

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE LA CEPA NATIVA
CV15Nd AISLADA DEL PÁRAMO CRUZ VERDE, DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA.**

DIANA LORENA MALDONADO CEPEDA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar al título de

Microbióloga Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
07 DE Diciembre de 2010**

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE LA CEPA NATIVA
CV15Nd AISLADA DEL PÁRAMO CRUZ VERDE, DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA**

DIANA LORENA MALDONADO CEPEDA

APROBADO:

Jorge Robles, Ph.D.

Director

Andrea García, Mbia.

Codirectora

Luis David Gomez, Mbio

Jurado

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE LA CEPA NATIVA
CV15Nd AISLADA DEL PÁRAMO CRUZ VERDE, DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA.**

DIANA LORENA MALDONADO CEPEDA

APROBADO:

Ingrid Schuler, Ph.D.
Bióloga
Decana Académica

Janeth Arias M.So., MEd
Bacterióloga
Directora de carrera
Microbiología Industrial

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946: “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grados, solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la capacidad de producción de metabolitos secundarios de la cepa nativa de CV15Nd, aislada del páramo de Cruz Verde, la cual pertenece al cepario del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana, con el fin de encontrar compuestos con actividad antimicrobiana.

Esta cepa identificada como *Penicillium cirtinum*, fue cultivada para determinar la producción de metabolitos secundarios. La fermentación se realizó en cultivo líquido en agitador mecánico, con 160 rpm, a 25°C, por 11 días. Posteriormente el cultivo se filtró y se extrajeron los metabolitos secundarios en un sistema continuo líquido-líquido con éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo, al finalizar la extracción se concentró el extracto total al cual se le realizó cromatografía de capa delgada para evidenciar los posibles metabolitos secundarios presentes. El extracto se fraccionó en una columna cromatográfica de sílica gel corridas con éter – acetato 9 : 1, diclorometano – acetato 1 : 1 y diclorometano – metanol 9.5 : 0.5 . Por otro lado se corrió una cromatografía de gases con detector de masas con la que se pudo evidenciar los porcentajes de coincidencia de las estructuras presentes en cada uno de los extractos.

Se obtuvieron 200 mg del extracto obtenido con acetato de etilo, 490 mg del extracto obtenido en la extracción con diclorometano y 166mg del compuesto obtenido en la extracción con éter de petróleo, en 8 litros de medio de cultivo para biotransformación.

De los tres extractos mencionados anteriormente, el extracto de acetato presentó actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas; *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp, y Gram positivas; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, en una concentración de 150 mg/mL, para el extracto de diclorometano y éter que se encontraban en concentraciones de 150 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente no se presentó actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

La interacción de las especies microbianas en su ecosistema, puede estar determinada por muchos factores, incluyendo la habilidad de los microorganismos para liberar sustancias las cuales afectan el desarrollo de otras especies. Los metabolitos juegan un papel importante en la adaptación de las especies, formación y funcionamiento de las comunidades (Phytochemistry Vol 47 N° 18).

Estos metabolitos producidos por unos pocos organismos, no parecen ser esenciales para su crecimiento y reproducción; su formación es dependiente de las condiciones ambientales donde se encuentren (Crueger 1995). Para determinar estos metabolitos, es importante no solo conocer el género del hongo, sino también su especie, ya que actualmente este parámetro se emplea como un factor de aporte al estudio en nuevas investigaciones. Con el avance de la ciencia, el cultivo deliberado de estos microorganismos con expectativas a la producción de nuevas sustancias, han permitido cada vez más sus capacidades de biosíntesis (García, A. 2001).

JUSTIFICACION

Debido a la importancia que tienen los metabolitos en la adaptación de las especies, formación y funcionamiento de las comunidades, el Departamento de Química de la Facultad de ciencias de la Universidad Javeriana, está interesado en seguir avanzando, en la caracterización fisiológica y química de hongos filamentosos aislados a partir de los diferentes páramos Colombianos; dentro de la caracterización se pretende identificar sustancias producidas metabólicamente por la cepa CV15Nd, determinando su especie y evaluando la actividad antibacteriana que estos metabolitos puedan tener frente a diferentes microorganismos tanto Gram positivos como Gran negativos.

MARCO TEORICO

Los metabolitos secundarios son compuestos complejos que muchas veces poseen estructura química muy diferente a la de los metabolitos primarios, como lo son azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento en el cultivo de producción, pero cumplen un papel importante en funciones de supervivencia en la naturaleza, estos en contraste a la naturaleza general de los

metabolitos primarios, son producidos exclusivamente por algunas especies de un género (Sutton, 1996).

Las tecnologías tradicionales emplean hongos para diversos fines, incluyendo la producción y el aroma de los alimentos, además en productos bioquímicos (metabolitos secundarios) como sustancias antimicrobianas (Wainwright, 1995).

Los metabolitos secundarios son producidos cuando el hongo se encuentra en la fase denominada idiofase, es decir en la fase en que cesa el crecimiento por parte del hongo. Incluidos en este grupo están un conjunto de compuestos que son de gran importancia como las sustancias antimicrobianas, y nuevos compuestos importantes farmacológicamente tales como los agentes antitumorales o inmunomoduladores como la ciclosporina, que han adquirido importancia recientemente (Demain, 1999).

De los 100.000 productos naturales producidos por microorganismos y plantas solo se han caracterizado molecularmente 2500, y alrededor de 50.000 son producidos por microorganismos, de los 12000 antibióticos conocidos el 55% son producidos por bacterias filamentosas del género *Streptomyces*, 11% de otras bacterias filamentosas y 22% por hongos filamentosos. (Demain, 1999).

Los hongos filamentosos son microorganismos, eucarióticos, heterótrofos incapaces de sintetizar clorofila, aerobios facultativos que se producen de manera natural por medio de esporas, sexual o asexualmente; morfológicamente se ven como cuerpos alargados o filamentosos, y por lo general ramificados, que aumentan de tamaño por crecimiento apical, característica que los hace diferentes de las bacterias. Dichos filamentos pueden ser septados o no y se les denomina hifas; que en conjunto constituyen el micelio. Las hifas pueden ser uniformes en su diámetro o presentar cambios a lo largo de ellas, base morfológica importante en la determinación del crecimiento de cultivos lentos y cultivos rápidos, ya que ellas pueden crecer en forma sumergida, sobre medio, o ser aéreas (Kuhn, 1990). Las esporas son cuerpos resistentes que forman los hongos en estado latente o de reposo, que se producen de dos maneras diferentes sexual y asexualmente. Las sexuales tienen núcleo derivado de las células progenitoras, y sus esporas son haploides se funden para formar un núcleo diploide (zigoto) y las estructuras que producen las esporas asexuales se producen por simple diferenciación de la hifa de crecimiento (Barnett, 1998). Las esporas presentan generalmente un incremento del contenido citoplasmático que origina la formación de una larga estructura tubular denominado hifa, las hifas pueden ramificarse y extenderse a nivel de las puntas, que se entretajan y que terminan en una masa filamentosa con apariencia algodonosa que en conjunto se denomina micelio. (Pelczar, 1996).

Fisiológicamente los hongos se adaptan a condiciones más severas que otros microorganismos, soportando concentraciones elevadas de azúcares hasta del 10% (Pelczar, 1996), también se desarrollan en condiciones de acidez elevada, aunque soportan escalas de pH entre el 2.0 y 9.0, siendo la óptima para casi todas las especies de

5.6 (Barnett, 1998). Aunque necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmosfera libre y el medio, los hongos filamentosos pueden sobrevivir en ambientes deshidratados (A_w). Generalmente los hongos son oxigénicos facultativos, y se desarrollan en condiciones de temperatura entre 0°C y 62°C , pero entre 22°C a 30°C es la temperatura óptima para la mayoría de las especies (Carone, 1986). La glucosa es una fuente de carbono muy aprovechada por muchos hongos, (entre otros azúcares) así como compuestos de carbono orgánico complejos como el almidón y la celulosa; ellos también se sirven de nitrógeno orgánico como sales de amonio o nitratos, empleando además, substratos con nitrógeno orgánico y carbono, como el extracto de levadura y la peptona. (Pelczar, 1996).

El crecimiento del hongo puede ser dividido cualitativamente en una fase de adaptación, donde no hay un aparente crecimiento, una fase exponencial o tropofase donde se produce la multiplicación y desarrollo celular, y una fase de declinación o idiofase en la cual no hay crecimiento o el peso seco es disminuido debido a la autólisis (Moore, 1996). En la tropofase, el hongo va a producir los metabolitos necesarios para su crecimiento mientras que en la idiofase es en donde se van a generar una serie de metabolitos secundarios involucrados en la producción de compuestos que no son esenciales para el microorganismo. Estos metabolitos son producidos principalmente por tres vías, la del ácido mevalónico, la vía del policetido y la vía del ácido shiquímico (Garraway, 1984).

