetona), 3 (crisofanol), 4 (phycion). B) Control positivo de *Candida albicans*

## Conclusiones

El hongo *Escovopsioides nivea* 0.3.Ac., aislado de una colonia de hormigas *Acromyrmex echinator*, tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos tales como la microtecina, 2-furil-hidroximetilcetona, crisofanol, y physcion. Estos compuestos no presentaron actividad antifúngica contra dos hongos fitopatógenos (*Aspergillus brasiliensis* y *Fusarium oxysporum*), y contra el hongo patógeno especializado de hormigas Attini (*Escovopsis* sp.). Sin embargo, presentaron una actividad débil contra bacterias y *Candida albicans*. En el caso de la microtecina y el 2-furil-hidroximetilcetona poseen actividad contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, y *C. albicans*, mientras que el crisofanol y physcion, fueron también activas con la excepción de *S. aureus*.

Este es el primer trabajo donde se describen productos naturales producidos por el hongo *Escovopsioides nivea*, el cual solo se ha aislado del jardín de las colonias de hormigas cultivadoras de hongos (Tribu Attini). Existe poca información de este hongo en la literatura y aún se desconoce si tiene alguna función ecológica en el ecosistema de estos insectos.

Una posible función ecológica con las hormigas de la tribu attini y su hongo alimento podría ser un efecto antagonista con las actinobacterias defensivas de las hormigas attini y la inhibición de su hongo alimento. Pero esta hipótesis estaría pendiente por demostrar.

## **Recomendaciones**

- Realizar el espectro de masas de los compuestos pendientes.
- Evaluar los compuestos aislados contra el hongo alimento de las hormigas.
- Evaluar los compuestos en otros bioensayos tales como citotóxicos y antiparasitarios.

## Bibliografía

- Agustín, J., Groenewald, J., Nascimento, R., Mizubuti, E., Barreto, R., Elliot, S., & Evans, H. (2013). Más “malas hierbas” en el jardín: novedades fúngicas de los nidos de las hormigas cortadoras de hojas. *PLOS One*.
- Batey, S., Greco, C., Hutchings, M., & Wilkinson, B. (2020). Guerra química entre hormigas cultivadoras de hongos y sus patógenos. *Opinión actual en biología química*, 172-181.
- Baute, M., Deffieux, G., & Baute, R. (1986). BIOCONVERSION OF CARBOHYDRATES TO UNUSUAL PYRONE COMPOUNDS IN FUNGI: OCCURRENCE OF MICROTHECIN IN MORELS. *Phytochemistry* , 1472-1473.
- Broberg, A., Kenne, L., & Pedersén, M. (1996). PRESENCE OF MICROTHECIN IN THE RED ALGA GRACILARIOPSIS LEMANEIFORMIS AND ITS FORMATION FROM 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE. *Phytochemistry* , 151-154.
- Buitrago-Díaz, A., Rojas-Vera, J., & Velasco-Carrillo, J. (2020). Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana de fracciones de diferentes polaridades obtenidas de *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch y *Vismia macrophylla* Kunth. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 15-22.
- Castro Mandujano, O., Pastor de Abram, A., & Collantes Díaz, I. (2011). Aislamiento de ácido úsnico y parietina de *Caloplaca saxicola* Hoffm. *ECIPERÚ*, 13-17.
- Chen, K., Chang-Qian, W., Yu-Qi, F., Yu-Shui, X., Zhao-Fang, Y., Zuo-Jun, X., . . . Yue, W. (2015). Aplicación de crisofanol en pez cebra para reducir los lípidos introducidos en la dieta y su posible mecanismo. *Revista Internacional de Medicina Clínica* , 10558–10567.
- Currie, C. (2001). Una comunidad de hormigas, hongos y bacterias: un enfoque multilateral para estudiar la simbiosis. *Revista anual de microbiología*, 357-380.
- Currie, C., & Reynolds, H. (2004). Patogenicidad de *Escovopsis weberi*: El parásito de la simbiosis hormiga-microbio atino consume directamente el hongo cultivado por la hormiga. *PubMeb*.
- Currie, C., Scott, J., Summerbell, R., & Malloch, D. (1999). Las hormigas que cultivan hongos utilizan bacterias productoras de antibióticos para controlar las plagas del jardín. *Nature*, 701-704.
- de Man, T., Stajich, J., Kubicek, C., & Gerardo, N. (2016). Pequeño genoma del hongo *Escovopsis weberi* , un agente patógeno especializado en la agricultura de hormigas. *PNAS*, 3567 - 3572.

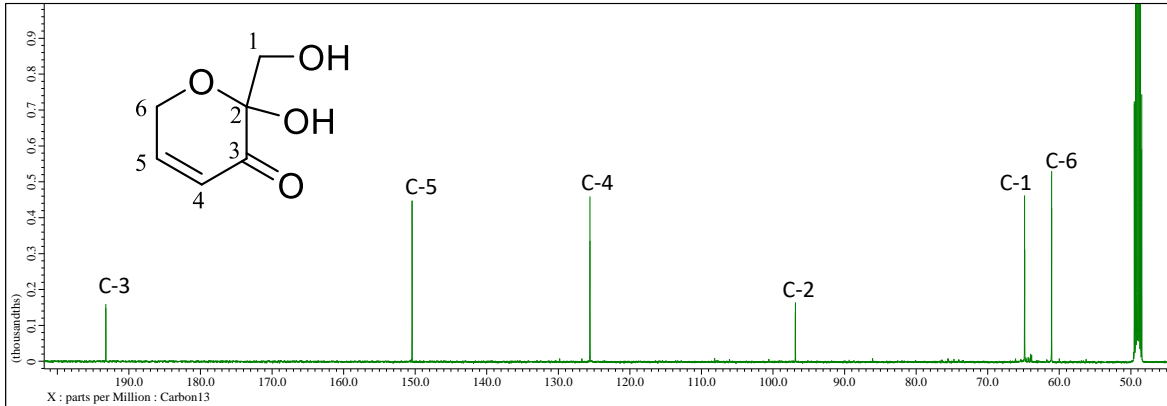
- Dhodary, B., Schilg, M., Wirth, R., & Spiteller, D. (2018). Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants. *Chemistry a european journal*, 4445 – 4452.
- Donnelly, D., & Sheridan, H. (1986). Antraquinonas de *Trichoderma polysporum*. *Phytochemistry*, 2303-2304.
- Fiskesund, R., Thomas, L., Schobert, M., Ernberg, I., Lundt, I., & Yu, S. (2008). Inhibition spectrum studies of microthecin and other anhydrofructose derivatives using selected strains of Gram-positive and -negative bacteria, yeasts and moulds, and investigation of the cytotoxicity of microthecin to malignant blood cell lines. *Journal of Applied Microbiology*.
- García-Sosa, K., Villarreal-Alvarez, N., Lübben, P., & Peña-Rodríguez, L. (2006). Chrysophanol, an Antimicrobial Anthraquinone from the Root Extract of *Colubrina greggii*. *Sociedad Química de México*, 76-78.
- Gibaja, S. (1998). *Pigmentos naturales quinonicos*. Lima.
- Hernández Medel, M., & Méndez Ventura, L. (2023). Una breve revisión del género *Picramnia*. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 2821-2828.
- Hutchings, M., & Wilkinson, B. (2023). Insects and their antibiotic-producing bacteria. *Bioscientifica*, 1-28.
- Li, C., Gong Shi, J., Peng Zhang, Y., & Zhong Zhang, C. (2000). Constituents of *Eremurus chinensis*. *Journal of Natural Products*, 653-656.
- Ling Zhao, Y., Jia-Bo, W., Guang-De, Z., Montaña Li, M., & Xiao-He, X. (2009). Investigaciones sobre antraquinonas libres del ruibarbo frente a la lesión hepática colestásica inducida por isotiocianato de  $\alpha$ -naftil en ratas. *Farmacología y toxicología básica y clínica*, 419-528.
- Madigan, M. T. (2009). BROCK BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS . En M. T. Madigan, *BROCK BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS* . Madrid: Pearson.
- Marfetán, J., Romero, A., & Folgarait, P. (2015). Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. *Fungal ecology* , 52-61.
- Martínez-Galán, J. (2009). *CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN EL SUROESTE ANTIOQUEÑO*. Medellín .
- Mendili, M., Essghaier, B., Seaward, M., & Khadhri, A. (2021). In vitro evaluation of lysozyme activity and antimicrobial effect of extracts from four Tunisian lichens: *Diploschistes ocellatus*, *Flavoparmelia caperata*, *Squamarina cartilaginea* and *Xanthoria parietina*. *Archives of Microbiology*, 1461–1469.

