



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Eduardo Valenzuela F.
INSTITUTO: Microbiología
FACULTAD: Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Juan C. Paredes G.
INSTITUTO: Química
FACULTAD: Ciencias

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS DE CEPAS
FÚNGICAS DE SUELOS DE PRADERAS DE LA X REGIÓN DE CHILE”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico

PAOLA ANDREA LORCA FUENTEALBA

VALDIVIA – CHILE

2007

A mis Padres, Hermanos, a mi querido Sobrino

Nicolás y a Nano.

“Una de las alegrías de mi vida se cumple y mas

aún si los veo a ustedes felices”

Agradecimientos

Al proyecto DID N° S – 200554, quien otorgó el financiamiento para el desarrollo de esta tesis.

Al profesor E. Valenzuela, a quien yo no conocía y que me acogió como sólo él sabe hacerlo, en que muchas veces no se sabía si realmente estaba enojado o sólo era la forma de cómo el expresaba sus bromas, pero la verdad es que debo agradecerle la paciencia, el tiempo, la dedicación, la enseñanza, la confianza que puso en mi para así lograr mis objetivos y todo esto asociado a un protocolo tanto de horarios como de cuidados dentro del laboratorio que lo hace a usted una persona ejemplar. Muchas gracias.

Al profesor J. C. Paredes, profesor que siempre estuvo para apoyarme y orientarme en los momentos difíciles, quien daba animo para seguir adelante. Agradezco esa energía y positivismo que entrega a cada alumno que lo necesite aunque usted estuviera cansado siempre tenia fuerza para dar palabras de aliento a los demás. Lo cual no desmerece su conocimiento en lo se refiere al desarrollo de la tesis, ya que siempre estuvo dispuesto a realizar lo mejor para el desarrollo de esta.

A las profesoras M^a Teresa Carmona y Mónica Quiñones del práctico de Química Orgánica que hicieron mas agradable y amena la estadía en el laboratorio de química orgánica, profesoras que siempre tenían un cafecito y experiencias de las cuales uno saca provecho. Gracias por siempre estar dispuestas a responder las dudas tanto del alumnado como de alumnas tesisistas.

A J. Pardo, Técnico Académico encargado del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, quien siempre tuvo la disposición de otorgar tiempo, conocimiento, experiencia y materiales

para así realizar con éxito el desarrollo experimental de algunos ensayos químicos en que el participó desinteresadamente.

No dejo de agradecer a Oscar Martínez quien siempre estuvo dispuesto a ayudar y orientar y en especial por otorgar palabras de aliento cuando las necesité.

A mis padres que siempre me han apoyado y confiado en mis capacidades, que me entregaron todo lo necesario para cumplir este paso, tanto en lo monetario como en lo moral, lo que agradezco eternamente.

Gracias Chochi, mi hermano, por entenderme, comprenderme y ayudarme siempre que lo necesité y en especial a mi sobrino Nicolás que es la alegría y el camino de mi vida.

A mis amigas de siempre Pamela, Mariela y Carola que en forma incondicional me entregaron su cariño y amistad, lo que hoy en día es muy difícil encontrar sin que pidan algo a cambio.

A mis compañeras y amigas Rossana, Ximena y en especial a Loret, Karina y Fabiola, chicas fueron tantas y variadas las lecciones vividas en este paso por la universidad y de las cuales sacamos grandes enseñanzas que nos hicieron madurar como personas y aprender a valorar nuestra amistad.

Y no puedo dejar de agradecer a quien me ha entregado su apoyo y amor en forma incondicional, Nano.

A todos ustedes muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

		Pág.
1	RESUMEN.....	1
	SUMMARY.....	2
2	INTRODUCCIÓN.....	3
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1	MATERIALES.....	10
3.1.1	Material biológico.....	10
3.1.2	Reactivos.....	10
3.1.3	Equipos.....	11
3.1.4	Otros.....	11
3.2	MÉTODOS.....	12
3.2.1	Masificación de cepas de microorganismos controles.....	12
3.2.2	Masificación de las cepas fúngicas y obtención de desechos metabólicos.....	12
3.2.3	Determinación de actividad antimicrobiana de los filtrados de las cepas en ensayo.....	13
3.2.4	Método extracción líquido-líquido de los filtrados fúngicos seleccionados.....	14
3.2.5	Determinación de la actividad antimicrobiana de fases polares y apolares obtenidas desde los filtrados fúngicos seleccionados.....	15
3.2.6	Análisis espectroscópico de la fase escogida con actividad antimicrobiana y un antibiótico y análisis cromatográfico de la fase elegida.....	15
3.2.6.1	Medición del espectro UV-visible de la fase con actividad inhibitoria y de un antibiótico (penicilina V).....	16

