

**OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA DE
UNA CEPA NATIVA AISLADA DEL PÁRAMO DE GUASCA, CUNDINAMARCA DE *Mucor
circinelloides* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**



ALEJANDRA OCAMPO CARDONA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE PREGRADO
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
GIFUJ
BOGOTA, 2011**

**OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA DE
UNA CEPA NATIVA AISLADA DEL PÁRAMO DE GUASCA, CUNDINAMARCA DE *Mucor
circinelloides* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

ALEJANDRA OCAMPO CARDONA

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título

MICROBIOLOGA INDUSTRIAL

***Grupo de investigación en fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ)- COLCIENCIAS
Metabolitos de cepas nativas Colombianas de hongos filamentosos y evaluación de su
actividad biológica III***

Investigador Principal: Jorge Robles Camargo

Coinvestigadora: Andrea García Caycedo

DIRECTOR: Jorge Robles Camargo

CODIRECTORA: Andrea García Caycedo

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

BOGOTÁ, DC.

**CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS EN FERMENTACIÓN
LÍQUIDA DE UNA CEPA NATIVA AISLADA DEL PÁRAMO DE GUASCA, CUNDINAMARCA DE
Mucor circinelloides Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

ALEJANDRA OCAMPO CARDONA

APROBADO

**JANETH ARIAS
DIRECTORA CARRERAS
DE MICROBIOLOGIA**

**INGRID SHULER
DECANA ACADEMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

NOTA DE ACEPTACION

FIRMA DIRECTOR DE TESIS

FIRMA DEL JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

*“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones
Anotadas son de responsabilidad del autor y no comprometen
En nada a la Pontificia Universidad Javeriana”
(Artículo 9,18 del reglamento de los trabajos de grado y
De investigación de 1989).*

ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfoxido
g/L	Gramo/litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
Rf	Relación de frente
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
uv	Ultravioleta
h	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
min	Minutos
cm³	Centímetros cúbicos
g	Gramos
%p/v	% peso/volumen
psi	Libras de presión

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	13
3. MARCO TEORICO.....	14
4. OBJETIVO	17
4.1. GENERAL	17
5. METODOLOGIA	18
5.1. OBTENCIÓN DE LA CEPA	18
2. RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA	18
5.4.1. Técnicas de cuantificación.....	19
5.4.1.1. Técnica de ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS)	19
5.4.1.2. Peso seco	19
5. PREPARACIÓN DEL PRE-INOCULO	19
6. FERMENTACIÓN	19
7. EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	19
5.7.1. Extracción	19
8. CROMATOGRAFÍA:	20
5.8.1. Cromatografía de capa fina a la extracción obtenida en éter de petróleo	20
5.8.2. Cromatografía de capa fina del extracto obtenido con diclorometano.....	20
5.8.3. Cromatografía de capa fina del extracto obtenido con acetato de etilo	20
9. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS	21
5.9.1. Preparación de los extractos	21
5.9.2. Pruebas antibacterianas.....	21
5.9.3. Pruebas antifúngicas.....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSION	22
1. Cultivo monospórico	22

2.	Cinética de crecimiento	22
3.	Fermentación y Extracción de metabolitos	24
4.	Cromatografía de capa fina.....	25
5.	Pruebas antimicrobianas	25
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	28
8.	BIBLIOGRAFIA.....	29

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Descripción macroscópica y microscópica de <i>Mucor circinelloides</i> en Agar extracto de malta y Agar avena.
TABLA 2	Cantidad de sustancias obtenidas en las extracciones realizadas a las fermentaciones.
TABLA 3	RF calculado de las cromatografías de capa fina, perteneciente a los extractos diclorometano y acetato de etilo.
TABLA 4	Diámetro de halos de inhibición, de los extractos de acetato de etilo a concentraciones de 50 mg y 75 mg en las pruebas antibacterianas.
TABLA 5	Diámetro de halos de inhibición de los controles positivos con discos de cloramfenicol a una concentración de 30 mg de las pruebas bacterianas y de los controles negativos con discos de DMSO en las pruebas antibacterianas.

ANEXOS

- ANEXO 1.** Macroscopía cepa *Mucor circinelloides*.
- ANEXO 2.** Microscopía cepa *Mucor circinelloides*.
- ANEXO 3.** Cromatografías de capa fina de los extractos.
- ANEXO 4.** Cálculos de RF de cromatografías de capa fina extractos diclorometano y acetato de etilo
- ANEXO 5.** Pruebas antimicrobianas
- ANEXO 6.** Cálculos cantidades de extracto en los discos de las pruebas antimicrobianas
- ANEXO 7.** Medios de cultivo

RESUMEN

Los hongos producen sustancias conocidas como metabolitos secundarios, las cuales, por las propiedades que presentan, pueden ser utilizados a nivel industrial. La cepa nativa *Mucor circinelloides*, aislada del páramo de Guasca Cundinamarca, perteneciente al phylum zigomyota al género *Mucor circinelloides*, presentó características macroscópicas como, micelio aéreo, color gris oscuro, reverso color blanco crema. Y características microscópicas como, hifas cenocíticas, demateaceo, esporangios, columnella. Esta cepa fue objeto de este estudio, para la obtención de metabolitos secundarios y evaluar su actividad antimicrobiana. Se realizó la recuperación de la cepa en medio de cultivo PDA y se garantizó la pureza de la misma a partir de un cultivo monospórico. Posteriormente se determinó la cinética de crecimiento por 15 días en donde se evidenció una trofofase en 3 días y una idiofase desde el día 4 hasta el día 15. La obtención de metabolitos secundarios, se llevó a cabo a partir de una fermentación en medio de cultivo líquido, Hanson, por 11 días y se realizó extracción líquido - líquido de la fase acuosa con solventes de baja, media y alta polaridad.

De la extracción líquido-líquido con los solventes éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo, se obtuvieron: de la fracción de baja polaridad (éter de petróleo) 44.8mg; de la fracción de media polaridad (diclorometano) 680mg, y de la fracción de alta polaridad: 517mg.

Los resultados obtenidos de las pruebas antimicrobianas arrojaron para la fracción polar una actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus* en las concentraciones de 50mg y 75mg; demostrando que las sustancias obtenidas en fermentación en medio líquido del hongo nativo de páramo de Guasca *Mucor circinelloides*, tienen capacidad antimicrobiana frente a otros microorganismos.

Este trabajo, forma parte del proyecto “*Metabolitos de cepas nativas Colombianas de hongos filamentosos y evaluación de su actividad biológica III*” del grupo de investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ), en la línea de química microbiológica. Y Colciencias.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas, han sido utilizados gran cantidad de compuestos de origen natural que generan distintos tipos de actividades (antibiótica, antitumoral, antioxidante, etc.). Éstas pueden ser aprovechadas para el tratamiento de enfermedades en humanos, plantas y animales, y para aplicaciones en industrias alimentarias, farmacéuticas, ambientales, agrícolas y veterinarias. **(1, 2, 3)**

Una de las mayores fuentes de obtención de estas sustancias son las de origen microbiano. Éstas sustancias, conocidas como metabolitos secundarios, son producidas por el microorganismo una vez ha finalizado su etapa de crecimiento, por lo que no son esenciales para el desarrollo, ni reproducción del microorganismo. **(4, 5)**

Estudios previos han demostrado que uno de los microorganismos que mayor producción de metabolitos secundarios presentan son los hongos. Estas sustancias les facilitan mecanismos de defensa para competir con otros microorganismos por espacio y nutrición. **(5)**

El conocimiento acerca de los metabolitos secundarios y sus aplicaciones es limitado y escaso, por esto ha generado gran interés, y se busca ampliar el conocimiento de estos con ayuda de herramientas tecnológicas que permiten el aprovechamiento de los metabolitos secundarios. Para la obtención y el uso de estos compuestos en la industria, se han desarrollado y optimizado métodos tecnológicos en distintas áreas para la utilización de estas sustancias. Como, por ejemplo, el uso de procesos fermentativos.