El uso de hongos en la producción de metabolitos secundarios es importante por la gran actividad metabólica que poseen, ya que son capaces de sintetizar, a partir de glucosa, una amplia variedad de sustratos de compleja estructura química (Kuhn, 1996).

Una característica notable de los hongos, es su capacidad de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios, en contraste con los metabolitos primarios que son esenciales para el funcionamiento de las vías metabólicas. A pesar que los metabolitos secundarios no presentan una función definida en la bioquímica celular, son generados bajo condiciones de estrés. Estos compuestos están constituidos por diferentes tipos de moléculas: proteínas, carbohidratos y lípidos. De esta variedad de metabolitos secundarios el 78% son producidos por bacterias y el 22% por hongos filamentosos. El conocimiento de dichos productos ha aumentado su importancia e interés en el área industrial, alimentos, farmacológica y análisis terapéuticos en medicina (Demain, 1999).

El crecimiento y diferenciación del microorganismo, son factores determinados por la estructura y función de las células, las células son adquiridas durante la diferenciación de su desarrollo. La diferenciación corresponde igualmente a la diferenciación morfológica (morfogénesis) y diferenciación química (metabolismo secundario) Por lo tanto los metabolitos secundarios son producidos por los procesos de diferenciación química y morfológica exclusivamente de cada microorganismo. (Sutton, 1996).

El desarrollo de la producción económica de medios de cultivo requiere de la selección de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, sulfato, potasio, elementos traza y una fuente de

energía que no soporte solamente el buen crecimiento del microorganismo sino la óptima producción del producto, con el fin de reducir la síntesis de productos estrechamente relacionados con el producto, para realzar la producción. Otros factores importantes para la optimización del medio incluyen pH, la temperatura del cultivo, nivel de disolución del oxígeno y la adecuada esterilización de los nutrientes (Demain, 1999).

Las fermentaciones industriales con hongos requieren en primer lugar un sustrato denominado a veces nutriente, este es generalmente un azúcar y efluentes de destilería o material de desecho de repostería. El uso de productos de desecho proporciona un nutriente potencialmente más económico que el uso de sustratos puros. En segundo lugar se requiere una fuente de Nitrógeno, y finalmente nutrientes menores y vitaminas. (Crueger, 1995).

Puesto que los hongos son primariamente organismos oxigénicos, los procesos de producción industrial implican invariablemente la aireación u oxigenación del medio líquido de crecimiento. Sin embargo puesto que la solubilidad del oxígeno en agua es relativamente baja, la velocidad de la transferencia de oxígeno y la toma de oxígeno son frecuentemente la etapa limitante durante el proceso a escala industrial por consiguiente es necesaria la máxima transferencia de oxígeno al mínimo costo posible, un proceso que generalmente implica el uso de un reactor de tanque agitado o fermentador (Dilip, K. 1992).

La preparación de poblaciones de microorganismos de un cultivo stock en dormancia a un estado útil para la producción de un inóculo final es llamado desarrollo del inóculo. El objetivo de este método es minimizar la baja viabilidad durante la recuperación de la dormancia. Obtener copias genotípicamente idénticas de la población, incrementar la biomasa, desarrollar el cultivo apropiadamente para conservar el funcionamiento fisiológico y mantener la producción final, estas poblaciones de microorganismos pueden ser obtenidas directamente de su ambiente o de subcultivos. (Demain, 1999).

El género *Penicillium* pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, subclase hypomycetidae y el orden de los moniliales, familia moniliaceae, en su fase sexual es conocido como *Talaromyces* que pertenece a la subdivisión Ascomycotina, orden eurotiales. Sus hifas son hialinas y tabicadas, los conidióforos son libremente ramificados y dan lugar a fiálides ramificadas que forman un cepillo o "penicillus", con conidios esféricos u ovals en cadenas ramificadas, de 1 μ a 2 μ , nacen de los esterigmas en cadenas largas; los extremos de los esterigmas son ramas y parecen cortados en ángulo recto.

Macroscópicamente las colonias son inicialmente blancas y vellosas, a medida que se producen esporas pigmentadas, toman matiz verde o verde azulado y a veces se observan amarillas. A menudo se forman rugosidades radiales. La superficie de la colonia es aterciopelada a pulverulenta por la densa producción de conidios y se presentan pliegues radiales, puede presentarse gotas de exudado en la superficie y pigmentación al reverso de la colonia (Pitt, J. 1988).

Se encuentra en el suelo y ésta asociado con material vegetal en descomposición, superficie de animales a temperatura ambiente de 25° a 30°C. Estos mohos se encuentran ampliamente distribuidos en suelo, aire, polvo, y también en alimentos como el pan, cereales, pasteles, frutas cítricas y compotas (Hansen, 1986).

Penicillium normalmente crece a temperaturas de 25 a 30°C por un tiempo de 4–5 días aproximadamente. Entre las principales fuentes de carbono que utiliza esta la glucosa, lactosa, soya, maíz aceite de oliva y glicerol. Como fuente de nitrógeno utiliza sales de amonio y nitrato de amonio; compuestos que proporcionan carbono y nitrógeno son el extracto de levadura, peptona, caseína y carbonato de amonio. También son necesarios sales minerales como sulfato de magnesio, sulfato de potasio, cloruro de potasio y cloruro de magnesio. El pH promedio es de 5.5 a 6.5; y la agitación y aireación varían según el producto que se quiera obtener (Kumar, 1989).

El género *Penicillium* es importante debido a que sus metabolitos secundarios se han utilizado principalmente para la producción de penicilina; enzimas como glucosa oxidasa y lipasas, también es utilizado en la industria alimentaria para la producción de quesos madurados como danes azul, stilton, camembert y roquefort (Wainwright, 1995).

OBJETIVO GENERAL

- Determinar y evaluar algunos de los metabolitos secundarios producidos por la cepa nativa CV15Nd aislada de suelo del páramo Cruz Verde.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar el género y la especie a la que pertenece la cepa CV15Nd obtenida de suelo, del páramo Cruz Verde, y perteneciente al cepario del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana.
- Evaluar el medio de cultivo Hanson para la fermentación de metabolitos secundarios por la cepa CV15Nd.
- Extraer mediante métodos químicos, sustancias producidas metabólicamente por la cepa CV15Nd.
- Evaluar actividad antibacteriana de las sustancias producidas por la cepa CV15Nd frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

METODOLOGIA

- **Reactivación de la cepa CV15Nd**

Para la activación de la cepa conservada en tubo con agar, fue necesaria la adición de caldo PDA, provocando de esta forma la esporulación de la cepa, en aproximadamente 8 días.

- **Purificación de la cepa CV15Nd**

Se realizaron pases de la cepa en diferentes medios de cultivo, como PDA, Czapeck, MEA, entre otros con adición de antibiótico (cloranfenicol) evitando de esta forma el crecimiento de bacterias que puedan lograr crecimiento.

- **Identificación de género y especie.**

Siguiendo las claves taxonómicas Pitt 1988; Samson, 1981; Barnett 1988; Domsch, 1980 sus características macroscópicas, microscópicas, (con la ayuda del programa MOTIC hallando las medidas de cada una de las estructuras del hongo), y realizando un seguimiento de crecimiento radial, (para observar características de cada uno de ellos, teniendo en cuenta color, textura y tamaño de la colonia) en diferentes medios de cultivo sólidos; (Rosa de Bengala, Czapeck, Sabouraud, MEA y Hanson) se hizo posible la identificación en género y especie de la cepa.

- **Cultivo monospórico.**

Los hongos presentan diferentes variedades, por tanto es conveniente obtener cultivos desarrollados de una espora simple. Los métodos más utilizados para purificar una cepa son el cultivo monospórico y el cultivo axénico. Los dos métodos se basan en obtener una espora totalmente pura. Para la elaboración del cultivo monospórico en tubos con agar inclinado se adicionaron 5 mL de Tween 80 al 0.5% a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas por duplicado (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), se realizó un recuento de conidios en cámara de newbauer, fue escogida la dilución 10^{-2} , ya que contenía una concentración de 10^7 conidios/mL, se sembró por agotamiento en cajas de petri con agar papa, sacarosa, cloranfenicol, y se incubaron a 25°C, las siembras fueron monitoreadas cada dos horas aproximadamente hasta lograr observar una espora germinada, se realizó un repique de esta espora a un tubo con agar inclinado, (Silverio, 1983).