3.2.6.2	Análisis en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a la fase con actividad escogida.....16
3.2.7	Aislamiento y fraccionamiento de la fase con actividad inhibitoria obtenida desde el filtrado fúngico seleccionado.....17
3.2.7.1	Cromatografía de capa fina para seleccionar solventes.....17
3.2.7.2	Cromatografía en columna de la fase con actividad inhibitoria obtenida desde el filtrado fúngico seleccionado.....17
3.2.7.3	Cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna.....18
3.2.7.4	Determinación de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas por cromatografía de capa fina19
3.2.8	Separación de componentes por cromatografía de capa fina preparativa obtenidos desde las fracciones originales con actividad inhibitoria.....20
3.2.9	Identificación y caracterización por métodos cromatográficos y espectrales de al menos un componente con actividad antibacteriana.....21
3.2.9.1	Determinación de la pureza de los componentes obtenidos de las fracciones originales con actividad mediante cromatografía de capa fina.....21
3.2.9.2	Espectrofotometría UV- visible de los componentes obtenidos por cromatografía en capa fina.....22
3.2.9.3	Espectroscopía Infrarroja (IR) de dos de los componentes obtenidos por cromatografía en capa fina.....22
3.2.10	Caracterización física y química de al menos un componente con actividad inhibitoria.....22
3.2.10.1	Medición de pH.....23
3.2.10.2	Determinación de la solubilidad.....23
3.2.10.3	Punto de Fusión.....23

4	RESULTADOS.....25
4.1	Determinación de actividad antimicrobiana de filtrados fúngicos....25
4.2	Selección de cepas fúngicas.....29
4.3	Determinación de actividad antimicrobiana de fracciones apolares y polares obtenidas desde los filtrados de cepas fúngicas seleccionadas.....30
4.4	Determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....32
4.5	Separación por cromatografía de capa fina de la fracción apolar obtenida del extracto de la cepa seleccionada <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....34
4.6	Separación por cromatografía en columna de constituyentes del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....35
4.7	Determinación de actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina preparativa.....38
4.8	Identificación y separación de componentes por cromatografía de capa fina preparativa de tres fracciones originales, dos con actividad inhibitoria y una sin actividad inhibitoria.....42
4.9	Espectrofotometría UV - visible para componentes determinados desde fracciones originales mediante cromatografía de capa fina.....45
4.10	Espectroscopía infrarroja para los componente 2 y 3 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....47
4.11	Caracterización química y física de los componentes con actividad inhibitoria obtenidos desde la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....49
4.11.1	Determinación del pH de los componentes 2 y 3, obtenidos desde la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....49
4.11.2	Determinación de la solubilidad de los componentes 2 y 3,	

	obtenidos desde la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....	50
4.11.3	Determinación del punto de fusión del componente 3, obtenido desde la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....	50
5	DISCUSIÓN.....	52
6	CONCLUSIÓN.....	57
7	LITERATURA CITADA.....	58
	ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Pág.
Figura 1	Extracción líquido-líquido de filtrados de cepas fúngicas seleccionadas.....	30
Figura 2	Halos de inhibición producida por la fracción apolar de 100 µl obtenida del extracto de <i>Penicillium frequentans</i> / T3 sobre tapiz de A: <i>Bacillus subtilis</i> . B: <i>Staphylococcus aureus</i> y C: <i>Candida albicans</i> respectivamente.....	32
Figura 3	Gráfico de determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fase apolar obtenida a partir del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3, leído a una longitud de onda de 254 nm.....	33
Figura 4	Cromatografía de capa fina, los colores corresponden a los distintos constituyentes de la fase apolar obtenida del extracto de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....	35
Figura 5	Columna que muestra los diferentes colores correspondientes a los distintos constituyentes de la fase apolar del extracto de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....	36
Figura 6	Cromatografía de capa fina preparativa correspondiente a la fracción original (27 –32) sin activa antibacteriana y las fracciones originales (33-34 y 91-92) con actividad antibacteriana.....	42
Figura 7	Cromatografía de capa fina para los componentes 2, 3, 4, 5.....	44
Tabla 1	Tamaño de halos producidos por alícuotas de filtrados de cepas fúngicas aisladas desde <i>Lolium perenne</i> (ballica inglesa) sobre tapices bacterianos y fúngico control.....	25
Tabla 2	Tamaño de halos producidos por alícuotas de 200 µl de filtrados de cepas fúngicas aisladas desde <i>Dactylis glomerata</i> (pasto ovillo), sobre tapices bacterianos y fúngico control.....	27
Tabla 3	Tamaño de halos producidos por alícuotas de 200 µl de filtrados de cepas fúngicas aisladas desde <i>Trifolium repens</i> (trébol blanco), sobre tapices bacterianos y fúngico control.....	28
Tabla 4	Cepas fúngicas seleccionadas, tamaño del halo y peso seco del micelio.....	29

