

“Caracterización de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana producidos por la fracción fúngica de líquenes”

Vega Rivera Miguel Angel (1), Álvarez Mejía Cesar², López Ramírez Varinia¹.

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [valopez@itesi.edu.mx]

2 [Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo] | Dirección de correo electrónico: [cesar.alvarez@tecabasolo.edu.mx]

Resumen

Los líquenes son organismos formados por la asociación simbiótica entre un alga o cianobacteria (fotobionte), un hongo (fracción fúngica o micobionte) y una levadura. Los líquenes han sido utilizados en medicina tradicional gracias a la actividad biológica que poseen, sin embargo, por su baja tasa de crecimiento, no han sido explotados a gran escala. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de producción de metabolitos secundarios en la fracción fúngica aislada de líquenes, dada su tasa de crecimiento y a que se ha reportado que la biosíntesis de metabolitos está dirigida principalmente por ésta. Se utilizaron 10 micobiontes (fracción fúngica) aislados a partir de líquenes colectados en el Estado de Guanajuato, y se realizaron ensayos de inhibición antimicrobiana usando extractos orgánicos de micelio desarrollado en medio líquido mineral con 4 diferentes fuentes de carbono: glucosa, celulosa, sorbitol y manitol. Los resultados mostraron que el extracto orgánico del micelio de *Usnea florida* desarrollado con celulosa como única fuente de carbono inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* y *Yarrowia lipolytica*, lo cual sugiere que en presencia de celulosa son sintetizados metabolitos con actividad antibiótica.

Abstract

Lichens are organisms formed by symbiotic association between an alga or cyanobacterium (photobiont) and a fungus (fungal fraction or mycobiont), lichens have been used in traditional medicine by their biological activity, however, they present a low growth rate. The main goal of this study was to evaluate the ability of production of secondary metabolites using fungal fraction of lichens because this has a higher growth rate and it is known that the biosynthesis of metabolites is directed mainly for this fraction. Ten different mycobionts isolated from lichens collected in Guanajuato state were used, antimicrobial inhibition assays were performed using extracts from mycelium developed in organic mineral liquid medium with 4 different carbon sources: glucose, cellulose, sorbitol and mannitol. The results showed that the organic extracts of mycelium from *Usnea florida* developed with cellulose as sole carbon source inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* and *Yarrowia lipolytica*. These results suggested that cellulose could be involved in the synthesis of secondary metabolites with antibiotic activity.

Palabras Clave

Líquenes; Micobiontes; Metabolitos secundarios.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos que están constituidos por una asociación entre un hongo, denominado micobionte y un alga o cianobacteria conocida como fotobionte, los cuales comparten una estrecha relación simbiótica mutualista. En la cual, el micobionte brinda principalmente soporte, protección y humedad al fotobionte, mientras que el fotobionte produce carbohidratos mediante el proceso de fotosíntesis [1]. Los micobiontes son hongos principalmente del grupo de los ascomicetos y basidiomicetos. Los líquenes han sido aprovechados como fuente de alimento, en la fijación de aromas en los perfumes y en medicina tradicional debido a las sustancias liquénicas que son producidas principalmente por los micobiontes a partir de los glúcidos que le brinda el fotobionte [2]. Muchas especies de líquenes se han reportado con actividad antibacteriana, antitumoral, antipirética, citotóxica, así como su uso como bioindicadores de contaminación [3]. La producción de compuestos químicos o metabolitos secundarios se ha relacionado con las condiciones climatológicas, al sustrato sobre el que están adheridos y a la intensidad de iluminación recibida [2]. En la actualidad hay una gran cantidad de enfermedades causadas por microorganismos, los cuales han ido adaptándose a los antibióticos tradicionales como la penicilina, por lo que, es necesario el uso de nuevas sustancias capaces de hacer frente a estos microorganismos, los líquenes producen variedad de sustancias liquénicas con actividad biológica, sin embargo, presentan una baja tasa de crecimiento. La biosíntesis de éstas sustancias esta principalmente controlada por la fracción fúngica, que tiene una mayor tasa de crecimiento, una vez que ha sido aislada del líquen. Por lo tanto, en este estudio nos propusimos evaluar la capacidad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por la fracción fúngica aislada de líquenes colectados en el Estado de Guanajuato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se trabajó con cepas de micobiontes que fueron previamente aisladas a partir de diferentes líquenes colectados en el Estado de Guanajuato los cuales están etiquetados como: ORM-18, ORM-20, BEG #2, LPDS 003, Varal #2, SHN08, SL #1, VLR-2, JAVR XI y Arandas #9, y están depositados en el cepario del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato.