- Moeller, A. (1893). *Los jardines de hongos de algunas hormigas sudamericanas*. Jena: Fischer.
- Mueller, U., Kardish, M., Ishak, H., Wright, A., Solomon, S., Bruschi, S., . . . Bacci, M. (2018). Los patrones filogenéticos de las asociaciones entre hormigas y hongos indican que las estrategias agrícolas, no solo un cultivar de hongos superior, explican el éxito ecológico de las hormigas cortadoras de hojas. *Molecular ecology*.
- Osti, J., & Rodríguez, A. (2018). Escovopsioides como antagonista fúngico del hongo cultivado por las hormigas cortadoras de hojas. *BMC Microbiology*.
- Oyetunde, O., & Bradley, C. (2017). Rhizoctonia solani : taxonomía, biología poblacional y manejo de la enfermedad rhizoctonia de las plántulas de soja. *Fitopatología*, 3-17.
- Ramírez-Cárdenas, A., Isaza-Mejía, G., & Pérez-Cárdenas, J. (2013). ESPECIES VEGETALES INVESTIGADAS POR SUS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS, INMUNOMODULADORAS E HIPOGLICEMIANTES EN EL DEPARTAMENTO DE CALDAS (COLOMBIA, SUDAMÉRICA). *Biosalud*, 59-82.
- Schmidt, S. (2014). *Natureza do parasitismo de Escovopsis e Escovopsioides sobre Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras*. Rio Claro.
- Schmidt, S., Albarici, T., Nunes, P., Haifig, I., Vieira, P., & Rodríguez, A. (2016). Naturaleza de las interacciones entre los hongos hipocrealeanos y el hongo mutualista de las hormigas cortadoras de hojas. *Antonie van Leeuwenhoek*, 593–605.
- Schultz, T., & Brady, S. (2008). Principales transiciones evolutivas en la agricultura de hormigas. *PNAS*, 5435-5440.
- Subhalakshmi, G., Madhushree, S., Patra, A., & Banasri, H. (2010). Compuestos antiinflamatorios y anticancerígenos aislados de Ventilago madraspatana Gaertn., Rubia cordifolia Linn. y Lantana camara Linn. *Revista de farmacia y farmacología*, 1158-1166.
- T, D., & Herret, R. (1971). Nuevos metabolitos furanoides de Rhizoctonia solani . *Ciencias de la vida celular y molecular*, 1143–1144.
- Tamokou, J., Tala, M., Wabo, H., Kuate, J., & Tane, P. (2009). Actividades antimicrobianas del extracto de metanol y compuestos de la corteza del tallo de Vismia rubescens. *Revista de etnofarmacología*.
- Tangavelou, A., Viswanathan, M., Balakrishna, K., & A, P. (2018). Análisis fitoquímico en hojas de Chamaecrista nigricans (Leguminosae). *Pharmaceutica Analytica Acta*.
- Vega-Gibbs, E. (2022). “*DIVERSIDAD DEL HONGO Escovopsis EN CUATRO ESPECIES DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS DEL GÉNERO*

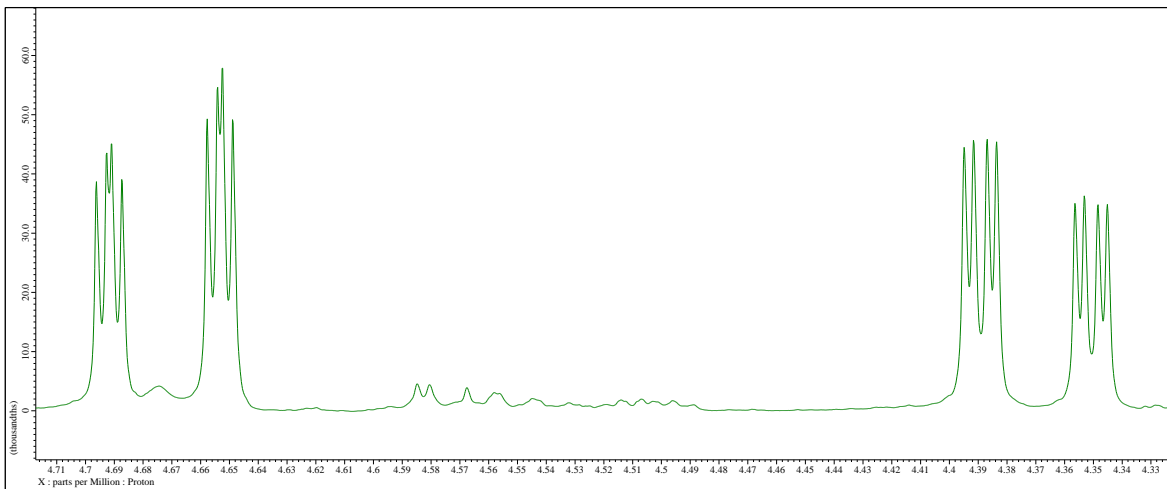
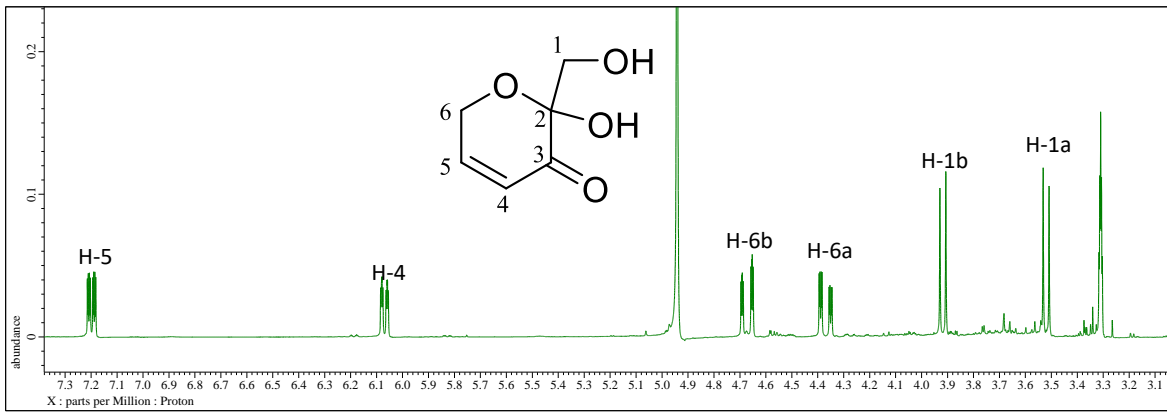
*Acromyrmex* Y PRIMER REGISTRO DEL GÉNERO *Escovopsioides* EN PANAMÁ". Panamá.

- Yang, C., Zhou, X., Meng, Q., Wang, M., Zhang, Y., & Fu, S. (2019). Secondary Metabolites and Antiradical Activity of Liquid Fermentation of *Morchella* sp. Isolated from Southwest China. *molecules* .
- Zhang, S., Jiang, Z., Un, S., Jiang, X., & Zhang, Y. (2024). Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de fisión de *Aspergillus chevalieri* BYST01 mediante la metodología de superficie de respuesta. *PeerJ*.
- Zilli, I., & Dos Santos, E. (2020). UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ANTAGONISTAS PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS ATTINIS: UMA REVISÃO. *Ciência é minha praia*.