El interés particular de este proyecto es la extracción de metabolitos secundarios obtenidos a partir de la cepa nativa del páramo de Guasca, Cundinamarca *Mucor circinelloides* por medio de fermentación en medio líquido, y la evaluación de su actividad antimicrobiana.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a la aparición de nuevas enfermedades, causadas por microorganismos que cada vez son más resistentes a los antibióticos empleados convencionalmente **(6, 7)**, se hace creciente la demanda de nuevos productos que puedan combatir estos microorganismos, y así disminuir estas enfermedades y mejorar la calidad de vida.

Los hongos filamentosos son microorganismos con un alto potencial a nivel biotecnológico para el desarrollo de productos que son de origen natural y que pueden ser utilizados a nivel industrial, ya que estos producen gran cantidad de compuestos que pueden ser aislados y utilizados en diferentes campos como: farmacéutico, industrial, ambiental, entre otros. Estos compuestos también son biosostenibles, lo que los hace una gran alternativa en el desarrollo de procesos menos costosos y con menos impacto ambiental.

Dentro de los compuestos producidos se encuentran aquellos que se dan en el metabolismo secundario (metabolitos secundarios), los cuales poseen una gran actividad biológica como la producción de antibióticos, pigmentos, ácidos grasos y otra gran cantidad de sustancias que pueden ser utilizados en contra de otros microorganismos por su capacidad inhibitoria. Con la implementación de diferentes procesos como fermentaciones en líquido y sólido etc., es posible la obtención y el aprovechamiento de estos compuestos.

3. MARCO TEORICO

Colombia es uno de los países más ricos y diversos del mundo en recursos naturales. En promedio, una de cada diez especies de fauna y flora en el mundo habita en este país. Debido a esto, actualmente se llevan a cabo gran cantidad de estudios en los diferentes ecosistemas existentes para determinar su importancia tanto económica como industrial.

En Colombia, uno de los ecosistemas más estudiados por su potencial biotecnológico es el de los páramos, gracias a las condiciones climatológicas que brinda este ecosistema. En éste se encuentra gran abundancia de ríos que cumplen con una función hidrológica de gran importancia. Debido al clima frío, y a la alta nubosidad que lo rodea, la evaporación es muy baja, por lo que el agua tiene alto rendimiento. El suelo es otro factor importante en el estudio de los páramos, ya que es rico en materia orgánica. Además, es de alto interés ya que aquí se observan gran cantidad de interacciones biológicas, y hay un alto contenido de microorganismos como bacterias, hongos, actinomicetos y protozoarios, cada uno con un interés particular. **(8)**

Actualmente, los microorganismos han causado gran impacto a nivel industrial, ya que pueden ser utilizados en diferentes campos. En la industria de alimentos son útiles en la producción de lácteos, cárnicos, productos de panadería, productos alcohólicos y muchos más; en la industria farmacéutica, por su capacidad de producir antibióticos, vitaminas etc.; en la industria agrícola, son utilizados por su potencial como controladores biológicos y, a nivel ambiental, como biorremediadores, entre otros **(9, 10, 11, 12)**. Una de las herramientas para la explotación de los microorganismos y el desarrollo de su potencial es la biotecnología, que busca optimizar y elaborar procesos para la obtención de productos específicos que suplan necesidades y que sean útiles a nivel industrial. Algunos de los microorganismos más utilizados en la búsqueda del desarrollo de nuevos productos, ya sea para la producción o para la solución de problemas, son los hongos.

Los hongos son microorganismos eucariotas, no tienen clorofila (lo que los hace no fotosintéticos), son aerobios facultativos de reproducción sexual y asexual, crecen en ambientes muy diversos (algunos son acuáticos pero la gran mayoría son terrestres), se alimentan de materia orgánica ya elaborada, y contribuyen a la mineralización del carbono orgánico. También hay especies que pueden nitrificar y desnitrificar y oxidar compuestos como el azufre el manganeso y el hierro. Su pared está constituida por quitina, un polisacárido altamente rígido por lo que estos microorganismos deben absorber nutrientes simples y solubles y no fagocitarlos. Fisiológicamente, los hongos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos. Éstos pueden resistir concentraciones de azúcares elevadas ya que no son sensibles a la presión osmótica alta y se mantienen en pH bajos (2.9-5.6). **(5, 8)**

El reino de los hongos se encuentra dividido en cinco phylum diferentes: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y hongos mitospóricos, cada uno con diferentes características. **(13)**

El phylum Zygomycota se caracteriza por tener un micelio cenocítico, producen esporas sexuales denominadas zigosporas, y su pared está compuesta de quitina y quitosán. Son hongos comunes y se encuentran saprofitos en el material orgánico. Algunos son parásitos débiles de semillas y hortalizas; su potencial como patógenos se limita únicamente a productos almacenados. Dentro del phylum Zygomycota se encuentran los mucorales, que son conocidos como mohos negros, los cuales son hongos que forman esporangios con columellas con el fin de construir una vesícula al interior de la célula. Dentro de sus géneros más conocidos se encuentra el género *Mucor*. **(5, 14)**.

Mucor es el género más conocido, y tiene gran actividad metabólica tanto en producción de enzimas como de metabolitos primarios y secundarios. Tiene crecimiento rápido y es de colonias algodonosas inicialmente blancas pero una vez esporulado se observa de color grisáceo o café. **(5)**.

Estos microorganismos, poseen un metabolismo quimioheterótrofo y crecen más lentamente que las bacterias. Existen dos tipos de metabolismo: primario y secundario. El metabolismo primario es aquel en el que el microorganismo realiza actividades necesarias para su crecimiento y para mantenerse viable. A nivel industrial, los productos del metabolismo primario son de gran interés para la producción de vitaminas, aminoácidos, y ácidos orgánicos, entre otros **(3, 5)**. Su elaboración es llevada a cabo principalmente en procesos biotecnológicos, como, por ejemplo, fermentaciones, debido a que son viables económicamente y de buena utilidad.

El metabolismo secundario se refiere a todo proceso realizado luego de terminado el crecimiento del microorganismo, por lo que la producción de metabolitos secundarios no es necesaria en la biosíntesis celular. A nivel industrial se les utiliza principalmente en la producción de antibióticos y otros productos. Los metabolitos secundarios, son productos naturales elaborados por diferentes especies y cumplen con ciertas funciones como la colonización de espacio y nutrientes brindada por metabolitos como toxinas o antibióticos. **(5)**.

Mucor circinelloides, es uno de los hongos pertenecientes al phylum zigomycota que es utilizado en la producción de metabolitos secundarios de interés industrial. Se emplea principalmente en procesos para la producción de carotenoides, los cuales son pigmentos pertenecientes a la familia de los isoprenoides **(15, 16)** que brindan colores atractivos en animales y plantas, además tienen funciones esenciales como antioxidantes y precursores de metabolitos como vitamina A **(16)**. Las rutas metabólicas que forman los carotenoides pueden dar desarrollo a otros productos también de interés industrial; tales como: β - carotenos, esteroides, isoprenoides y astaxantina **(5, 17)**. Esta especie también es conocida por su producción de ácidos

como, el ácido oleico el cual ejerce acción beneficiosa en los vasos sanguíneos y evita enfermedades cardiovasculares, entre otros ácidos grasos **(5)**.

Debido a la gran cantidad de sustancias que se pueden obtener a partir de los microorganismos, se han desarrollado diversos métodos y procesos industriales que han resultado ser exitosos en la adquisición de productos de origen natural.

La fermentación, es uno de los procesos más empleados, y es la base de muchas actividades industriales **(18)**. Este es el proceso, en el que se usan microorganismos junto con un conjunto de condiciones específicas como: nutrientes (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, microelementos, etc.), temperatura, pH, tiempo, entre otras **(18)**. Existen principalmente dos tipos de fermentaciones, fermentación líquida y fermentación sólida.

La fermentación líquida es mas empleada, debido a las siguientes ventajas: (I) es más fácil de manejar en términos de reproducibilidad, (II) el control de los parámetros y las condiciones en el proceso es más fácil, al igual que la adición de nutrientes, (III) es mas adaptable para ser usada en diferentes procesos para la obtención de diferentes productos. **(19)**

Es por esta razón, que se busca con el desarrollo de bioprocesos productos de origen natural que sean sostenibles, renovables y de utilidad industrial.

4. OBJETIVO

4.1.GENERAL

Obtener y evaluar los metabolitos secundarios presentes en los extractos producidos en la fermentación líquida de la cepa nativa aislada del páramo de Guasca *Mucor circinelloides*.

4.2.ESPECÍFICOS

- Evaluar la producción de metabolitos secundarios obtenidos de *Mucor circinelloides* a partir de una fermentación en medio de cultivo líquido.
- Establecer los parámetros cinéticos de la cepa de *Mucor circinelloides* y su relación con la producción de metabolitos secundarios.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de la cepa nativa *Mucor circinelloides*.

5. METODOLOGIA

5.1. OBTENCIÓN DE LA CEPA

La cepa fue aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca para luego ser purificada, luego fue conservada en tubo con medio de cultivo inclinado PDA por el grupo de investigación en fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ) para luego ser identificada por medio de claves taxonómicas para constatar el género y la especie de la cepa.

2. RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA

A partir de la cepa conservada en tubo con medio de cultivo inclinado de *Mucor circinelloides*, se reconstituyó la cepa en medio Agar papa dextrosa (PDA), y se incubó a 25°C por 5 días. Una vez finalizado el periodo de incubación, se verificó la pureza por medio de tinción de azul de lactofenol y Gram, y se identificaron las características microscópicas y macroscópicas con la utilización de claves taxonómicas. **(5)**

3. ELABORACIÓN DEL CULTIVO MONOSPÓRICO

El cultivo monospórico se realiza para obtención de un cultivo axénico a partir de una única espora. Se realizó a partir de tubos con medio PDA (papa dextrosa agar) inclinado con la cepa ya crecida, se agregaron 10 mL de una solución de tween 80 al 0.1% estéril para el desprendimiento de conidios, y posteriormente se realizó recuento de conidios en cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 0.5 mL de la suspensión de conidios en tween 80 al 0.1% a 4.5 mL de agua peptonada al 0.1% estéril para obtener una dilución de 10^{-1} hasta 10^{-7} . A partir de las diluciones obtenidas, se realizó un recuento en cámara de Neubauer, y se sembraron por agotamiento en cajas de Petri con medio de cultivo extracto de malta las últimas tres diluciones (10^{-5} – 10^{-7}). Las cajas se incubaron a 25°C realizando observaciones periódicas de las cajas para el seguimiento del crecimiento de una espora con ayuda del estereoscopio y luego de 72h se transfirió una única espora a una caja de Petri con medio de cultivo extracto de malta, y se incubó a 25°C /5 días. Se verificó la pureza mediante tinción de azul de lactofenol. **(20)**

4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Se utilizaron 48 Erlenmeyer de 250 mL cada uno con 36 mL de medio de cultivo líquido Hanson (Ver anexo 7). Cada Erlenmeyer se inoculó con 4 mL de una suspensión de esporas en tween 80 a una concentración de 1×10^6 esporas/mL, se incubaron a 160 rpm, temperatura ambiente por 15 días (384h). Se tomaron muestras cada 24 h por triplicado para la determinación del crecimiento y el consumo de sustrato. **(5, 21)**

5.4.1. Técnicas de cuantificación

5.4.1.1. Técnica de ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS)

Se tomaron las muestras por triplicado y se filtró la biomasa de la fase acuosa. Posteriormente se tomó 0.25mL de la fase acuosa y se le adicionaron 0.25mL de reactivo DNS, luego se tomaron las muestras y se pusieron en un baño de agua en ebullición por 5 min, seguidamente las muestras se pusieron en un baño de hielo por 5 min. Finalmente se adicionaron 2.5 mL de agua destilada las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 540 nm; este procedimiento se realizó cada 24h por 15 días. **(5, 21)**

5.4.1.2. Peso seco

Se separó la biomasa de la fase acuosa por el método de filtración en papel y se secó el papel filtro con la biomasa en horno a 60°C /24h, se pesó la biomasa para medir el crecimiento del microorganismo.

5. PREPARACIÓN DEL PRE-INOCULO

A partir de un tubo del cultivo monospórico, se realizó una suspensión de conidios con una concentración de 10^6 a 10^8 esporas/mL. Posteriormente se adicionó la suspensión a 25mL de caldo PGS y se transfirió la suspensión de esporas en el caldo a 100mL de caldo PGS modificado (papa glucosa sulfato de amonio + cloramfenicol). Se incubó en un shaker a 160rpm/72h a temperatura ambiente. **(22)**

6. FERMENTACIÓN

En un erlenmeyer con capacidad de 5 litros, conteniendo 4 litros de medio Hanson (caldo), se adicionaron los 125mL de pre-inoculo luego de las 72h de incubación al caldo; el procedimiento se repitió hasta completar un valor de fermentación de 18L. Se incubó a 160 rpm, con una aireación constante de $1.6 \text{ cm}^3/\text{mL}$, a temperatura ambiente por 11 días. **(5)**

7. EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Una vez finalizado el tiempo de fermentación, se tomó el inoculo y se centrifugó a 100 rpm/5 min; con el fin de separar la biomasa del medio de cultivo y obtener la fase acuosa. Posteriormente se tomó la fase acuosa y se filtró al vacío. Paralelo a esto, se tomó la biomasa y se llevó al horno y se secó a 60°C/24h y se cuantificó para obtener el peso seco.

5.7.1. Extracción

La fase acuosa se transfirió a embudos de separación y se adicionó a cada uno, 100 mL de éter de petróleo, se agitó manualmente. Se separó la fase acuosa del solvente y se le adicionaron 2g de cloruro de sodio (NaCl), seguido de esto, se filtró la mezcla y se concentró el solvente en rotavapor y se obtuvo el extracto correspondiente a la fracción apolar (éter de

petróleo). Posteriormente, se retomó la fase acuosa, se adicionaron 100mL de diclorometano, se realizó el procedimiento descrito anteriormente. Una vez concentrado el solvente se adquirió el extracto de la fracción de mediana polaridad (diclorometano). Finalmente, se tomó nuevamente la fase acuosa se le adiciono 100 mL de acetato de etilo y se repitió el procedimiento anterior; luego de la concentración del solvente se obtuvo el extracto perteneciente a la fracción polar (acetato de etilo). Se dejó secar los extractos a temperatura ambiente y se pesaron las sustancias obtenidas. **(5, 21, 22)**

8. CROMATOGRAFÍA:

Se realizaron cromatografías de capa fina a las sustancias obtenidas en la extracción, siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

5.8.1. Cromatografía de capa fina a la extracción obtenida en éter de petróleo

Se tomó una pequeña cantidad del extracto de la fracción apolar y se disolvió en éter de petróleo. Paralelo a esto, se preparó una cámara cromatográfica a saturación con 10 mL de la fase móvil (éter de petróleo – acetato de etilo 8:2), utilizando como fase estacionaria sílica gel. Posteriormente se colocó la muestra del extracto con un capilar sobre una placa de sílica gel y se introdujo la placa en la cámara cromatográfica hasta que la fase móvil corriera completamente a través de la placa de sílica gel. Se retiró la placa de sílica gel de la cámara cromatográfica y se dejó secar. Por último, se reveló con luz uv y con una solución de vainillina y ácido sulfúrico, y se calentó hasta 100° C aproximadamente. **(5, 23)**

5.8.2. Cromatografía de capa fina del extracto obtenido con diclorometano

Se tomó una pequeña cantidad del extracto de la fracción de mediana polaridad y se disolvió en diclorometano; previamente se preparó la cámara cromatográfica saturada con 10mL de la fase móvil (diclorometano), se colocó una muestra del extracto en una placa de sílica gel (Fase estacionaria) y se introdujo en la cámara dejando que la fase móvil corriera completamente a través de la placa de sílica gel posteriormente se realizó el procedimiento descrito en el numeral 5.8.1. **(5, 23)**.

5.8.3. Cromatografía de capa fina del extracto obtenido con acetato de etilo

Se tomó una pequeña cantidad del extracto de la fracción polar y se disolvió en acetato de etilo. Se colocó una muestra del extracto sobre una placa de sílica gel (fase estacionaria) y se puso en una cámara cromatográfica saturada con 10mL de la fase móvil (diclorometano – metanol 9.5:0.5), permitiendo que

la fase móvil corriera a través de la placa de silica gel. Posteriormente se reveló la placa siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 5.8.1. **(5, 23)**

9. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

5.9.1. Preparación de los extractos

Para probar los extractos obtenidos en las fermentaciones y evaluar su actividad antimicrobiana se realizó el siguiente procedimiento: Se tomaron las muestras pertenecientes a los extractos obtenidos en diclorometano y acetato de etilo.

Los extractos fueron preparados a concentraciones de 50mg/350 μ L y 75mg/350 μ L. Para ello se tomaron 4 tubos eppendorff y se adicionaron a 2 tubos 50mg y a dos tubos 75mg de cada uno de los extractos. Posteriormente se adicionaron a cada uno de los tubos 350 μ l de DMSO para obtener las suspensiones de los extractos. Finalmente se adicionaron 20 μ L de cada una de las suspensiones preparadas a discos estériles y se dejaron secar a temperatura ambiente. **(24)**

5.9.2. Pruebas antibacterianas

Se probaron los extractos obtenidos, frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*. Se prepararon las bacterias 24h antes a la prueba realizando siembra por aislamiento en medio de cultivo nutritivo, se incubaron a 37°C. Luego se realizaron suspensiones de cada una de las bacterias en agua peptonada al 0.85 (%p/V) con una turbidez equivalente al 0.5 del patrón de Mcfarland. Posteriormente se realizaron siembras masivas por triplicado para cada concentración de extracto, de cada una de las bacterias en medio de cultivo Muller Hinton, e inmediatamente se colocó un disco con el extracto sobre el agar inoculado. Se prepararon los controles positivos y negativos para cada una de las bacterias, realizando siembras masivas de las suspensiones bacterianas en medio de cultivo Muller Hinton, se pusieron discos de cloramfenicol 30mg/mL para el control positivo y discos de DMSO para el control negativo. Las cajas se incubaron a 37°C/24h. Se tomó el diámetro de los halos de inhibición. **(25, 26)**

5.9.3. Pruebas antifúngicas

Para evaluar la actividad antifúngica de los extractos, se utilizó el hongo fitopatógeno *Fusarium roseum*. A una cepa crecida en tubo inclinado de medio PDA, se adicionaron 10mL de tween 80 al 0.85 (%p/v) y se obtuvo una suspensión de esporas. Se realizó una siembra masiva de la suspensión sobre medio de cultivo PDA y se colocó el disco con el extracto sobre el medio inoculado. Se incubó a 25°C/7 días. **(25)**

6. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Cultivo monospórico

Se obtuvo una cepa pura en medio de cultivo extracto de malta y avena, luego de 5 días de incubación la cepa presento las siguientes características macroscópicas y microscópicas que teniendo en cuenta las claves taxonómicas **(27, 28, 29)** corresponden al microorganismo *Mucor circinelloides* :

MACROSCOPIA (Ver anexo 1.)	ANVERSO: micelio aéreo denso de aproximadamente 1 cm de alto, color gris oscuro
	REVERSO: color blanco
MICROSCOPIA (Ver anexo 1.)	HIFAS: cenocíticas, hialinas gruesas de aproximadamente 20-40µm de ancho
	ESPORANGIOS: globosos, demateaceos, rectos o curvos de 50-70µm de diámetro
	COLUMNELLAS: libres, semiesféricas, lisas de 25 µm de diámetro
	ESPORAS: ovoides, lisas, de aproximadamente 2.5 µm de diámetro, incoloras individualmente pero se observan gris oscuro en masa.

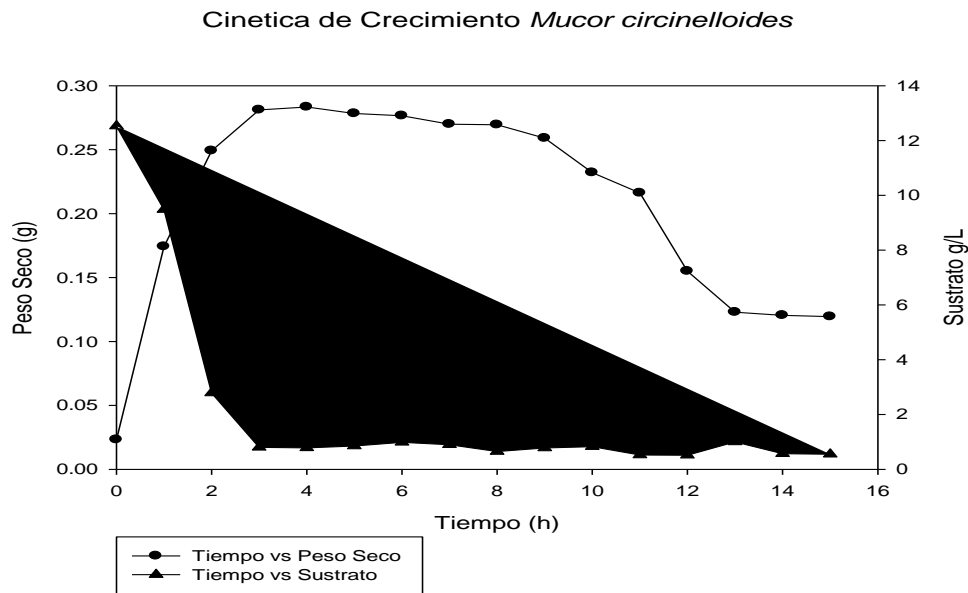
Tabla 1. Descripción macroscópica y microscópica de *Mucor circinelloides* en Agar extracto de malta y Agar avena.

Se observaron las mismas características macroscópicas y microscópicas en los dos medios de cultivo empleados ya que la variedad de los componentes de los dos medios no afectan la morfología del microorganismo **(5)**, y al haber incubado la cepa a partir de una sola spora se garantiza que el microorganismo va a mantener un mismo genotipo y se manifiesta en una morfología única **(28)**; y una vez finalizado el periodo de incubación (5 días) es posible la observación de sus estructuras: esporangios, columnellas, esporas e hifas.

2. Cinética de crecimiento

Con el fin de determinar el comportamiento cinético de *Mucor circinelloides*, se realizó la cinética de crecimiento de la cepa durante 15 días, cuantificando el consumo del sustrato y midiendo su peso seco, en donde se observó que el microorganismo alcanza

trofófase al tercer día de incubación y se observó una idiofase a partir del cuarto día de incubación.



Grafica 1. Cinética de crecimiento *Mucor circinelloides*.

En la grafica 1 se observa que la concentración de biomasa del microorganismo aumenta constantemente en los primeros 4 días de incubación, gracias a la concentración de sustrato inicial y al consumo de este. A partir del día 5 la velocidad de crecimiento del microorganismo disminuye debido al agotamiento del sustrato. Sin embargo la biomasa del microorganismo es mayor por la acumulación de sustancias producto del metabolismo primario del hongo. En esta etapa se llevan a cabo una serie de reacciones metabólicas para que el microorganismo pueda crecer y mantenerse viable; también ocurren reacciones catabólicas y anabólicas las cuales son esenciales para el mantenimiento de la célula (29).

Comenzando en el día 5, el hongo se muestra constante, puesto que finalizó el crecimiento del microorganismo. Aquí la célula inicia la síntesis de metabolitos secundarios ya que desarrolla procesos metabólicos que no cumplen con una función estructural ni de reserva (5), por lo que sus productos no son de vitalidad para la célula.

El consumo de la glucosa es inversamente proporcional al crecimiento del hongo. La glucosa es la fuente principal de energía del microorganismo y disminuye cuando es usado por el hongo como sustrato para la síntesis de nuevo material. (5, 29)

Aproximadamente desde el día 9, se evidencia decrecimiento en la biomasa y por lo tanto de viabilidad celular, esto a causa del agotamiento de los nutrientes proporcionados por el medio de cultivo y también del material de reserva almacenado por la célula.

En la grafica 1. Se observa que al culminar la idiofase, también el sustrato ha decaído casi es su totalidad, razón por la cual se tomo hasta el día 11 para la finalización de la fermentación.

3. Fermentación y Extracción de metabolitos

Se Fermentaron 18L de la cepa en medio de cultivo Hanson, en donde se obtuvo un peso seco de la biomasa de 28g.

Las fuentes nutricionales que se empleen son esenciales para el desarrollo del microorganismo y a su vez para la producción de metabolitos secundarios.

La producción de estos depende de las fuentes nutricionales del medio principalmente de la fuente de carbono y de nitrógeno, también la presencia de sales incrementan el crecimiento del microorganismo mejorando su metabolismo y por esto también la producción de metabolitos, así mismo la presencia de algunos metales como zinc, manganeso y hierro inducen la producción de metabolitos secundarios **(30)**.

De la fermentación en medio líquido de la cepa *Mucor circinelloides*, se obtuvieron las cantidades de las fracciones de baja, mediana y alta polaridad con los solventes: éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo respectivamente, presentadas en la siguiente tabla.

FRACCION	CANTIDAD
ÉTER DE PETROLÉO	44.8 mg
DICLOROMETANO	680 mg
ACETATO DE ETILO	517 mg

Tabla 2. Cantidad de sustancias obtenidas en las extracciones realizadas a las fermentaciones.

La mayoría de los metabolitos secundarios son excretados al exterior de la célula, lo que puede estar relacionado con la eliminación del material toxico **(31)**. De manera que la mayoría de las sustancias de interés se encuentran en la fase acuosa. Para la extracción de estas sustancias, se emplean solventes con distintas polaridades para que, por la afinidad que tengan con los compuestos, estos sean arrastrados por el solvente en el momento en el que el compuesto entre en contacto con el mismo.

En el caso del éter de petróleo se obtendrán sustancias de baja polaridad principalmente ácidos grasos. Al usar diclorometano se encontraran sustancias de mediana polaridad que posiblemente puedan ser: terpenoides y flavonoides **(32)**. Entre otras. El acetato de etilo arrastrara las sustancias que tengan mayor polaridad, estudios anteriores muestran que las sustancias de alta polaridad presentan gran actividad antimicrobiana. **(33)**

La cantidad de sustancia que se obtenga, depende del método de extracción que se utilice. En este estudio se empleo una cantidad específica de solvente (100mL) y se realizó la extracción por agitación constante, la cantidad que se obtiene es

relativamente poca comparado con otros estudios en los que la técnica de extracción consiste en la adición de nuevo solvente, mas no, en la agitación del mismo por la saturación de este, por la cantidad de sustancia que recoja el solvente.

4. Cromatografía de capa fina

De las cromatografías realizadas a los extractos obtenidos de las fermentaciones, se observo que los extractos de diclorometano y acetato de etilo presentaron actividad al ser reveladas por la luz uv (ver anexo 3). Se calcularon los Rf de las cromatografías que se presentan en la siguiente tabla:

REVELADO	EXTRACTO	Rf
LUZ UV ONDA LARGA	DICLOROMETANO	0.48
LUZ UV ONDA LARGA	ACETATO DE ETILO	0.8
LUZ UV ONDA CORTA	DICLOROMETANO	0.58
LUZ UV ONDA CORTA	ACETATO DE ETILO	0.75
LUZ UV ONDA LARGA	ACETATO DE ETILO	0.76
VAINILLINA Y ÁCIDO SULFÚRICO	DICLORO METANO	0.5
VAINILLINA Y ÁCIDO SULFÚRICO	ACETATO DE ETILO	0.83

Tabla 4. RF calculado de las cromatografías de capa fina, perteneciente a los extractos diclorometano y acetato de etilo. (Ver anexo 3)

La cromatografía de capa fina es una técnica sencilla, que permite la separación de sustancias de acuerdo a la polaridad de las mismas. Esta técnica es limitada y no es posible determinar la cantidad de sustancias presentes en la muestra ya que una misma mancha pueden haber varias sustancias de polaridades similares. **(34, 35)**

El RF permite determinar la relación de frente en el que se mira cuanto recorrió la muestra en la placa (Ver anexo 4). Un valor adecuado de Rf se encuentra entre 0.20 y 0.80; cuando este valor es demasiado bajo indica que la muestra no tiene una buena afinidad con el solvente, por lo que hay que aumentar gradualmente la polaridad del solvente, y por el contrario cuando se obtiene un valor de Rf demasiado alto, es necesario reducir la polaridad del solvente. Para poder tener un dato aproximado de las sustancias que se encuentran en la placa. **(23).**

5. Pruebas antimicrobianas

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las sustancias producidas por *Mucor circinelloides*, se probaron 4 bacterias con morfologías distintas (bacilo Gram positivo,

bacilo Gram negativo y coco Gram positivo). Esto debido a que las sustancias pueden inhibir a los microorganismos de distintas formas: pueden atacar el microorganismo a nivel de pared o membrana celular o en la síntesis de ácidos nucleídos. **(36)**

Con los ensayos realizados de los extractos de diclorometano y acetato de etilo se observó actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* con el extracto de acetato de etilo (ver anexo 4). Las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa* no fueron afectadas por ninguno de los dos extractos evaluados, el diámetro de los halos de inhibición se presentan en la siguiente tabla.

CONCENTRACIÓN EXTRACTO	MICROORGANISMO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3
Acetato de etilo 75 mg/350 µL	<i>Bacillus subtilis</i>	11 mm	15 mm	13 mm
Acetato de etilo 50 mg/350µL	<i>Bacillus subtilis</i>	6 mm	10 mm	5 mm
Acetato de etilo 75 mg/350µL	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 mm	13 mm	0 mm
Acetato de etilo 50 mg/ 350µL	<i>Staphylococcus aureus</i>	5 mm	4 mm	0 mm
Acetato de etilo 75 mg/350 µL	<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etilo 50 mg/350µL	<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etilo 75 mg/350µL	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etilo 50 mg/ 350µL	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	0 mm	0 mm	0 mm

Tabla 4. Diámetro de halos de inhibición, de los extractos de acetato de etilo a concentraciones de 50 mg y 75 mg en las pruebas antibacterianas (ver anexo 4).

Se realizaron los controles positivos y negativos de las bacterias utilizando discos de cloramfenicol 30mg/mL y discos de DMSO respectivamente los halos de inhibición se muestran en la tabla 5. El cloramfenicol es uno de los antibióticos más empleados y conocidos para combatir bacterias, posee una actividad de amplio rango frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas **(37)**. Este antibiótico, tiene acción principalmente como bacteriostático y actúa impidiendo la transpeptidación de aminoácidos al unirse con la fracción 50s del ribosoma **(38)**. El DMSO se empleo para disolver los extractos de acetato de etilo por lo que no debe ejercer ninguna influencia

sobre la bacteria que pueda causar su inhibición y mostrar falsos positivos en las pruebas.

CONTROL	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
POSITIVO	35 mm	30 mm
NEGATIVO	0 mm	0 mm

Tabla 5. Diámetro de halos de inhibición de los controles positivos con discos de cloramfenicol a una concentración de 30 mg de las pruebas bacterianas y de los controles negativos con discos de DMSO en las pruebas antibacterianas. (Ver anexo 4).

La actividad antimicrobiana de las sustancias obtenidas en los extractos fueron únicamente frente a las bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) y no frente a las Gram negativas, posiblemente por las diferencias en su pared celular. La pared celular de las bacterias Gram positivas es de una sola capa (peptidoglicano) siendo esta más vulnerable a la acción del extracto. Mientras que la pared celular de las bacterias Gram negativas está formada de varias capas (lipopolisacáridos) que están unidas a una membrana extracelular. (39, 40). Sin embargo esto no indica que las sustancias probadas de los extractos no tienen acción antimicrobiana frente a las bacterias Gram negativas, si no que tal vez no fue adecuada la concentración empleada en las pruebas de manera que pudiera afectar de alguna forma el crecimiento de bacterias Gram negativas.

Los extractos fueron preparados a concentraciones de 50 mg/350 μ L y a 75 mg / 350 μ L para luego pasar 20 μ L de los extractos a los discos empleados para cada bacteria; por lo que las cantidades de extracto contenidas en cada uno de los discos fueron de: 2.8 mg/ μ L y 4.2 mg/ μ L respectivamente (ver anexo 5).

Comparando los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de los extractos y los controles, se observa que la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de las fermentaciones de la cepa *Mucor circinelloides* son resultados significativamente altos ya que se probaron cantidades pequeñas de los extractos y se obtuvo una inhibición positiva, frente a la inhibición brindada por el antibiótico en una mayor concentración (30mg/mL) siendo esta una sustancia pura. Lo que indica que los metabolitos secundarios obtenidos tienen potencial para ser utilizados a futuro como antimicrobianos frente a estos microorganismos.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

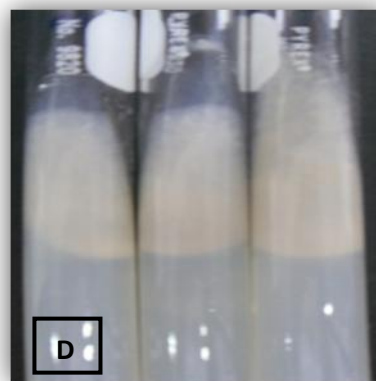
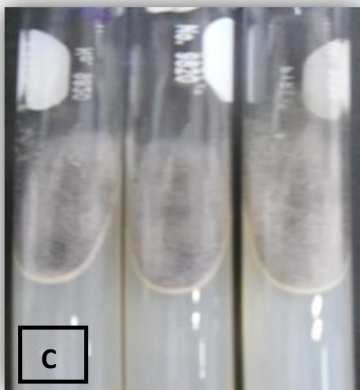
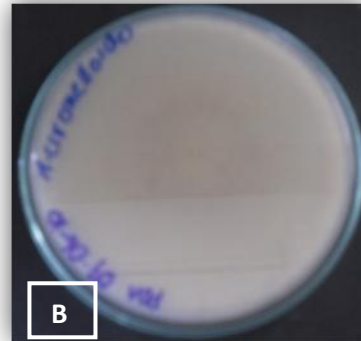
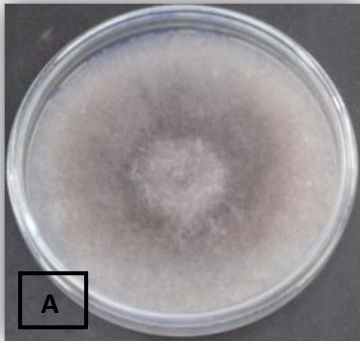
- Según las características macroscópicas y microscópicas que presentó la cepa nativa aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca pertenece a phylum *Zygomycota* al género *Mucor* y a la especie *circinelloides*.
- La cepa presentó una cinética de crecimiento típica en donde alcanza una trofofase a tercer día y una trofofase que culmina al día 11.
- Los extractos polares de la fase acuosa de la cepa *Mucor circinelloides*, presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *staphylococcus aureus*, lo que sugiere una fuente de productos con potencial biotecnológico. Lo que hace de esta cepa un microorganismo promisorio.
- Los extractos de mediana polaridad no presentaron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Se sugiere realizar pruebas moleculares para continuar con la confirmación de la cepa nativa del páramo de Guasca, Cundinamarca *Mucor circinelloides*.
- Se recomienda estandarizar las técnicas tanto de extracción de los metabolitos con los diferentes solventes, como de fermentación para aumentar la producción de metabolitos secundarios.
- Se propone la realización de cromatografía de gases para la identificación de las sustancias presentes en la fase acuosa que puedan tener actividad antimicrobiana.

14. Hollmann, M. Razzazi-Fazeli, F. Grajewski, J. Twaruzek, M. Sulyok, M. Böhm, J .Detection of 3-nitropropionic acid and cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. *Mycotoxin Research*. 2008. Vol. 24, No. 3, 140-150 pág.
15. Csernetics , A. Nagy, G. Iturriaga, E. Szekeres. Eslava, A. Vágvölgyi, C. Papp, T . Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology* xxx .2011. xxx–xxx pág.
16. Echavarri, C. Johnson, E .Fungal Carotenoids. *Applied Mycology and Biotechnology. Agriculture and Food Production*. 2002. Volume 2.
17. Martín, J. Gudiña, E. Barredo, J. Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein?. *Microbial Cell Factories* 2008.
18. Adeyemo, J. Enitan, A.Optimization of fermentation processes using evolutionary algorithms. *Scientific Research and Essays*. 2011. Vol. 6(7), 1464-1472 pág.
19. Carnevali, P. Ciati, R. Leporati, A. Paese, M. Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food Microbiology*. 2007. Vol 24. 150–154 pág.
20. García, A. Realizar protocolos de producción y uso de microorganismos benéficos. Se inicia la fase i del banco de microorganismos utilizando claves taxonómicas macroscópicas y microscópicas. Alcaldía Mayor de Bogotá Jardín Botánico José Celestino Mutis.
21. Carreño, S. Evaluación de la capacidad biotransformadora de las cepas nativas de *Penicillium* sp. Sobre el ácido kaur 16-en-19-oico. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá 2000, 66 pág.
22. Campos, Z. Evaluación del efecto antagónico in vitro de cepas nativas de *Penicillium* sp. Frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá 2002,77 pág.
23. Torres de young, S. Introducción a la cromatografía. ed. Editorial Universidad Nacional (eun). Bogotá 2002, 134 pág.
24. NCCLS. National comité for Clinical laboratory Standard. Performance standars for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. Document M2-A8. 2003. National comité for clinical laboratory standad Vol 23 (1). Wayne. Pennsylvania.
25. Medina, A. Evaluación de la capacidad biotransformadora de la cepa nativa de *fusarium oxysporum* sobre el B-D glucopiranosil-ester del ácido(-)16-(B-Glucopiranosiloxil)-17-hidroxi-kaur an 19-oico e identificación de metabolitos secundarios. Maestría en microbiología con énfasis en industrial .Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá 2001. 77 pág.

26. Daza, P. Capacidad biotransformadora y actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios de *Aspergillus niger* 511. Maestría en microbiología con énfasis en industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá 2001. 79 pág.
27. Samson R, Hoekstra E, Frisvad J, Filtenborg O. Introduction to food and airborne fungi. Sexta Edición. CBS. The Netherlands. 2000, 372 p.
28. Gilman J. A manual of soil fungi. The Iowa state university press, Ames, Iowa, U.S.A. 1950. 572p.
29. Barnett H, Hunter B. Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta Edición The American Phytopathological Society. Pilot Knob Rodal, St Paul, Minnesota, USA. 1999, 216 p.
30. Bentley, R. Microbial secondary metabolites play important roles in medicine: prospects to discovery of new drug. *Perspect Biol Med* 40. 1997. 364-394.
31. Owen, P. Biotecnología de la fermentación. Ed. acribia. Zaragoza España. 1991. 27-45
32. Arunachalam, K. Velmurugan, P. Balaji, R. Anti-inflammatory and cytotoxic effects of extract from *Plumbago zeylanica*. *African Journal of Microbiology Research*. 2010 Vol. 4(12), 1239-1245. Pág.
33. Okeleye, B. Samie, A. Bessong, P. Mkwetshana, N. Green, Clarke, N. Ndip, R. Crude ethyl acetate extract of the stem bark of *Peltoporum africanum* (Sond, Fabaceae) possessing in vitro inhibitory and bactericidal activity against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010. Vol. 4(14), 1432-1440 pág.
34. La cromatografía y sus aplicaciones. <https://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r49955.PDF>. consultado 28 mayo 2011
35. Cromatografía de capa fina. <http://depa.pquim.unam.mx/~fercor/dqo/manuales/1311/p7.pdf>. consultado 28 mayo 2010.
36. Ncube, N. Afolayan, A. Okoh, A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 7 (12), 1797-1806 pág.
37. Tetraciclinas, cloranfenicol y antibióticos polipeptídicos. Departamento de Farmacología y Terapéutica Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
38. Esimone, C. Nworu, C. Ekechukwu, A. Awemu A. Effects of phenylalanine and glycine on some toxic effects of chloramphenicol. *iScientific Research and Essay*. 2007. Vol. 2 (4), 105-111 pág.

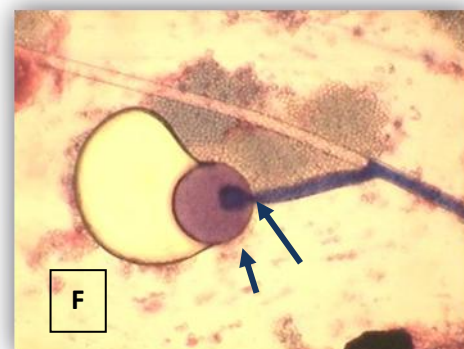
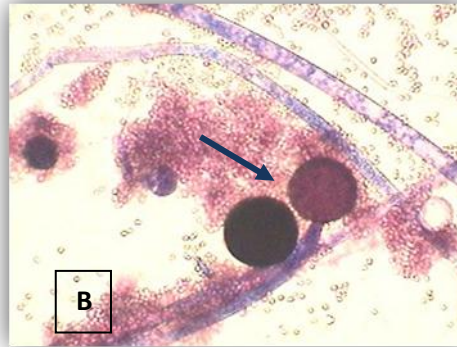
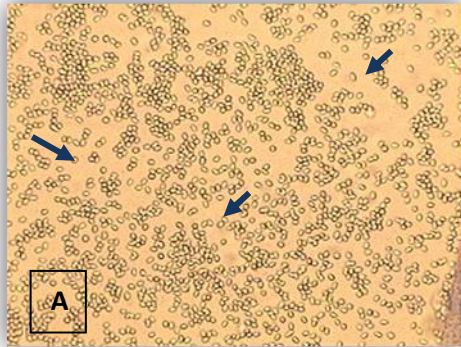
- 39.** ERGENE, A. GULER, P. TAN, S. HAMZAOGLU, E. DURAN, A Antibacterial and antifungal activity of *Heracleum sphondylium* subsp. *Artvinense*. African Journal of Biotechnology. 2006 Vol. 5 (11), 1087-1089 pág.
- 40.** Benkerroum, N .Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. African Journal of Biotechnology. 2008. Vol. 7 (25), 4856-4867 pág.

ANEXO 1. Macroscopía cepa *Mucor circinelloides*.



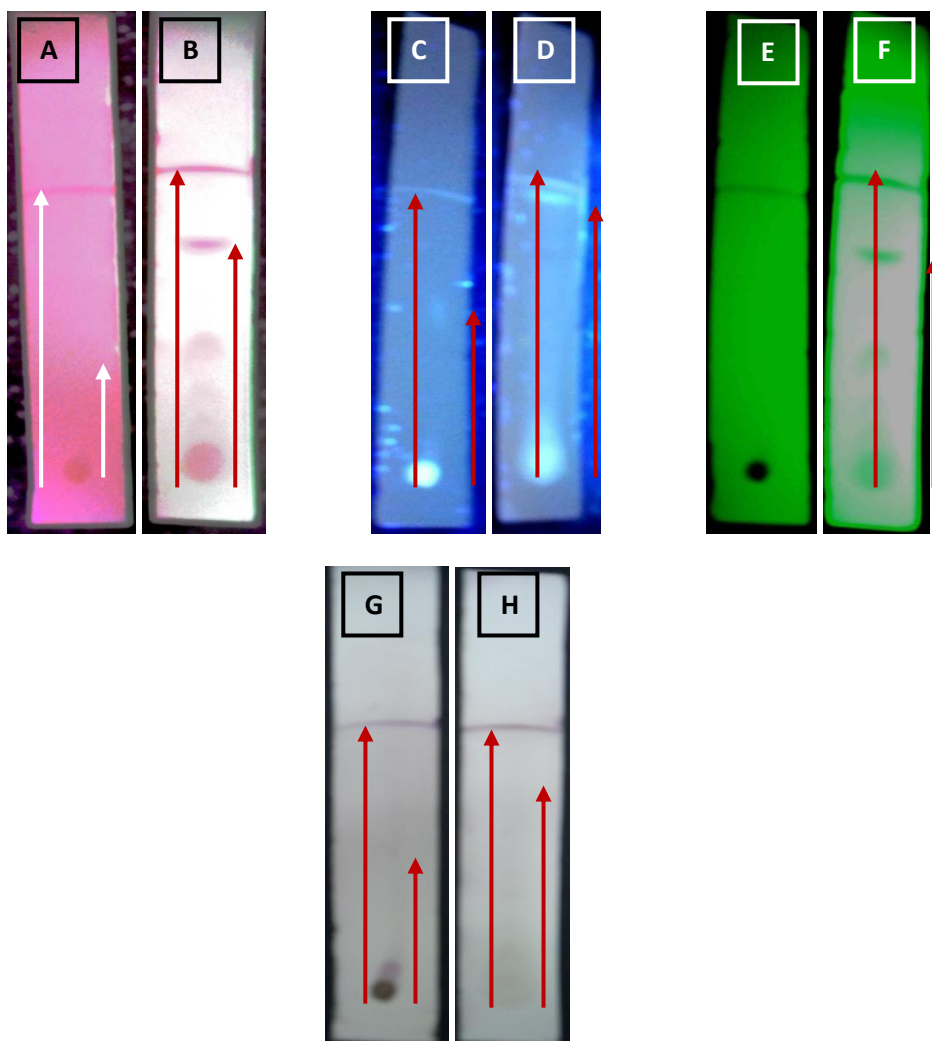
(A) Anverso: micelio aéreo, color gris oscuro. (B) Reverso: color blanco cremoso (C) Macroscopía en tubo medio avena. Anverso: micelio aéreo color gris oscuro de aproximadamente 1 cm de alto. (D) Macroscopía en tubo medio avena. Reverso: color blanco cremoso.

ANEXO 2. Microscopía cepa *Mucor circinelloides*.



(A) Esporas ovoides, globosas de $2.5\mu\text{m}$ de diámetro. (B) Esporangios globosos, demateaceos de $57.5\mu\text{m}$ y $67.5\mu\text{m}$. (C) Hifas cenocíticas, gruesas, hialinas o incoloras de $38\mu\text{m}$ y $23\mu\text{m}$ de ancho. (D) Esporangio demateaceo de $70\mu\text{m}$ de diámetro, liberando el contenido en el interior, columnella de $20\mu\text{m}$ de diámetro. (E) Hifa cenocítica incolora de $23\mu\text{m}$ de ancho, esporangio demateaceo, esporas ovoides lisas. (F) Esporangio demateaceo de $65\mu\text{m}$ de diámetro, columnella globosa de $25\mu\text{m}$ de diámetro.

ANEXO 3. Cromatografías de capa fina de los extractos.



(A) Cromatografía extracto diclorometano empleando como fase móvil diclorometano, revelada con luz uv de longitud de onda larga con un Rf de 0.48 **(B)** Cromatografía extracto acetato de etilo utilizando como fase móvil diclorometano-metanol (9.5: 0.5), revelado con luz uv de longitud de onda larga con un Rf de 0.83 **(C)** Cromatografía de extracto diclorometano con diclorometano como fase móvil, revelado con luz uv de longitud de onda corta con un Rf de 0.58 **(D)** Cromatografía extracto acetato de etilo usando diclorometano-metanol (9.5: 0.5) como fase móvil, revelado con luz uv de longitud de onda corta con un Rf de 0.75 **(E)** Cromatografía diclorometano con diclorometano como fase móvil, revelado con luz uv de longitud de onda larga en donde no se observan sustancias a través de la placa **(F)** Cromatografía extracto acetato de etilo empleando como fase móvil diclorometano-metanol (9.5: 0.5) revelado con luz uv de longitud de onda larga con un Rf de 0.76 **(G)** Cromatografía extracto diclorometano con diclorometano como fase móvil, revelado con ácido sulfúrico y vainillina con un Rf 0.5 **(H)** cromatografía extracto acetato de etilo usando como fase móvil diclorometano-metanol (9.5: 0.5), revelado con ácido sulfúrico y vainillina con un Rf de 0.83

ANEXO 4. Cálculos de Rf de cromatografías de capa fina extractos diclorometano y acetato de etilo

El Rf está definido como: distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el solvente hasta el frente del eluyente. (41).

$$(A) \frac{2.9}{6} = 0.48$$

$$(B) \frac{5.4}{6.5} = 0.8$$

$$(C) \frac{3.5}{6} = 0.58$$

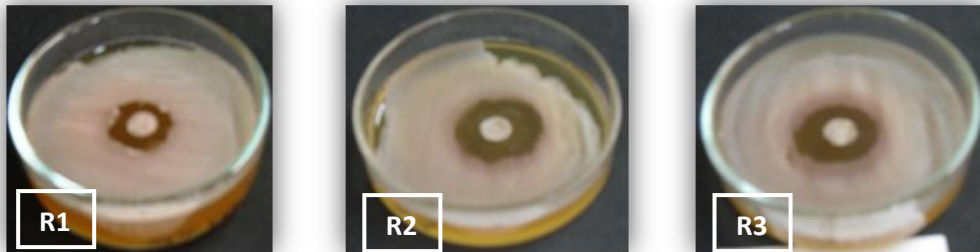
$$(D) \frac{4.5}{6} = 0.75$$

$$(F) \frac{5}{6.5} = 0.76$$

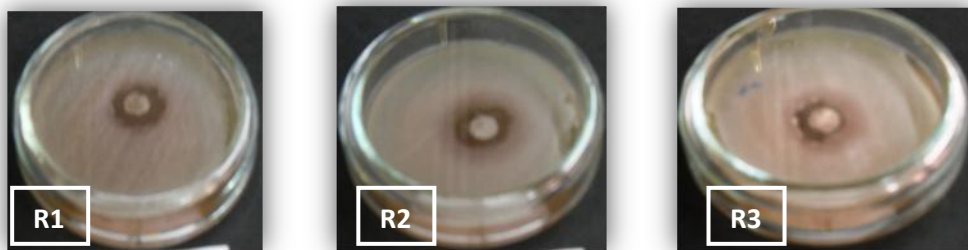
$$(G) \frac{3}{6} = 0.5$$

$$(H) \frac{5.4}{6.5} = 0.83$$

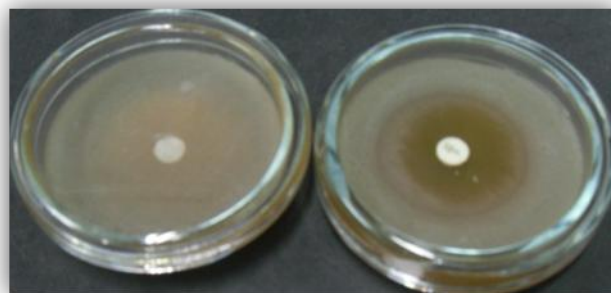
ANEXO 5. Pruebas antimicrobianas



(A) Pruebas antimicrobianas extracto acetato de etilo 75mg/350µL para *Bacillus subtilis* con halos de inhibición de: R1. 11mm, R2. 15mm y R3. 13mm

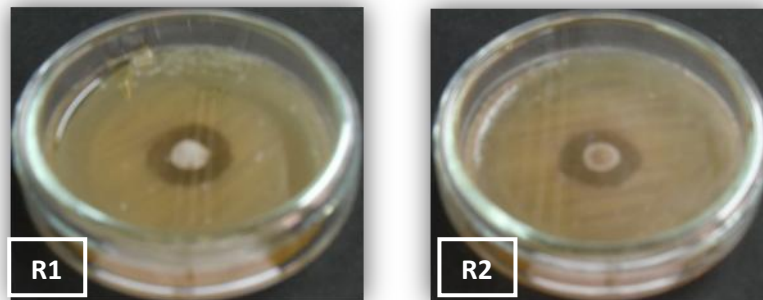


(B) Pruebas antimicrobianas extracto acetato de etilo 50mg/350 µL para *Bacillus subtilis* con halos de inhibición de: R1. 6mm, R2. 10mm y R3. 5 mm

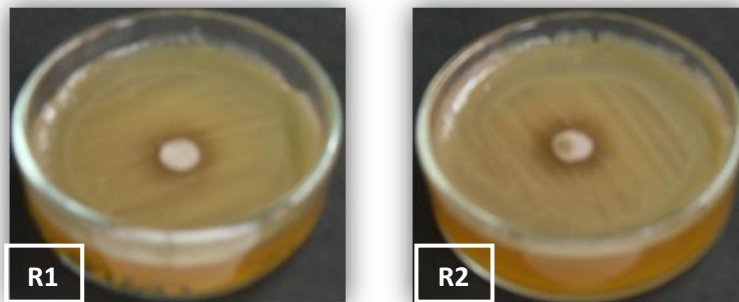


(C) Controles negativo y positivo con DMSO y cloramfenicol 30mg/mL para *Bacillus subtilis* con un halo de inhibición para el control positivo de 35 mm.

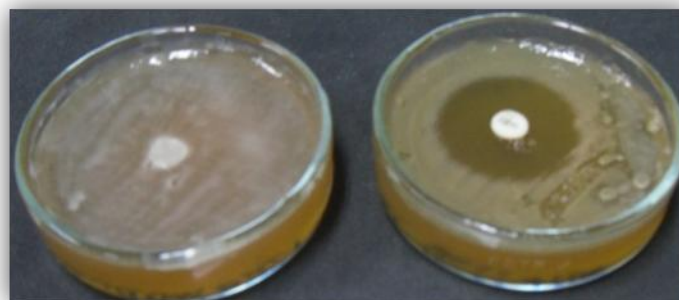
ANEXO 5. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS



(A) *Pruebas antimicrobianas extracto acetato de etilo 75mg/650 μ L para *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición R1. 13 mm y R2. 11 mm*



(B) *Pruebas antimicrobianas extracto acetato de etilo 50mg/350 μ L para *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición R1. 4 mm y R2. 5 mm.*



(C) *Controles negativo y positivo con DMSO y cloramfenicol 30mg/mL para *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición para el control positivo de 30 mm.*

ANEXO 6. Cálculos cantidades de extracto en los discos de las pruebas antimicrobianas

(A) Extracto acetato de etilo 75mg/350 μ L

$$\begin{array}{r} 75 \text{ mg} \longrightarrow 350 \mu\text{L} \\ X \qquad \qquad 20 \mu\text{L} \\ X: 4.2 \text{ mg} \end{array}$$

(B) Extracto acetato de etilo 50 mg/ 350 μ L

$$\begin{array}{r} 50 \text{ mg} \longrightarrow 350 \mu\text{L} \\ X \qquad \qquad 20 \mu\text{L} \\ X: 2.8 \text{ mg} \end{array}$$

ANEXO 7. Medios de cultivo

MEDIO HANSON

GLUCOSA	20 g/L
SULFATO DE AMONIO ((NH ₄) ₂ SO ₄)	8 g/L
FOSFATO DE POTASIO (K ₂ HPO ₄)	5 g/L
SULFATO DE MAGNESIO (MgSO ₄)	1 g/L

Para la solución de microelementos preparar 100 mL y tomar 2 mL por litro

SULFATO FERROSO (FeSO ₄)	0.1 g
SULFATO DE COBRE (Cu ₂ SO ₄)	0.0015 g
SULFATO DE ZINC (ZnSO ₄)	0.016 g
MOLIBDATO DE AMONIO (NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.1 g
DINITRO COBALTO	0.01 g

Esterilizar a 121°C a 15 psi / 15 min.

MEDIO EXTRACTO DE MALTA

EXTRACTO DE MALTA	30 g/L
PEPTONA	5 g/L
AGAR	15 g/L

Esterilizar a 121°C a 15 psi/15 min

Medio Avena

Avena	20 g/L
Agar	15 g/L

Esterilizar a 121°C a 15 psi/15 min

CALDO PGS

PAPA	400 g/L
GLUCOSA	20 g/L
SULFATO DE AMONIO ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3 g/L

Esterilizar a 121°C a 15 psi/15 min