



**UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**MODALIDAD PRESENCIAL**

**Aislamiento de metabolitos bioactivos de procesos fermentativos de  
actinobacterias recolectadas en ecosistemas marinos**

**Trabajo de fin de carrera  
previa a la obtención del  
Título de Bioquímico  
Farmacéutico**

**AUTORES:**

Macas Albán Diana Patricia  
Paccha Ramírez Mayra Vanessa

**DIRECTOR:**

BQ. Cartuche Flores Luis Emilio

**CENTRO UNIVERSITARIO LOJA**

**2012**

## **CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS**

Nosotras, Diana Patricia Macas Albán y Mayra Vanessa Paccha Ramírez declaramos ser autoras del presente trabajo y eximimos expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Adicionalmente declaramos conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....  
**Diana Macas**  
**TESISTA**

.....  
**Mayra Paccha**  
**TESISTA**

.....  
**Bq. Luis Cartuche**  
**DIRECTOR**

## CERTIFICADO DE REVISIÓN DEL TUTOR

Bq. Luis Emilio Cartuche Flores  
**DIRECTOR DE TESIS**

Certifica:

Que el trabajo de Investigación “**Aislamiento de metabolitos bioactivos de procesos fermentativos de actinobacterias recolectadas en ecosistemas marinos**” elaborado por las egresadas Diana Patricia Macas Albán y Mayra Vanessa Paccha Ramírez, ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Escuela de Bioquímica y Farmacia por lo tanto autorizo su presentación.

.....

Bq. Luis Emilio Cartuche Flores  
**DIRECTOR DE TESIS**

**Loja, Febrero 2012**

## **CERTIFICACIÓN DE AUTORIA**

Las ideas y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de las autoras

.....  
Diana Patricia Macas Albán

.....  
Mayra Vanessa Paccha Ramírez

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darnos la vida y la capacidad de seguir adelante.*

*A nuestros Padres, hermanos y a toda nuestra familia por ser el pilar fundamental en nuestras vidas.*

*A la Universidad Técnica Particular de Loja y a todos nuestros profesores por brindarnos la oportunidad de prepararnos y terminar nuestra carrera profesional.*

*A nuestro director de tesis Bq. Luis E. Cartuche F. por su apoyo durante la realización de este proyecto.*

*A todos los docentes y miembros del Instituto de Química Aplicada por sus valiosos aportes.*

*A todos nuestros compañeros con quienes compartimos nuestra vida estudiantil.*

*Diana Patricia,  
Mayra Vanessa*

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a Dios por ser nuestra guía y fortaleza espiritual. A Nuestros padres y hermanos por su apoyo permanente, por la confianza que han depositado en nosotras y el inmenso amor que nos han dado. A nuestras amigas por compartir con nosotras aquellos momentos que enriquecieron nuestras vidas y por creer en nosotras hasta el final. Para ustedes, todos los frutos de esta experiencia.

*Diana Patricia,  
Mayra Vanessa*

## CONTENIDO

	Pag
CESIÓN DE DERECHOS.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORÍA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
CONTENIDO.....	VI
RESUMEN.....	VII
ARTÍCULO.....	VIII
<b>I PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO</b>	
1.1. FIN DEL PROYECTO.....	2
1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO.....	2
1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO.....	2
<b>II INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b>	
2.1. INTRODUCCIÓN.....	4
2.2. ANTECEDENTES.....	8
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. CEPAS DE ACTINOBACTERIAS.....	11
3.2. MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE PRUEBA.....	11
3.3. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	11
3.4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y FERMENTACIÓN.....	12
3.4.1. Determinación del medio de fermentación más productivo.....	12

3.4.2. Escalado del proceso de fermentación.....	12
3.5. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS.....	13
3.5.1. Obtención del extracto crudo.....	13
3.5.2. Fraccionamiento de los extractos crudos .....	13
3.5.2.1. Fraccionamiento del extracto crudo MJG-8.....	13
3.5.2.2. Fraccionamiento del extracto crudo MJG-9.....	14
3.5.3. Análisis de las fracciones obtenidas.....	14
3.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	14
3.6.1. Determinación antimicrobiana de los extractos crudos.....	15
3.6.1.1. Método de difusión en agar.....	15
3.6.1.2. Método de microdilución en caldo.....	17
3.6.1.3. Método de Inhibición del crecimiento radial (ICR).....	19
3.6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones.....	21
3.6.2.1. Método de Bioautografía.....	21
3.6.2.2. Método de microdilución en caldo.....	22

#### **IV RESULTADOS Y ANÁLISIS**

4.1. RENDIMIENTO DEL MEDIO FERMENTATIVO.....	24
4.1.1. Medio fermentativo para cepa MJG-8.....	24
4.1.2. Medio fermentativo para cepa MJG-9.....	25
4.2. EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS DE ACTINOBACTERIAS MJG-8 Y MJG-9.....	27
4.2.1. Actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos.....	28
4.2.1.1. Actividad antibacteriana.....	28
4.2.1.2. Actividad antifúngica.....	29
4.3. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS MJG-8 Y MJG-9...	32
4.3.1. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo MJG-8.....	34

4.3.2. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo MJG-9.....	35
4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS FRACCIONES.....	36
4.4.1. Actividad antifúngica.....	36
<b>V CONCLUSIONES</b>	43
<b>VI RECOMENDACIONES</b>	46
<b>VII ANEXOS</b>	48

## ABREVIATURAS

Pv	<i>Proteus vulgaris</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Wt LT2	<i>Salmonella typhimurium</i>
Sa	<i>Stafilococcus aureus</i>
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
Tm	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
An	<i>Aspergillus niger</i>
sw	Agua de mar artificial
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CCF	Cromatografía de capa fina
Hex	Hexano
EtOAc	Acetato de Etilo
MeOH	Metanol
Ff	Subfracción
MTT	3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-bromuro difeniltetrazolio
DMSO	Dimetil Sulfóxido

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b>	Microorganismos utilizados en las pruebas y sus respectivos medio de cultivo y condiciones de incubación.....	27
<b>Tabla 2.</b>	Rendimiento de los medios de fermentación para la cepa de actinobacteria MJG-8.....	36
<b>Tabla 3.</b>	Rendimiento de los medios de fermentación para la cepa de actinobacteria MJG-9.....	37
<b>Tabla 4.</b>	Características físicoquímicas del extracto MJG-8.....	39
<b>Tabla 5.</b>	Características físicoquímicas del extracto MJG-9.....	39
<b>Tabla 6.</b>	Tamaño del halo de Inhibición en mm de las cepas bacterianas frente a los extractos ensayados mediante el método de difusión en agar.....	40
<b>Tabla 7.</b>	Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 ensayados frente a los microorganismos de prueba mediante el Método de Microdilución en caldo.....	42
<b>Tabla 8.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff9.....	44
<b>Tabla 9.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff10.....	45
<b>Tabla 10.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff12.....	45
<b>Tabla 11.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff100.....	46
<b>Tabla 12.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff2.....	46
<b>Tabla 13.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff4.....	47
<b>Tabla 14.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff5.....	47
<b>Tabla 15.</b>	Características físicoquímicas de la subfracción Ff6.....	48
<b>Tabla 16.</b>	Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de las subfracciones frente a los microorganismos de prueba mediante el Método de Microdilución en caldo.....	52

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Morfología microscópica y macroscópica de las actinobacterias en estudio.....	16
<b>Figura 2.</b>	Ilustración de la microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas (A –H), con las concentraciones del extracto en µg/ml.....	30
<b>Figura 3.</b>	Cromatografía de Capa Fina (Compuestos presentes en los medios para la cepa de actinobacteria MJG-8).....	36
<b>Figura 4.</b>	Cromatografía de Capa Fina (Compuestos presentes en los medios para la cepa de actinobacteria MJG-9).....	38
<b>Figura 5.</b>	Resultados del método de Difusión en placa de las cepas bacterianas frente a los extractos crudos ensayados: a) <i>K. pneumoniae</i> b) <i>S.aureus</i> c) <i>E. faecalis</i> d) Control Gentamicina Kp. e) Control Gentamicina Sa. f) Control Ampicilina Ef.....	41
<b>Figura 6.</b>	Resultados del método de ICR de <i>A.niger</i> frente a los extractos crudos ensayados: a) Extracto crudo MJG-8 b) Extracto crudo MJG-9 c) Control Positivo Itraconazol d) Control Negativo DMSO.....	43
<b>Figura 7.</b>	Bioautograma de la subfracción Ff 9 frente a hongos dermatofitos: a) TLC b) <i>T. mentagrophytes</i> c) Control Itraconazol d) <i>T. rubrum</i> e) Control Itraconazol.....	49
<b>Figura 8.</b>	Bioautograma de la subfracción Ff 10 frente a <i>T. mentagrophytes</i> : a) TLC b) <i>T. rubrum</i> c) Control Itraconazol.....	50
<b>Figura 9.</b>	Bioautograma de la subfracción Ff 2 frente a hongos dermatofitos: a) TLC b) <i>T. mentagrophytes</i> c) Control Itraconazol d) <i>T. rubrum</i> e) Control Itraconazol.....	51
<b>Figura 10.</b>	Bioautograma de la subfracción Ff 4 frente a hongos dermatofitos: a) TLC b) <i>T. mentagrophytes</i> c) Control Itraconazol d) <i>T. rubrum</i> e) Control Itraconazol.....	51

## RESUMEN

Las actinobacterias marinas tienen un gran potencial en la generación de nuevos productos naturales, muchos de los cuales tienen aplicación médica en la terapia antimicrobiana. Para aislar metabolitos secundarios bioactivos producidos por estos microorganismos, se cultivaron 2 cepas de actinobacterias procedentes de sedimentos marinos denominadas MJG-8 y MJG-9, en caldos de fermentación. De este proceso se obtuvieron los extractos crudos que fueron fraccionados mediante cromatografía en columna utilizando diversas relaciones de solventes orgánicos. Se evaluaron las propiedades antibacteriana y antifúngica de los extractos revelando una actividad antifúngica del extracto crudo MJG-8 contra los hongos dermatofitos con una CMI de 125ug/ml frente a *T. mentagrophytes (Tm)* y de 250ug/ml para *T.rubrum (Tr)*, las subfracciones (Ff9, Ff10) de mediana polaridad de dicho extracto exhibieron los siguientes resultados de CMI: subfracción Ff9 de 125 ug/ml para *Tm*, 250 ug/ml para *Tr* y la subfracción Ff10 de 500 ug/ ml frente a *Tr*. Los resultados obtenidos nos hacen concluir que el sedimento marino de la costa sur del Ecuador es una fuente promisoriosa de cepas de actinobacterias con gran capacidad de producir compuestos bioactivos.

---

## INSOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES FROM FERMENTATION PROCESSES OF ACTINOMYCETES COLLECTED IN MARINE ECOSYSTEMS

Luis E. Cartuche<sup>1\*</sup>, Diana P. Macas<sup>2</sup>, Mayra V. Paccha<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química Aplicada -Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto  
s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador  
e-mail: [lecartuche@utpl.edu.ec](mailto:lecartuche@utpl.edu.ec)

<sup>2</sup> Bioquímica y Farmacia -Universidad Técnica Particular de Loja,  
San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja-Ecuador

---

### ABSTRACT

Two strains of marine Actinomycetales namely MJG9 and MJG8 were cultured in fermentation media. Crude extracts were obtained and fractionated using column chromatography. The antibacterial and antifungal properties of the extracts were evaluated revealing antifungal activity in the crude extract MJG-8 with MICs of 125 ug/ml against *Trichophyton mentagrophytes* and 250 ug/ml for *Trichophyton rubrum*. The sub fractions (FF9, FF10) of medium polarity of the extract showed significant inhibitory activity against these microorganisms. The results demonstrated that the marine sediment of the southern coast of Ecuador is a promising source of Actinomycetes strains with a high capacity to produce bioactive compounds.

Keywords: Actinomycetes, secondary metabolites, column chromatography, MIC.

---

### INTRODUCTION

Easy access to drugs to combat infections caused by pathogenic micro-organisms increases the persistence and spread of micro-organisms resistant.<sup>1</sup> This rapid development of resistance and toxicity of some of the antibiotics currently used to find and foster the continued development of new antimicrobial agents.<sup>2</sup>

From the twentieth century has been reported about 50,000 natural products from micro-organisms, of which over 10,000 are biologically active and more than 8,000 are antibiotics and antitumorales agents.<sup>3</sup> In this context, it is known that the species of Actinomycetes are responsible for the production about half of these secondary metabolites.<sup>4</sup>

Traditionally, these organisms were isolated from terrestrial sources and only in the last two decades it became evident the potential of marine microorganisms as producers of antibiotics with unique structures and special characteristics.<sup>5</sup> Now, several studies emphasize in the importance of marine actinomycete due to they are very interesting in development of new natural products and they have potential biomedical application in therapy

antimicrobial.<sup>6</sup> Though chemical synthesis of drugs is an option, the search for compounds from micro-organisms is the main source of new antimicrobial agent.<sup>2</sup>

Therefore, this research aims to isolate bioactive secondary metabolites from marine actinomycetes collected from Jambell's mangrove.