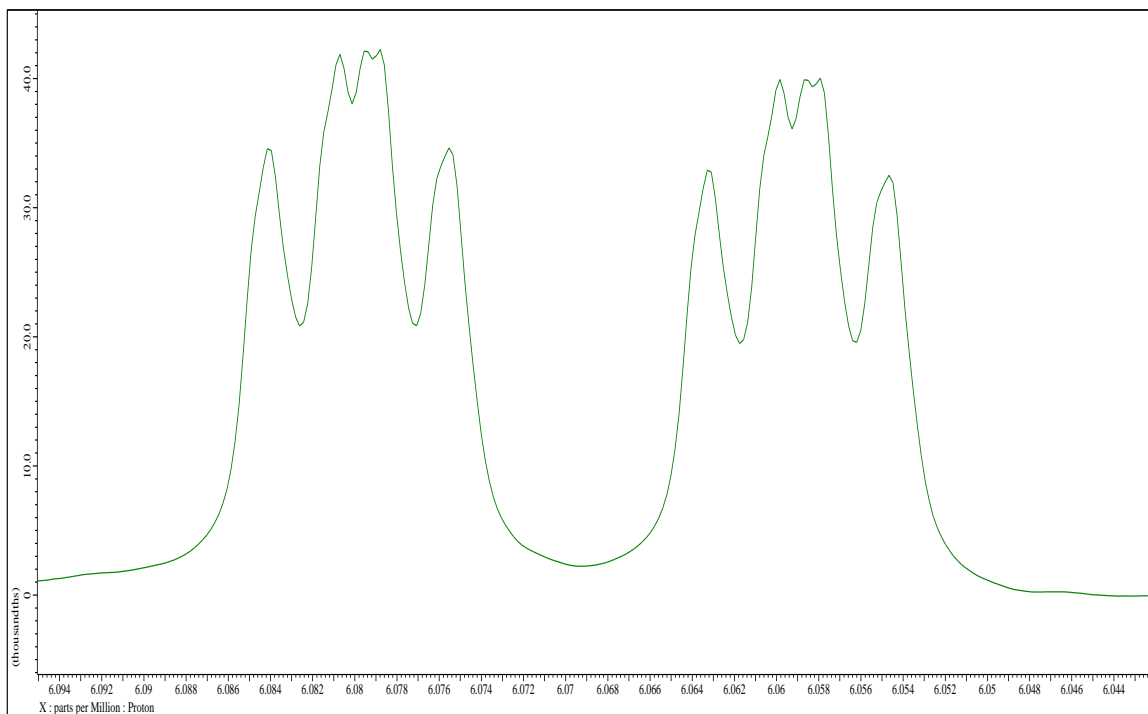
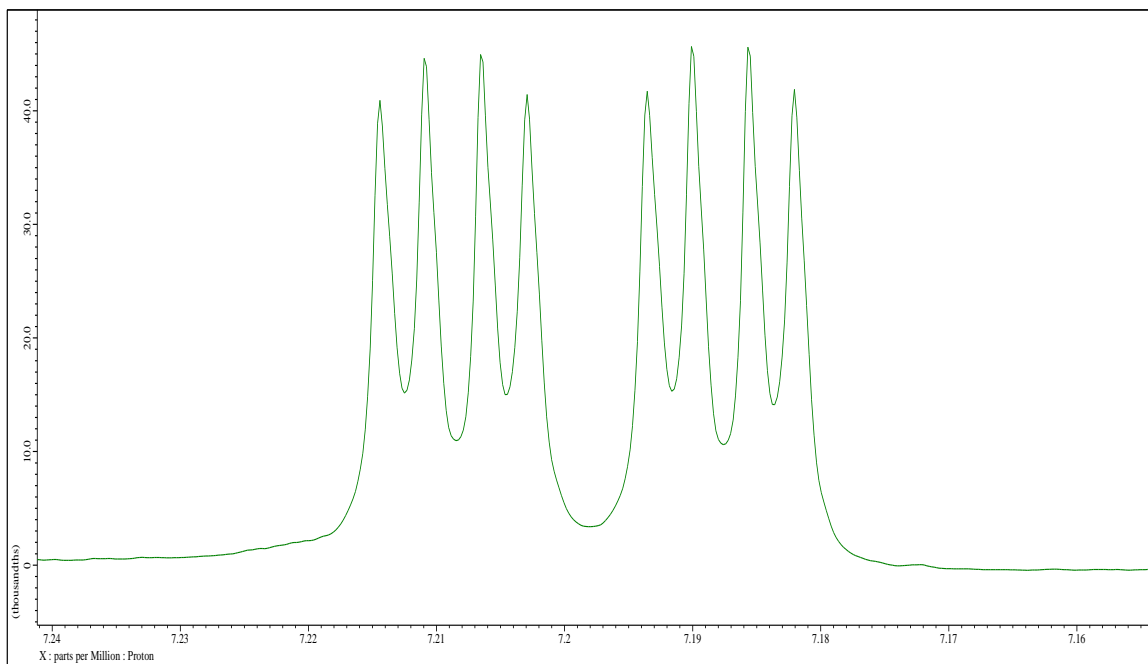
## Anexos



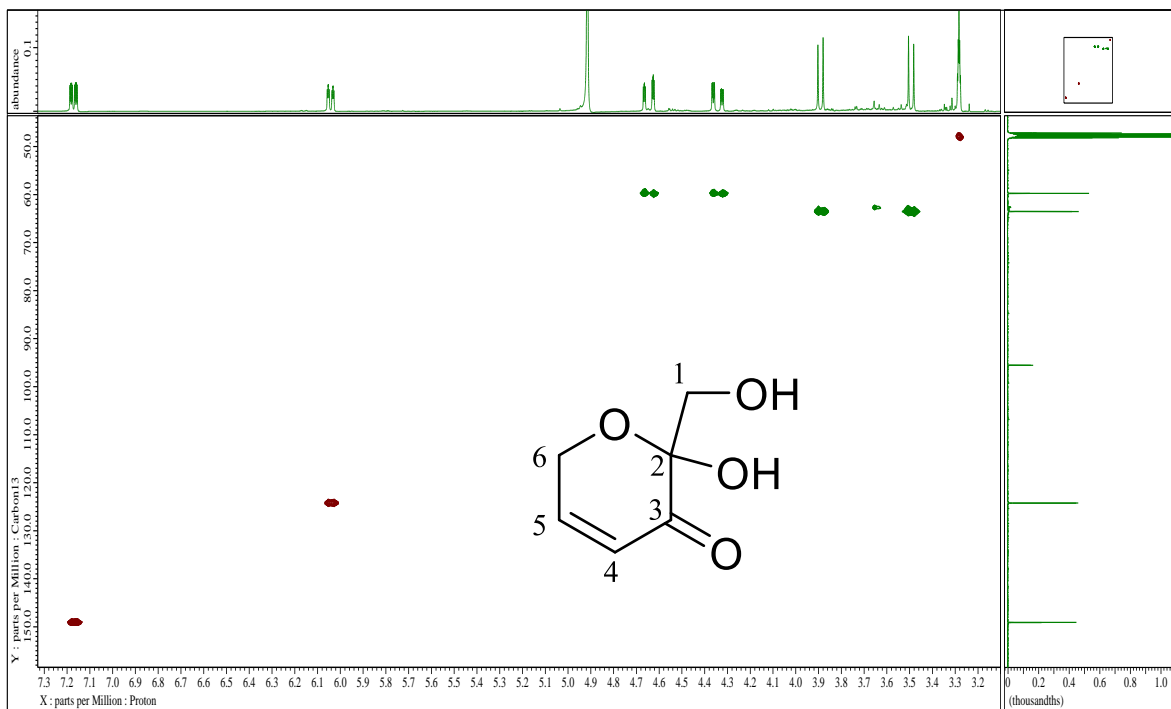
**Anexo 1.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de la microtecina en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz



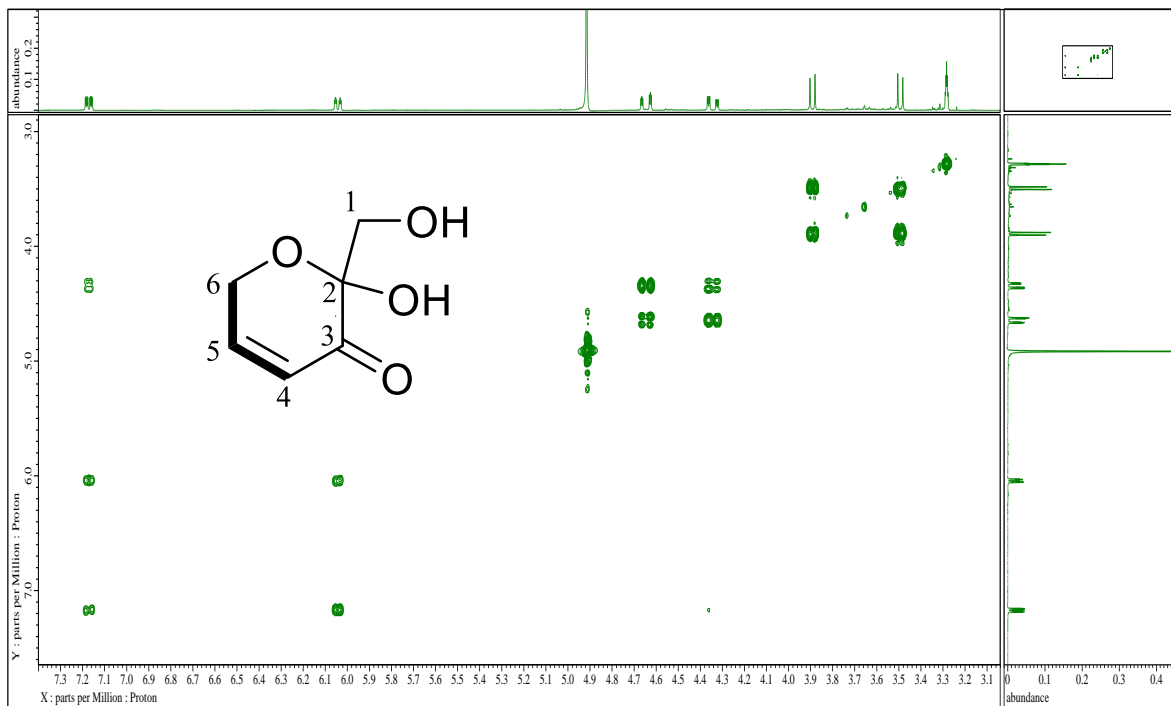
**Anexo 2.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la microtecina en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz



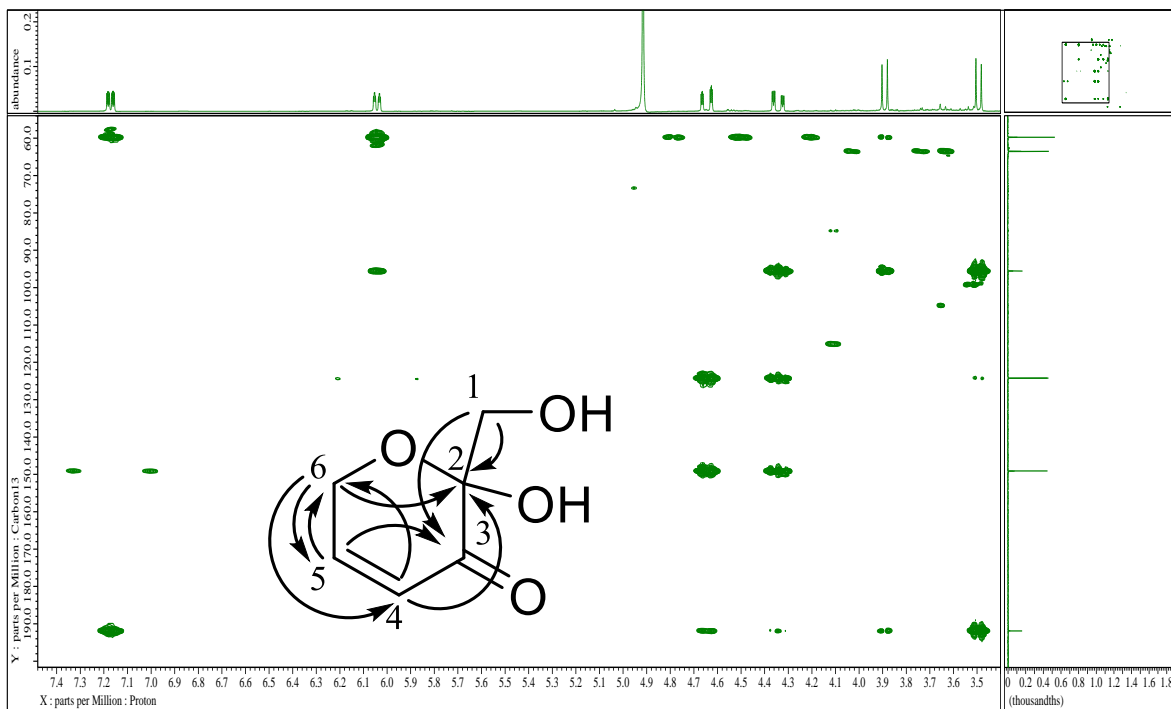
**Anexo 2 (Cont.).** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la microtecina en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz



**Anexo 3.** Espectro gHSQC de la microtecina en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz



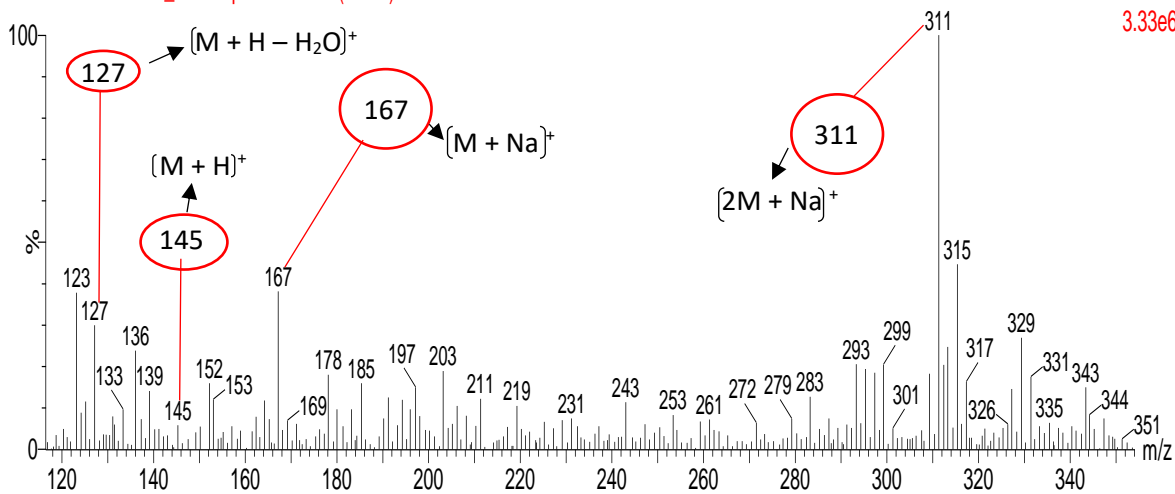
**Anexo 4.** Espectro gCOSY de la microtecina en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz



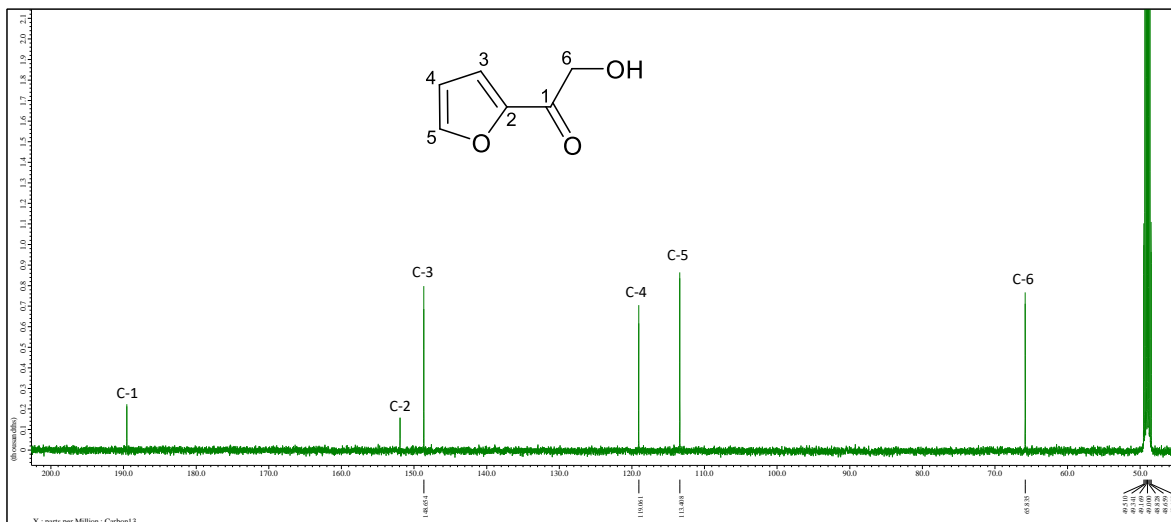
Anexo 5. Espectro gHMBC de la microtecina en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz

21DICIEMBRE2023\_escovopsioides 209 (1.494)

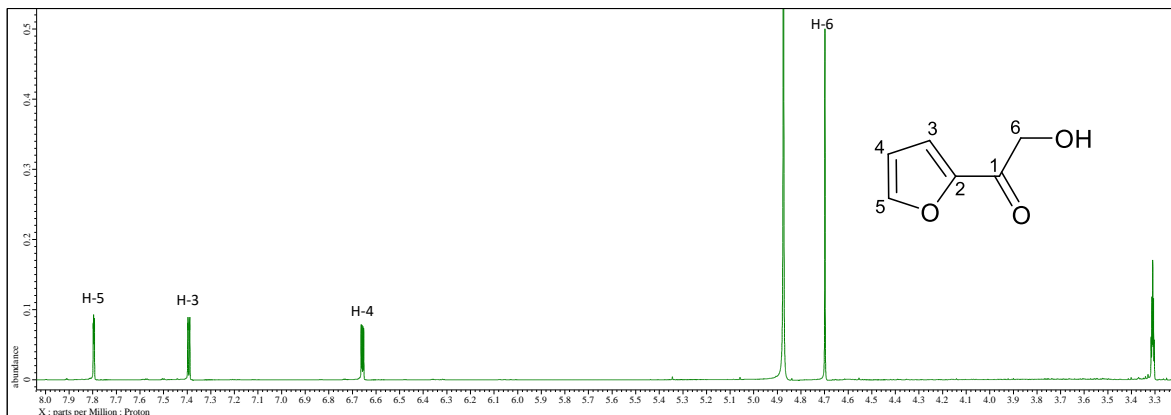
1: MS2 ES+  
3.33e6



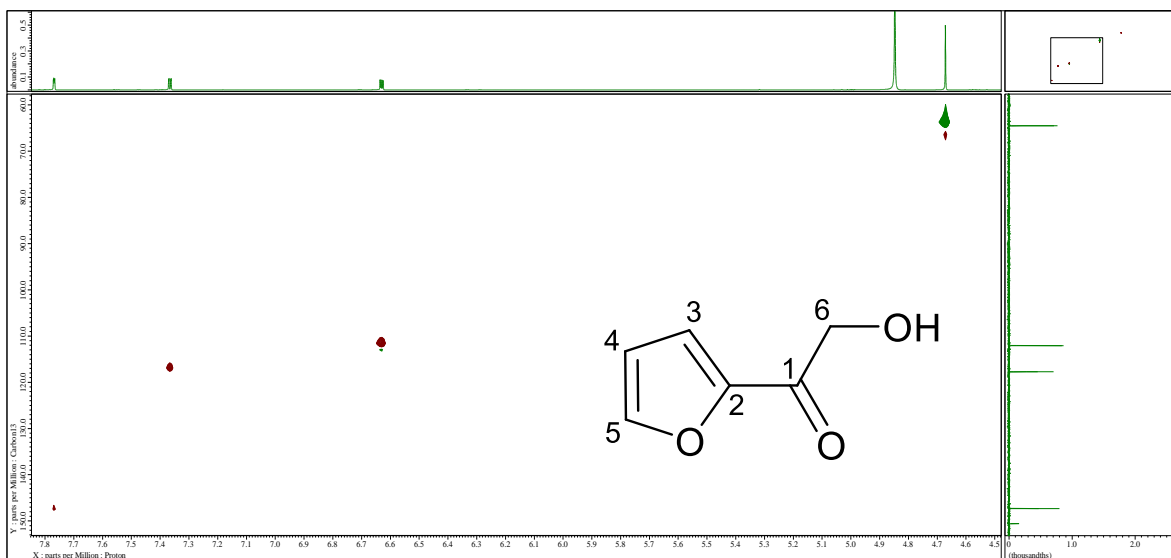
Anexo 6. Espectro de masas de la microtecina



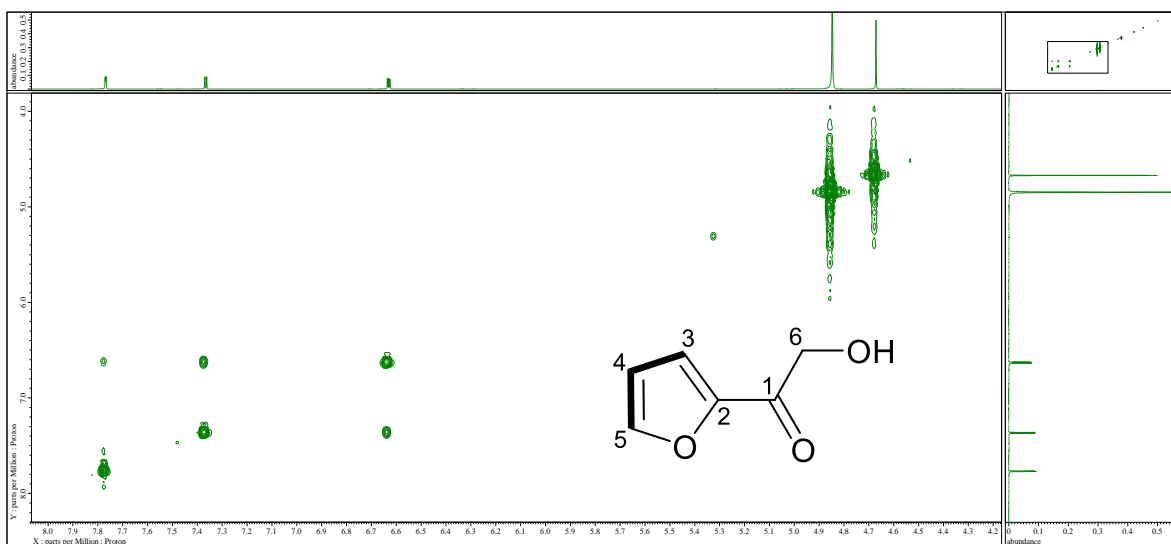
**Anexo 7.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 2-furil-hidroximetilcetona en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz



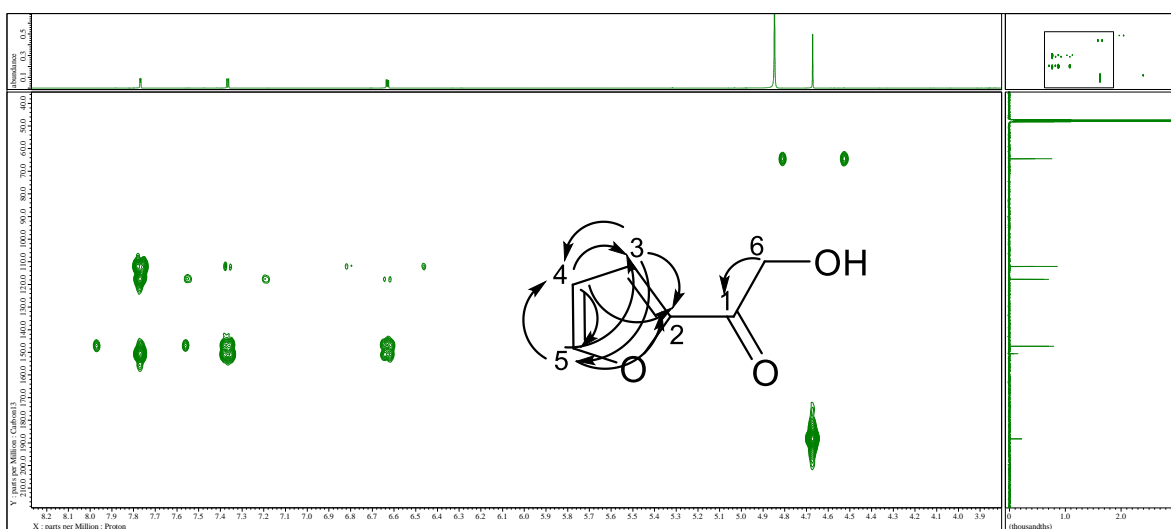
**Anexo 8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 2-furil-hidroximetilcetona en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz



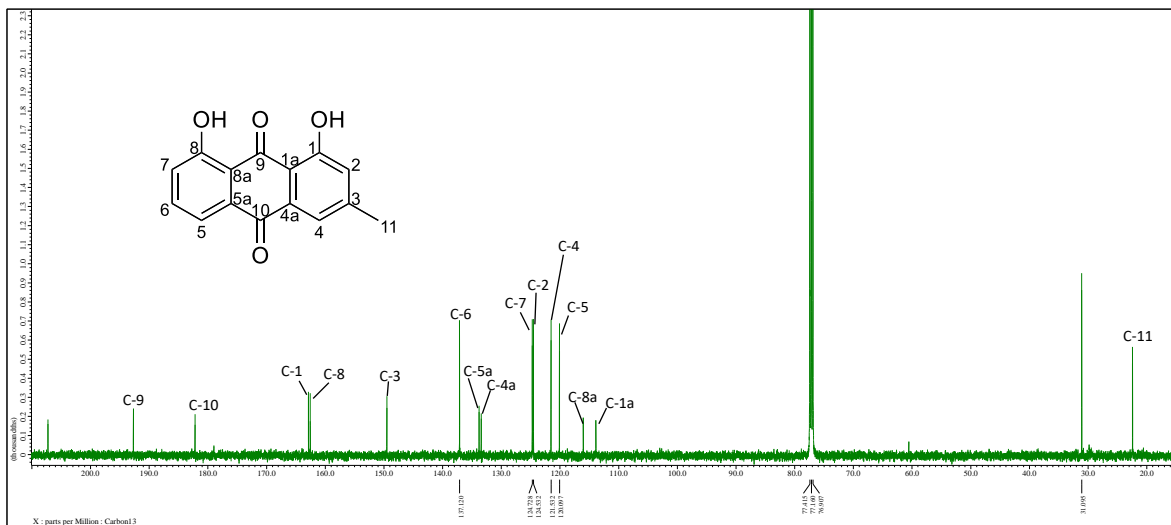
**Anexo 9.** Espectro gHSQC del 2-furil-hidroximetilcetona en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz



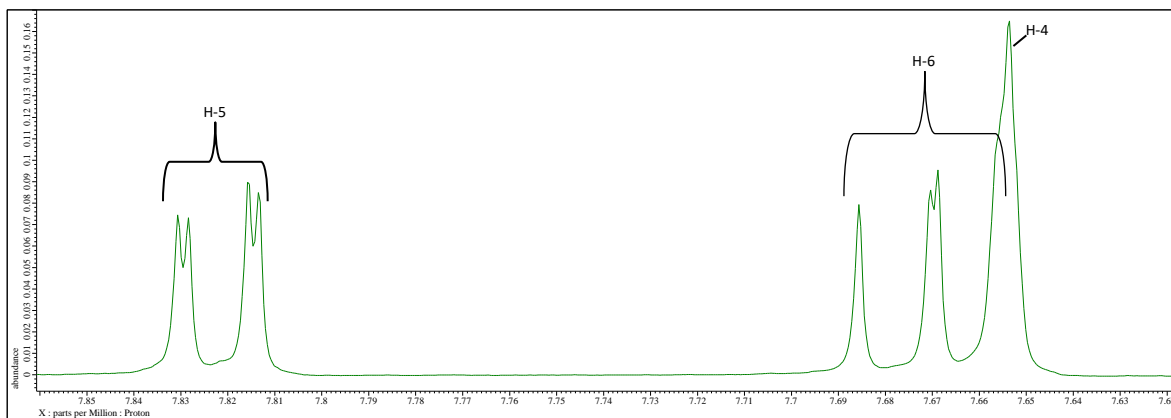
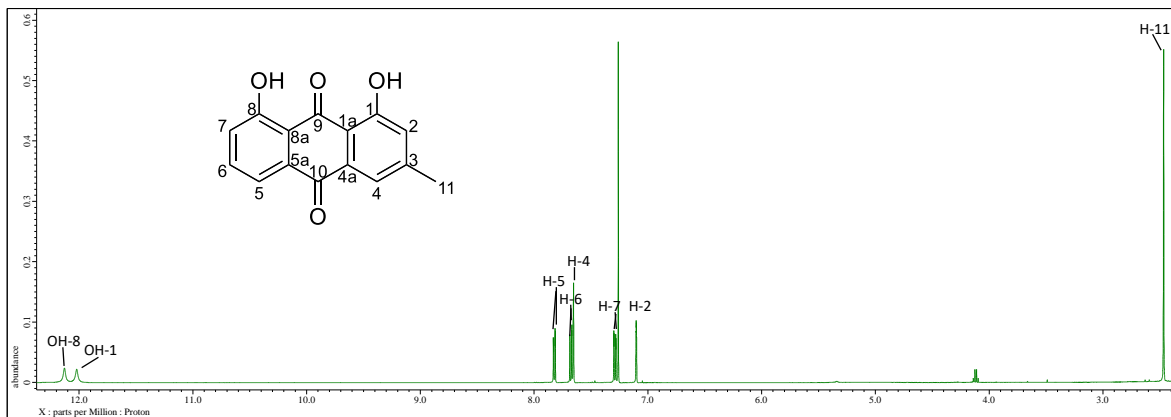
**Anexo 10.** Espectro gCOSY del 2-furil-hidroximetilcetona en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz

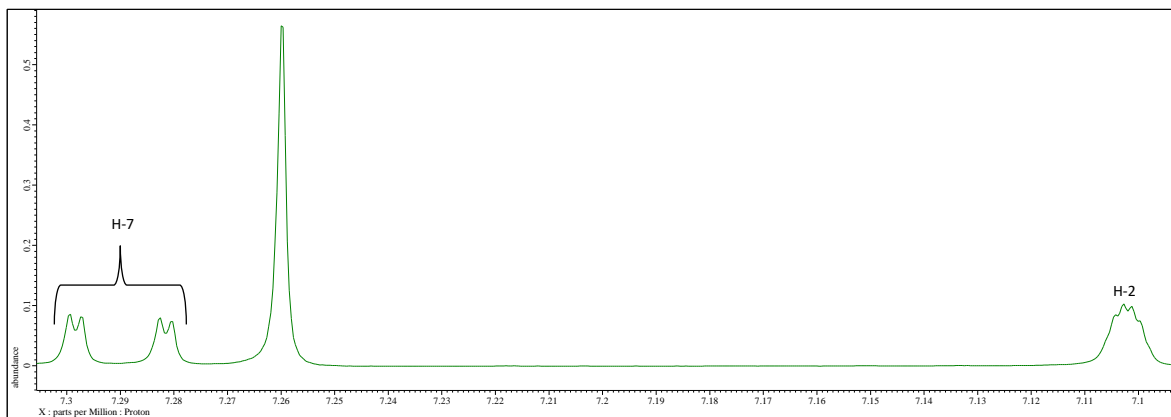


**Anexo 11.** Espectro gHMBC del 2-furil-hidroximetilcetona en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 500 MHz