- **Elaboración de un banco de trabajo.**

El banco de trabajo fue realizado por dos metodologías diferentes:

- ✓ Tierra estéril: A partir de un cultivo puro en caldo, de concentración conocida se sirvió 1 mL en tubos eppendorf estériles que contenían 1 g de suelo estéril (30 minutos a 121°C, 15 lb de presión), se cerró herméticamente y se dejó a temperatura ambiente durante 1 mes, terminado éste tiempo se realizó una prueba de viabilidad.

- ✓ Conservación en glicerol: A partir de un cultivo puro en caldo, de concentración conocida se sirvió 1 mL en viales estériles que contenían 1 mL de glicerol estéril (30 minutos a 121°C, 15 lb de presión), se cerró herméticamente y se llevó a congelación (4°C).

- **Preinóculo.**

Una suspensión de esporas de 10 mL, a la misma concentración requerida para la elaboración del cultivo monospórico, fue adicionada en condiciones de completa asepsia a 390 mL de caldo de Hanson, para esto se utilizó un erlenmeyer de 2000 mL guardando de esta forma una proporción 1/5, esto fue realizado por duplicado, los erlenmeyer se pusieron en un shaker a 160 rpm aproximadamente durante 72 horas.

- **Fermentación en medio líquido.**

Para la fermentación se prepararon 7.2 L de caldo Hanson, distribuidos en 4 frascos de 4 L previamente estériles, y cada uno de estos fue inoculado con 200 mL del preinóculo obtenido luego de las 72 horas se cerraron herméticamente con suministro de oxígeno, en agitación constante a 160 rpm, el proceso de fermentación se llevó a cabo durante 11 días. (García, A. 2001).

- **Extracción líquido- líquido.**

Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de extraer los metabolitos secundarios producidos por el hongo, por medio de la utilización de diferentes solventes no miscibles con el medio de cultivo, que van a variar la polaridad y la densidad del medio. Luego de una filtración al vacío del medio, fueron utilizados tres solventes, éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo, respetando el orden mencionado. En un embudo de decantación a una porción de medio le fue adicionado una mínima cantidad de solvente, agitando vigorosamente varias veces, luego se esperó la separación de las dos fases, decantando por separado el medio y el solvente, este procedimiento se repitió varias veces hasta pasar todo el medio por cada uno de los solventes (fueron utilizados 2 L de cada solvente).

- **Caracterización de los metabolitos.**

Para la concentración de los extractos obtenidos, se utilizó la técnica de rotavaporación. Posteriormente se realizó una cromatografía de placa delgada de sílica gel para observar la presencia de metabolitos secundarios. Estos extractos fueron sometidos a espectrometría de masas para observar la composición de cada uno de ellos.

- **Actividad antibacteriana.**

La valoración de la actividad antibacteriana de las sustancias producidas por el hongo, se realizó por la prueba de sensibilidad de pozos.

RESULTADOS

- **Reactivación de la cepa.**

La cepa nativa de *Penicillium* CV15Nd, que se encontraba conservada en tubo con agar, se recuperó en agar PDA.

- **Identificación de género y especie.**

Por las características encontradas en los análisis macroscópicos y microscópicos y siguiendo las claves taxonómicas, se realizó una confrontación con la cepa de trabajo obteniendo los siguientes resultados:

- ✓ **Características macroscópicas**

La cepa fue sembrada e incubada a diferentes temperaturas (10 °C, temperatura ambiente, 25 °C, y 35 °C) y en diferentes medios de cultivo, se realizó un seguimiento de la cepa observando diferentes características como tamaño de las colonias, color y textura, concluyendo que la temperatura adecuada para el óptimo crecimiento es de 25 °C.

Las colonias en agar Czapeck incubadas a 25 °C, crecen rápidamente alcanzando un diámetro de 1.0 – 1.5, cm en 5 días. Consiste de una superficie pulverulenta, color verde claro a verde oscuro azulado, con margen ancha de color blanco tipo algodonosa. Reverso normalmente amarillo a naranja. Colonia redonda, borde irregular, algunas veces presenta exudación (Anexo 1, figura 1: A y B). En medio MEA el crecimiento tiene características similares que en el medio anterior en cuanto a color, textura y tamaño. (Anexo 1, figura 1: C y D). En agar Sabouraud el crecimiento fue en 8 días con características similares, aunque la esporulación fue menor que con los dos medios anteriores (Anexo 1, figura 1: E). En agar Rosa de Bengala el crecimiento se presentó a los 7 días notándose un mínimo crecimiento radial y un color más oscuro en las colonias (Anexo 1, figura 1: F). En el medio de la fermentación las colonias tuvieron crecimiento en 7 días y las colonias se observaron de tamaño mayor y no presentaron margen de color blanco tipo algodonosa (Anexo 1, figura 1: G).

✓ **Características microscópicas**

Conidióforos largos, hialinos, de paredes lisas, normalmente de 2 – 3 μm de ancho y 50 a 200 μm de largo, con 3 a 5 métulas divergentes (12 – 20 x 2.0 – 3.0 μm), fiálides en forma de botella (8 – 10 x 2.0 – 2.5 μm). Conidios producidos en columnas, globosas a subglobosas hialinos a verdes, 2.5 – 3.0 μm . (Anexo 1, figura 2).

Estas características, tanto macroscópicas como microscópicas concuerdan con las claves dadas por Hoestria y Samson 1981, Samson 1989, Pitt 1988, Domsch 1980, Barnett 1998. Por las características encontradas en los análisis macroscópicas y microscópicas y siguiendo las claves taxonómicas específicas coincidió que la cepa de trabajo pertenece al género *Penicillium*, especie *citrinum*.

• **Capacidad del medio para producción de metabolitos secundarios.**

Los metabolitos secundarios se produjeron en el medio químicamente definido de biotransformación Hanson, (componentes Anexo 5) la fermentación se realizó con un preinóculo de 1×10^7 conidios/mL por 11 días, 100 rpm en agitador mecánico, al finalizar el tiempo se observaban claramente los pellets formados por *Penicillium citrinum*, que presentaban forma regular pero rugosa, de 0.5 cm de diámetro aproximadamente.

• **Cromatografía de capa delgada.**

A partir de la extracción líquido – líquido se pudieron hallar sustancias contenidas en los tres extractos, éter de petróleo corrida en éter - acetato 9.0 : 1.0, diclorometano corrida en diclorometano – acetato 1.0 : 1.0 y acetato corrida en diclorometano – metanol 9.5 : 0.5, que fueron observadas inicialmente por cromatografía de capa delgada en donde se pudo observar presencia de sustancias identificadas por fluorescencia, por otro lado se realizó también un revelado con vainillina identificando así las sustancias que no presentaron fluorescencia (Anexo 2, Figura 3).

• **Actividad antimicrobiana.**

Se realizó esta prueba presuntiva para determinar la actividad de la sustancia frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. La actividad se evidenció en mayor proporción frente a bacterias Gram positivas, sin verse afectada la actividad frente a bacterias Gram negativas. La concentración utilizada con el extracto de éter de petróleo fue de 100 mg/mL, para los extractos de diclorometano y acetato de etilo la concentración utilizada fue de 150 mg/mL, presentándose actividad solamente para este último, es por esto que

solo se reportan los resultados para este extracto. Para el control positivo se utilizó cloranfenicol ya que se tiene como referencia que es un excelente inhibidor de amplio espectro (González, 2002), y para el control negativo fue utilizado la sustancia en la que previamente se hizo la dilución de cada uno de los extractos correspondiendo esta a dimetilsulfóxido. Las siembras se realizaron por triplicado para cada microorganismo por el método de inmersión en caldo, al obtener el tamaño de los halos se realizó un promedio entre las tres replicas y su correspondiente extracto (Tabla 1), (Anexo 3).

Tabla 1. Promedio de halos con el extracto de acetato de etilo, control positivo y control negativo.