### MATERIALS AND METHODS

#### Selected Actinomycetes

Selected Actinomycetes MGJ-8 and MGJ -9 were stored at -80 °C as cryogenic reserves in Laboratorio de Bioensayos del Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja.

#### Biological material

We used five Gram-negative bacteria: *Proteus vulgaris* (Pv) ATCC® 8427, *Escherichia coli* (Ec) ATCC® 25922, *Klebsiella pneumoniae* (Kp) ATCC® 9997, *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) ATCC® 27853, and *Salmonella typhimurium* (Wt LT2), two Grampositive

bacteria: *Stafilococcus aureus* (Sa) ATCC® 25923, *Enterococcus faecalis* (Ef) ATCC®; two dermatophytes fungi: *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) ATCC® 28185, *Trichophyton rubrum* (Tr) ATCC® 28188 and *Aspergillus niger* (An) ATCC® 9642-U. They are as cryogenic reserves at -80 °C in Instituto de Química Aplicada, UTPL.

### Fermentation process

Discs of 10 mm of diameter extracted from plate cultures of MJG-8 and MJG-9 were put into 1L of fermentation media A1 and CTG 75 % sea water respectively. These were incubated at 30 °C, 200rpm by 7 days.

### Extraction and Isolation of Metabolites

5 g of Amberlite XAD-7HP Sigma (Resin) was added to each fermentation medium and stirred for 3h, then washed with ethyl acetate and then concentrated down until dry using rotary vacuum evaporators. The extracts were subjected to fractionation using column chromatography. Then the crude extract MJG-8 was fractionated using a sample-silica ratio of 3:30, while the crude extract MJG-9 was fractionated using a ratio of 1:20. Silica gel 60 Merck was used during the stationary phase and organic solvents during the mobile phase checking the purity of the fractions and selecting the sub fractions using TLC.

### Antimicrobial Activity

#### Agar well diffusion

This method was used only with bacteria following the procedure described by Bauer et al,<sup>7</sup> and modified for natural products. A working solution of 20 mg of extract in 1 mL DMSO was prepared. 25 ul of this was placed into 6 mm wells made on agar Muller Hinton plates. (The procedure was repeat 3x).

#### Microdilution broth assay

Crude extracts and sub fractions were tested for dermatophyte fungi using the procedure described by Peoples et al.<sup>8</sup> A working solution 20mg of extract in 1mL DMSO and 2mg of extract in 100ul DMSO was prepared for MIC and sub fractions respectively. The inoculum was adjusted to a concentration of

$5 \times 10^4$  spores/ ml. The plates were incubated at 28 °C for 72h.

### Inhibition of radial growth assay

This method was used in *A. niger*, a working solution 100 mg of extract in 500ul DMSO was prepared and we made two dilutions 1:10 and 1:100 obtaining three concentrations 1000ppm, 100 ppm and 10 ppm respectively.

50 ul of each dilution was homogenized on agar Sabouraud and these were inoculated with fungi. Everyone was incubated at 28°C for 72h. (The procedure was repeat 3x).

### Bioautography assay

A solution of 2 mg from each sub fraction was prepared in 100ul of organic solvent, spreading an aliquot of 10 ul on a 6x1cm TLC plate with mobile phase emulsion, which was distributed onto 1 ml of agar which had been inoculated with the fungus whose concentration is  $2.5 \times 10^4$  spores/ ml. The developed bio-autograms were incubated at 28 °C for 72h.

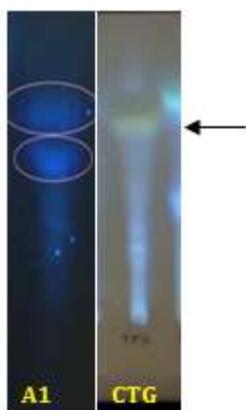
## RESULTS AND ANALYSIS

### Fermentation process

Table1. Measurement of A1 and CTG fermentative process

Fermentative process	%
CTG 75% sea water actinomycete MJG-8	0.07%
A1 75% sea water actinomycete MJG-9	0,05%

All crude extract compounds were separated by Thin layer chromatography (TLC) plate. Figure 1



**Figure 1.** TLC plate of A1 and CTG fermentative process

CTG (75% sea water) and A1 (75% sea water) were the best in growth and production of MJG-8 and MJG-9 metabolites, respectively.

The medium CTG 75% sea water presented nitrogen sources in its composition which are required for the biosynthesis of proteins and nucleic acids; in addition glucose being a simple carbohydrate is readily available for the use of bacteria as opposed to the starch present in the medium A1 is a complex carbohydrate and requires enzymatic cleavage process prior to their assimilation.

While the medium A1 75% sea water has excellent carbon sources (starch), nitrogen source (Peptones and yeast extract), which together are necessary for growth and metabolite production. Leveau et al,<sup>9</sup> and Demain.<sup>10</sup>

### Fractionation

This was carried out using column chromatography and 104 fractions were obtained from crude extract MJG-8 and 10 fractions from crude extract MJG-9. From the separation of fractions using thin layer chromatography 4 sub fractions were selected (Ff) of interest: Ff9, Ff10, Ff12, Ff100 out of MJG-8 crude extract and Ff2, Ff4, Ff5, Ff6 from the MJG-9 extract.

### Antimicrobial Evaluation

#### Crude extracts

Crude extracts, showed no antibacterial activity.

However they had antifungal activity against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*, MIC results are in Table 2.

**Table 2.** MIC values of crude extracts MJG-8 and MJG-9

Dermatophyte Fungi	Crude extracts MJG-8	Crude extracts MJG-9
<i>T. mentagrophytes</i>	125 ug/ml	250 ug/ml
<i>T. rubrum</i>	250ug/ml	500ug/ml

This table showed the great antifungal activity of crude extract MJG-8 in particular against *T. mentagrophytes*, Laboratory criteria "is considered that the extracts have significant and selective activity when the value of MIC is under 200ug/ml " therefore we can suggest the effective use of crude extract MJG-8 as an antifungal.

These results are consistent with the contributions of Leiva et al,<sup>2</sup> who reported 13 strains of actinomycetes were evaluated against filamentous fungi and yeast, 3 strains showed moderate activity against *T. rubrum* and strong antagonism against *T. mentagrophytes*. Other authors such as Jiang and Xu,<sup>11</sup> reported actinomycetes activity against filamentous fungi such as *Aspergillus niger* and *Trichophyton mentagrophytes*.

None of the two extracts had inhibitory activity against *A. niger*. These results were reported by León et al,<sup>12</sup> who said that marine actinomycete no showed inhibitory activity against *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigates*. The opposite Pisano et al,<sup>13</sup> reported that some marine actinomycetes were active against yeast and *A. niger*.

#### Sub fractions

Sub fractions analyzed using the bio autography assay showed the following results:

#### MJG-8 sub fractions

- FF9: presented a bioactive compound with an Rf of 0.8 compared to Tm and Tr (Fig.2)

- FF10: presented a bioactive compound with an Rf of 0.8 compared to Tr (Fig.3)

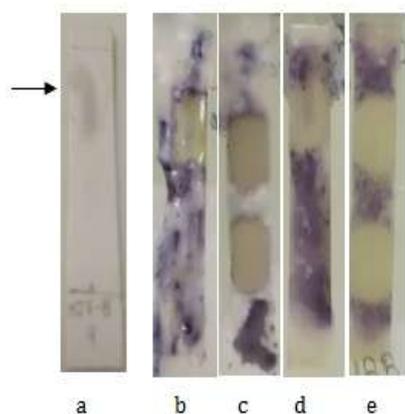


Figure 2.- Subfraction Ff 9 Bioautography: a) TLC plate b) *T. mentagrophytes* c/e) Itraconazol Control d) *T. rubrum*

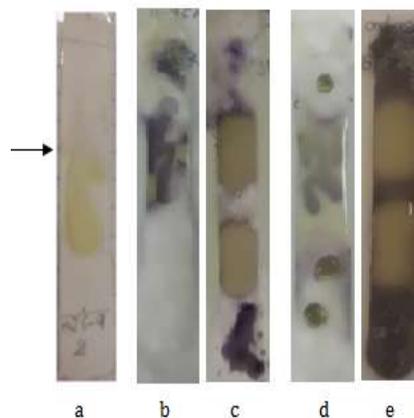


Figure 4.- Subfraction Ff 2 Bioautography: a) TLC plate b) *T. mentagrophytes* c/e) Itraconazol Control d) *T. rubrum*

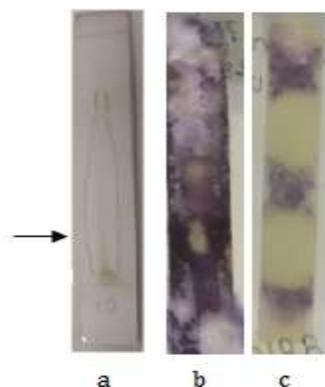


Figure 3.- Subfraction Ff 10 Bioautography: a) TLC plate b) *T. mentagrophytes* c/e) Itraconazol Control d) *T. rubrum*

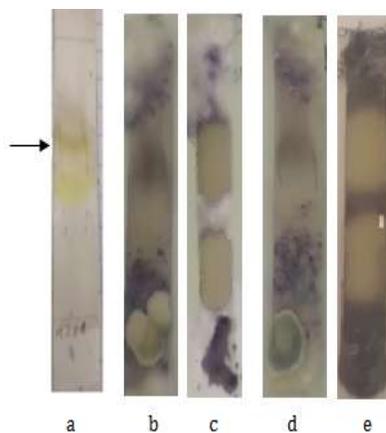


Figure 5.- Subfraction Ff 4 Bioautography: a) TLC plate b) *T. mentagrophytes* c/e) Itraconazol Control d) *T. rubrum*

### MGJ-9 sub fractions

- FF12: presented a bioactive compound with an Rf of 0.5 compared to Tm and Tr (Fig.4)

- FF4: presented a bioactive compound with an Rf of 0.6 compared to Tm and Tr (Fig.5)

**Table 3. MIC values of MJG-8 and MJG-9 subfractions**

Dermatophyte fungi	MJG-8 subfractions ug/ml		MJG-9 subfractions ug/ml	
	Ff 9	Ff10	Ff 2	Ff 4
<i>T. metagrophytes</i>	125	250	1000	500
<i>T. rubrum</i>	250	500	1000	1000

The MJG-8 extract showed a higher antifungal activity compared to the Ff2 and Ff4 sub fractions derived from the same (Table2 and Table3). Hardman et al,<sup>14</sup> and Fauci et al,<sup>15</sup> said that compounds in conjunction showed activity.

Katzun,<sup>16</sup> reported that medial polarity and low molecular weight of these compounds can cross the cell membrane of microorganisms. Emilio Bouza et al,<sup>17</sup> reported that these compounds exert their action at this level by inhibiting the synthesis of ergosterol, which is a lipid disrupting essential to its integrity and the physicochemical properties of fungal cell membrane. Finally we show that the crude extracts obtained from actinomycetes MJG-8 and MJG-9 have significant antifungal activity which is important considering that antifungal agents are limited, also the yeast and fungal infections are caused by dermatophyte fungi and generally have increasing importance as opportunistic agents in immunocompromised patients, to which must be added the increased resistance to the small number of antifungal existences.<sup>18</sup>

## REFERENCES

1. Kunin, C.M Resistance to antimicrobial drugs a worldwide calamity. *Ann Int Med.* 1993, 118, 557-611
2. Leiva, S.; Yañez, M.; Zaror, L.; Rodríguez, H.; García Quintana, H Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. *Rev. Med.* 2004, 132, 151-159.
3. Fenical, W.; Jensen, P Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol.* 2006, 2, 666-73.
4. Bull, A.; Ward A.; Good fellow, M Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Rev. Microbiol. Mol. Biol.* 2000, 64, 573-606
5. Maldonado, L.; Stach, J.; Pathom-aree, W.; Ward A.; Bull A.; Goodfellow. M Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005, 87, 11-8.
6. Magarvey, N.A., J.M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin & D.H. Sherman. 2004. Isolation and characterization of novel marinederived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 70(12):7520-9.
7. Bauer, A.; Kirby, W. ; Sherris, I.; Turk, M Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966. 45, 493-496
8. Peoples, A.; Zhang,Q.; Millet, W.;Rothfeder, M.;Pescatore, B.; Madden, A Neocitreomicins I and II, Novel Antibiotics with activity Againsts Meticillin Resistant Staphylococcus aureus and

## CONCLUSIONS

CTG 75% sw and A1 75% sw are optimal for the growth of marine actinomycetes (MJG-8 and MJG-9) and for the production of bioactive metabolites.