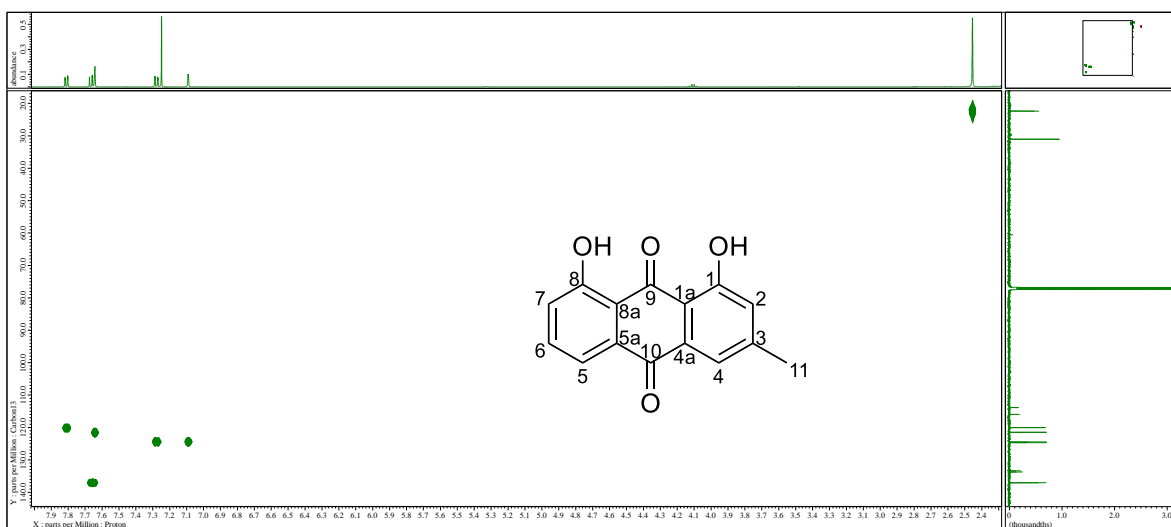


Anexo 12. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del crisofanol en CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz

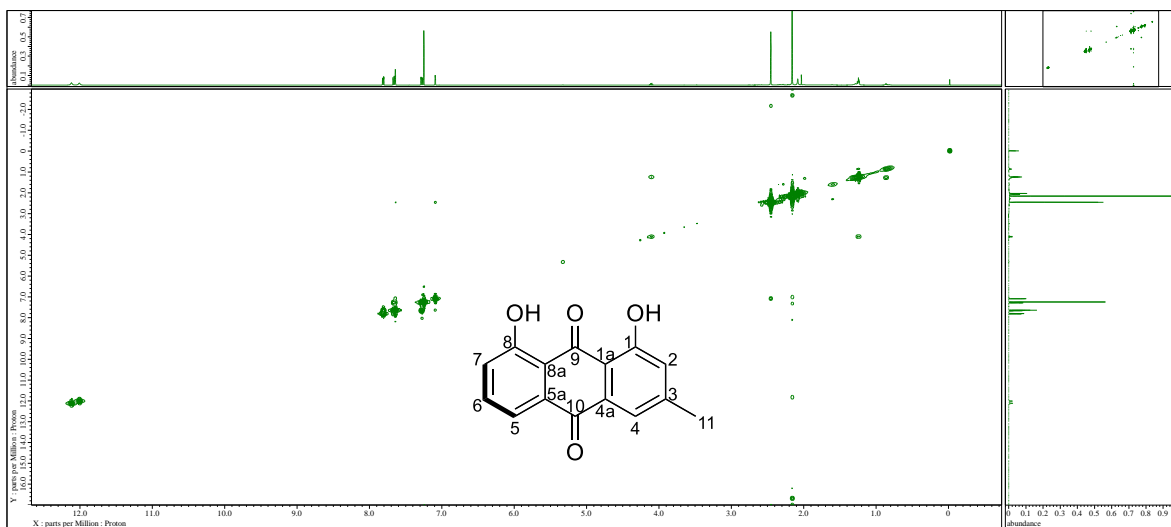




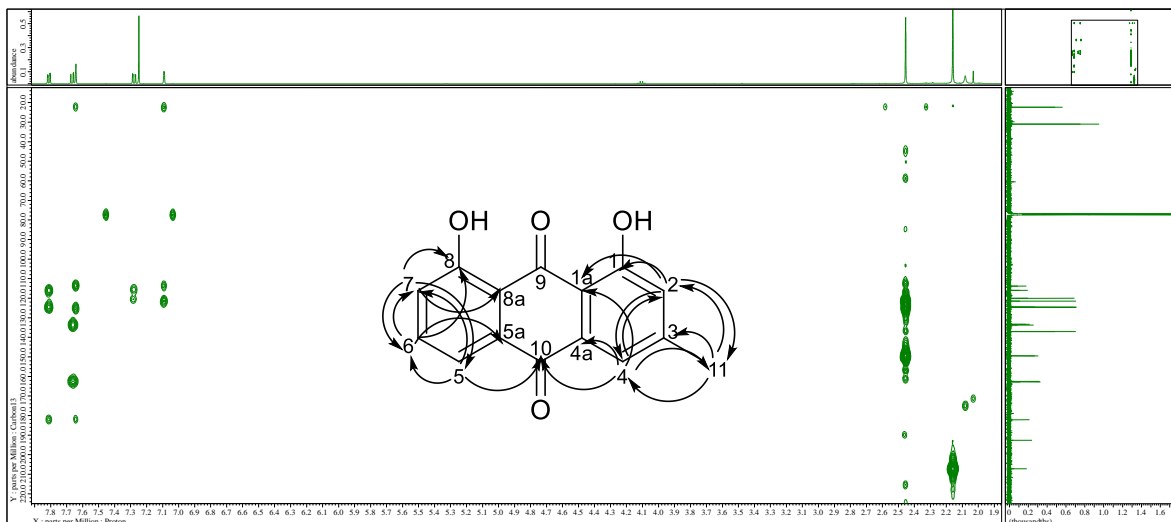
**Anexo 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del crisofanol en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



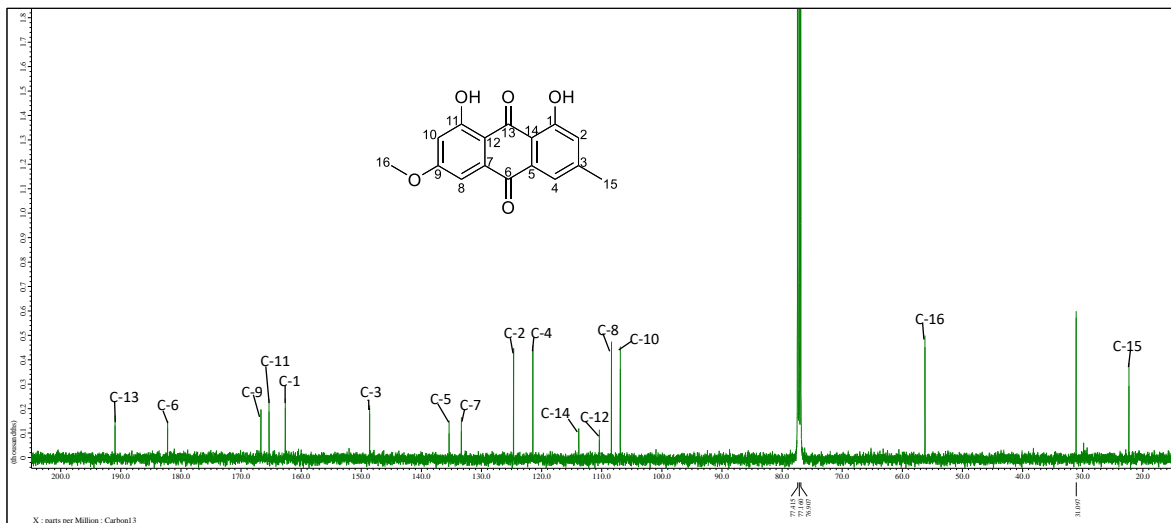
**Anexo 14.** Espectro gHSQC del crisofanol en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