Microorganismos	Extracto acetato de etilo	Control Positivo	Control Negativo
<i>Pseudomonas sp.</i>	12 mm	10 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	13 mm	13 mm	0 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	17 mm	22 mm	0 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	14 mm	9 mm	0 mm

✓ **Cromatografía de gases con detector de masas**

Por este método, se pudo determinar un porcentaje de coincidencia relacionado entre las sustancias encontradas y la base de datos del cromatógrafo de masas 6850 Series II Network GC System, indicando que por encima del 90%, existe una alta probabilidad y coincidencia de las sustancias, basado en el tiempo de retención, en las graficas de coincidencia de las sustancias y su estructura (Anexo 3). Se encontraron cerca de 30 sustancias de los tres extractos, pero para este trabajo se tuvieron en cuenta solamente las obtenidas con la extracción de acetato ya que como se mencionó, solamente este extracto presento actividad antimicrobiana frente a los microorganismos evaluados. En la fracción de acetato pasada por el cromatógrafo de gases se encontraron 11 sustancias de las cuales según la bibliografía consultada, para solo 4 de estas ha sido reportada actividad biológica. (Tabla 2).

Tabla 2. Sustancias obtenidas de la extracción de acetato.

NOMBRE DE LA ESTRUCTURA	% coincidencia	Tiempo de retención	Actividad antimicrobiana reportada
3,6-dimetil, 4 hidroxil, 2H-pirano-2-ona	94	9.520 min	SI
4-metil, 4 hidroxil, tetrahidro, 2H-piranona	91	7.047 min	SI
2-dimetil, 2,3-dihidro, 7 Benzofuranol	98	7.603 min	SI
3-il-etil, N-2-1H-indolacetamida	93	17.304 min	SI
4-hidroxil-bencenetanol	90	9.171 min	NO
Feniletil – alcohol	94	5.210 min	NO
2,6-dimetilpirazina	91	2.933 min	NO
Acedoben	96	14.577 min	NO
ácido 2 – hidroxil, becenoacético	95	9.838 min	NO
Ácido indolacético	96	14.429 min	NO
Ácido (Z,Z) – 9, 12 – octadecadienoico	94	16.701 min	NO

DISCUSIÓN

Se evidenció que el género de cepas de *Penicillium* sp es comúnmente encontrado en variedad de ambientes de suelos y en condiciones extremas como son los páramos colombianos, debido a que es un hongo poco exigente en pH, nutrición y temperatura en comparación con otros grupos de hongos filamentosos, además presenta una alta esporulación lo cual puede aumentar su presencia en la mayoría de los ambientes, como lo demostraron Chitiva y Cabrera (2001).

Aquellos compuestos orgánicos sintetizados por un organismo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo son conocidos como metabolitos secundarios, para que estos se produzcan debe suministrársele al hongo los nutrientes necesarios durante su fermentación. En este caso se trabajó con medio líquido de biotransformación Hanson ya que es un medio rico en nutrientes como glucosa, que es una fuente de carbono excelente para el crecimiento y no interfiere en la formación de metabolitos secundarios (Sutton, 1996) contiene además sulfato de amonio, fosfato diácido de potasio, sulfato de magnesio y solución de elementos traza, siendo todos estos componentes esenciales para el desarrollo del microorganismo, ayudando a mantener las necesidades nutricionales óptimas para producir la transformación positiva de compuestos por el hongo (Khaled, 2000).

Se pudo determinar que el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos (*Penicillium*, especie *citrinum*) no están relacionados en la forma de producción, debido a que un hongo puede crecer con nutrientes desnaturalizados o con estructuras complejas; pero para la síntesis de sus metabolitos secundarios se necesita que los nutrientes no se encuentren alterados en sus propiedades químicas por factores como pH extremos, altas temperaturas, humedad y por reacciones químicas con otros compuestos. Estos se debe tener en cuenta debido a que se produce una alteración metabólica de las reacciones primarias para la síntesis del compuesto de interés (Demain, 1986).

Los procesos de extracción se basan en la distribución de una sustancia entre dos fases inmiscibles; una fase es agua y la otra un disolvente orgánico adecuado, solo el extracto obtenido del acetato de etilo mostró una amplia actividad frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp, siendo claramente más amplia la inhibición para *Bacillus subtilis*, este resultado pudo deberse a la alta polaridad que presenta este solvente en comparación con los otros dos también trabajados. Teniendo en cuenta los resultados presentados en la tabla 1 y haciendo una comparación entre los controles positivos y los obtenidos con el extracto, se mostró para *Pseudomonas* sp y *Staphylococcus aureus* mayor actividad de inhibición en comparación con los controles (Anexo 3), lo que sugiere que los resultados sean atractivos en el momento de realizar la fermentación a mayor escala permitiendo mas recuperación del extracto y así mediante pruebas químicas más específicas la separación de sustancias para una total identificación, caracterización y valoración de su actividad frente a otros microorganismos.

Dentro de las sustancias identificadas mediante la cromatografía de gases se encuentra 3,6-dimetil, 4 hidroxil, 2H-pirano-2-ona, cuya actividad biológica está referida como

analgésico, sedante suave y como relajante muscular (Novikov, 2001). También se encontró que el compuesto 4-metil, 4 hidroxil, tetrahidro, 2H-piranona, presenta actividad de inhibición frente a microorganismos Gram negativos, más específicamente contra *P. agglomerans* (Niku–Paavola, 1998) lo cual concuerda con los resultados obtenidos ya que probablemente fue esta la sustancia que pudo haber causado la inhibición a la cepa de *Pseudomas* sp, que se utilizó para este trabajo. Según (Kossakowski, 2006, Harper, 2005) el 2-dimetil, 2,3-dihidro, 7 Benzofuranol y 3-il-etil, N-2-1H-indolacetamida, presentan actividad biológica como antiviral, considerándose este aspecto de gran importancia a nivel industrial y farmacéutico. La mayoría de las sustancias encontradas hacen parte de compuestos y estructuras mucho más grandes para las que ha sido reportada actividad biológica por lo que sería un trabajo de posterior investigación la separación de las sustancias y estructuras e identificación y comprobación de su actividad.

CONCLUSIONES

- Se determinó que la cepa CV15Nd perteneciente al cepario del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana coincidió con el género *Penicillium* especie *citrinum*.
- El medio de cultivo utilizado para la fermentación suministró las condiciones necesarias para la óptima producción de metabolitos secundarios por la cepa de *Penicillium citrinum* garantizando los nutrientes necesarios para el desarrollo de este microorganismo.
- Los métodos químicos utilizados en este trabajo fueron efectivos para la extracción y observación de la presencia de metabolitos secundarios a partir de la cepa nativa CV15Nd.
- Se logró la determinación de metabolitos secundarios producidos por la cepa nativa CV15Nd aislada de suelo del paramo Cruz Verde.
- El extracto obtenido con acetato de etilo presentó actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. Por el contrario los extractos obtenidos con diclorometano y éter de petróleo no presentaron ningún tipo de actividad frente a las cepas de bacterias anteriormente mencionadas.

RECOMENDACIONES

- Realizar la fermentación a mayor escala para obtener mas cantidad de extracto, lo que permitiría evaluar actividad antibacteriana en concentraciones menores, así como también actividad antifúngica en diferentes concentraciones.
- Comparar los resultados obtenidos en este trabajo con resultados posteriores en fermentación en medio sólido y medios líquidos diferentes al medio de transformación Hanson.
- Realizar una optimización del medio, haciendo unas variaciones durante la fermentación, así se podría evaluar un rendimiento en la producción de los metabolitos secundarios.
- Realizar otro tipo de pruebas biológicas como antitumorales, citotóxicas entre otras.

BIBLIOGRAFIA

- Barnett, H. L. 1998. Illustrated Genera of Imperfect fungi. Ed APS Press.
- Cabrera, C; Chitiva, A. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos del suelo del páramo de Guasca (Colombia) en zona de vegetación de frailejones. Grupo de Investigación en Fitoquímica Universidad Javeriana. Bogotá 2001.
- Carone, M. 1986, Micología. Editorial, Pueblo y educación. Habana – Cuba.
- Crueger, W. 1995. Biotecnología Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia. España.
- Demain, A. 1999 Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 52: 455 – 463.
- Dilip, K.A. 1992. Handbook of Applied mycology, cuarto volumen, Fungal Biotechnology. Ed. Marcel de Kker, inc. New York, USA.
- Domsch, K.H., O.W. Gams % T.H. Yerson. 1980. Compendium of soil. Editorial Academic Press, USA.
- García, A. 2001 Determinación demetabolitos sevundarios a partir de una cepa de *Aspergillus sp.*, Aislada del páramo del Tablazo, Departamento de Cundinamarca. Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Pregrado Microbiologia Industrial Bogotá
- Garraway, M. 1984. Fungal Nutrition and Physiology, Ed: Michael Wiley & Sons. Inc. USA.
- Hansen, A. 1986. Microbiología de las fermentaciones. Ed Pueblo y educación.
- Khaled, Y.O & M. Alice. 2000. Microbial transformation of Bensosampangine.. Journal Natural Products. 63: 396–398.
- Harper S, Avolio S, Pacini B, Di Filippo M, Altamura S, Potent inhibitors of subgenomic hepatitis C virus RNA replication through optimization of indole-N-acetamide allosteric inhibitors of the viral NS5B polymerase. J Med Chem. 2005 Jul 14; 48(14):4547-57.
- Jerzy Kossakowski and Kinga Ostrowska., Synthesis of new derivatives of 2,3 – dihidro – 7 – benzofuraol whith potential pharmacological activity, Acta Polonie Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 63 N° 4 pp. 271 - 275, 2006.
- Khaled Y. Orabi, Alice. M. Clark and Charles D. Hufford, Microbial Transformation of Bensosampangine. 2000. J. Nat. Prod. 63, 396 – 398.
- Kuhn, P. J & Trinci, A. 1990. Biochemistry of cell walls and membranes I fugi. Ed Springer verlag.
- Kumar, P & B. Lonsane. 1989. Microbial production of gibberellins: State of the art. Advances in applied microbiology 34: 64 – 65.
- Moore, E. 1996. Fundamentals of the fungi, cuarta edición. Prentice Hall, New Jersey; USA.
- Niku – Paavola, N. – L., Laitila, A., Mattila – Sandholm T., and Haikara A., New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology 1999, 86, 29 – 35.