Crude extracts MJG-8 and MJG-9 didn't have antibacterial activity. But they had antifungal activity against *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*.

MJG-8 subfractions (Ff9 and Ff10) showed promising antifungal activity.

## RECOMMENDATIONS

Get better the fermentation process to obtain a higher content of biomass and increase production of the metabolites.

The actinomycetes research is important from medical perspective because they have antimicrobial properties.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Universidad Técnica Particular de Loja for the financial support given to this work. We also express our appreciation to the members of Instituto de Química Aplicada leded by the PhD. Omar Malagón, for their help in carrying this project.

- Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Antibiot* (Tokyo). 2008, 61, 7,457-63
9. Leveau, J.; Bouix, M *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*. España. 2000
  10. Demain, A Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: Sutton B (ed) *A century of mycology*. Cambridge University Press. 1996, 23, 3-254
  11. Jiang CL, Xu LH. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 249-53.
  12. León, J.; Liza, L.; Soto, I.; Cuadra, L.; Patiño, L.; Zerpa, R Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Rev. Perú. biol.* 2007, 14, 259-270.
  13. Pisano, M.; Sommer, M.; Taras, L Bioactivity of chitinolytic Actinomycetes of marine origin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992, 36, 553-5.
  14. Hardman, J.; Limbird L.; Molinoff ,P.; Ruddon, R.; Gilman, A *Las bases farma-cológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill, México DF. 1996, 1907.
  15. Fauci, A.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.; Wilson, J.; Martin, J.; Kasper, D.; Longo, L *Harrison: Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill, México D.F. 1998.
  16. Katzung, B *Farmacología Básica Clínica*. Ed. El Manual Moderno. México D.F. 1987.
  17. Bouza, E.; González, J.; Grasa, M.; Orós, D; Pérez, M.; Rubio, C.; Sobreviela, M *Antifúngicos. Criterios de uso racional y guía práctica terapéutica*.
  18. Pujol, I.; Aguilar, C.; Gene, J.; Guarro, J *In vitro antifungal susceptibility of Alternaria spp and Ulocladium spp*. *J. Antimicrob Chemother*. 2000, 46:337-338

# **CAPITULO I**

## **FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO**

## **1. Presentación de Fin, Proposito y Componentes del Proyecto**

### **1.1. Fin del Proyecto**

Esta investigación pretende contribuir en la lucha contra las enfermedades causadas por los agentes patógenos de origen bacteriano o fúngico que aquejan a la población mundial y que por años han cobrado la vida de millones de personas de todas las edades principalmente en los países en vías de desarrollo como el nuestro, es por ello que nos hemos enfocado en estudiar a Actinobacterias marinas como una nueva y potencial fuente de metabolitos bioactivos, cuya característica principal es su actividad antibacteriana y/o antifúngica que lamentablemente en Ecuador al momento no ha sido estudiada.

### **1.2. Propósito del Proyecto**

Dada la tendencia actual en la búsqueda de los compuestos estructuralmente novedosos y con mecanismos de acción poco usuales para combatir procesos infecciosos causados por organismos más resistentes, el enfoque está dirigido a la identificación de especímenes potenciales cuya maquinaria metabólica produzca nuevas entidades químicas, y es en los ecosistemas como los marinos donde las condiciones poco favorables como la elevada salinidad, pH alcalino entre otros, han conseguido producir adaptaciones evolutivas singulares que resultan atractivos para la industria farmacéutica. Por tal razón el estudio pretende contribuir al descubrimiento de microorganismos biológicamente activos para el aislamiento de metabolitos secundarios de interés.

### **1.3. Componentes del Proyecto**

Los resultados que se pretenden obtener en esta investigación comprenden:

1. Selección del medio fermentativo que favorezca la mayor producción de metabolitos con actividad biológica.
2. Determinación de la actividad antibacteriana o antifúngica del extracto obtenido a partir del medio fermentativo.
3. Separación de los componentes activos presentes en el extracto y determinación de su actividad antimicrobiana.

## **CAPITULO II**

### **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias y los hongos patógenos representan un desafío serio para la farmacología actual, pues así lo evidencian los millones de muertes prematuras que causan en el mundo.<sup>1</sup> El fácil acceso y el uso inapropiado de fármacos para combatir las infecciones causadas por microorganismos patógenos promueve la autoprescripción, lo que facilita la selección, persistencia y diseminación de microorganismos resistentes.<sup>2</sup> Este rápido desarrollo de la resistencia antibiótica por muchos patógenos y la toxicidad de algunos de los antibióticos actualmente usados propician la búsqueda y el desarrollo constante de nuevos agentes antimicrobianos.<sup>3</sup>

La mayoría de estas sustancias con actividad antimicrobiana son producidas especialmente por hongos, bacterias, y actinobacterias.<sup>4</sup> El orden Actinomycetal comprende 63 géneros y representa un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia por sus propiedades fisiológicas.<sup>5</sup>

En la actualidad las actinobacterias llamados también actinomicetos se encuentran incluidas en el dominio bacteria debido a varias razones: la pared celular está compuesta por péptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos “0.5 a 2.0um” y la disposición de su material genético es típicamente procariótica. Se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citocina en su ADN (51-78% (51-78% G+C)).<sup>6</sup> Constituyen un particular grupo de bacterias filamentosas gram positivas que se

---

<sup>1</sup> WHO. World Health Organization, Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2002. Available from URL: [http://www.who.int/emc/amr\\_interventions.htm](http://www.who.int/emc/amr_interventions.htm).

<sup>2</sup> Kunin, C Resistance to antimicrobial drugs a worldwide calamity. *Ann Int Med.* 1993, 118, 557-611

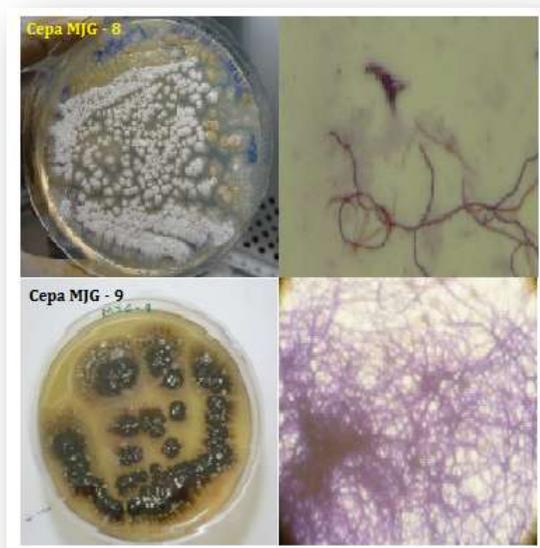
<sup>3</sup> Leiva, S.; Yañez, M.; Zaror, L.; Rodríguez, H.; García Quintana, H Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. *Rev. Med.* 2004, 132, 151-159.

<sup>4</sup> Lazzarini, A.; Cavaletti, L.; Toppo, G.; Marinelli, F Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000, 78, 399-405.

<sup>5</sup> Ghanem, N.; Sabry, S.; El Sherif Z.; Gehan A Isolation and enumeration of marine Actinomycetes from sea water and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2000, 46, 05-111.

<sup>6</sup> Sylvia D Principles and applications of soil microbiology, Pearson /Prentice Hall, Segunda Edición: New Jersey, 2005, 259-306.

distinguen por su capacidad de formar filamentos ramificados y presentar un olor típico a “tierra húmeda” por la producción de Geosmina la cual se percibe de manera indistinta en los actinobacterias de origen terrestre y marinos.<sup>7</sup> Adicionalmente, presentan una actividad metabólica alta, son los principales productores de metabolitos secundarios con propiedades biológicas tales como antimicrobianos, antivirales, anticancerígenos, anticoagulantes, inmunomoduladores, entre otros.<sup>8 9 10</sup>



**Figura 1.- Morfología microscópica y macroscópica de las actinobacterias en estudio**  
Elaboración: Las Autoras

Los metabolitos secundarios producidos por las bacterias son moléculas relativamente pequeñas generadas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular a diferencia de los metabolitos primarios como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos que son esenciales para su supervivencia. Estos metabolitos secundarios, en contraste a la naturaleza general de los

---

7 Zaitlin, B.; Watson, S.; Ridal, J.; Satchwill, T.; Parkinson, D Actinomycetes in Lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. Journal. AWWA. 2003, 95, 113-118.

8 Bull, A.; Ward A.; Good fellow, M Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. Rev. Microbiol. Mol. Biol. 2000, 64, 573-606.

9 Mincer, T.; Jensen, P.; Kauffman C.; Fenical W Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Appl. Envirom. Microbiol. 2002, 68, 5005-5011.

10 Kokare, C.; Mahadik, K.; Kadam S.; Chopade. B Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). J. Mar. Sc. 2004, 248-256.

metabolitos primarios, constituyen estructuras químicas muy diferentes producidas en la fase estacionaria.<sup>11</sup>

Tradicionalmente, las actinobacterias fueron aisladas de fuentes terrestres y sólo en las dos últimas décadas llegó a ser evidente el potencial de microorganismos marinos como productores de antibióticos con estructuras únicas y características muy propias del ambiente marino.<sup>12</sup> Actualmente, se considera que el estudio de los metabolitos bioactivos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos es una rica fuente para el descubrimiento de nuevas drogas: la lista de compuestos obtenidos incluyen antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres.<sup>8 9 10</sup>

Los sedimentos marinos como fuente de actinomicetos bioactivos fue uno de los recursos menos explorados hasta hace poco, pero hoy en día constituye una de las fuentes más promisorias.<sup>13</sup>

Los países Andinos como Colombia, Ecuador y Venezuela muestran una alta diversidad de tipos de hábitats, especies marinas y costeras.<sup>14</sup> La superficie litoral de nuestro país es extensa y diversificada con una microbiota poco o nada estudiada, esto motiva a la búsqueda de nuevas cepas en estas fuentes inexploradas debido a que los ecosistemas marinos difieren notablemente de los terrestres, y por lo tanto las capacidades metabólicas y fisiológicas de las actinobacterias marinas son también diferentes, lo que ofrece un enorme potencial en el descubrimiento de nuevas drogas, las cuales se espera que actúen contra diversas bacterias y hongos.

---

11 Mateos, P., Producción industrial de metabolitos secundarios, 2006. Sitio web <http://darwin.usal.es/profesores/pfmg/sefin/MI/tema08MI.html>

12 Maldonado, L.; Stach, J.; Pathom-aree, W.; Ward A.; Bull A.; Goodfellow. M Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005, 87, 11-8.

8 Bull, A.; Ward A.; Good fellow, M Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Rev. Microbiol. Mol. Biol.* 2000, 64, 573-606.

9 Mincer, T.; Jensen, P.; Kauffman C.; Fenical W Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 5005-5011.

10 Kokare, C.; Mahadik, K.; Kadam S.; Chopade. B Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *J. Mar. Sc.* 2004, 248-256.

13 Fenical, W.; Jensen, P. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol.* 2006, 2, 666-73.

14 Majluf, P "Los Ecosistemas Marinos Y Costeros". "Proyecto Estrategia Regional D Biodiversidad Para Los Países Del Tropic Andino" Convenio De Cooperación Técnica No Reembolsable Atn/Jf-5887/Rg Can-Bid. Perú. 2002.

Por ello desde el área de Bioensayos del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, se ha realizado el proyecto “Aislamiento de metabolitos bioactivos de procesos fermentativos de actinobacterias recolectadas en ecosistemas marinos”.

La presente investigación comprende la selección del medio fermentativo ideal para la producción de los metabolitos y la determinación de la actividad antimicrobiana. Para lo cual se emplearon 2 cepas de actinobacterias aisladas, procedentes de sedimentos marinos de Jambelí que demostraron tener actividad biológica moderada durante la realización del proyecto “Aislamiento e identificación de bacterias del orden actinomicetales como fuente para la obtención de compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica” conducido por el Bioq. Luis Cartuche y que se encuentran como reserva criogénica a - 80°C en el Laboratorio de Bioensayo del Instituto de Química Aplicada. Las cepas seleccionadas están etiquetadas como MGJ-8 y MGJ-9 (nomenclatura interna del laboratorio).

La determinación de su actividad se llevó a cabo mediante pruebas in vitro de susceptibilidad antimicrobiana tales como Difusión en Agar, Inhibición de Crecimiento Radial, Microdilución en caldo y Bioautografía.