La activación de dichos micobiontes se llevó a cabo en agar Dextrosa Sabouraud. Las cepas fueron incubadas a temperatura ambiente (25-30°C) durante una semana.

Inoculación de micobiontes en medio líquido BG-11

Se inocularon 10 mL de medio líquido BG-11 [4] con micelio de cada uno de los aislados de micobiontes por cuadruplicado (cada uno con una fuente distinta de carbono al 2%: glucosa, sorbitol, manitol y celulosa). Los tubos se colocaron de costado con un ángulo aproximado de 5° para obtener un mayor área de crecimiento e incubados a temperatura ambiente (26-30°C) durante 20 días.

Extracción orgánica de metabolitos

Para la extracción de metabolitos producidos por los micobiontes, el micelio de cada micobionte crecido en cada una de las 4 condiciones se depositó en tres tubos eppendorf, así mismo se tomaron 250 µL de sobrenadante en un cuarto tubo. El micelio se centrifugo a 13,000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadieron 250 µL de acetona y acetato de etilo a cada tubo con micelio, se incubaron 24 horas a 4°C antes de su uso.

Antibiogramas

Se inocularon individualmente cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* y

Yarrowia lipolytica en 40 mL de caldo nutritivo y caldo YPD respectivamente, se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y 120 rpm a excepción de *Staphylococcus aureus* que se incubó a 37°C.

Para la realización de los antibiogramas se prepararon cajas de agar cerebro corazón y YPD, las cuales fueron inoculadas con 100 µL del cultivo microbiano (con D.O._{600 nm} de 0.5), por extensión con ayuda de una varilla acodada.

Posteriormente, se depositaron en círculos de papel filtro de 5 mm de diámetro, 20 µL de cada extracto orgánico con el micelio del micobionte crecido en cada una de las 4 condiciones, así como del sobrenadante. Se utilizaron como controles los solventes empleados (acetona y acetato de etilo), el caldo BG-11 y los extractos orgánicos de los líquenes correspondientes a los micobiontes con acetona y acetato de etilo.

Las cajas inoculadas con *Pseudomonas sp.* y *Yarrowia lipolytica* se incubaron a temperatura ambiente, mientras que las cajas inoculadas con *Staphylococcus aureus* se incubaron a 37 °C, todos los cultivos se incubaron durante 24 horas.

Cromatografía de capa fina

Los extractos orgánicos de los micelios de micobiontes que presentaron actividad antimicrobiana fueron evaluados por cromatografía de capa fina (CCF) para determinar los compuestos orgánicos presentes en el extracto. Para lo cual, se tomó una placa de sílice gel (60762 SIGMA-ALDRICH® Silica gel on TLC plates) y se agregaron los extractos orgánicos de cada muestra (10 µL), la placa se introdujo en la cámara de elución con la mezcla tolueno-ácido acético (170:30). Una vez concluida la corrida, la placa se reveló con yodo metálico y se determinaron las distancias correspondientes de cada banda para determinar los coeficientes de retención o R_f's.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 10 micobiontes evaluados se encontró que solo uno que presentó la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. El micobionte SL #1 aislado del líquen *Usnea florida* (Figura 1), logró inhibir el crecimiento microbiano con el extracto orgánico de micelio desarrollado con celulosa como única fuente de carbono con el solvente acetona, ésta inhibición se observó en las cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.*, y *Yarrowia lipolytica*. De igual manera, observamos que los extractos de acetona y acetato de etilo del líquen de procedencia también presentaron inhibición.

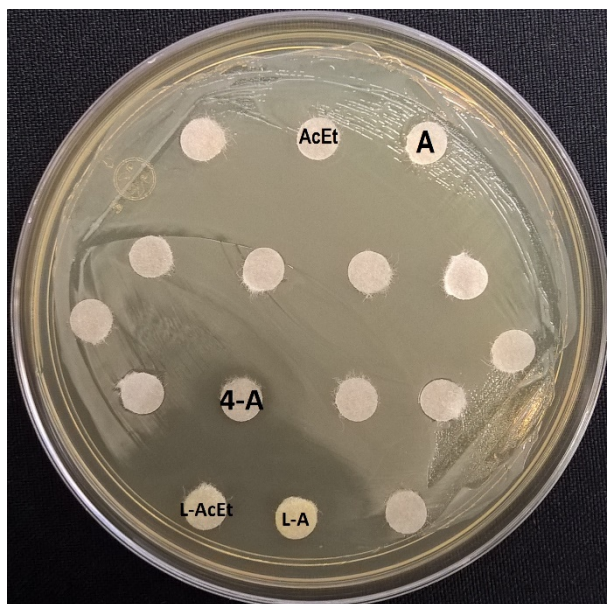


Figura 1. Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con los extractos orgánicos del micobionte SL #1 y líquen de *Usnea florida*. 4-A: Extracto acetónico del micelio desarrollado en medio mineral con celulosa como fuente de carbono; L-AcEt: Extracto con acetato de etilo del líquen *Usnea florida*; L-A: Extracto acetónico del líquen. El resto de los papeles corresponden a pruebas con las diferentes fuentes de carbono así como los controles de acetona y acetato de etilo

Identificación de compuestos presentes en los extractos orgánicos

Se realizó cromatografía de capa fina (CCF) para identificar los compuestos presentes en el extracto que mostró inhibición de crecimiento microbiano. En la Figura 2, se muestra el resultado de CCF donde se pueden observar las bandas de compuestos químicos presentes en el extracto orgánico que logró inhibir el crecimiento microbiano.

Los resultados obtenidos muestran un compuesto presente en el micobionte SL #1, el cual por su coeficiente de retención o R_f se identificó como el ácido difractaico (Tabla 1; reportado para *Usnea diffracta* [5]), esta banda se observó tanto en los extractos orgánicos del micobionte como del líquen del cual fue aislado.

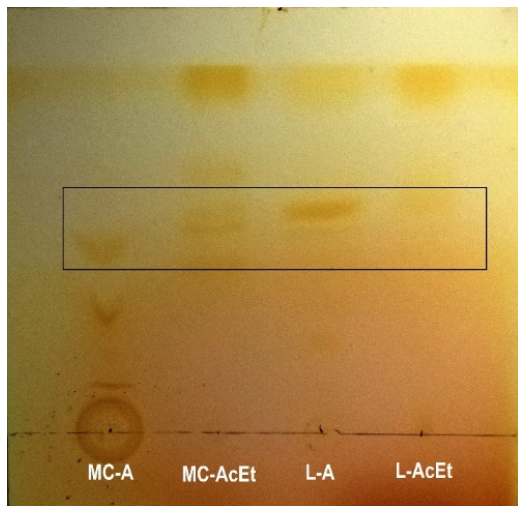


Figura 2: Cromatografía en capa fina de extractos orgánicos de micelio y líquen *Usnea florida*. Se observa 1 banda que muestra compuestos similares en el micobionte y el líquen de donde fue aislado. MC-A: corresponde al extracto de acetona del micelio del micobionte desarrollado con celulosa como fuente de carbono; MC-AcEt: corresponde al extracto de acetato de etilo del micelio del micobionte desarrollado con celulosa como fuente de carbono; L-A: extracto del líquen con acetona, L-AcEt: extracto del líquen con acetato de etilo.

Tabla 1. Identificación de compuestos químicos de acuerdo a los R_f 's obtenidos por CCF.

Micobionte	Cromatografía de capa fina	
	R_f	Compuesto
<i>Usnea florida</i> (SL #1)	0.51	Ácido difractaico

Existen reportes de la capacidad que poseen los líquenes para la producción y almacenamiento de sustancias líquénicas, siendo los compuestos polares los que presentan una fuerte actividad antimicrobiana [2].

El metabolito secundario identificado en el micobionte SL #1 tiene naturaleza polar y también ha sido reportado para el líquen *Heterodea muelleri* [6] y se ha observado que puede inhibir el crecimiento en plantas junto con el ácido orselínico [5].

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este trabajo muestran la identificación de un compuesto con actividad biológica producida por la fracción fúngica o micobionte del líquen *Usnea florida*, mismo que está presente tanto en el micobionte y su respectivo líquen. Estos resultados sugieren que para este aislado, la celulosa puede ser empleada como fuente de carbono y podría funcionar como un factor que activa la expresión de metabolitos secundarios con actividad antibiótica.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana por las facilidades y guía, así como a PRODEP por la beca otorgada a través del proyecto DSA/103.5/14/100327.

REFERENCIAS

- [1] Montañez, A. L., & Countiño, B. (2000). Los líquenes. *Laboratorio de Etnobotánica*, 64–65.
- [2] Robles C, J., Morales B, P., & Pastor de Abram, A. (1992). Líquenes y Sustancias Líquenicidas. *Revista de Química*, VI, 65–76.
- [3] Zelada, B. R., & Abram, A. P. De. (2012). Estudio fitoquímico de *Usnea durietzii*. *Sociedad Química de Perú*, 78(4), 264–276.
- [4] Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205.
- [5] Huneck, S., & Isao, Y. (1996). Identification of Lichen Substances (1st ed.). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-85243-5>
- [6] Hager, A., Brunauer, G., Türk, R. et al. *J Chem Ecol* (2008) 34: 113. doi:10.1007/s10886-007-9408-9.