- Novikov, D.V., Yakovlev, I.P., Zakhs, V. E., and Prep yalov. Synthesis, Properties, and Biological Activity of 4 – Hidroxi – 2H – Pyran – 2 – ones and Their Derivates. Russian Journal of General Chemestru, Vol. 72, N° 10, 2002, pp. 1601 – 1615.
- Pelczar, M.J & D.R. Roger 1996. Microbiología 4 edición. Ed Mc Graw Hilol. Mexico D.F.
- Phytochemistry and International Journal of Plant. Vol 47, N° 18. Biochemistry Pergamon Press. Oxford England. 1998.
- Pitt, J. 1988. A laboratory guide to commo *Penicillium* species. Ed Afisc, Australia.
- Samson, R. 1989. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus*, Ed Pleum Press.
- Silverio, J. 1983. Bacterias y hongos fitopatógenos. Editorial puebla. La Habana, Cuba.
- Samson, R & E. Hoestria. 1981. Introducción to food-Borne fungi, Ed. Centroalbureau voor schimmelcultures.
- Sutton, B. 1996. A century of mycology. Ed Cambridge University Press. USA.

ANEXO 1



A



B



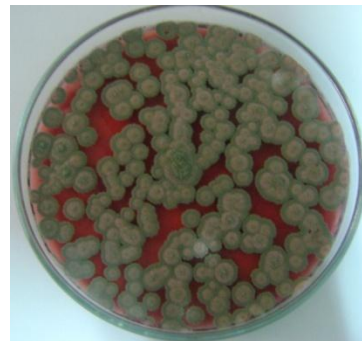
C



D



E



F

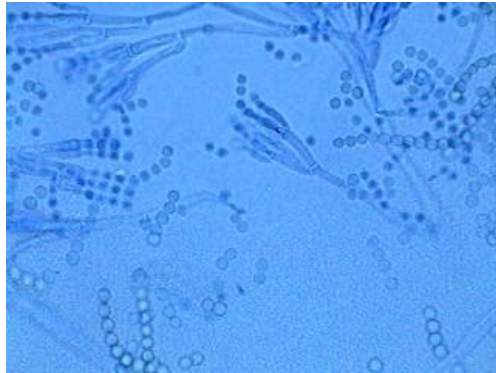


G

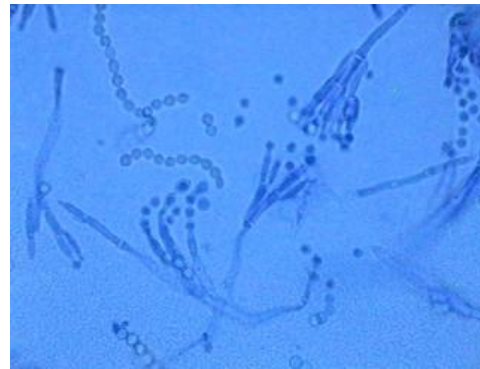
Figura 1. Macroscopía de la colonia

- A.** Anverso agar Czapeck 25 °C **B.** Reverso agar Czapeck 25 °C **C.** Anverso agar MEA 25 °C **D.** Reverso agar MEA 25 °C **E.** Reverso agar Sabouraud 25 °C **F.** Anverso agar Rosa de Bengala 25 °C **G.** Reverso agar Hanson 25 °C.

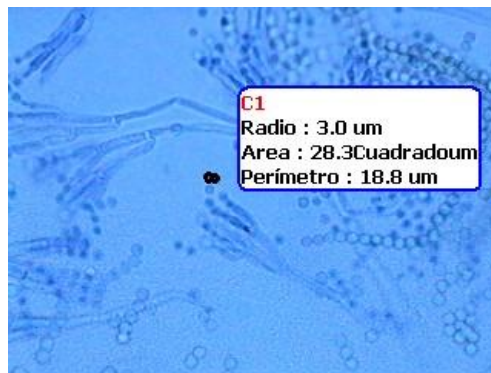
Fuente: Autor



A



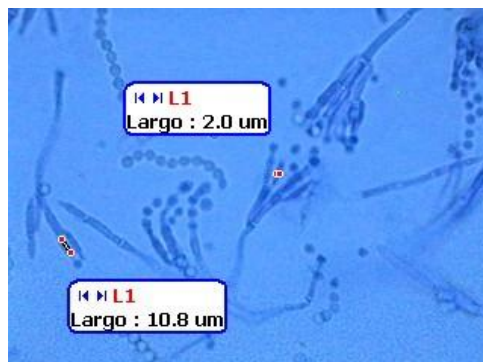
B



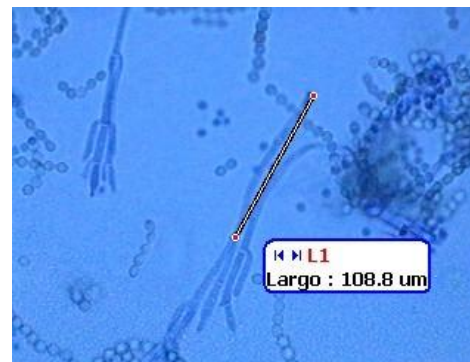
C



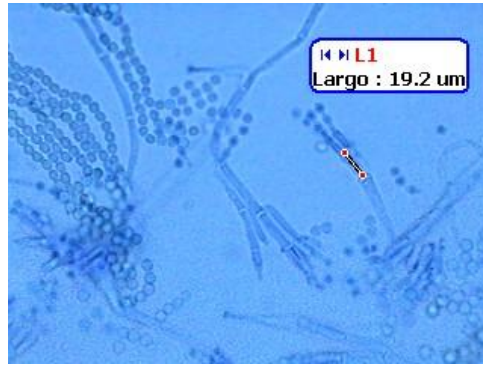
D



E



F



G

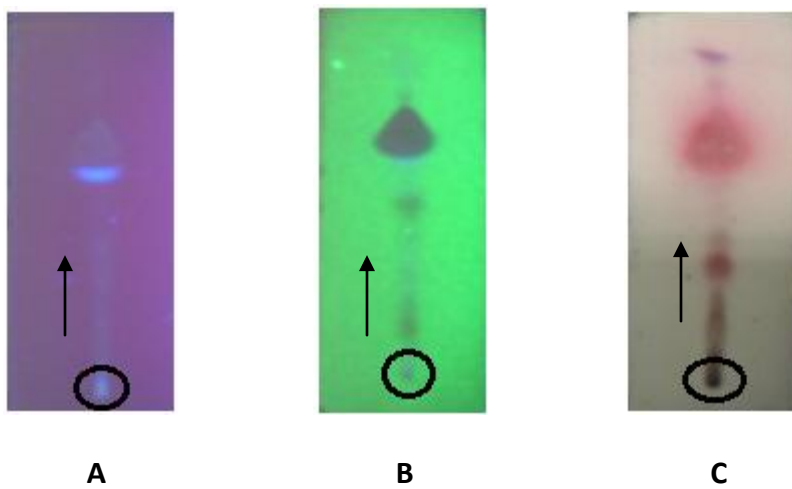
Figura 2. Microscopía de la colonia

A, B. Características generales **C.** Medida del conidio **D.** Conidios en cadena **E.** Medidas de la fiálide **F.** Medida del conidióforo **G.** Medida de la métula.

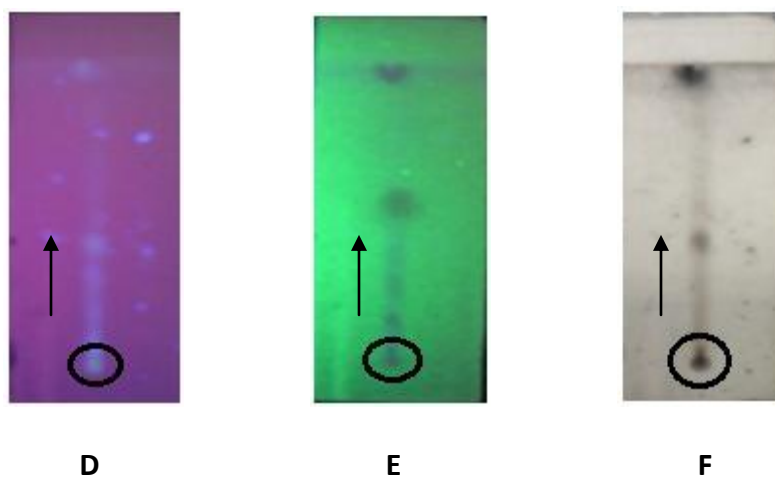
Fuente: Autor

ANEXO 2

Fase móvil: Éter - Acetato 9 : 1



Fase móvil: diclorometano – Acetato 1 : 1



Fase móvil: Diclorometano – Metanol 9.5 : 0.5

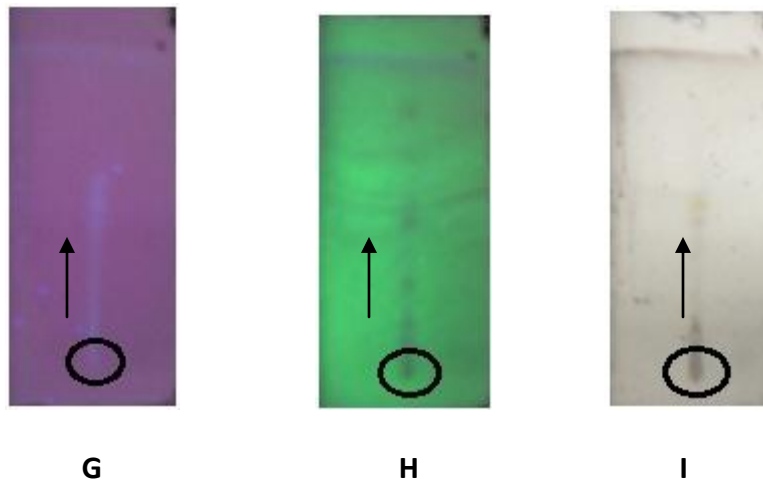


Figura 3. Cromatografía de capa delgada

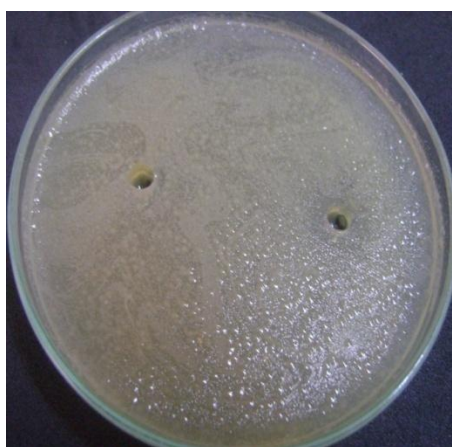
A, B. Cromatografía éter de petróleo, observada bajo luz ultravioleta. **C.** Cromatografía, éter de petróleo revelada con vainillina. **D, E.** Cromatografía diclorometano, observada bajo luz ultravioleta. **F.** Cromatografía diclorometano revelada con vainillina. **G, H.** Cromatografía, acetato observada bajo luz ultravioleta. **I.** Cromatografía, acetato revelada con vainillina.

Fuente: Autor

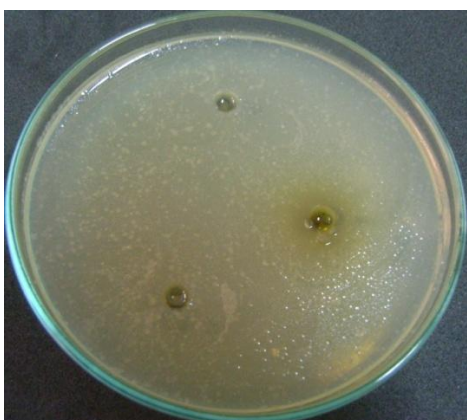
ANEXO 3



A



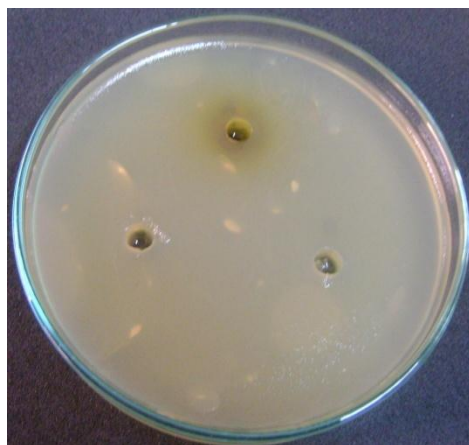
B



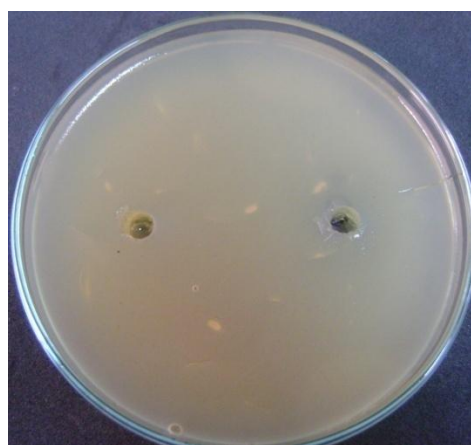
C



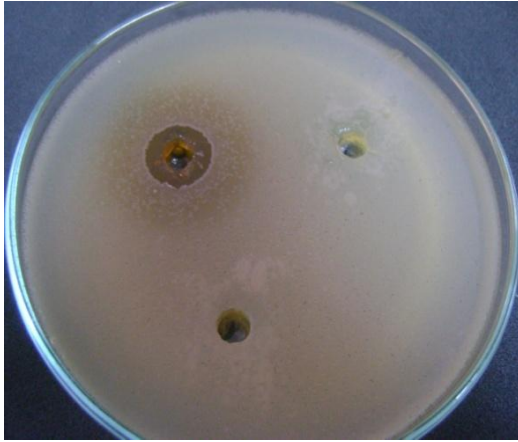
D



E



F



G



H

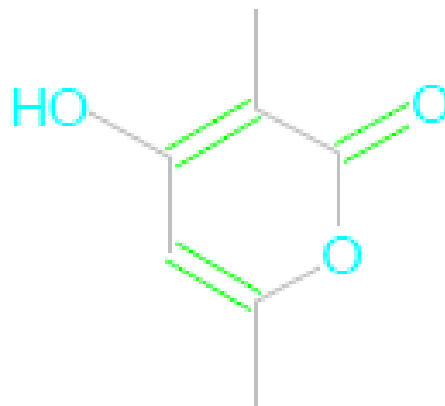
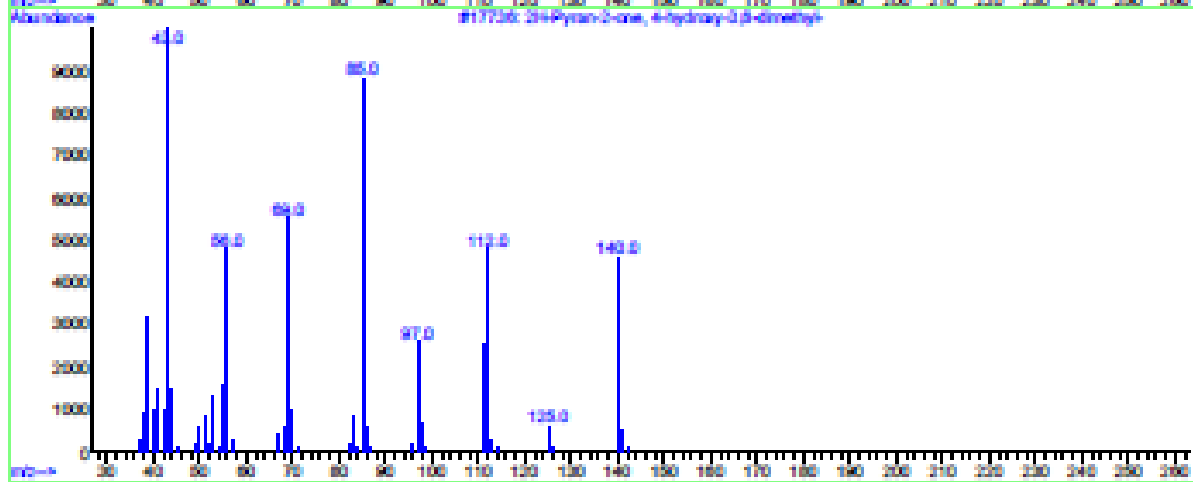
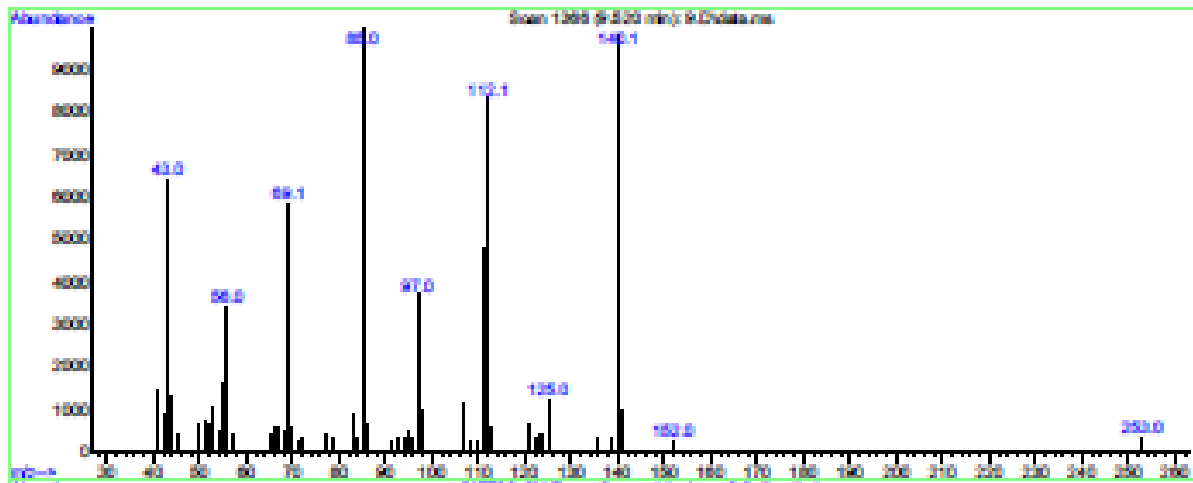
Figura 4. Actividad antimicrobiana, halos de inhibición
Agar Muller Hinton

- A.** Antibiograma de *Staphylococcus aureus* **B.** Antibiograma control positivo y negativo *Staphylococcus aureus* **C.** Antibiograma de *Pseudomonas* sp **D.** Antibiograma control positivo y negativo *Pseudomonas* sp **E.** Antibiograma de *Escherichia coli* **F.** Antibiograma control positivo y negativo *Escherichia coli* **G.** Antibiograma de *Bacillus cereus* **H.** Antibiograma control positivo y negativo *Bacillus cereus*

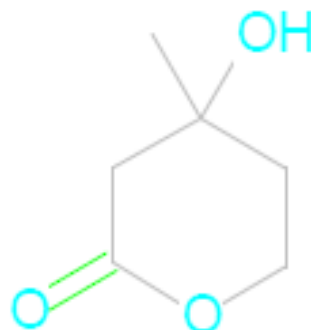
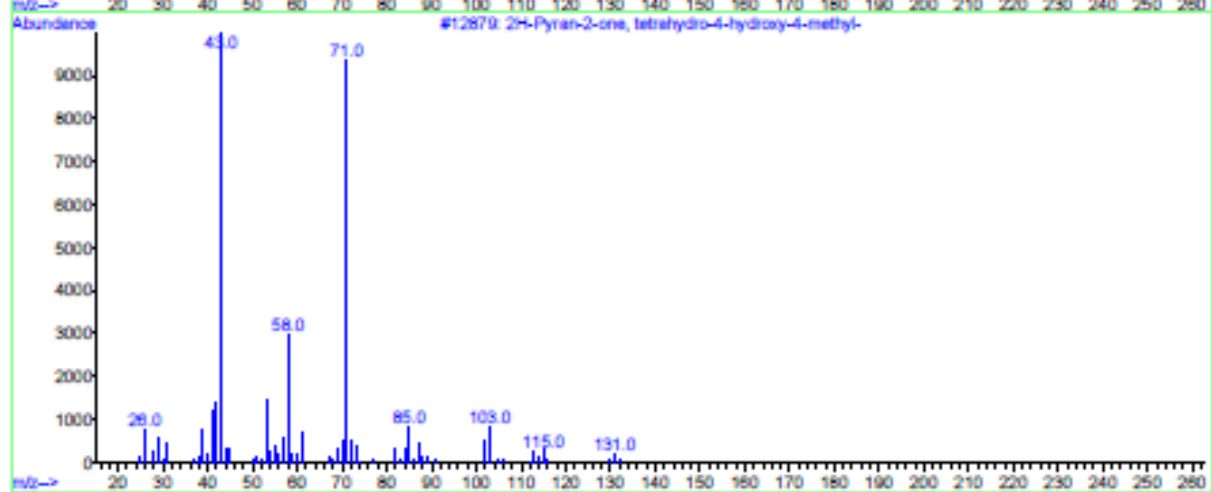
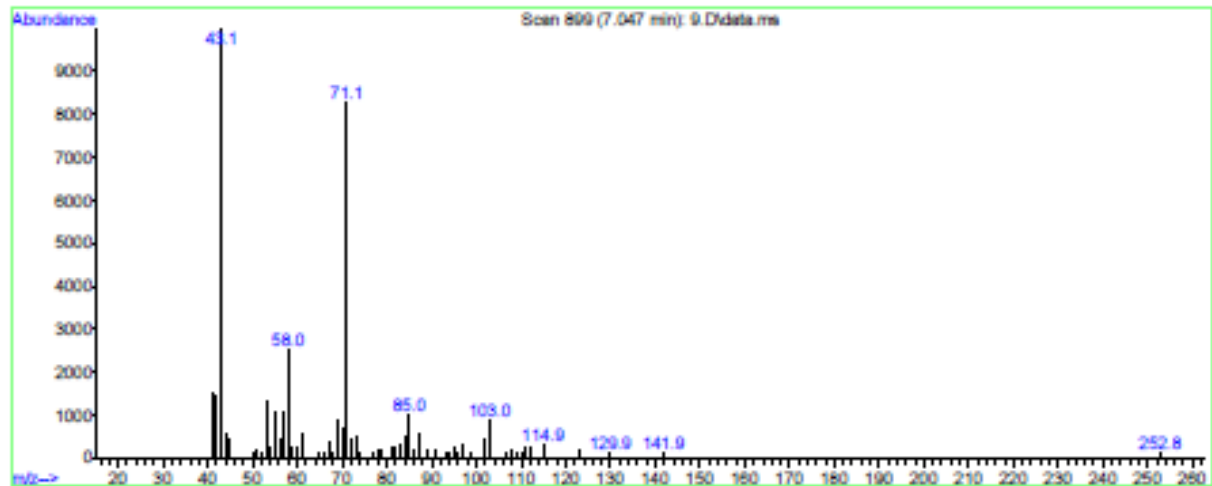
Fuente: Autor

ANEXO 4

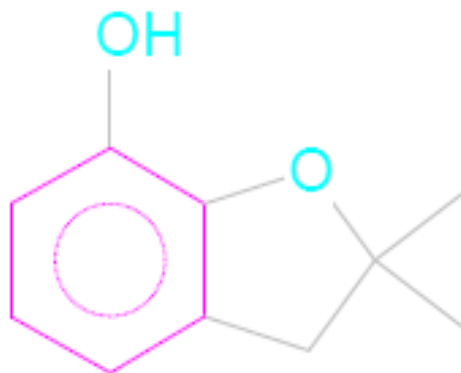
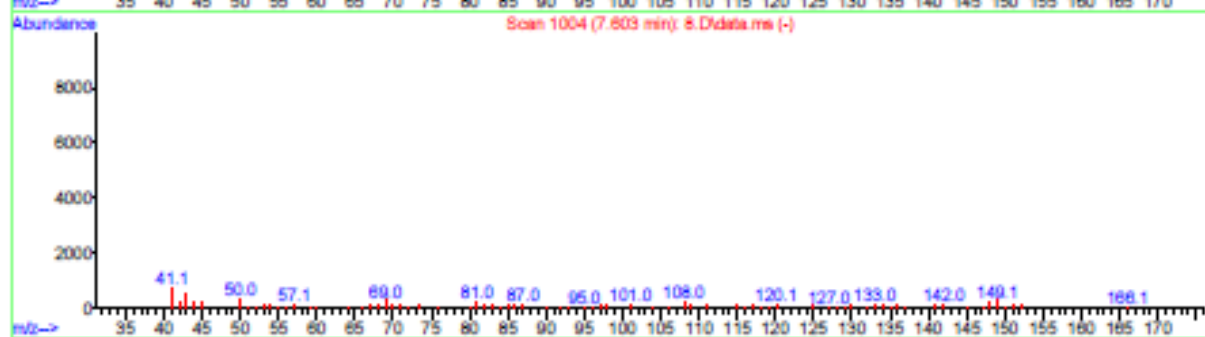
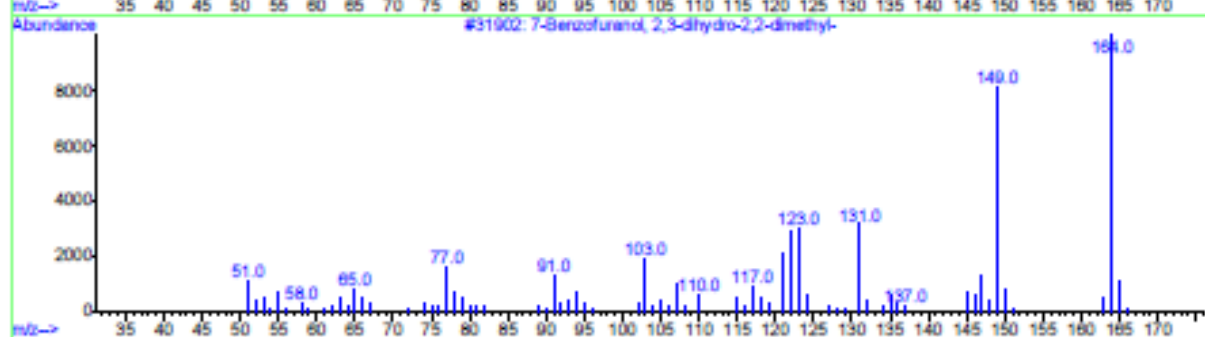
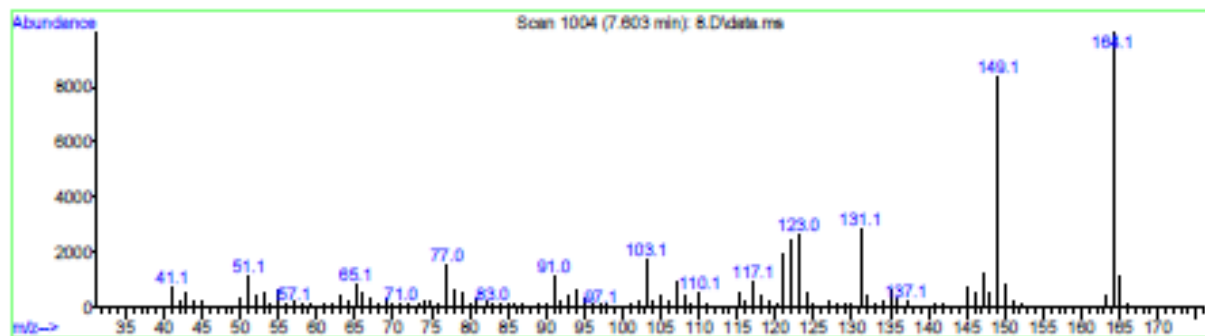
Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 94
ID : 2H-Pyran-2-one, 4-hydroxy-3,6-dimethyl-



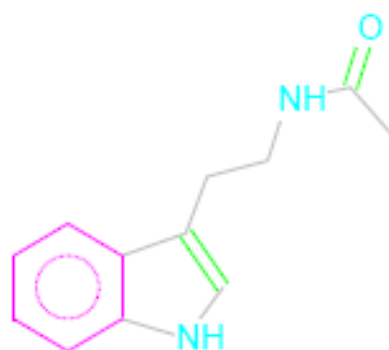
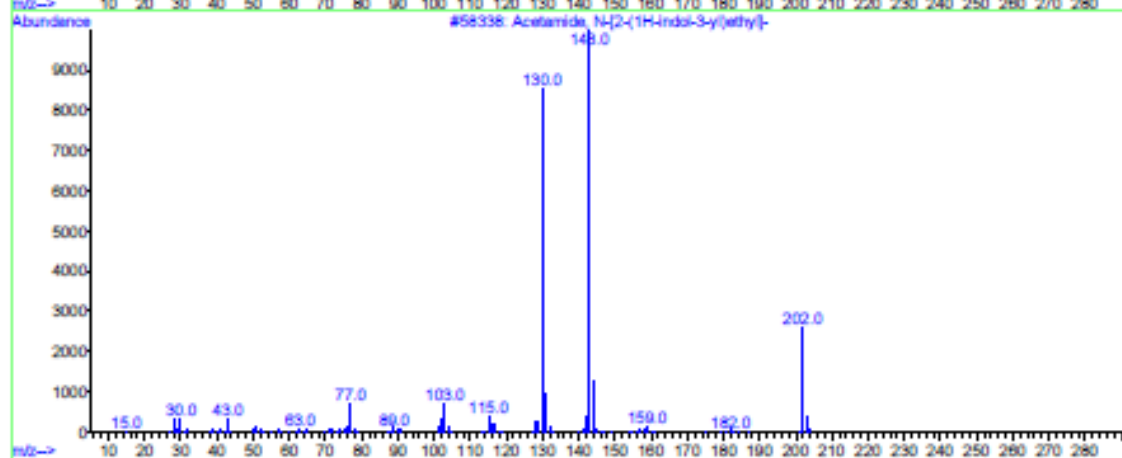
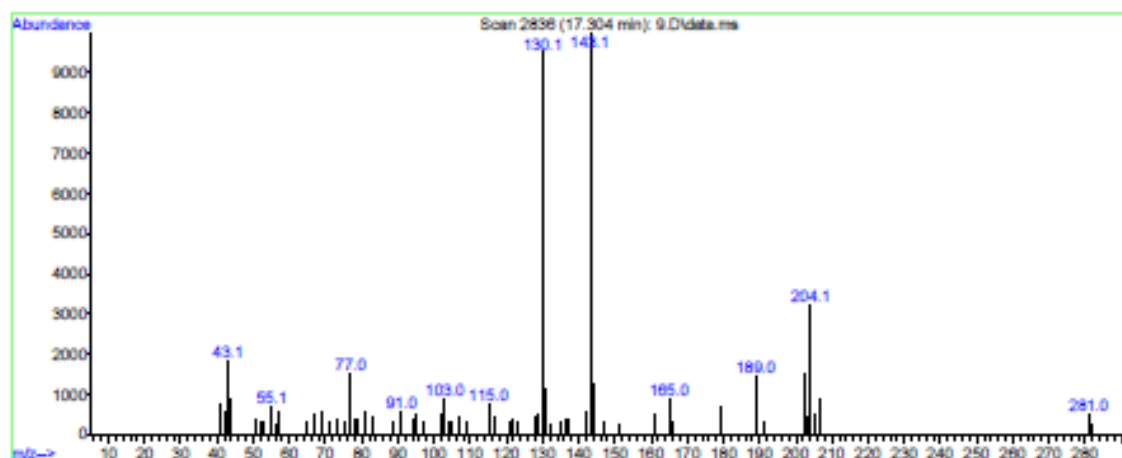
Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 91
ID : 2H-Pyran-2-one, tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-



Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 98
ID : 7-Benzofuranol, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-



Library Searched : D:\Database\NIST05a.L
Quality : 93
ID : Acetamide, N-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-



ANEXO 5

Composición medio Hanson (1 Litro)

Glucosa	80 g
Sulfato Amonio	7,92 g
Fosfato diácido de Potasio	5,0 g
Sulfato de Magnesio	1,0 g

2 mililitros de una solución de elementos traza preparados en 100 mL

Sulfato ferroso	0,1 g
Sulfato de Cobre	0,015 g
Sulfato de Zinc	0,16 g
Sulfato de Manganeso	0,01 g
Molibdato de Amonio	0,1 g
Dinitrito de Cobalto *6H ₂ O	0,01 g