## **2.2. ANTECEDENTES**

En el transcurso de los últimos veinte años el mar se ha convertido en la principal fuente natural de moléculas bioactivas, ello resulta lógico si consideramos que su extensión abarca el 70% de la superficie del mundo, agréguese otro factor de interés: el 1,8 por ciento de los extractos marinos muestran actividad en ensayos in vitro; ese valor baja al 0,4 por ciento en los extractos terrestres.<sup>15</sup>

Aunque el descubrimiento de fármacos naturales del mundo oceánico data desde 1970, en los últimos años las investigaciones se vieron incrementadas por la necesidad de desarrollar fármacos activos contra el número cada vez mayor de patógenos resistentes.<sup>16</sup> Actualmente, muchos científicos se han centrado en programas de búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen actinomicetal, por su prolífica producción de antibióticos naturales.<sup>17</sup> Se ha evidenciado que muchos de ellos son productores de metabolitos con actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, antitumoral, citotóxica, etc; cuyas estructuras químicas son únicas.<sup>18</sup>

De los trabajos de investigación referidos al aislamiento de actinomicetos marinos bioactivos se pueden mencionar los realizados por Leiva *et al.*<sup>3</sup>, en su proyecto denominado “Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile” en la que se obtuvieron varias cepas que inhibieron un amplio espectro de bacterias patógenas, como la cepa LRI 4<sup>a</sup> (*Streptomyces* sp) que inhibe el *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y 4 hongos filamentosos.

En otro estudio realizado en la Universidad Nacional de San Marcos por León *et al.*<sup>19</sup>, se aislaron 62 actinomicetos provenientes de sedimentos marinos en la Bahía de Ancón

---

<sup>15</sup> Jiménez, J.; Marfil, M.; Francesch, A.; Cuevas, C.; Alvarez, M.; Albericio, F Productos naturales de origen marino, Investigación y Ciencia. 2007.

<sup>16</sup> Fenical, W., Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Rev Chem.1997, 93, 1673-83.

<sup>17</sup> Oskay, M.; Tamer, A.; Azeri, C Antibacterial activity of semeactinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African J. Biotechnol. 2004, 3, 441-6

<sup>18</sup> Prashith, K.; Shobba, K.; Onkarappa, R Fascinating diversity and potent biological activities of actinomycetes metabolites. J. Pharmacy Res. 2010, 3, 250-6.

<sup>3</sup> Leiva, S.; Yañez, M.; Zaror, L.; Rodríguez, H.; García Quintana, H Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. Rev. Med. 2004, 132, 151-159.

<sup>19</sup> León, J.; Liza, L.; Soto, I.; Cuadra, L.; Patiño, L.; Zerpa, R Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Rev. Perú. biol. 2007, 14, 259-270.

(Lima-Perú), los cuales mostraron una interesante actividad frente a bacterias y hongos patógenos, y actualmente León *et al.*<sup>20</sup>, han determinado el potencial antimicrobiano de actinomicetos marinos frente a dos cepas patógenas multidrogo-resistentes : *S. aureus* y *E. faecalis*, siendo M10-77 la cepa de actinomiceto de mayor actividad antibiótica frente a *S. aureus* resistente a meticilina y *E. faecalis* resistente a vancomicina.

Otros trabajos de investigación como los realizados por De la Rosa García *et al.*<sup>21</sup>; y Evangelista *et al.*<sup>22</sup>; destacan la importancia de los actinomicetos marinos como fuentes productoras de metabolitos secundarios farmacológicamente útiles.

En este sentido, Baltz *et al.*<sup>23</sup>, señalan que los actinomicetos son ampliamente reconocidos por la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios bioactivos.

No se conoce hasta el momento ningún estudio realizado en el Ecuador sobre el aislamiento de metabolitos bioactivos a partir de actinobacterias marinas.

Con esta investigación se pretende contribuir a la búsqueda de metabolitos secundarios biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de importancia en la industria farmacológica.

---

<sup>20</sup> León, J.; Aponte, J.; Rojas, R.; Cuadra, L.; Ayala, N.; Tomás, G.; Guerrero, M Estudio de Actinomicetos Marinos Aislados de la Costa Central del Perú y su Actividad Antibacteriana frente A *Staphylococcus Aureus* Meticilina Resistentes Y *Enterococcus Faecalis* Vancomicina Resistentes. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2011., 28, 237-46.

<sup>21</sup> De la Rosa García, S.; Gamboa, M Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. Ciencia Ergo Sum. 2003. vol.11, número 002, pp.186-190.

<sup>22</sup> Evangelista, Z.; Moreno, A; Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Bio Tecnología, 2007, Vol.11.

<sup>23</sup> Baltz, R.; Hosted, T Molecular genetic methods for improving secondary metabolite production in actinomycetes. Tib Tech. 1996, 14, 245-250.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. CEPAS DE ACTINOBACTERIAS

Las cepas utilizadas en este estudio fueron previamente aisladas de sedimentos marinos colectados en el Manglar de Jambelí a profundidades de 1 a 3 m por medio del dispositivo “Universal core head sampler”. Se encuentran etiquetadas como MGJ-8 y MGJ-9 en reserva criogénica a - 80°C en el Laboratorio de Bioensayo del Instituto de Química Aplicada, de la Universidad Técnica Particular de Loja y se seleccionaron por demostrar actividad biológica moderada frente a hongos dermatofitos, según se describe en un trabajo previo realizado en el Instituto.<sup>24</sup>

#### 3.2. MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE PRUEBA

Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizaron cinco bacterias Gram negativas: *Proteus vulgaris* (Pv) ATCC® 8427, *Escherichia coli* (Ec) ATCC® 25922, *Klebsiella pneumoniae* (Kp) ATCC® 9997, *Pseudomona aeruginosa* (Pa) ATCC® 27853, y *Salmonella typhimurium* (Wt) LT2; dos cepas Gram positivas: *Stafilococcus aureus* (Sa) ATCC® 25923, *Enterococcus faecalis* (Ef) ATCC®. Y en la evaluación antifúngica se emplearon dos hongos dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* (Tr) ATCC® 28188 además de *Aspergillus niger* (An) ATCC® 9642-U, que están almacenadas como crio-reservas a -80°C en el Instituto de Química Aplicada de la UTPL.

#### 3.3. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE ESTUDIO

Las cepas MJG-8 y MJG-9 fueron reactivadas respectivamente en: **Medio CTG** Caldo Tripticasa +Glucosa) y **Medio A1** (Almidón + Extracto de Levadura + peptona +CaCO<sub>3</sub>) al

---

<sup>24</sup> Cartuche, L.; Abad, X Aislamiento y determinación de la actividad antimicrobiana de actinomicetos provenientes de ecosistemas lacustres y marinos. Programa de Investigación: Inventario de Biodiversidad y su Aprovechamiento Sustentable Incluyendo Biotecnología.UTPL.2009.

75% de agua de mar artificial (**sw**). La composición porcentual de los medios y del agua de mar se encuentran detalladas en el ANEXO 1. Una vez reactivadas fueron cultivadas en medio agar CTG y A1 para su conservación y utilización posterior. ( ver ANEXO 2).

### **3.4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y FERMENTACIÓN**

#### **3.4.1. Determinación del medio de fermentación más productivo**

Discos de agar con crecimiento de las cepas MJG8 y MJG9 en estudio, se inocularon y homogenizaron en 50mL de los medios de producción A1 y CTG (75% sw) con pH inicial de 7.0 y luego se cultivaron bajo constante agitación de 200 rpm a 30 °C durante 7 días.

Posteriormente los caldos se trataron con Acetato de Etilo (v/v), se agitaron por una hora y luego se colocaron en decantadores dejando reposar por 24 horas. La fase orgánica (Fase de Acetato de Etilo) fue separada y luego evaporada en un rotaevaporador Heidolph Laborata 40002 hasta obtener un extracto totalmente seco en el que se determinó el peso final como el rendimiento de biomasa, paralelo a esto se realizó cromatografía en capa fina (CCF), método que permitió separar los compuestos presentes en los medios de fermentación procesados y comparar la producción metabólica para elegir el tipo de medio adecuado para el escalado y obtención de los extractos finales.<sup>25</sup>

#### **3.4.2. ESCALADO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN**

Una vez determinado el medio más adecuado para una mayor producción de biomasa se procedió a sembrar en el medio específico para cada bacteria al 75% de sw. La fermentación se llevó a cabo en fermentadores de 2.8 L con un volumen de medio de producción efectivo de 1 L reproduciendo las condiciones de agitación, pH, temperatura y tiempo antes descritos en el apartado 3.4.1, con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa. Se cultivaron tantos litros como biomasa necesaria a coleccionar para obtener una cantidad representativa de extracto.

---

<sup>25</sup> Dickson T.R. Introducción a la química, Edit Publicaciones cultural 16ª ed México 1999 pp. 259

## **3.5. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS**

### **3.5.1. Obtención del Extracto Crudo**

Concluido el tiempo de fermentación se adicionó 5g de Amberlite XAD-7 SIGMA (Resina) por litro de medio producido para la adsorción de los compuestos presentes en el medio líquido.<sup>26</sup> Inmediatamente se agitó durante 3h a 200 rpm. Posteriormente, se filtró el medio de manera que la resina y la biomasa microbiana sean retenidas y el medio líquido descartado. El residuo resultante se devolvió al frasco fermentador para la extracción de metabolitos.

Para la utilización de la resina adsorbente previo a la extracción ésta fue lavada repetidamente con metanol (20 minutos en reposo) y purificada con Agua destilada.

El residuo de la biomasa y la resina obtenidas en el proceso de filtración se extrajeron con acetato de etilo en un volumen aproximado de 1000 ml por frasco y se dejó en agitación hasta el día siguiente. Se filtró con adición de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en cantidad suficiente para retener residuos de agua y se procedió a concentrar el líquido resultante a presión reducida y  $30^\circ\text{C}$  en rotaevaporador, hasta lograr sequedad del extracto.

### **3.5.2. Fraccionamiento de los extractos crudos**

Los extractos fueron sometidos a fraccionamiento mediante cromatografía en columna en sílica gel 60 (Merck), este método permite separar mezclas o purificar sustancias de distinta polaridad que tienen diferente grado de elución.<sup>27</sup>

#### **3.5.2.1. Fraccionamiento del extracto crudo MJG-8**

El extracto crudo MJG-8 se fraccionó por cromatografía en columna con sílica gel 60 (Merck). Se utilizaron 3g del extracto y 30g de sílica gel en una relación muestra-sílica gel

---

<sup>26</sup> Martínez, A. Estudio de adsorción de Boro con Amberlite IRA 743. Ingeniería Técnica Industrial. Universidad Politécnica de Catalunya. 2011. Sitio web [http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/12077/1/Memoria\\_72976.pdf](http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/12077/1/Memoria_72976.pdf)

<sup>27</sup> Roberts, R.; Gilbert, J.; Rodewald, L. Modern Experimental Organic Chemistry. Holt Rinehart and Winston. Third Edition. 1979.

de 1:10. Se emplearon como eluyentes Hexano (Hex), Acetato de etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH) en diferentes proporciones. A las fracciones se les aplicó cromatografía en capa fina (CCF) en placas de 6cm de largo por 1cm de ancho en fase móvil emulsión (AcOEt - MeOH-Agua) en proporciones 8:1:1 para determinar el grado de pureza de las fracciones obtenidas.

### **3.5.2.2. Fraccionamiento del extracto crudo MJG-9**

El extracto crudo MJG-9 se fraccionó por cromatografía de columna con sílica gel 60 (Merck). Se utilizaron 0.8g del extracto y 20g de sílica gel en una relación muestra-sílica gel de 1:20. Se emplearon como eluyentes Hexano (Hex), Acetato de etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH) en diferentes proporciones. A las fracciones se les aplicó cromatografía en capa fina (CCF) en placas de 6cm de largo por 1cm de ancho en fase móvil emulsión (AcOEt-MeOH-Agua) en proporciones 8:1:1 para determinar el grado de pureza de las fracciones obtenidas.

### **3.5.3. Análisis de las fracciones obtenidas**

La identificación de las diferentes fracciones se llevó a cabo por los siguientes métodos:

*Factor de Retención (Rf)*: se define como la relación entre la distancia que recorre una sustancia y la que recorre la fase móvil.<sup>27</sup> Se determinó en placas de sílica gel, corridas en fase emulsión y posterior visualización con luz UV 254-366nm. Además se revelaron con vainillina.

*Punto de Fusión*: el punto de fusión es la temperatura a la cual una sustancia se convierte en un líquido, frecuentemente es utilizado como criterio de pureza.<sup>28</sup> Se realizó en el equipo Fisher-Johns Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60 Hz.

## **3.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permiten medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a sustancias con posible potencial antimicrobiano.<sup>29</sup>

---

<sup>28</sup> Russo, T.; Meszaros, M *Orgánica en viales*, Flinn Scientific, INC.: Batavia, 1988, 26:27.