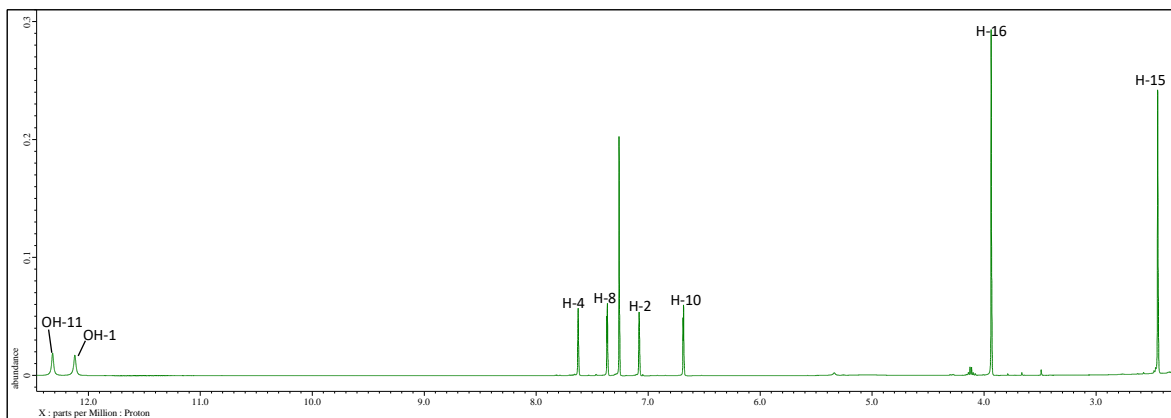
**Anexo 15.** Espectro gCOSY del crisofanol en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



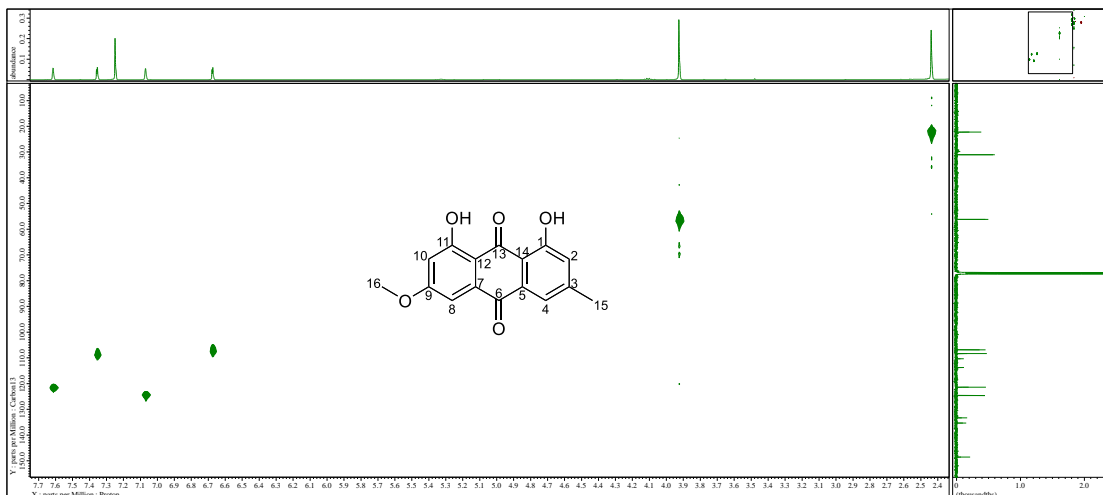
Anexo 16. Espectro gHMBC del crisofanol en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



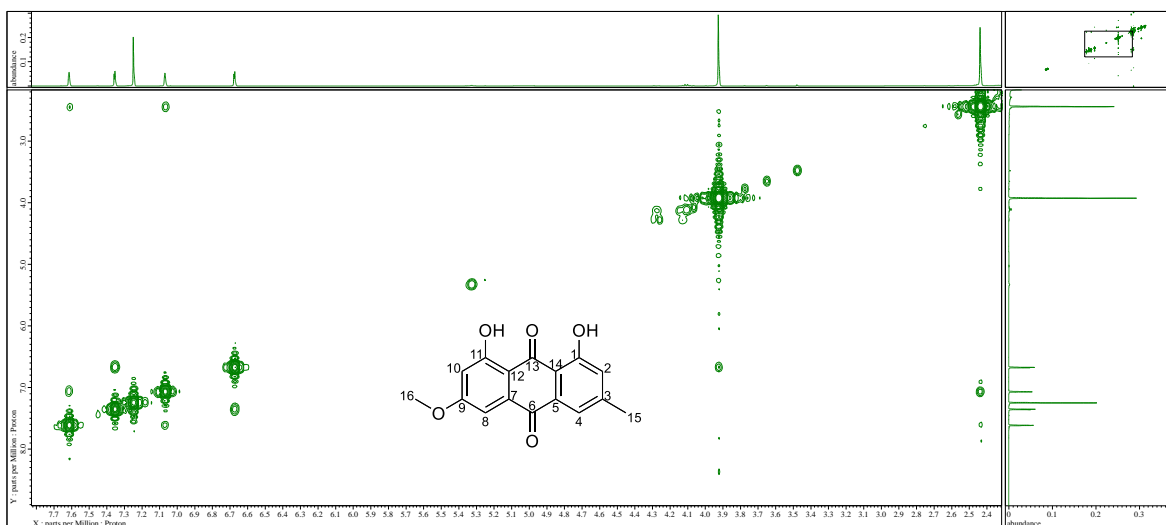
Anexo 17. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de physcion en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



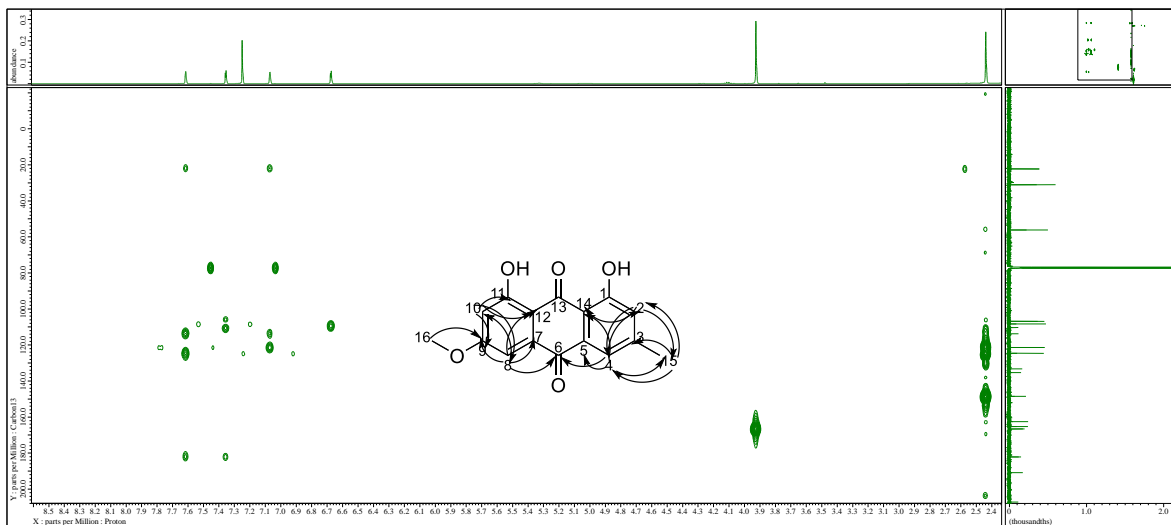
Anexo 18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de physcion en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



**Anexo 19.** Espectro gHSQC de physcion en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



**Anexo 20.** Espectro gCOSY de physcion en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



Anexo 21. Espectro gHMBC de physcion en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz