

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
DETECTADOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO DE *Aspergillus* sp. NATIVO DEL PÁRAMO
DE CRUZ VERDE**



PAOLA ANDREA HERNÁNDEZ GUZMÁN

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE PREGRADO
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
GIFUJ
BOGOTA, 2012**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
DETECTADOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO DE *Aspergillus* sp. NATIVO DEL PÁRAMO
DE CRUZ VERDE**

**PAOLA ANDREA HERNÁNDEZ GUZMÁN
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar por el título de
MICROBIOLÓGA INDUSTRIAL

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FITOQUÍMICA UNIVERSIDAD JAVERIANA (GIFUJ)- COLCIENCIAS
METABOLITOS DE CEPAS NATIVAS COLOMBIANAS DE HONGOS FILAMENTOSOS Y EVALUACIÓN
DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Investigador principal: Jorge Robles Camargo
Co-investigadora: Andrea García Caycedo

DIRECTOR: Jorge Robles Camargo
CO-DIRECTORA: Andrea García Caycedo

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
DETECTADOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO DE *Aspergillus* sp. NATIVO DEL PÁRAMO
DE CRUZ VERDE**

PAOLA ANDREA HERNÁNDEZ GUZMÁN

APROBADO

**JANETH ARIAS PALACIOS
DIRECTORA CARRERAS DE
MICROBIOLOGÍA**

**INGRID SCHULER
DECANA ACADÉMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
DETECTADOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO LIQUIDO DE *Aspergillus* sp. NATIVO DEL PÁRAMO
DE CRUZ VERDE**

PAOLA ANDREA HERNÁNDEZ GUZMÁN

APROBADO

**JORGE ROBLES CAMARGO
DIRECTOR**

**ANDREA GARCÍA CAYCEDO
CO-DIRECTORA**

**LUIS DAVID GÓMEZ
JURADO**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Sólo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque los trabajos de grado no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN	11
MARCO TEÓRICO	12
OBJETIVO GENERAL:	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	14
METODOLOGÍA	15
Reactivación de la cepa:	15
Elaboración de un cultivo monospóricó:	15
Identificación de la cepa:	15
Elaboración de un banco de trabajo:	15
Cinética de crecimiento:	15
Determinación de los metabolitos secundarios:	15
Fermentación:	16
Extracción y Fraccionamiento	16
Pruebas de actividad antimicrobiana:	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	22
BIBLIOGRAFIA	23
ANEXOS	27

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por iluminarme y bendecirme durante el desarrollo de este proyecto
- A mis padres y hermanas, por brindar siempre su amor incondicional y el constante apoyo.
- Jorge Robles, por su dirección, apoyo, paciencia, conocimiento, y confianza, que nos brindó en todo momento.
- A Andrea García por su conocimiento y apoyo.

- A mis compañeras de laboratorio por su apoyo y alegría durante este tiempo en especial María Paula por brindarme su amistad y apoyo, por su paciencia y por escucharme siempre.
- A todas mis amigas que siempre estuvieron apoyándome y motivándome incondicionalmente a continuar en el camino y a culminar esta etapa
- A Viviana González por su ayuda en el momento oportuno, por su cariño y amistad
- A todas aquellas personas que ocupan un lugar en mi corazón pues fueron de vital importancia en este proceso. Gracias por su paciencia, amor, amistad, y compañía.
- A los laboratorios de Bioensayos y Química, por permitirme desarrollar mi trabajo de grado.
- A la Pontificia Universidad Javeriana por proporcionarnos las condiciones necesarias para desarrollar nuestras metas.

ABREVIATURAS

g/L	Gramo/Litro
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
L	Litros
mL	Mililitros
µL	Microlitros
UV	Ultravioleta
h	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetro
min	Minutos
cm³	Centímetros cúbicos
%p/v	Porcentaje peso-volumen
Psi	Libras de presión
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDP	Éter de petróleo
DCM	Diclorometano
AcOEt	Acetato de etilo
MetOH	Metanol
CG	Cromatografía de gases

RESUMEN

Los metabolitos secundarios obtenidos a partir de especies de hongos han sido tema de interés, debido a que diferentes estudios han demostrado su capacidad para actuar como antimicrobianos frente a algunos microorganismos de importancia clínica, además de sus múltiples aplicaciones en áreas como alimentos y farmacéutica. Diversas investigaciones se han enfocado en buscar posibles soluciones para tratar microorganismos patógenos que afectan la salud de los seres humanos y la posibilidad de utilizar una herramienta proporcionada por la naturaleza. En este caso la producción de sustancias de interés a partir de hongos, se presenta como una alternativa atractiva para aportar una posible solución a esta problemática. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue realizar la detección de metabolitos secundarios con posible actividad antimicrobiana, mediante la fermentación en medio líquido de una cepa de *Aspergillus sp.* nativa del páramo de cruz verde. Para ello, se caracterizó la cepa nativa de *Aspergillus sp.* que pertenece a la familia de los ascomicetes, y presunta especie *Aspergillus terreus*, seguido a esto se realizó la cinética de crecimiento del hongo en medio líquido SPG (sulfato de amonio, papa, glucosa); de esta manera se lograron establecer parámetros como consumo de azúcares reductores, biomasa y germinación de conidios en función del tiempo; además de esto se hicieron análisis químicos preliminares de los extractos y fracciones obtenidos de la curva de crecimiento para detectar en qué momento se expresan los metabolitos secundarios; para ello se realizó cromatografía en capa fina la cual se leyó con luz UV y fue revelada con vainillina. Al determinar estos parámetros, se realizó la fermentación de la cepa en medio líquido SPG durante 15 días para la detección de metabolitos secundarios, se filtró la biomasa y posteriormente se obtuvieron los extractos y fracciones con el uso de dos solventes de diferente polaridad: éter de petróleo y acetato de etilo, a través del método de fraccionamiento líquido-líquido, donde se obtuvieron 200mg y 600mg de extracto respectivamente. Estas fracciones fueron usadas para realizar las pruebas antimicrobianas: bioautografía y técnica de difusión en pozo, usando concentraciones de 1.2 mg/μL para el extracto de éter de petróleo y 1.6 mg/μL para el de acetato de etilo en dimetilsulfoxido (DMSO); estas concentraciones fueron enfrentadas a las bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) y a las Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), con lo que se evidenció que la fracción de acetato de etilo presenta actividad antimicrobiana frente a las cuatro bacterias enfrentadas, mientras que la fracción de éter no presentó actividad antimicrobiana para ninguna de las bacterias. De acuerdo con los resultados obtenidos es posible afirmar *Aspergillus sp.* es capaz de producir metabolitos con actividad antimicrobiana que pueden ser potencialmente útiles en diferentes campos de la biotecnología, y principalmente ser una alternativa para el tratamiento de bacterias de importancia clínica.

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas, que han sido objeto de estudio durante mucho tiempo, debido a que se ha demostrado que algunos de ellos tienen la capacidad para producir sustancias que son de gran utilidad en diferentes campos de la industria y la biotecnología; dichas sustancias han presentado actividad farmacológica, como antibióticos e inmunosupresores, antitumorales, actividad antimicrobiana, pigmentos, entre otros y se conocen como metabolitos secundarios. (1) Los metabolitos secundarios de los Hongos filamentosos son compuestos que poseen estructura química muy diferente a la de los metabolitos primarios, como lo son, azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos; estos no son esenciales para el crecimiento, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia en la naturaleza. (2)

El género *Aspergillus sp.*, es reconocido como productor de una amplia gama de metabolitos secundarios con actividad biológica, los de mayor importancia, son las micotoxinas y antibióticos; entre estos se destacan las lovastatinas, que es un potente hidroximetilglutaril, usado clínicamente para reducir los niveles de colesterol, y las aflatoxinas que son micotoxinas, que pueden causar efectos adversos en la salud (3). Debido a esto se han desarrollado gran cantidad de estudios que buscan aislar cepas de hongos filamentosos productores de toda clase de metabolitos como enzimas, antibióticos, sustancias con actividad farmacológica, biocontroladores y pigmentos, entre otros (4).

Los estudios que se centran en la búsqueda de cepas de hongos filamentosos que sean productoras de metabolitos secundarios, recurren a la exploración de ecosistemas donde sea posible hallar diversidad de géneros y especies. Los páramos son altamente estudiados, debido a su potencial biotecnológico por las condiciones climáticas extremas a las que se encuentran adaptadas las diferentes especies que lo habitan; adaptaciones que se expresan en producción de enzimas, transporte de nutrientes y competencia con otros organismos (5).

Las especies de *Aspergillus sp.* ya han sido estudiadas anteriormente, debido a que este género es uno de los principales productores de diferentes metabolitos secundarios de origen fúngico (6) (7) tales como: las aflatoxinas, la patulina, ácido penicílico, citroviridina, esterigmatocistina, ocratoxinas, ácido ciclopiazónico y citocalasinas. (8). A su vez cepas aisladas de suelos paramunos, como los de Guasca y Cruz Verde han demostrado tener la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios que poseen actividad antimicrobiana. Por estas razones el objetivo del presente estudio es evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios detectados a partir de fermentación en medio líquido de *Aspergillus sp.*, nativo del páramo de Cruz verde.

JUSTIFICACIÓN

Los hongos producen gran variedad de metabolitos secundarios de interés para el hombre como son: antibióticos, ciclosporinas, ácidos mevinicos, alcaloides, compuestos antifúngicos, pigmentos etc. De todos ellos, la biosíntesis de metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos, ha sido la más estudiada a nivel bioquímico y genético; estudios anteriores han reportado que especies como *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Acremonium sp.*, son las especies más destacadas en la producción de dichos metabolitos (9).

Los metabolitos secundarios muestran diversidad de actividad biológica y a menudo a muy bajas concentraciones; además de ello en los suelos de ecosistemas naturales se encuentran distribuidos organismos que son capaces de sintetizar estos metabolitos que pueden ser útiles a nivel industrial (10). Actualmente se han convertido en un tema de interés debido a su alto potencial en el campo de la biotecnología, el uso en la agricultura y tratamiento de enfermedades (11).

Debido a la gran diversidad de los suelos paramunos en Colombia, estos son una fuente principal de exploración; ya que representan infinidad de posibilidades y nuevas alternativas en la industria de alimentos, producción de químicos, productos farmacéuticos etc. (5). Estudios anteriores realizados a partir de cepas nativas del páramo de Cruz Verde, han demostrado la existencia de sustancias con actividad antimicrobiana mediante la detección de metabolitos secundarios.(2)(5)

Por estas razones, el presente trabajo pretende evaluar si los metabolitos secundarios de *Aspergillus sp.*, nativo del páramo de Cruz Verde detectados por fermentación en medio líquido poseen actividad antimicrobiana; y de esta manera contribuir con estudios anteriores que se han encargado de la investigación de metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos nativos del suelo.

MARCO TEÓRICO

Los hongos son organismos eucariotas, que presentan ergosterol hacia el exterior en la membrana citoplasmática, la pared celular está compuesta por polisacáridos principalmente: quitina (polímero de de n-acetil glucosamina), el manano (polímero de manosa), glucano (polímero de glucosa) y proteínas. Se encuentran clasificados en el Reino Fungí, que se divide en cinco *Phyla* denominados *Ascomycota* (el más extenso que comprende el 50% de los hongos conocidos), *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* y *Glomeromycota* (12). Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Las hifas crecen por extensión apical de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de sustratos complejos (13).

Estos organismos presentan un metabolismo quimioheterótrofo, es decir que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos, mediante exoenzimas que degradan diversidad de compuestos que posteriormente son absorbidos a través de la pared (12). Fisiológicamente, los hongos filamentosos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, su desarrollo en sustratos puede ser con concentraciones altas de azúcar, hasta del 10%, debido a que estos no son sensibles a la presión osmótica elevada; creciendo lentamente de 5 a 7 días, y resistiendo condiciones de acidez relativamente altas (pH entre 2-9) y óptimo 5 a 6 (14.)

El género *Aspergillus sp.* se encuentra distribuido en una amplia gama de hábitats (15) y presentan un amplio rango de temperatura, humedad y aerobiosis para su desarrollo.(16). Se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán los conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fialides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas biseriadas. (17).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular, que son heterogéneos estructuralmente; estos son producidas por un gran número de microorganismos, especialmente por bacterias y hongos que viven en el suelo, lo cual se debe principalmente a que estos microorganismos se desarrollan en ecosistemas complejos en los cuales compiten constantemente con otros organismos; a su vez estos son un recurso natural, y representan un potencial en el ámbito de fármacos terapéuticos. (18)(19). Los suelos en particular son un extenso nicho de exploración ecológica en lo que hace referencia a la búsqueda de microorganismos que sean productores de compuestos con actividad biológica que útiles en la industria, como por

ejemplo los antibióticos. Estudios actuales enfatizan en la necesidad de explorar nuevos ecosistemas como esponjas marinas, bosques y páramos donde se puedan hallar microorganismos productores de metabolitos promisorios para la biotecnología. (20)(21). Los páramos en Colombia presentan amplia diversidad biológica, además el potencial biotecnológico es muy grande, debido a las condiciones climáticas extremas a las que se encuentran adaptadas las diferentes especies que lo habitan. (22).

Se define páramo como un ecosistema de alta montaña, ubicado entre el límite superior del bosque Andino, y, si se da el caso, el límite inferior de los glaciares o nieves perpetuas, en el cual domina una vegetación herbácea y de pajonales, frecuentemente frailejones y pueden haber formaciones de bosques bajos y arbustivos y presentar humedales como los ríos, quebradas, arroyos, turberas, pantanos, lagos y lagunas (23). El páramo de Cruz Verde se encuentra en el kilómetro 10 al suroeste de la ciudad de Bogotá, vía del municipio de Choachí- Cundinamarca, con temperatura promedio de 8,4° C y precipitación de 1200mm; es una región con abundante matorral y los suelos se caracterizan por tener un alto contenido de materia orgánica. (24)

Existen diferentes tipos de fermentación para la obtención de metabolitos secundarios, pero se ha reportado que hongos filamentosos en fermentación líquida son capaces de producir concentraciones considerables del compuesto durante la ideofase; es decir cuando ya ha finalizado su etapa de crecimiento. (25.)

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios detectados por fermentación en medio líquido de *Aspergillus sp.* nativo del paramo de Cruz Verde

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Reactivar, conservar e identificar una cepa de *Aspergillus sp.*, nativa del páramo de cruz verde.
- Realizar curva de crecimiento en el sustrato seleccionado.
- Realizar análisis químicos preliminares de los extractos y fracciones obtenidos de la curva de crecimiento en el medio líquido SPG.
- Realizar pruebas de actividad antimicrobiana con los diferentes extractos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

METODOLOGÍA

Reactivación de la cepa: La cepa suministradas por el GIFUJ, obtenida a partir de muestras de suelo del Páramo de Cruz verde, conservada en tubo de agar se repico en agar PDA para su reactivación, el medio inoculado se llevo a incubación 7 días a 25°C.

Elaboración de un cultivo monospórico: Se realizó un cultivo monospórico a partir de la suspensión de conidios en Tween 1% (v/v), posteriormente se llevo a cabo un recuento en cámara de Neubauer, y se hicieron diluciones en base diez con un volumen final de 5mL, hasta obtener una concentración de 1×10^6 conidios por mililitro, finalmente se sembró por agotamiento en agar SPG y se incubó a 25°C.

La selección del conidio germinado se realizó a las 18 horas de la siembra, la cual se incubó nuevamente durante 48 horas para posteriormente realizar un repique en agar SPG.

Identificación de la cepa: Al obtener el microorganismo axénico y viable, por medio del cultivo monospórico, se realizó la clasificación a partir de repiques hechos en 2 medios de cultivo diferentes: agar SPG y agar Extracto de malta (MEA) (26), la identificación se realizó mediante el uso de claves taxonómicas de Samsom y Hoekstra *et al*, 2000 (27), inicialmente se recibió una cepa del banco del GIFUJ, que había sido clasificado dentro del género de *Penicillium sp.*, más al realizar la caracterización macroscópica y microscópica se obtuvo que la cepa a tratar no era *Penicillium sp* sino que era una cepa perteneciente al género *Aspergillus sp.*; fue posible la identificación de acuerdo a características macroscópicas como el diámetro, color (anverso y reverso), pigmentos difusibles, exudados textura de la colonia; y características microscópicas como cabezas conidiales, forma de la vesícula, disposición de las fialides, la presencia o ausencia de métulas, la forma tamaño de los conidios.

Elaboración de un banco de trabajo: A partir del cultivo monospórico se elaboró un banco de trabajo, conservando la cepa por diferentes métodos; uno de ellos fue la conservación en suelo, según la técnica de Chang y Miles, 1989 (28), y conservación en agua destilada según la metodología realizada por Beltrán, 2006(29). (figura3)

Cinética de crecimiento: La curva de crecimiento se realizó por triplicado durante 15 días en erlenmeyers de 250mL con 45mL de medio líquido SPG y cada uno fue inoculado con 5mL de una concentración de $10^6 - 10^8$ conidios/mL de la cepa, y se sometieron a una constante agitación de aproximadamente 120rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se cuantificó la biomasa mediante la determinación de peso seco (55°C por 24 horas), se realizó el recuento de conidios, y adicionalmente se empleó la técnica de DNS para la cuantificación de azúcares reductores según Miller, 1959. (30)

Determinación de los metabolitos secundarios: Durante el proceso de la cinética de crecimiento se recogió la fase acuosa del filtrado para la determinación del peso seco de cada uno de los días, y seguido a esto se realizó el proceso de extracción mediante el uso de solventes con dos polaridades diferentes: baja (éter de petróleo) y alta (acetato de etilo), finalmente obtenidos los

diferentes extractos se realizaron cromatografías en capa delgada de cada uno por cada día según la metodología empleada por Frisvad y Andersen *et al.*, 2008 (31)

Fermentación: La fermentación se llevó a cabo en el medio SPG con un volumen total de 2L, en 2 frascos de vidrio grandes de 2L con un volumen total de 1L, a temperatura ambiente durante 16 días en agitación constante a 120rpm. Para lo cual previamente se realizó un preinóculo del 10% del volumen a fermentar, el cual se puso en agitación a 120rpm durante 5 días, para asegurar que durante el tiempo de fermentación se expresen únicamente los metabolitos de interés. Posteriormente se realizó un proceso de filtración al vacío y se recogió la fase acuosa, y la biomasa se secó a 50°C por 24 horas.

Extracción y Fraccionamiento

La extracción de la fase acuosa se realizó separando la biomasa del medio en condiciones de vacío, posteriormente mediante el uso de solventes con dos polaridades diferentes: baja (éter de petróleo), y alta (acetato de etilo) se obtuvieron las fracciones correspondientes. La detección de los metabolitos secundarios obtenidos, se hizo por CCF de acuerdo a la metodología empleada por Parvatkar y D'Souza *et al.*, 2009 (5) y Slack y Puniani *et al.*, 2009 (32)

Pruebas de actividad antimicrobiana: Se realizaron pruebas antimicrobianas contra las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, y las Gram negativas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediante la técnica de bioautografía según la metodología descrita por A Martson (33) y difusión en pozo. Posteriormente se realizó cromatografía de gases acoplado a detector de masas para realizar la comparación de las sustancias con las de la base de datos del equipo (librerías Nist 0.5 y Willey 7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de la cepa obtenida del banco del laboratorio de química microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana, se realizó teniendo en cuenta características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas, para lo que se hicieron siembras en medios de cultivo como PDA y Extracto de Malta, en dichos medios se evaluaron las diferentes características, y se observó que eran representativas del género *Aspergillus sp.*, entre las que se encontraban micelio con hifas hialinas septadas, cabezuelas de origen en células hifales especializadas, paredes gruesas y vesículas globosas (33) (Figura 1). Posteriormente se realizó el seguimiento de la clave taxonómica de Samsom y Hoekstra *et al*, 2000 (27), identificando al microorganismo posiblemente como *Aspergillus terreus*, debido a las características macroscópicas y microscópicas observadas tales como colonias aterciopeladas, reverso amarillo, tornándose café, exudado incoloro y pigmento difusible al medio; microscópicamente conidios hialinos globosos conidióforos lisos y vesícula subglobosa.(Figura 2) Sin embargo para la confirmación de la especie se recomienda realizar pruebas moleculares.

Una vez se identificó el organismo se realizó un cultivo monospórico para mantener la cepa en condiciones axénicas y con el cual se pretendía que la cepa conservara las características tanto bioquímicas como fisiológicas (34).

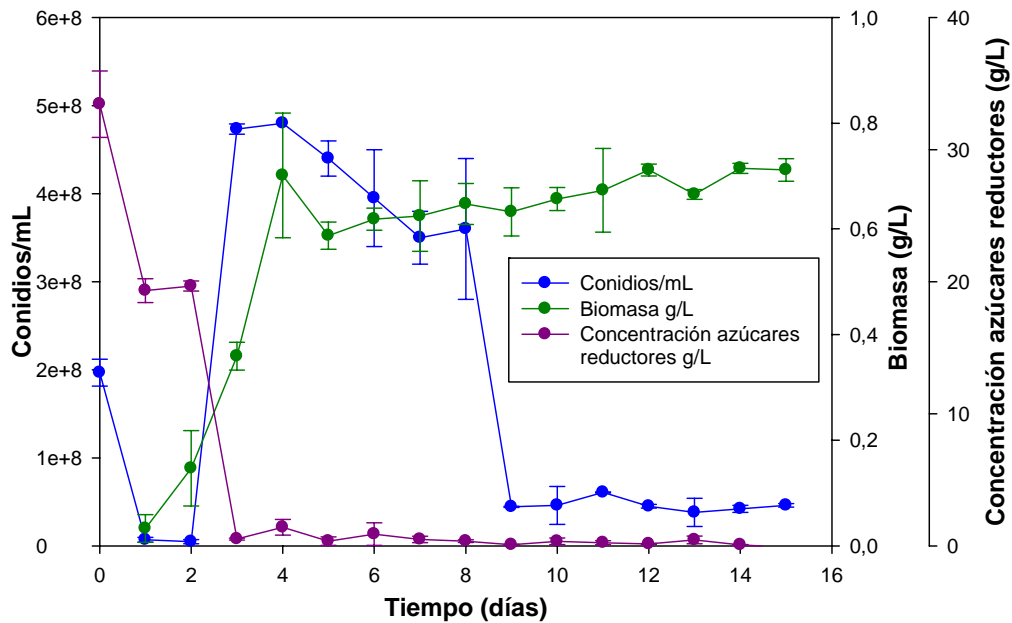


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Aspergillus sp.*

Posteriormente llevó a cabo la cinética de crecimiento del microorganismo, esta se realizó en medio líquido SPG; este es un medio de fácil preparación y económico. De otro lado tiene componentes que proporcionan las fuentes de carbono necesarias para su crecimiento óptimo.

Hay estudios que reportan que la alta producción de metabolitos secundarios así como la concentración de los mismos en hongos pertenecientes al género *Aspergillus sp.*, depende principalmente de que el medio de cultivo en el cual se desarrollen, contenga altas concentraciones de glucosa o sacarosa, extractos de levadura o malta, agregados minerales y metales trazas (35).

En la figura 4 se observó que la mayor producción de biomasa fue cuantificada el día 14, dicho crecimiento se generó en forma de pellets; según Kim y Song en el 2009, la formación de pellets en medio líquido es uno de los factores más influyentes en la expresión de metabolitos secundarios, pues la transferencia de oxígeno y la cantidad de metabolito secundario expresado, depende del tamaño y la morfología del pellet (36). De igual forma, se evidenció que a medida que aumenta la biomasa, la formación de conidios disminuye; esto se debe a que los pellets son obtenidos a partir de la germinación de esporas suspendidas en el medio (37).

Se observó el efecto del sustrato en el crecimiento del microorganismo, pues hubo consumo de azúcares reductores como la glucosa, y así mismo un aumento de biomasa proporcional (Figura 4).

Luego de determinar las mediciones correspondientes durante la curva de crecimiento; se obtuvieron los extractos, para realizar una cromatografía en capa delgada, la cual es una técnica de separación, basada en la distribución de los compuestos entre una fase móvil y una fase estacionaria donde la acción capilar del adsorbente se deposita en forma de capa delgada sobre una placa de vidrio o de plástico **(38)**. Esto se hizo para determinar en qué fase de la curva de crecimiento se producen los metabolitos secundarios; al observar la cromatografía, se evidenció que efectivamente hay compuestos que pueden ser considerados como metabolitos secundarios y que están presentes a partir del día 11 en adelante, en las dos fracciones. (Figura 5 y 6).

Posteriormente se realizó una fermentación discontinua en medio líquido SPG durante 16 días, a oxigenación constante 120rpm y temperatura ambiente; se realiza este tipo de fermentación, debido a que permite controlar factores como: transferencia de oxígeno, y homogenización principalmente, lo cual le confiere una ventaja frente a las fermentaciones en medio sólido, ya que es fácilmente manejable y rentable debido a la reproducibilidad de los resultados obtenidos (39).

De la fermentación se obtuvieron dos fracciones para los solventes Éter de Petróleo y acetato de etilo, 200mg y 600mg respectivamente, las cuales fueron usadas para realizar las pruebas antimicrobianas. Para ello se realizaron nuevamente cromatografías en capa delgada evidenciándose la presencia de compuestos al observarse bajo luz UV de onda corta 256nm y larga 336 nm. Teniendo en cuenta que en la técnica de cromatografía de capa delgada, el solvente utilizado como fase móvil arrastra los compuestos que coinciden con su polaridad, se muestra en la primera cromatografía, cuya fase móvil fue éter de petróleo-acetato de etilo en proporción 9:1 un compuesto de baja polaridad ubicado en la parte media y en la segunda cromatografía, cuya fase móvil fue diclorometano-metanol en proporción 8:2 (polar), también fue encontrado un solo compuesto de alta polaridad fue detectado en la parte inferior. (Figura 7).

Cuanto mayor es la polaridad de los compuestos, más intensamente se ven éstos atraídos por el adsorbente. De mayor a menor polaridad los grupos funcionales se ordenan en hidrocarburos saturados, hidrocarburos no saturados, halogenuros de alquilo y arilo, aldehídos, cetonas, esterres, alcoholes, tioles, aminas y ácidos carboxílicos (40). Comparando los resultados de la cromatografía de capa delgada con la cromatografía de gases, es posible que en el extracto de este estudio se encuentren ácidos tales como ácido penicílico y/o ácido ciclopiazónico, de baja polaridad, lo que concuerda con Carillo (2003), quien dice que *Aspergillus sp.*, produce aflatoxina, patulina, ácido penicílico, citroviridina, esterigmatoscistina, ocratoxina, ácido ciclopiazónico.

De igual forma según Arévalo y colaboradores (2006) los esteroides, los terpenos y aflatoxinas se observan a la luz ultravioleta como manchas azules y violetas de diferentes tonalidades; es decir que en este estudio es posible encontrar dichos compuestos con actividad antimicrobiana.

Para las pruebas antimicrobianas se realizaron dos procedimientos que evalúan la actividad de los extractos, se usó el método de bioautografía que es un método cualitativo por medio del cual se debe observar la inhibición de la bacteria por la concentración del extracto que se adhiere al medio. Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, (41), realizando el ensayo

a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, como se hizo previamente. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada (42).

Los resultados obtenidos para estas pruebas se observan en la figura 8, donde se realizó el procedimiento enfrentando los extractos a cuatro diferentes bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*); allí se evidencia que después del periodo de incubación el extracto de la fracción de acetato de etilo (AcOEt) presentó actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, lo que se manifestó en la aparición de zonas de aclaramiento en el medio, lo que indica inhibición de la bacteria por parte de la sustancia; de otro lado, la fracción de éter de petróleo (E.P) no tuvo acción antimicrobiana contra ninguna de las bacterias evaluadas.

Paralelamente se realizó la prueba de difusión en agar, para la cual se emplearon las mismas bacterias, pero se usó una concentración conocida de los extractos, en este caso se empleó una concentración de 1.2 mg/μL para el extracto de éter de petróleo y 1.6 mg/μL, para acetato de etilo; este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (43).

En los resultados es posible observar que el extracto de éter no inhibió ninguno de los microorganismos evaluados; (figura 9) resultados que concuerdan con las pruebas de bioautografía; esto se puede deber a que no se encuentran compuestos con actividad antimicrobiana en el extracto o a que no hay suficiente concentración del compuesto para actuar como inhibidor del crecimiento bacteriano; cabe anotar que el no encontrar inhibición contra los diferentes microorganismos ensayados, no significa que no se encontraran metabolitos secundarios con actividad biológica, sino que posiblemente se puede presentar el fenómeno de sobrelapamiento, el cual consiste en que la actividad de una o más sustancias presentes en la fase acuosa de manera individual, pueden ser inhibidos por la combinación de todas las sustancias presentes en la muestra (44). Por el contrario el extracto de acetato de etilo (AcOEt) inhibió el crecimiento de las cuatro bacterias evaluadas (figura 9); este resultado no concuerda en su totalidad con los obtenidos en la bioautografía, sin embargo es posible que los resultados de la prueba se hayan dado de esta forma debido a que la concentración usada en la técnica de difusión en pozo es más alta que la que se utiliza en la bioautografía. Esto indica que en el extracto de acetato de etilo contenía un compuesto que presenta actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. En el caso de compuestos con actividad antibiótica se ha reportado que existen diferentes mecanismos por medio de los cuales estas sustancias pueden afectar el crecimiento de las bacterias, a su vez estos compuestos tienen diferentes puntos de acción, están los que actúan sobre la pared bacteriana, la membrana celular, interfieren en la síntesis de proteínas y síntesis de nucleótidos, lo cual impide el desarrollo de la bacteria. (45)

Debido a los resultados obtenidos en las pruebas antimicrobianas, se realizó cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas al extracto de AcOEt, para determinar las sustancias que se encuentran presentes y que se podrían asociar a la actividad antimicrobiana reportada, detectándose los siguientes compuestos:

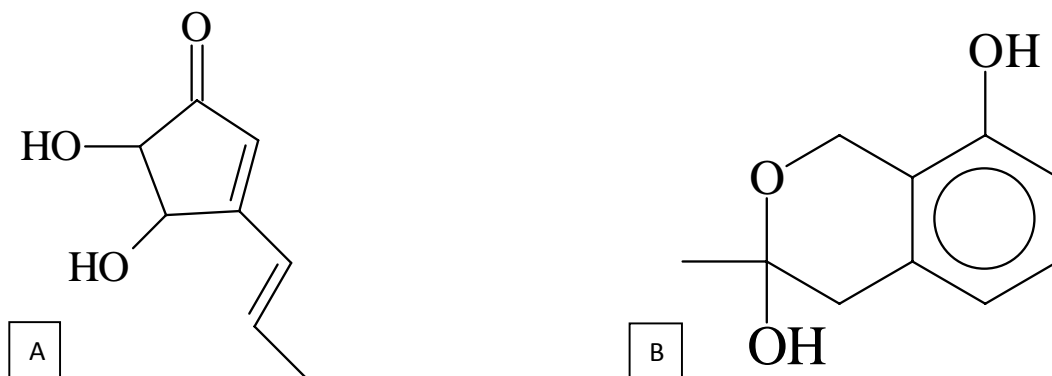


Figura No 10. Compuestos obtenidos a partir del extracto de AcOEt, basado en el análisis del cromatograma de gases-con detector de masas.

A. Terreina **B.** 1H-2-Benzopirran-1-ona, 3,4-dihidro-3,8-dihidroxi-3-metil-,
Elaboración propia.

La Terreina es un compuesto previamente reportado en este hongo (46) que se logró detectar en este estudio, confirmando químicamente la similitud con la especie *Aspergillus terreus*. Este compuesto ha demostrado inhibición en el crecimiento de plantas y bacterias (46) y por lo tanto, se propone como el posible responsable de la actividad antimicrobiana que presentó este extracto.

De otro lado el compuesto B, se clasifica como una cumarina las cuales son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y que pueden ser sintetizadas por hongos y plantas; tienen una estructura común de 1H-2-benzopirran-1-ona. Estas se obtienen del metabolismo secundario por vía del ácido shikímico. La propiedad física más importante de estos compuestos es la fluorescencia generada con la luz ultravioleta (365 nm), propiedad ampliamente usada para su detección; además de esto, cabe anotar que las aflatoxinas son compuestos que contienen un núcleo cumarina fusionado, a su vez ha sido reportado que especies de *Aspergillus sp.* son productoras de aflatoxinas,(47)(48), razón por la cual es posible que los compuestos observados en las cromatografías de capa delgada con esta fluorescencia se trataran de cumarinas las cuales son precursores de aflatoxinas como se mencionaba anteriormente.

Las cumarinas presentan un amplio rango de actividad biológica, como la acción anticoagulante y antibacteriana del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, etc., se destaca además, el uso de cumarinas como saborizantes y en perfumería (47) (49), por ello posiblemente la actividad antimicrobiana que arrojaron los resultados pueda deberse a la acción de este compuesto.

Es importante resaltar que la actividad antimicrobiana detectada no se atribuye a un compuesto en específico, debido a que es posible que se encuentren mezclas de sustancias, lo cual es muy común cuando de metabolitos secundarios se trata y porque se está ensayando un extracto o fracción en donde puede existir el sinergismo.(50).

CONCLUSIONES

- *Aspergillus sp.* nativo del páramo de Cruz verde es capaz de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.
- Se obtuvo actividad antimicrobiana por parte del extracto de Acetato de etilo contra las cuatro bacterias evaluadas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; con una concentración de 1.6 mg/μL, obtenido durante la fermentación en medio líquido de *Aspergillus sp.*
- Se detectó la presencia de cumarinas y terreina en la fracción que presentó actividad antibacteriana, estos compuestos reportan dicha acción contra microorganismos, además de ser compuestos propios del metabolismo secundario de *Aspergillus sp.*

RECOMENDACIONES

- Se recomienda además, realizar cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas, a las fracciones de la cinética de crecimiento, lo cual permitirá confirmar la formación de los compuestos detectados al final de la fermentación.
- Se recomienda realizar estudios para evaluar la actividad antimicrobiana teniendo en cuenta los compuestos encontrados específicamente para confirmar su actividad biológica.
- Finalmente se recomienda, continuar con el proceso de purificación de las sustancias con actividad antimicrobiana

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hyuk, J. Keller, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi
Annu. Rev. Phytopathol 2008; **43** 437-458
- 2) Segura LM. Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium spg 28*. aislada del paramo de guasca, departamento de Cundinamarca. Grupo de Investigación en Biotransformación (GIBUJ). **Tesis Pregrado**. Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. 2006. 1-22 Pp.
- 3) Haylon, A. stress and release: chemical modulation of secondary metabolites. 2006.
- 4) Segura L. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios obtenidos por fermentación en medio sólido de *penicillium roseopurpureum* nativo del páramo de guasca, Cundinamarca **Tesis pregrado**. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2010, 43p.
- 5) Arias L., Piñeros P. Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de grado de Pregrado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 2008.
- 6) Parvatkar R, D`souza C, Tripathi A, Naik C. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Elsevier, Phytochemistry*. 2009; 70, 128-132
- 7) Frisvad JC, Larsen T, De Vries R, Meijer M, Houbraken J, Cabañes FJ, Ehrlich K, Samson RA. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Stud Mycol*. 2007; 59, 31-7.
- 8) Carrillo L. Hongos de los Alimentos y los Forrajes. Primera edición. Editorial Salta. 2003. 165p.
- 9) Gutiérrez, S; Casqueiro, J; Martín, F. 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Rev Iberoamericana Micología*. (17): S54-S60
- 10) Karlovsky, P. Secondary Metabolites in Soil Ecology Chemical Interactions in Soil 2004. Pp3-12
- 11) T. Robinson, T., Singh, D., Nigam, P., *Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. Apply Microbiology Biotechnology* (2001) (55):284-289
- 12) Aristegui B. El reino de los Hongos. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 1-3.

- 13) Romero, S, Producción de Invertasa por, *Aspergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA. 2001
- 14) Moreno, Z. 2000. Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico de hongos filamentosos aislados de la planta *Eespeletia barclayana*. Microbiologo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. BogotáD.C. 74 pg.
- 15) Chan P-K, Ehrlich K. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 138, 189–199
- 16) Pointing S.B, Hyde K.D. BioExploitation of Filamentous Fungi. *Fungal Diversity Press, Hong Kong*. 2001; 223, E251
- 17) Rangel-Ch JO. Consideraciones sobre la diversidad y la vegetación de alta montaña en Colombia. En: J.A. Lozano & D. Pabón. (eds). Memorias del I seminario taller sobre alta montaña colombiana. Acad.Colomb.Cienc. Colección de Memorias, N° 3:33-60. 2001
- 18) Frank, H. K. 1972. Mykotoxine und ihre Produzenten in landwirtschaftlichen Produkten. Ber. Landwirtsch. 50:240-255.
- 19) Sanglier JJ, Haag H, Huck TA, Fehr T. Review of actinomycetes compounds: 1990—1995. *Expert Opin Invest Drugs* 1996; 5: 207—23.
- 20) Waksman SA. Classification, identification and description of genera and species. In: Waksman SA, editor. *The Actinomycetes*, vol. 2. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1961. p. 1- 363.
- 21) Kumar, G. Mongolla, P, Joseph, J. Journal Antimicrobial activity from the extracts of fungalisolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de Mycologie Médicale* .2010; 20: 283—289
- 22) Ospina M. El Páramo de Sumapaz un ecosistema estratégico para Bogotá. Sociedad Geográfica de Colombia. Ponencia de posesión como Miembro de la Sociedad Geográfica de Colombia. 2003. www.sogeocol.edu.co Consultado el 15 de Abril de 2012.
- 23) Proyecto Ley De Paramos. Proyecto de Ley No 032 De 2003, Senado y No 242 de 2004, Cámara —Por medio de la Cual se Dictan Disposiciones para Garantizar la Conservación y Uso Sostenible de las Aéreas de Paramo en Colombia
- 24) Cárdenas, G., Moreno, G 1993. Características foliares adaptativas en seis comunidades vegetales del páramo de Cruz Verde, Colombia. *Biólogo*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá. 148 p.
- 25) Demain A. Regulation of Secondary metabolism in Fungi. *Pure & Appl Chem* 1986; 58, 219-226.

- 26) Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi Sh, Rezaie S, Mahmoudi M. Identification of *Aspergillus* Species Using Morphological Characteristics. *Pak J Med Sci.* 2007; 23, 867-872.
- 27) Samson R, Hoekstra E, Van Oorschot C. Introduction To Food-Borne Fungi. . 2000.
- 28) Chang S.T, Miles P.G. 1989. Edible Mushrooms and Their Cultivation. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 29) Beltran A. Caracterización Química de Metabólitos Secundarios Producidos en la Fermentación de Dos Cepas Nativas de *Acremonium* sp. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 2006.
- 30) Miller G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.*1959. 3: 426-428.
- 31) Frisvad J, Andersen B, Thrane U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *mycological research.* 2008; 2, 231-240.
- 32) Slack G, Puniani E, Frisvad J, Samsom J, Miller D. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *mycological research.* 2009; 113, 480-490.
- 33) García, L., Verástegui, L. 2001. Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa Nativa de *Aspergillus* sp. aislada del páramo del Tablazo. Departamento de Cundinamarca. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 72 p.
- 34) Estrada V, Vélez A, Montoya R. Caracterización de cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé.*1997; 4, 217-224.
- 35) Frisvad J, Andersen B, Thrane U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *mycological research.* 2008; 2, 231-240.
- 36) Kim YM, Y Song HG. Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phtalatedegradation. *Journal of Microbiology.* 2009; 47(4):420-424
- 37) Casas López, J.L; Sánchez Pérez, J.A; Fernández Sevilla, J.M; Rodríguez Porcela, E.M Y. Chistib. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. 2005.
- 38) Durst D, Gokel G. 1985. Química orgánica experimental. Editorial Reverté. Barcelona, España. p. 79-90
- 39) Laskin A, Gadd G, Sariaslani S. *Advances in Applied Microbiology.* 2008. Academic Press. 352 pp. 44.

- 40) Rodríguez, J. 2004. Prácticas de Fundamentos químicos de la Ingeniería – 4: cromatografía de capa fina. Encontrado en <http://www.unedcervera.com>
- 41) Schmourlo G, Mendonca-Filho RR, Alviano CS, Costa SS, "Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal food plants." *Ethnopharmacology*, Vol. 96(3), pp. 563, 2004.
- 42) Ncube N. S, Afolayan A. J, Okoh A. I, "Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7(12), pp. 1797, 2008.
- 43) L. Barry, D. Amsterdam, M. B. Coyle, E. H. Gerlach, C. Thornsberry, H. R. W, "Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." *J. Clin. Microbiology.*, Vol. 10, pp. 910, 1979.
- 44) Shmid I, Sttler I, Grabley S, Thiericke R. Natural Products in High Throughput Screening: Automated High- Quality Sample Preparation. *Journal of biomolecular screening*. 1999; 4, 15-25.
- 45) Puglia M. Microbial Technologies for the Discovery of Novel Bioactive Metabolites. *Journal Biotechnology*. 2002; 99, 187-198.
- 46) Sigma 2007. Product information. Terrein from *Aspergillus terreus*. In <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/9/t5705dat.Par.0001.File.tmp/t5705dat.pdf>
- 47) Murray, R., J. Mendez and S.A. Brown, "The Natural Coumarins" John Wiley & sons Ltd, N. Y 1982.
- 48) Peterson SW et al. 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and A. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification.
- 49) Samson RA, Pitt JI, editores. Harwood Academic Publishers, Australia. pp. 447-458
- 50) Lock de Ugaz, O. "Investigación Fitoquímica – Métodos en el estudio de productos naturales". Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994

ANEXOS

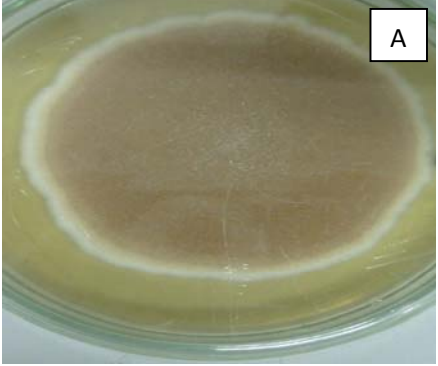

MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS	FOTO
SPG	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento lento de forma regular. • Colonias de color café. • Textura pulverulenta-aterciopelada. • No produce exudados. • Produce pigmento amarillo verdoso. 	
EXTRACTO DE MALTA	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento rápido de forma regular. • Colonias de color amarillo cremoso. • Textura pulverulenta. • Produce exudados. <p>Produce pigmento amarillo verdoso</p>	

FIGURA No1. Identificación macroscópica de *Aspergillus sp.* sembrada a 25°C, en diferentes medios de cultivo **A.** Medio SPG **B.** Medio Extracto de malta. Fuente: Elaboración propia.

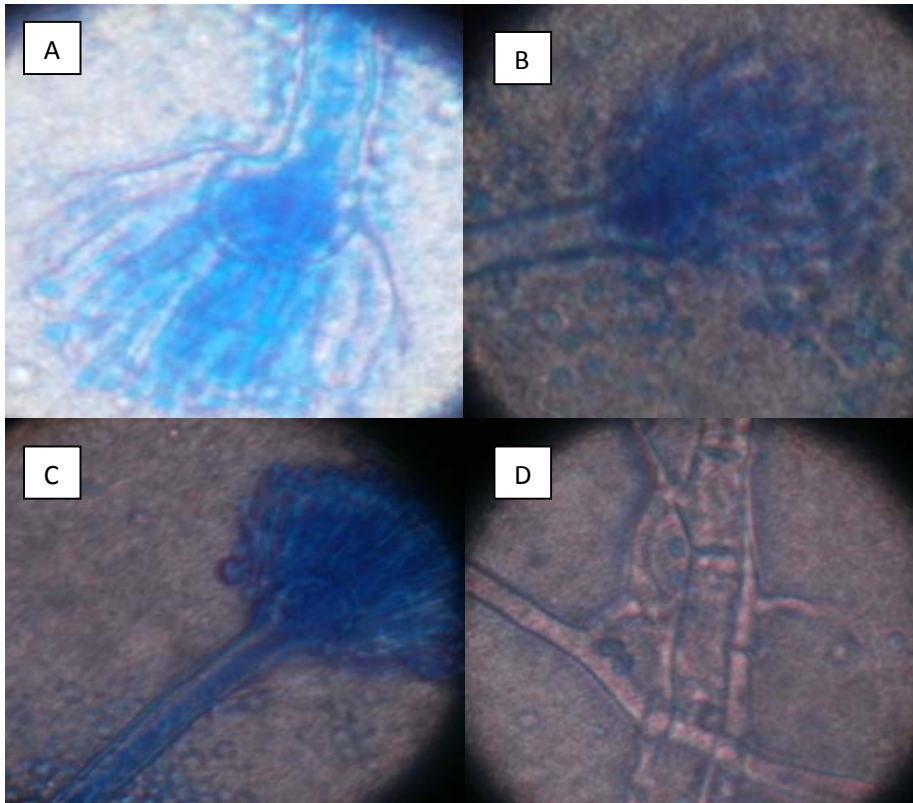


Figura No 2 Identificación microscópica de mediante la técnica de impronta con azul de lactofenol **A, B, C, D** micelio vegetativo. **Fuente:** Elaboración propia.

- Cabezas conidiales columnares compactas.
- Conidióforos lisos hialinos.
- Vesícula subglobosa.
- Métula, Fiálides.
- Conídios hialinos globosos.



FIGURA No 3. Conservación de la cepa. **A.** B Suelo. **B.** Solución salina. **C.** Aceite mineral. Fuente: Elaboración Propia.



FIGURA No 5 Detección de Metabolitos secundarios a partir de la cinética de crecimiento durante 15 días en medio líquido SPG de la cepa mediante extracción con éter de petrolero. CCD, Fase Móvil: Éter de petróleo-Acetato de etilo (9:1). Revelado con vainillina en ácido sulfúrico concentrado. Fuente: Elaboración propia.

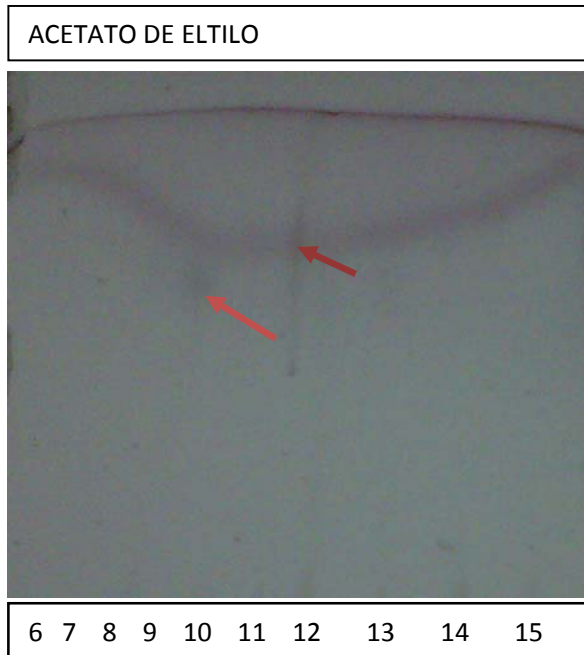


FIGURA No 6 Detección de Metabolitos secundarios a partir de la cinética de crecimiento durante 15 días en medio líquido SPG de la cepa mediante extracción con Acetato de etilo. CCD, Fase Móvil: diclorometano-metanol (8:2) Revelado con vainillina en ácido sulfúrico concentrado. Fuente: Elaboración propia.


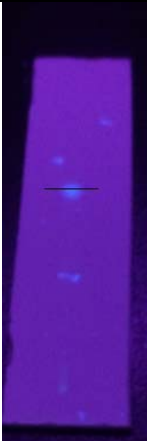


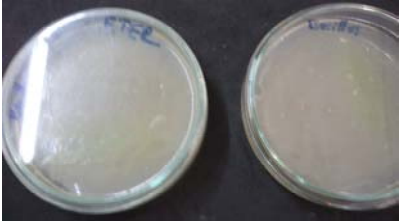

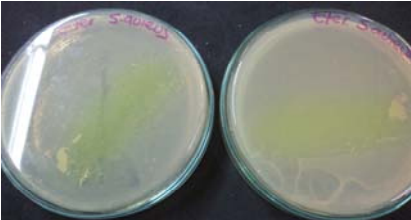


Revelador	Muestra	Fotografía con luz UV (Onda corta 256 nm)	Fotografía con luz UV (Onda larga 366 nm)	Rf
Vainillina (alcoholes, esteroides, fenoles, aceites esenciales)	Extracción Éter de petróleo <i>Aspergillus sp.</i> Fase móvil: éter de petróleo – acetato de etilo 9:1			0.603
	Extracción de Acetato <i>Aspergillus sp.</i> Fase móvil: Diclorometano – metanol 8:2			0.83

Figura 7. Cromatografía de capa delgada. La letra [a] en todas las fotos muestra la distancia recorrida por la fase móvil utilizada

FRACCIÓN	MICROORGANISMO	IMAGEN
ÉTER DE PETRÓLEO (E.P)	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	

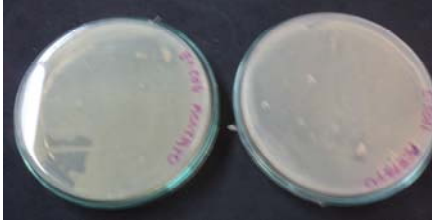

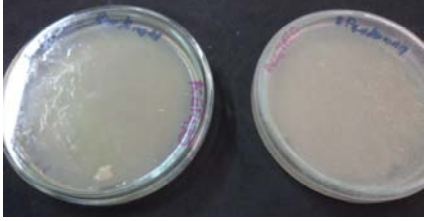
ACETATO DE ETILO (AcOEt)	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

FIGURA No 8. Evaluación de actividad antimicrobiana mediante bioautografía

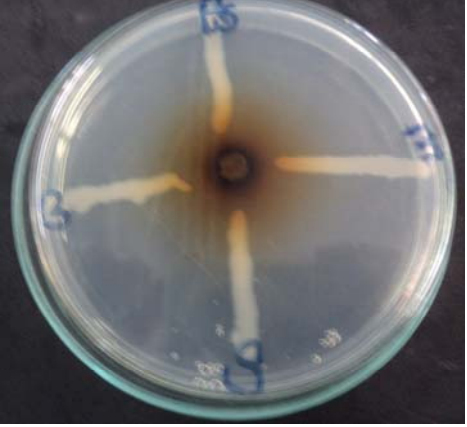
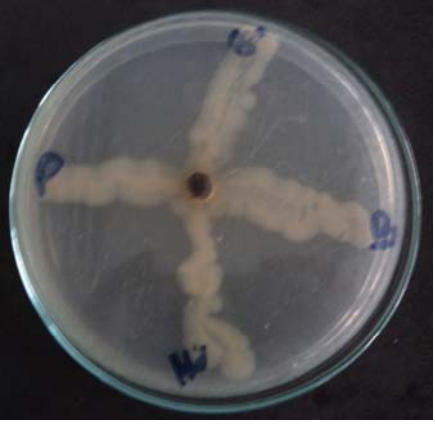
FRACCIÓN	MICROORGANISMO	IMAGEN
ACETATO DE ETILO	<p><i>Ps: Pseudomonas aeruginosa</i> <i>B: Bacillus subtilis</i> <i>S: Staphylococcus aureus</i> <i>E: Escherichia coli</i></p>	
ETER DE PETROLEO	<p><i>Ps: Pseudomonas aeruginosa</i> <i>B: Bacillus subtilis</i> <i>S: Staphylococcus aureus</i> <i>E: Escherichia coli</i></p>	

FIGURA No 9. Evaluación de actividad antimicrobiana mediante difusión en pozo

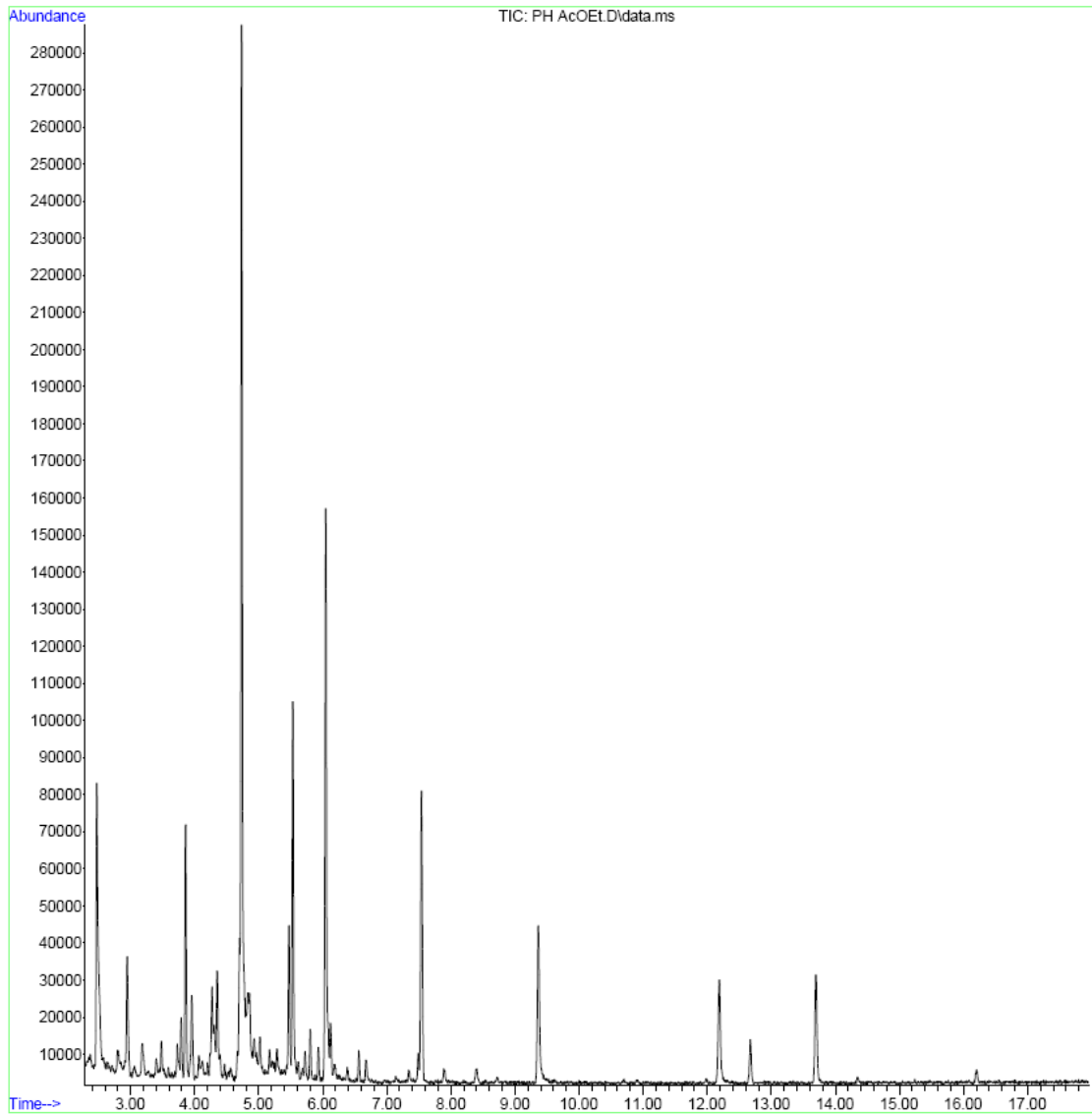


FIGURA No 11. Cromatograma de la fracción de AcOEt obtenida por fermentación en medio líquido de *Aspergillus sp.*