### **3.6.1. Determinación antimicrobiana de los extractos crudos**

Para determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos se realizó las pruebas de susceptibilidad microbiana conocidas como Difusión en Placa y Microdilución en Caldo. Para ello se preparó una disolución de 20mg de extracto crudo en 1mL de Dimetil sulfóxido (DMSO) que se empleó en los métodos antes mencionados. Adicionalmente se realizó el método de Inhibición de Crecimiento Radial para evaluar la susceptibilidad de *Aspergillus Niger* (An) frente a los extractos crudos.

#### **3.6.1.1. Método de Difusión en Agar**

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*<sup>30</sup>, (método de Kirby-Bauer), la cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento antimicrobiano mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición, en este caso se empleó el método de difusión modificado para productos naturales (agar well-diffusion).

##### **a) Preparación del cultivo bacteriano (Cultivo Overnight)**

Para la preparación de los inóculos bacterianos se realizaron cultivos en caldos nutritivos específicos para cada cepa las cuales se encuentran en reserva a -80°C, siguiendo las pautas indicadas en la Tabla 1.

---

<sup>29</sup> Roth, B.; Poot, M.; Yue, S.; Millard, P. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. *App Environm Microbiol.* 1997, 63:2421-31.

<sup>30</sup> Bauer, A.; Kirby, W. ; Sherris, I.; Turk, M Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966. 45, 493-496.

Tabla 1.- Microorganismos utilizados en las pruebas y sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO*	Condiciones de Incubación
<b>Bacterias Gram Negativas</b>		
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Caldo Triptisoya (Bacto™)	37°C por 14-16 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 horas
<i>Escherichia Coli</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton (Difco)	37°C por 14-16 horas
<i>Salmonella Tiphymurium</i>	Caldo Oxoid No 2 (Oxoid)	37°C por 14-16 horas
<b>Bacterias Gram Positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón (Bacto™)	37°C por 14-16 horas

Fuente:\* American Type Culture Collection (ATCC)

Elaboración: Las Autoras

## b) Procedimiento

Se rotulan las cajas petri con el nombre de cada bacteria a utilizar, se adicionan 100µL del cultivo bacteriano en el centro de la placa que tiene una concentración final alrededor de  $1 \times 10^7$  UFC/mL y se hace un vertido de 25mL de agar Muller Hinton sobre ella, luego se homogeniza y se deja solidificar bajo corriente de flujo. A continuación se realizan 4 pocillos de 5mm con un tubo estéril en la placa y se extraen los discos con las micro-espátulas para que de esta manera quede el pocillo con un diámetro de 5mm y listo para colocar el extracto, posteriormente se colocan 25µL de la disolución del extracto preparado.

Para lograr una mayor difusión de los extractos se deja reposar por unos minutos a temperatura ambiente, se sella con parafilm y se incuban las placas de forma invertida a 37°C por un periodo de 24h. Después de retirar las placas de la incubadora, se procede a medir los halos de inhibición tanto del control como de los extractos.

**Controles positivos:** se emplean con el fin de respaldar la efectividad del método, para ello se utilizan discos de sensibilidad específicos para cada microorganismo como Gentamicina 10µg en *Pa*, *Kp*, *Ec*, *Pv*, *Sa* y Ampicilina 8µg en *Ef* y *Wt* colocados en el pocillo central de la placa respectiva. Se emplea una caja de control por microorganismo.

### c) Interpretación de Resultados

La presencia de una zona clara de inhibición alrededor del depósito del extracto es indicativo de su actividad y la NO actividad con la ausencia. Se hizo una lectura visual empleando un calibrador para medir los halos de inhibición en mm (milímetros). El tamaño de la zona de inhibición se tomó como valor promedio de todas las mediciones efectuadas en cada placa para cada microorganismo probado.<sup>31</sup>

#### 3.6.1.2. Método de Microdilución en Caldo

Es un método de cultivo líquido al cual se le agrega un estándar bacteriano o fúngico y es inoculado dentro de los pocillos de una microplaca (llamada TC<sub>96</sub>, porque contiene 96 pocillos) que contienen diferentes diluciones del extracto a ensayar para tener concentraciones decrecientes inhibitorias en caldo. Este método define la menor concentración del extracto necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba.<sup>32</sup>

Se realizó la metodología según Peoples *et al.*<sup>33</sup>, con las bacterias que resultaron sensibles al método anterior así como también con los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

---

<sup>31</sup> Normas CLSI-NCCLS. Tabla de Interpretación de los Resultados Métodos de Difusión en Agar.2005

<sup>32</sup> Pellecuer, S; et al. 1976. Huiles Essentielles Bactericides et Fungicides. Revue de L Institute Pasteur de Lyon. 9;135-159.

<sup>33</sup> Peoples, A.; Zhang,Q.; Millet, W.;Rothfeder, M,;Pescatore, B.; Madden, A Neocitreamicins I and II, Novel Antibiotics with activity Againsts Meticillin Resistant Staphylococcus aureus and Vancomycin-Resistant Enterococci. J. Antibiot (Tokyo). 2008, 61, 7,457-63

## **a) Preparación de la suspensión de los inóculos**

### **Bacterias**

Se preparó un cultivo overnight ya descrito anteriormente. De este cultivo se tomó 150-300µL en 7mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, de esta suspensión tomamos 140µL e inoculamos en 7 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de  $2 \times 10^6$  UFC/mL. De esta suspensión se tomó 100 µL para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### **Hongos Dermatofitos**

Se prepara la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C a una concentración definida en 7ml de Caldo Sabouroud. De esta suspensión se usan 100 µL para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a  $5 \times 10^4$  esporas/mL.

## **b) Procedimiento**

El ensayo se realizó sobre microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente modo: colocamos 180µL de caldo Muller Hinton o Caldo Sabouroud según corresponda al primer pocillo y 100 µL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20µL de la disolución del extracto a probar en el primer pocillo, después se realizan diluciones seriadas tomando 100µL del primer pocillo y diluyendo con 100µL del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180µL caldo + 20 µL extracto) control negativo (180µL caldo + 20µL DMSO) como para el control positivo (180µL caldo + 20µL Gentamicina® o Itraconazol). Se sella las placas e incubamos a 37°C por un período de 18-24 horas (bacterias) y a 28°C durante 96 horas (dermatofitos). Como se ve en la Figura 2.

	EXTRACTO 1				EXTRACTO 2				CONTROLES DMSO (C11), ANTIBIOTICO (C12)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000											
B	500											
C	250											
D	125											
E	62.5											
F	31.25											
G	15.625											
H	7.8125											

Figura 2.- Ilustración de la microplaca TC<sub>96</sub> hecha con 12 columnas y 8 filas (A –H), con las concentraciones del extracto en µg/ml.  
Elaboración: Las Autoras

### c) Interpretación de Resultados

La lectura se realiza de manera visual e indica la Concentración Mínima Inhibitoria es decir a que concentración el extracto inhibe de manera visible el crecimiento bacteriano o fúngico.<sup>34</sup>

Sin embargo, Pandey *et al.*<sup>35</sup>, señalan que la CMI no es una constante para un agente determinado ya que está influenciada por varios factores, por lo cual se procede a agregar MTT 3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-bromuro difeniltetrazolio al pocillo donde se presume ver el crecimiento y luego se incubaba de 10 a 30 minutos. El crecimiento es indicado porque el MTT se reduce a púrpura (sal de formazán) por acción enzimática de las células vivas.<sup>36</sup>

#### 3.6.1.3. Inhibición del Crecimiento Radial (ICR)

Este método emplea el procedimiento de Macrodilución en Agar que consiste en una dilución del extracto con el medio agarizado. Si el extracto es efectivo contra el microorganismo probado disminuirá el crecimiento micelial del hongo.

<sup>34</sup> Cos, P.; Arnold, J.; Vanden, D.; Louis, M Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *J Ethnopharmacology*. 2006, 106, 290-302.

<sup>35</sup> Pandey, B.; Ghimire, P.; Agrawal, V Studies on the antibacterial activity of actinomycetes isolated from the Khumbu region of Mt. Everest. *Int Confer Great Himalayas*. Kathmandu University, Canada. 2004, 12-5.

<sup>36</sup> Mosmann, T "ensayo colorimétrico rápido para el crecimiento celular y la supervivencia: la aplicación de los ensayos de proliferación y citotoxicidad". *Diario de métodos inmunológicos*. 1983, 65, 1-2

### **a) Preparación de los Extractos**

Se preparó una disolución de 100mg de cada extracto crudo en 500µL de DMSO y a partir de esta se realizó dos diluciones 1:10 y 1:100 obteniendo tres concentraciones: 1000ppm, 100ppm y 10ppm respectivamente.

### **b) Preparación del Inóculo**

Para la preparación del inóculo fúngico se tomó 50µL de la cepa *A. niger*, se sembró en el centro de las cajas petri de 50 a 60mm de diámetro e inmediatamente se adicionó 10mL de Agar Sabouraud; dejamos solidificar e incubamos a 28°C durante 24-48 horas.

### **c) Procedimiento**

Se rotulan las cajas petri de 50 a 60mm de diámetro con la concentración correspondiente a cada dilución del extracto (1000ppm, 100ppm y 10ppm), luego se colocan 50 µL de cada dilución en el centro de las cajas y sobre este se vierte 10 ml de agar Sabouraud, se homogeniza y se deja solidificar bajo corriente de flujo. Posteriormente se realiza un pocillo de 10mm de diámetro con un tubo estéril en el centro de la placa y se extrae el disco con una micro-espátula para que de esta manera quede el pocillo vacío con un diámetro de 10mm, que luego será llenado con un disco del inóculo extraído bajo el mismo procedimiento y de igual medida. Se sellan las placas e incubamos invertidas a 28°C y se monitorea el crecimiento cada 24 horas por un período máximo de 3 días. La prueba se realiza por triplicado.

**Controles:** Como testigo negativo empleamos una solución de 50 µL de DMSO en 10mL de Agar y como testigo positivo una solución de 50 µL de Itraconazol (1mg/ml) en 10 ml de Agar.

### **d) Interpretación de Resultados**

En la prueba de Inhibición del Crecimiento Radial se medirá el diámetro (mm) de la zona de crecimiento del hongo a intervalos de 24 horas por un período máximo de 3 días.

### **3.6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de las Fracciones**

Se emplearon los métodos de Bioautografía y Microdilución en Caldo para evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones y subfracciones obtenidas de la Cromatografía en Columna realizada a cada extracto.

#### **3.6.2.1. Bioautografía**

La Bioautografía resulta ser una técnica fundamental que determina con exactitud y precisión la sustancia o sustancias responsables de la actividad antimicrobiana en una mezcla compleja, previamente optimizado su perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina.<sup>37</sup>

##### **a) Preparación de los Bioautogramas**

Las subfracciones fueron sometidas a Cromatografía de Capa Fina utilizando placas de sílica gel 60 F 254 (Merck) de 1x6cm, tomando para la siembra una alícuota de 10 ul de la subfracción disuelta en un solvente orgánico (2mg/100uL). La separación de los compuestos se llevó a cabo usando como fase móvil la emulsión que permite una mejor separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se realizó en UV 254nm - 366nm y como controles se emplearon placas reveladas para identificar los compuestos y adicionalmente medir el valor de Rf.

##### **b) Procedimiento**

Se realizó una siembra de los microorganismos a partir de la reserva criogénica en caldo Muller Hinton para las bacterias (cultivo overnight) y en caldo Sabouraud para los dermatofitos.

A partir de este cultivo se siembran 10µL por cada 2.5 mL de medio agarizado para obtener una concentración aproximada de  $2.5 \times 10^5$  UFC/mL en bacterias y  $2.5 \times 10^4$  esporas/ml en hongos. Se distribuye 1ml de este medio de cultivo ya inoculado sobre los cromatogramas desarrollados previamente formando una película de aproximadamente 1mm de espesor. Se deja solidificar, se sella e

---

<sup>37</sup> Botz, L.; Nagy, S.; Kocsis, B Detection of Microbiologically Active Compounds. Planar Chromatography. Hungary. 2001, 489-516.

incuba a las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo correspondiente.

Luego se procede a la tinción con MTT; nuevamente se incuba para el desarrollo de las zonas de inhibición.

### **c) Interpretación de Resultados**

Se identificarán cada uno de los compuestos presentes en el bioautograma mediante su respectivo valor de  $R_f$  y se determinará la actividad antimicrobiana en base a la presencia de una zona de inhibición alrededor del compuesto bioactivo, manifestado como ausencia de coloración en la zona de inhibición sobre un fondo coloreado luego de colocar MTT.<sup>38</sup>

#### **3.6.2.2. Microdilución en Caldo**

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de las subfracciones se preparó una disolución de 2mg de la subfracción en 100 $\mu$ L de DMSO siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.6.1.2. para hongos dermatofitos.

---

<sup>38</sup> Choma, I. The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe 2005.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

## 4. RESULTADOS Y ANALISIS

En esta investigación los resultados muestran a los medios fermentativos más favorables para la mayor producción de metabolitos bioactivos procedentes de actinobacterias marinas, como también la evaluación antimicrobiana cualitativa y cuantitativa de los extractos y fracciones mediante pruebas como Difusión en Placa, Microdilución en Caldo y Bioautografía.

### 4.1 DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN MÁS PRODUCTIVO

#### 4.1.1. Medio Fermentativo para Cepa MJG-8

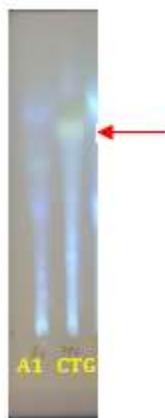
Transcurrido 7 días de incubación y con pH final de 9.0 se obtuvo un mayor rendimiento de biomasa en 50 mL del medio CTG 75% sw correspondiente a 0.0347g, valor sobresaliente en comparación con el medio A1 observados en la Tabla 2.

**Tabla 2.- Rendimiento de los medios de fermentación para la cepa de actinobacteria MJG-8**

Medio Fermentativo	Rendimiento g/ 50 ml
Medio CTG 75% sw	<u>0.0347 g</u>
Medio A1 75% sw	0.0173g

Elaboración: Las Autoras

Los compuestos presentes en los medios de fermentación en estudio fueron separados mediante cromatografía en capa fina (TLC), y se visualiza en la Figura 2.



**Figura 2.- Cromatografía de Capa Fina (Compuestos presentes en los medios para la cepa de actinobacteria MJG-8)**  
Elaboración: Las Autoras

El medio de fermentación que evidenció un mayor crecimiento de las actinobacterias fue el medio CTG 75% sw en comparación con el medio A1 75% sw que mostró un crecimiento mínimo. Sin embargo al realizar la CCF pudimos descubrir que ambos medios presentaron compuestos pero con mayor intensidad para el medio CTG 75% sw.

Sinclair C. et al.<sup>39</sup>, mencionan que los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química, los cuales deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y suministro de energía para la síntesis de los metabolitos. De acuerdo a esta afirmación el medio CTG 75% sw suministró los componentes necesarios para el crecimiento de la cepa MJG-8 e incentivó la generación de sus metabolitos, debido posiblemente a su composición rica en fuentes de Nitrógeno necesarios para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y aminoácidos, y también a la presencia de glucosa la cual es la materia prima para la obtención de energía en el proceso metabólico de microorganismos, al ser este un carbohidrato simple se encuentra fácilmente disponible para el uso de la bacteria a diferencia del Almidón presente en el medio A1 que es un carbohidrato complejo y requiere de procesos enzimáticos de desdoblamiento previo a su asimilación.<sup>40</sup> Por otra parte De Baets *et al.*<sup>41</sup>, indican que la glucosa posiblemente se agota provocando estrés a la cepa hacia el final de la tropofase dando lugar al metabolismo secundario que se origina al finalizar la etapa de crecimiento.

#### 4.1.2 Medio Fermentativo para Cepa MJG-9

El medio A1 75% sw con pH final de 9.0 generó mayor rendimiento de biomasa en contraste con el medio CTG 75% sw que estuvieron bajo las mismas condiciones. Los datos comparativos se observan en la Tabla 3.

Tabla3.- Rendimiento de los medios de fermentación para la cepa de actinobacteria MJG-9

Medio Fermentativo	Rendimiento g/ 50 ml
Medio A1 75% sw	0.0255 g
Medio CTG75% sw	0.0194 g

Elaboración: Las Autoras

<sup>39</sup> Sinclair, C.; Kristiansen, B Fermentation kinetics and modeling. Open University Press, 1987.

<sup>40</sup> Parés, R.; Juárez, A Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté S.A., España, 2002.

<sup>41</sup> De Baets, S.; Vandedrinc, S.; Vandamne, E Vitamins and related biofactors, microbial production. Encyclopedia of microbiology. Academic. London. 2000, 4, 837-853

Mediante cromatografía en capa fina se pudo separar los compuestos presentes en los distintos medios de cultivo estudiados A1 y CTG donde se observa que los compuestos del medio A1 75% sw sobresalen en concentración evidenciado en la intensidad de su coloración, Figura 3.



**Figura3.- Cromatografía de Capa Fina (Compuestos presentes en los medios para la cepa de actinobacteria MJG-9)  
Elaboración: Las Autoras**

Estos datos sugieren que el medio A1 75%sw posee nutrientes suficientes para un buen crecimiento y producción de metabolitos de la actinobacteria MJG-9. Uno de los componentes es el almidón que según Demain<sup>42</sup> es una excelente fuente de carbono necesario para la supervivencia de los microorganismos.

Otros componentes del medio fermentativo son las fuentes de nitrógeno de naturaleza orgánica como los hidrolizados de proteínas (Peptonas) que aportan algunas vitaminas, sales inorgánicas como fosfatos y algunos micronutrientes como Ca, Zn, Fe y Cu. Así como también el Extracto de levadura que básicamente es una mezcla de aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en H<sub>2</sub>O y carbohidratos, que en conjunto son necesarias para el crecimiento y producción de metabolitos.<sup>43</sup>

Mateos P.<sup>11</sup>, asegura que cuando el organismo a utilizar es aislado de fuentes naturales, el material de crecimiento debe hacerse teniendo en cuenta que dicho organismo exprese en ese ambiente las propiedades que son de interés. En este caso el porcentaje de Agua

---

<sup>42</sup> Demain, A Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SuttonB (ed) A century of mycology. Cambridge University Press. 1996, 23, 3-254

<sup>43</sup> Leveau, J.; Bouix, M Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial. España. 2000.

<sup>11</sup> Mateos, P., Producción industrial de metabolitos secundarios, 2006. Sitio web <http://darwin.usal.es/profesores/pfmg/sefin/MI/tema08MI.html>.

de mar artificial (75%) empleado en la preparación de los medios mejora la adaptación de la actinobacteria marina durante su crecimiento debido a que posee fuentes minerales. Bentley 1997<sup>44</sup>, indica que la presencia de algunos metales como manganeso, hierro y zinc inducen la producción de metabolitos secundarios en bacterias y hongos.

#### **4.2 EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS DE ACTINOBACTERIAS MJG-8, MJG-9**

Los extractos crudos obtenidos de ambas cepas fueron recolectados con Acetato de Etilo y sus características físico químicas se encuentran en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4.- Características físico químicas del extracto MJG-8**

<b>Extracto crudo de la cepa MJG-8</b>	
<b>Características</b>	
<b>Consistencia:</b> Mezcla Viscosa	
<b>Color:</b> Café Claro	
<b>Rendimiento:</b> 3.47g/5L, 0.07%	
<b>Solubilidad:</b> Acetato de Etilo	

Elaboración: Las Autoras

**Tabla 5.- Características físico químicas del extracto MJG-9**

<b>Extracto crudo de la cepa MJG-9</b>	
<b>Características</b>	
<b>Consistencia:</b> Mezcla Viscosa	
<b>Color:</b> Café Oscuro	
<b>Rendimiento:</b> 3.57g/7L, 0,05%	
<b>Solubilidad:</b> Acetato de Etilo	

Elaboración: Las Autoras

<sup>44</sup> Bentley, R Microbial secondary metabolites play important roles in medicine: prospects to discovery of new drugs. *Perspect Biol Med.* 1997, 40, 364-394.

#### 4.2.1 Actividad Antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos.

##### 4.2.1.1. Actividad Antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos crudos obtenidos frente a *E. faecalis*, *S.aureus*, *P.vulgaris*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.typhimurium*, empleando el método de difusión en placa. Los resultados se observan en la Tabla 6

Tabla 6.- Tamaño del halo de Inhibición en mm de las cepas bacterianas frente a los extractos ensayados mediante el método de difusión en agar.

Bacterias Gram Negativas	Extracto Crudo	Extracto Crudo	Control *
	MJG-8	MJG-9	
<i>P. Vulgaris</i>	8	NA	28 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	8	NA	23 <sup>a</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	12	NA	26 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	22 <sup>a</sup>
<i>S. typhimurium</i>	8	NA	16 <sup>b</sup>
<b>Bacterias Gram Positivas</b>			
<i>S. aureus</i>	10	NA	25 <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i>	9	NA	22 <sup>b</sup>

NA: no activo a la concentración máxima ensayada

a. Control positivo: Gentamicina 1mg/ml

b. Control positivo: Ampicilina 8mg/ml

\* Los diámetros de los halos de inhibición reportados para los controles empleados en esta prueba, están dentro de los márgenes de referencia publicados por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

**Elaboración: Las Autoras**

Estos resultados indican que el extracto crudo MJG-9 no presentó actividad antibacteriana, mientras que el extracto crudo MJG-8 mostró una débil actividad inhibitoria frente a las bacterias testigo principalmente con *K. pneumoniae*, *S.aureus* y *E. faecalis* (Tabla 6, Figura 4). Sin embargo estos resultados no son relevantes ya que según la CLSI 2005<sup>45</sup> se considera sensible la presencia de un halo mayor o igual a 15mm, intermedio con un halo de 13-14mm y resistente cuando el halo es menor o igual a 12mm para *S. aureus* y *K. pneumoniae*, en tanto que para *E. faecalis* se considera sensible cuando presenta un halo mayor o igual a 17mm y resistente cuando presenta un halo menor o

<sup>45</sup> Normas CLSI-NCCLS. Tabla de Interpretación de los Resultados Métodos de Difusión en Agar.2005.

igual a 16mm, por tanto estas bacterias se consideran resistentes frente a los extractos en estudio.

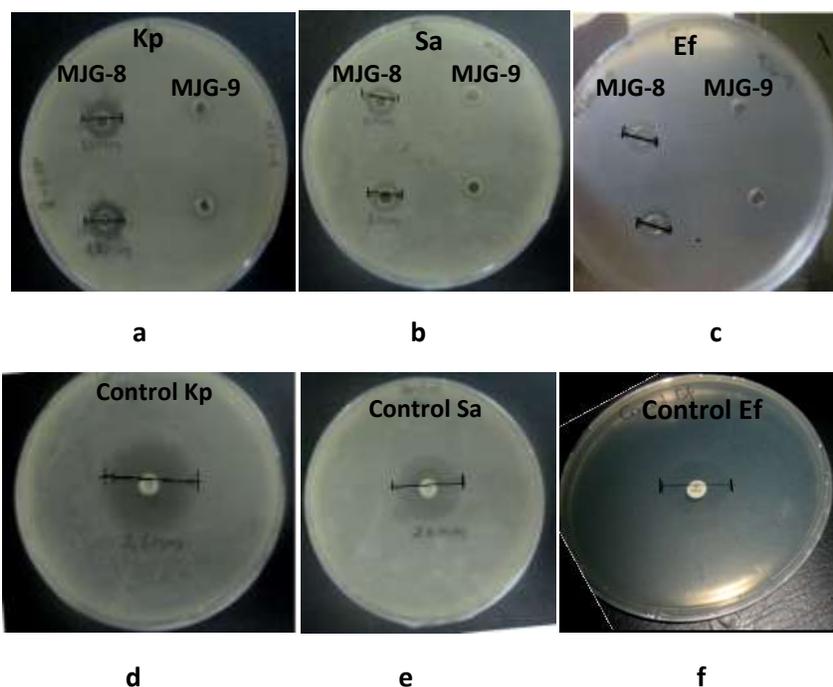


Figura 4.- Resultados del método de Difusión en placa de las cepas bacterianas frente a los extractos crudos ensayados: a) *K. Pneumoniae* b) *S.aureus* c) *E. faecalis* d) Control Gentamicina Kp e) Control Gentamicina Sa f) Control Ampicilina Ef

Elaboración: Las Autoras

Para respaldar los resultados anteriores se procedió a realizar Microdilución en caldo para determinar las concentraciones inhibitorias a las que actúa el extracto crudo MJG-8 frente a dichas bacterias, obteniendo una CMI de 1000ug/ml frente a *S. aureus*, 500ug/ml para *K. pneumoniae* y 1000 ug/ml en *E. Faecalis*. Según los criterios establecidos en el Laboratorio de Productos Naturales “se considera que los extractos poseen actividad relevante y selectiva cuando el valor de CMI está por debajo de 200ug/ml”, y en base a ello se pudo descartar la utilidad eficaz de este extracto como antibacteriano.

#### 4.2.1.2. Actividad Antifúngica

Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 frente a hongos dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, como también frente al hongo *A. niger*.

### a) Microdilución en caldo de los extractos crudos frente a los hongos dermatofitos

Mediante la técnica de Microdilución en caldo se evaluó la actividad antifúngica de los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 frente a los hongos dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7.- Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 ensayados frente a los microorganismos de prueba mediante el Método de Microdilución en caldo.

Hongos Dermatofitos	Extracto Crudo MJG-8	Extracto Crudo MJG-9
<i>T. mentagrophytes</i>	125 ug/ml	250 ug/ml
<i>T. rubrum</i>	250ug/ml	500ug/ml

Elaboración: Las Autoras

Como se puede apreciar en esta tabla, los extractos crudos presentan una actividad antifúngica prometedora, siendo el extracto crudo MJG-8 el de mayor actividad ya que su valor de CMI se encuentra por debajo de 200ug/ml frente a *T. mentagrophytes*. Estos resultados concuerdan con los aportes de Leiva *et al.*<sup>46</sup>, quienes publicaron que 13 cepas de actinomicetos fueron evaluadas contra hongos filamentosos y levaduriformes de las cuales 3 cepas presentaron actividad moderada frente a *T. rubrum* y fuerte antagonismo contra *T. mentagrophytes*. Otros autores como Jiang y Xu<sup>47</sup> en lagos de Yunan en China informaron acerca de la actividad de los actinomicetos en contra de hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*.

León *et al.*<sup>19</sup>, considera que el rendimiento antimicrobiano de los extractos puede variar dependiendo de la naturaleza química del metabolito y la polaridad del solvente utilizado,

<sup>46</sup> Leiva, S.; Yañez, M.; Zaror, L.; Rodríguez, H.; García Quintana, H Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. Rev. Med. 2004, 132, 151-159.

<sup>19</sup> León, J.; Liza, L.; Soto, I.; Cuadra, L.; Patiño, L.; Zepa, R Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Rev. Perú. biol. 2007, 14, 259-270.

<sup>47</sup> Jiang CL, Xu LH. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 249-53.

siendo el acetato de etilo el más recomendado en la literatura, esto concuerda con el comportamiento observado en ambos extractos.

### b) Inhibición del Crecimiento Radial (ICR)

Los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 probados en concentraciones de 1000ppm, 100ppm y 10ppm frente *A.niger* no presentaron actividad inhibitoria observándose un normal crecimiento del hongo en el medio de cultivo, los resultados se muestran en la Figura 5.

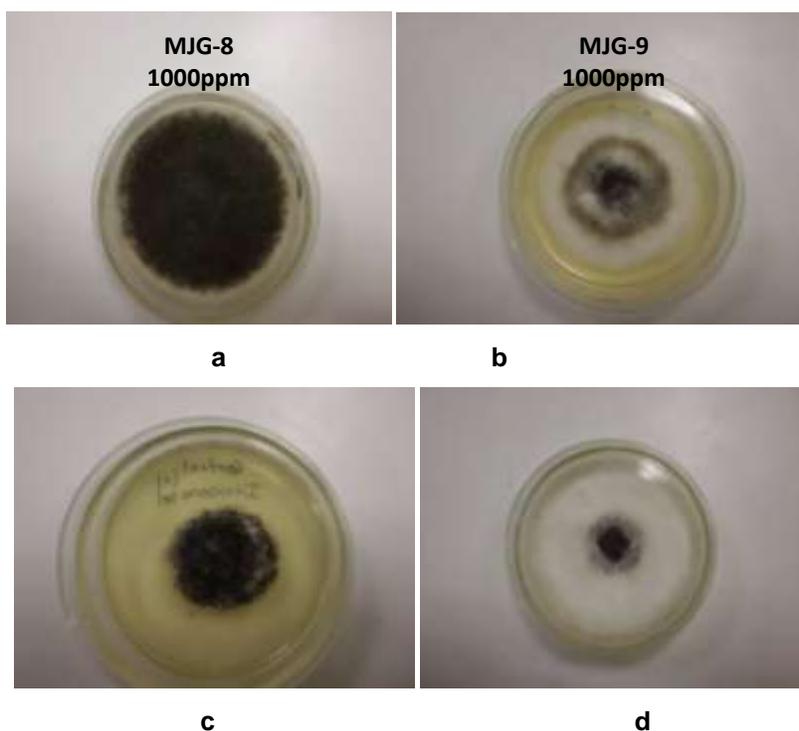


Figura 5.-Resultados del método de ICR de *A.niger* frente a los extractos crudos ensayados a) Extracto crudo MJG-8 b) Extracto crudo MJG-9 c) Control Positivo Itraconazol d) Control Negativo DMSO

Elaboración: Las Autoras

Estos resultados concuerdan con los reportados por León *et al.*<sup>19</sup>, donde mencionan que ningún actinomiceto marino presentó actividad inhibitoria frente a otros hongos miceliales de origen clínico tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, contrario a esto Pisano *et al.*<sup>47</sup>, reportaron que los aislamientos de actinomicetos marinos eran activos

<sup>19</sup> León, J.; Liza, L.; Soto, I.; Cuadra, L.; Patiño, L.; Zerpa, R Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Rev. Perú. biol. 2007, 14, 259-270.

<sup>47</sup> Pisano, M.; Sommer, M.; Taras, L Bioactivity of chitinolytic Actinomycetes of marine origin. Appl Microbiol Biotechnol. 1992, 36, 553-5.

contra levaduras y hongos filamentosos como *A. niger*, atribuyendo la actividad antifúngica principalmente a polienos como heptaenos, iguales resultados fueron reportados por García *et al.*<sup>48</sup>, informando la actividad de actinomicetos en contra de hongos filamentosos como *A. niger*.

#### 4.3 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS MJG-8 y MJG-9

Cada extracto crudo fue sometido a fraccionamiento mediante la técnica de cromatografía en columna, controlando el proceso por CCF para el análisis y selección de las fracciones.

##### 4.3.1. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo MJG-8

A partir de este extracto se obtuvieron 104 fracciones de las cuales se seleccionaron como relevantes en base a la pureza observada en la placa de CCF las subfracciones denominadas Ff9, Ff10, Ff12 y Ff100, cuyas características fisicoquímicas se encuentran en las Tablas 8, 9, 10 y 11.

Tabla 8.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff9

<b>Ff 9</b>	
	Eluida con: Hex - EtOAc 70:30
	Consistencia: Polvo
	Color: Café Blanquecino
	Solubilidad: Diclorometano
	Punto de Fusión: 31-34 °C
	Peso: 0.0054 g.
	Rf: 0.8

Elaboración: Las Autoras

<sup>48</sup> García-Quintana, H.; Zaror, L.; Leiva, S Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. Rev Méd Chile. 1997, 125, 1157-64.

**Tabla 9.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff10**

<b>Ff 10</b>	
 <p style="text-align: center;">UV 254nm    UV 360nm</p>	Eluida con: Hex - EtOAc 65:35
	Consistencia: Polvo
	Color: Blanco Verdoso
	Solubilidad: Diclorometano
	Punto de Fusión: 35-37 °C
	Peso: 0.0174 g.
	Rf: 0.5

Elaboración: Las Autoras

**Tabla 10.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff12**

<b>Ff 12</b>	
 <p style="text-align: center;">UV 254nm    UV 360nm</p>	Eluida con: Hex - EtOAc 55: 45
	Consistencia: Polvo
	Color: Verde Claro
	Solubilidad: Diclorometano
	Punto de Fusión: 39-41°C
	Peso: 0.0011g.
	Rf: 0.7

Elaboración: Las Autoras

**Tabla 11.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff100**

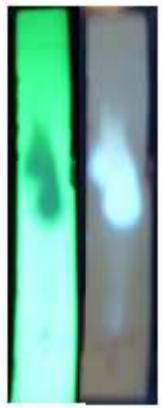
<b>Ff 100</b>	
 <p>UV 360nm UV254nm</p>	Eluida con: EtOAc - MeOH 15: 85
	Consistencia: Polvo
	Color: Blanquecino
	Solubilidad: Metanol
	Punto de Fusión: 61-65 °C
	Peso: 0.0298 g
	Rf: 0.63

Elaboración: Las Autoras

#### 4.3.2. Fracciones obtenidas a partir del extracto crudo MJG-9

A partir de este extracto se obtuvieron 10 fracciones de las cuales se seleccionaron como relevantes en base a la pureza observada en la placa de CCF las subfracciones Ff2, Ff4, Ff5 y Ff6, sus características fisicoquímicas se describen en las Tablas 12, 13, 14, 15.

**Tabla 12.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff2**

<b>Ff 2</b>	
 <p>UV 360nm UV 254nm</p>	Eluida con: Hex - EtOAc 5 : 5
	Consistencia: Oleosa
	Color: Verde Claro
	Solubilidad: Acetato
	Punto de Fusión: 31-35 °C
	Peso: 0.078 g
	Rf: 0.5

Elaboración: Las Autoras

**Tabla 13.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff4**

<b>Ff 4</b>	
 <p>UV 360nm UV254nm</p>	Eluida con: EtOAc 100%
	Consistencia: Viscosa
	Color: Café oscuro
	Solubilidad: Acetato
	Punto de Fusión: 31-35 °C
	Peso: 0.0219 g.
	Rf: 0.6

Elaboración: Las Autoras

**Tabla 14.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff5**

<b>Ff 5</b>	
 <p>UV 360nm UV 254nm</p>	Eluida con: EtOAc - MeOH 9: 1
	Consistencia: Polvo
	Color: Amarillo
	Solubilidad: Cloroformo
	Punto de Fusión: 42-45 °C
	Peso: 0.043g.
	Rf: 0.58 Rf: 0.74

Elaboración: Las Autoras

**Tabla 15.- Características fisicoquímicas de la subfracción Ff6**

<b>Ff 6</b>	
 <p>UV 360nm UV 254nm</p>	Eluida con: EtOAc - MeOH 7: 3
	Consistencia: Polvo
	Color: Blanco
	Solubilidad: M
	Punto de Fusión: 61-65 °C
	Peso: 0.0298 g
	Rf: 0.8

Elaboración: Las Autoras

En las Tablas 8 a 15 aparentemente se observa la presencia de un solo compuesto en la placa de CCF sin embargo los bajos puntos de fusión obtenidos de algunas de las subfracciones indican la presencia de impurezas mezcladas con el compuesto de interés. Russo et al.<sup>28</sup>, señalan que un compuesto orgánico puro funde usualmente en un rango de fusión muy estrecho (normalmente un grado o menos) y un compuesto menos puro exhibe un rango más amplio, a veces 3° o incluso de 10-20°. Además agregan que un compuesto orgánico impuro no solo muestra un rango de fusión más amplio sino también un punto de fusión mas bajo que el compuesto puro.

#### **4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS FRACCIONES**

##### **4.4.1. Actividad Antifúngica**

Frente a los hongos dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se evaluó la actividad antifúngica de las 4 subfracciones obtenidas de cada uno de los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 utilizando los métodos de Bioautografía y Microdilución en caldo.

---

<sup>28</sup> Russo, T.; Meszaros, M *Orgánica en viales*, Flinn Scientific, INC.: Batavia, 1988, 26:27.

### a) Bioautografía de las subfracciones del extracto crudo MJG-8

Se evaluaron las subfracciones denominadas Ff9, Ff10, Ff12 y Ff100 empleando una alícuota de 10uL frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* empleando como control Itraconazol. Las figuras 6 y 7 indican los resultados más relevantes de esta evaluación donde se observó mayor actividad de las subfracciones Ff9 y Ff10 frente a los dos hongos con su respectivo control.

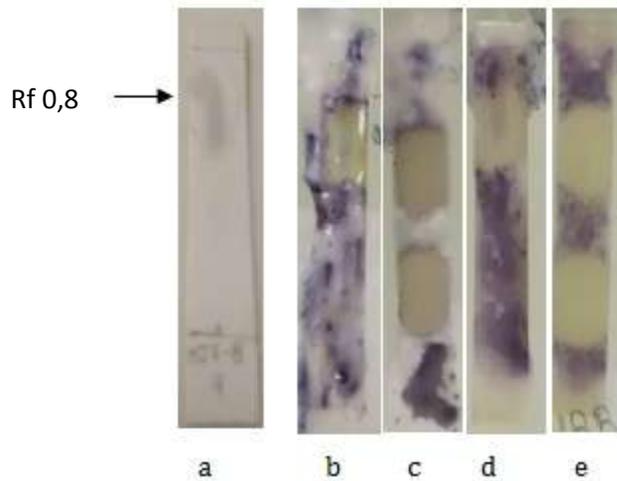


Figura 6.- Bioautograma de la subfracción Ff 9 frente a hongos dermatofitos a) TLC b) *T. mentagrophytes* c) Control Itraconazol d) *T. rubrum* e) Control Itraconazol  
Elaboración: Las Autoras

Los resultados obtenidos de la subfracción Ff9 frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, exhibieron la presencia de un compuesto bioactivo con un Rf de 0.8 el cual mostró una zona de inhibición en los bioautogramas expuestos.

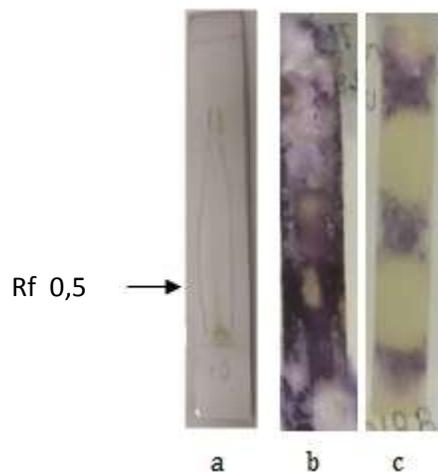


Figura 7.- Bioautograma de la subfracción Ff 10 frente a *T. rubrum*. a) TLC b) *T. rubrum* c) Control Itraconazol  
Elaboración: Las Autoras

En la Figura 7 se indican la actividad antifúngica contra *T. rubrum* de la subfracción Ff10 mediante una zona de inhibición visible con un Rf de 0.5; frente a *T. mentagrophytes* la subfracción se mostró inactiva.

### b) Bioautografía de las subfracciones del extracto crudo MJG-9

Se determinó la actividad de las subfracciones Ff2, Ff4, Ff5 y Ff6 empleando una alícuota de 10uL frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, obteniendo como resultado la actividad antifúngica de las subfracciones Ff2 y Ff4 utilizando como control Itraconazol. Figuras 8 y 9.

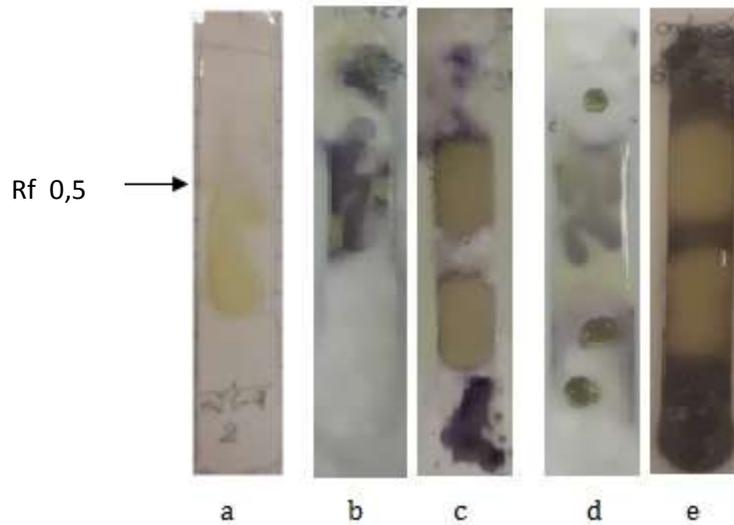


Figura 8.- Bioautograma de la subfracción Ff2 frente a hongos dermatofitos a) TLC b) *T. mentagrophytes* c) Control Itraconazol d) *T. rubrum* e) Control Itraconazol  
Elaboración: Las Autoras

En la Figura 8 se indican los resultados obtenidos de la subfracción Ff2 frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, en donde los bioautogramas exhibieron la presencia de un compuesto bioactivo con un Rf de 0.5 evidenciado con una zona de inhibición.

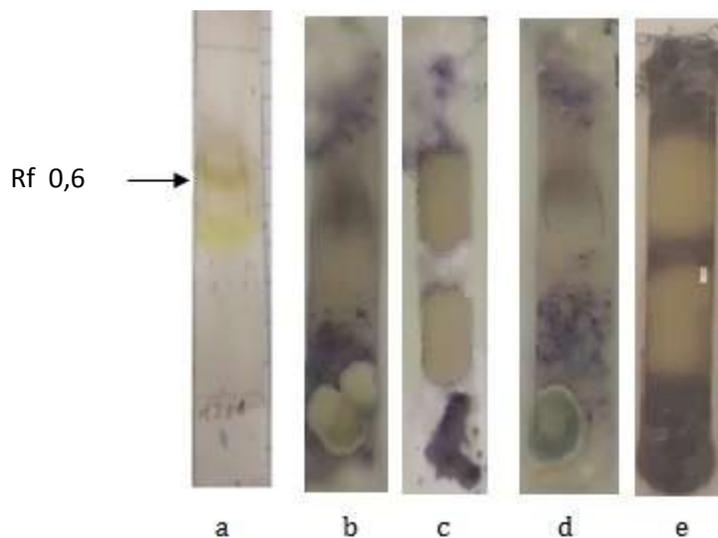


Figura 9.- Bioautograma de la subfracción Ff4 frente a hongos dermatofitos a) TLC b) *T. mentagrophytes* c) Control Itraconazol d) *T. rubrum* e) Control Itraconazol  
Elaboración: Las Autoras

Como se puede apreciar en la Figura 9, la subfracción muestra actividad inhibitoria para los dos microorganismos evaluados con un Rf de 0.6.

**c) Microdilución en Caldo de las subfracciones de los extractos crudos MJG-8 y MJG-9**

Se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria de las subfracciones denominadas Ff9y Ff10 obtenidos del extracto crudo MJG-8 y las subfracciones Ff2 y Ff4 del extracto crudo MJG-9 que presentaron actividad antifúngica con el método de Bioautografía. Los resultados se observan en la Tabla 16.

**Tabla 16.- Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de las subfracciones frente a los microorganismos de prueba mediante el Método de Microdilución en caldo.**

Dermatofitos	Compuestos del Extracto de la cepa MJG-8		Compuestos del Extracto de la cepa MJG-9	
	Ff 9	Ff10	Ff 2	Ff 4
<i>T.mentagrophytes</i>	125 ug/ml	250 ug/ml	1000 ug/ml	500 ug/ml
<i>T.rubrum</i>	250 ug/ml	500 ug/ml	1000 ug/ml	1000 ug/ml

Elaboración: Las Autoras

Al comparar los resultados de CMI de las Tablas 7 y 16 podemos darnos cuenta claramente que el extracto crudo MJG-9 posee una actividad antifúngica mayor que las subfracciones derivadas del mismo (Ff2 y Ff4). Respecto a esto Hardman *et al*,<sup>49</sup> y Fauci *et al*,<sup>50</sup> señalan que existen compuestos que en conjugación producen una mayor actividad antifúngica que cuando estas sustancias están separadas, lo cual puede ser explicado por el efecto de potenciación dado por el resultado combinado entre los compuestos que lo conforman.

En tanto, los resultados obtenidos con las subfracciones Ff9 y Ff10 derivados del extracto crudo MJG-8 mostraron una actividad inhibitoria muy prometedora (Tabla 16) frente a los hongos dermatofitos, esto puede ser debido posiblemente a su mediana polaridad.

<sup>49</sup> Hardman, J.; Limbird L.; Molinoff ,P.; Ruddon, R.; Gilman, A Las bases farma-cológicas de la terapéutica. McGraw-Hill, México DF. 1996.

<sup>50</sup> Fauci, A.; Brauunwald, E.; Isselbacher, K.; Wilson, J.; Martin, J.; Kasper, D.; Longo, L Harrison: Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill, México D.F. 1998.

Katzun<sup>51</sup> señala que la mediana polaridad y el bajo peso molecular de estos compuestos les permiten atravesar con mayor facilidad la membrana celular de estos microorganismos, Bouza *et al.*<sup>52</sup>, añaden que estos compuestos ejercen su acción a este nivel al inhibir la síntesis de ergosterol que es un lípido imprescindible para su integridad, perturbando así las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular del hongo.

Finalmente podemos indicar que los extractos crudos obtenidos de las actinobacterias MJG-8 y MJG-9 poseen una actividad antifúngica relevante lo cual es importante si se considera que los antimicóticos de uso clínico son escasos, además las candidiasis y micosis causadas por hongos dermatofitos constituyen enfermedades emergentes y en general tienen creciente importancia como agentes oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, a lo cual hay que agregar el incremento de la resistencia al escaso número de antifúngicos existentes.<sup>53</sup>

---

<sup>51</sup> Katzung, B Farmacología Básica Clínica. Ed. El Manual Moderno. México D.F. 1987.

<sup>52</sup> Bouza, E.; González, J.; Grasa, M.; Orós, D; Pérez, M.; Rubio, C.; Sobreviela, M Antifúngicos. Criterios de uso racional y guía práctica terapéutica.

<sup>53</sup> Pujol, I.; Aguilar, C.; Gene, J.; Guarro, J In vitro antifungal susceptibility of *Alternaria* spp and *Ulocladium* spp. J. Antimicrob Chemother. 2000, 46:337-338

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

## 5. Conclusiones

- El medio CTG 75% agua de mar artificial(sw) favoreció el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de la cepa MJG-8, con un rendimiento de 0.0347g/50ml
- El medio A1 75% agua de mar artificial(sw) favoreció el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de la cepa MJG-9, con un rendimiento de 0.0255g/50ml
- Los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 no presentaron actividad antibacteriana frente *P. vulgaris*, *E.coli*, *K. pneumoniae* , *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* , *E. faecalis*.
- El extracto crudo MJG-8 tiene propiedades antifúngicos relevantes frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, mostrando una CMI de 125 ug/ml y 250 ug/ ml respectivamente
- El extracto crudo MJG-9 presento una moderada actividad antifungica frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, con una CMI de 250ug/ml y 500 ul/ mg respectivamente
- Los extractos crudos MJG-8 y MJG-9 no presentaron actividad antifúngica frente a *Aspergillus Niger* en ninguna de las concentraciones evaluadas (1000ppm, 100ppm,10ppm)
- Del fraccionamiento del extracto crudo MJG-8 se obtuvieron cuatro subfracciones de interés de los cuales dos subfracciones de mediana polaridad fueron activos contra los hongos dermatofitos. La subfracción denominada Ff 9 presentó una importante actividad antifúngica frente *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* con una CMI de 125 ug/ml y 250 ug/ml respectivamente, mientras que la subfracción denominada Ff 10 presentó una moderada actividad frente a *T. rubrum* con una CMI de 500 ug/ ml

- Del fraccionamiento del extracto crudo MJG-9 se obtuvieron cuatro subfracciones de interés de las cuales dos subfracciones fueron analizadas contra los hongos dermatofitos mostrando resultados antifúngicos mínimos comparados con los obtenidos en el extracto crudo debido a la pérdida de potenciación originada en el proceso de fraccionamiento.

## **CAPÍTULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

## 6. Recomendaciones

- Optimizar el proceso de fermentación para continuar el estudio del extracto crudo MJG-8, y de sus fracciones que presentaron actividad antifúngica en hongos dermatofitos partiendo de un mayor contenido de biomasa y caldo para asegurarse que el rendimiento de los compuestos sea más alto.
- Se recomienda estudiar otras condiciones de fermentación con el fin de incrementar el rendimiento de los metabolitos para evitar que cantidades limitadas restrinjan la realización de pruebas antimicrobianas.
- Se recomienda ampliar el estudio en las fracciones de mediana polaridad que presentaron actividad antifúngica e identificar su estructura química.
- Estudiar nuevas cepas de actinobacterias que desde la perspectiva médica han demostrado tener propiedades antimicrobianas a fin de potenciar el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales en beneficio de la salud y el bienestar de la población.

## **CAPÍTULO VII**

### **ANEXOS**

**Anexo 1.- Composición de los medios de fermentación 75% agua de mar artificial (sw)**

<b>Medio A1</b>	<b>g/L</b>	<b>Medio CTG</b>	<b>g/L</b>
Almidon ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	10g	Caldo Triptisoya ( <i>Becton and Dickinson</i> )	9 g.
Ext. Levadura ( <i>Becton and Dickinson</i> )	4g	Dextrosa ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	3,25 g.
Peptona ( <i>Becton and Dickinson</i> )	2g.		
Carbonato de calcio ( <i>Aldrich</i> )	1g.		
<b>Suplemento</b>			
Sulfato Ferrico (Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> )	5ml/ L o 8g/L		
Bromuro de Potasio (KBr)	5ml/L o 8g/L		

**Anexo 2.- Composición de los medios agar 75% agua de mar artificial (sw)**

<b>Medio A1</b>	<b>g/L</b>	<b>Medio CTG</b>	<b>g/L</b>
Almidon ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	10g	Caldo Triptisoya ( <i>Becton and Dickinson</i> )	9 g.
Ext. Levadura ( <i>Becton and Dickinson</i> )	4g	Dextrosa ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	3,25 g.
Peptona ( <i>Becton and Dickinson</i> )	2g.	Agar Bacto ( <i>Bacto</i> ™)	15 g.
Carbonato de calcio ( <i>Aldrich</i> )	1g.		
Agar Bacto ( <i>Bacto</i> ™)	15 g.		
<b>Suplemento</b>			
Sulfato Ferrico (Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> )	5ml/ L o 8g/L		
Bromuro de Potasio (KBr)	5ml/L o 8g/L		