Tabla 5	Determinación cualitativa de extractos apolares y polares obtenidos desde filtrados fúngicos de cepas seleccionadas ensayados en tapices de cepas microbianas controles.....31
Tabla 6	Volúmenes totales, relación de solventes utilizados y número de fracciones recolectadas.....37
Tabla 7	Fracción ensayada, actividad inhibitoria, tamaño del halo formado (cm) y características observadas en el halo de inhibición.....40
Tabla 8	Fracción final con actividad inhibitoria, fracciones originales y su actividad inhibitoria.....41
Tabla 9	Valores de Rf determinados para bandas observadas al UV.....44
Tabla 10	Datos de la máxima longitud de onda y absorbancia en el espectro UV para componentes de fracciones originales obtenidas a partir de la fase apolar, de la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3 y de la penicilina V.....46
Tabla 11	Números de onda y los respectivos grupos funcionales según literatura y los números de onda determinados en los componentes 2 y 3 obtenidos desde la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....47
Tabla 12	Números de onda (cm ⁻¹) y los grupos funcionales según literatura y la frecuencia (cm ⁻¹) de la penicilina V.....49
Tabla 13	Solventes y determinación de la solubilidad de los componente 2 y 3.....50
Tabla 14	Punto de fusión de cristales del componente 3 obtenido desde la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....51

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
ANEXO 1	Tabla 1. Taxa y números de cepas fúngicas a las cuales se les determinó la capacidad de producir metabolitos con capacidad inhibitoria para bacterias y hongos.....	65
ANEXO 2	Tabla 2. Número de fracciones recolectadas y número de fracciones unidas.....	66
ANEXO 3	Tabla 3. Fracciones unidas y clasificación de fracciones con iguales revelados al UV.....	67
ANEXO 4	Gráficos de espectros UV-visible del blanco (metanol), las fracciones analizadas, la fase apolar y de la penicilina V.....	68
	Figura 1. Gráfico del espectro UV-visible del metanol (blanco) determinado entre 200 y 750 nm.....	68
	Figura 2. Gráfico del espectro UV-visible del componente 1 determinado entre 200 y 750 nm.	68
	Figura 3. Gráfico del espectro UV-visible del componente 2 determinado entre 200 y 750 nm.....	69
	Figura 4. Gráfico del espectro UV-visible del componente 3 determinado entre 200 y 750 nm.....	69
	Figura 5. Gráfico del espectro UV del componente 4 determinado entre 200 y 750 nm.....	70
	Figura 6. Gráfico del espectro UV-visible del componente 5 determinado entre 200 y 750 nm.....	70
	Figura 7. Gráfico del espectro UV-visible de la fase apolar determinado entre 200 y 750 nm.....	71
	Figura 8. Gráfico del espectro UV-visible de la penicilina V determinado entre 200 y 750 nm.....	71
ANEXO 5	Gráficos de espectroscopía infrarroja para los componente 2 y 3 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3 y el gráfico de la penicilina V, según	

	literatura.....72
	Figura 9. Gráfico de espectroscopía infrarroja para el componente 2 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....72
	Figura 10. Gráfico de espectroscopía infrarroja para el componente 3 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de <i>Penicillium frequentans</i> / T3.....73
	Figura 11. Gráfico de espectroscopía infrarroja de la penicilina V.....74
ANEXO 6	Estructura química de la penicilina V y del anillo β -lactámico....75
	A) Penicilina V.....75
	B) Anillo β -lactámico.....78
ANEXO 7	Estructuras químicas de metabolitos activos extraídos del <i>Penicillium frequentans</i>76
	A) Ácido penicílico.....76
	B) Citrinin.....76
	C) Frequentin.....77
	D) Palitantin.....77
	E) Patulin.....78
ANEXO 8	Preparación de medios de cultivos.....79
	A) Agar malta al 2%.....79
	B) Agar peptona al 2%.....79
	C) Caldo malta al 1%.....79

1. RESUMEN

Hay una constante necesidad de nuevas drogas antimicrobianas debido al inevitable desarrollo de resistencia patógena que es resultado del abuso de estas drogas por los humanos. Esto ha llevado a las industrias farmacéuticas a estudiar productos naturales con actividad biológica de distintas fuentes en especial de fungi, ya que proveen de una diversidad de metabolitos activos. En relación a esto es que nuestro objetivo es obtener y caracterizar químicamente al menos un producto metabólico de cepas fúngicas rizosféricas que presente actividad inhibitoria al ser extraídos desde filtrados de cultivos líquidos de cepas fúngicas rizosféricas. Para lo cual, se estudiaron 100 cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L., *Lolium perenne* L. y *Dactylis glomerata* L. las que se sembraron en agar malta al 2%. Luego las cepas fúngicas fueron cultivadas en caldo malta al 1%, e incubadas por 10 días a 1500 r.p.m. obteniéndose el filtrado respectivo, a las que se les estudio su actividad antimicrobiana frente a las cepas controles *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6639, *Escherichia coli* ATCC 25922 y la levadura *Candida albicans* ATCC 90029. Del total de filtrados fúngicos con actividad inhibitoria se escogieron cinco filtrados fúngicos a los que se le realizó extracción líquido-líquido para determinar la fase que presenta la actividad antimicrobiana eligiéndose sólo uno de ellos, la fase apolar de la cepa *Penicillium frequentans* / T3. A ésta fase se le realizaron análisis de HPLC además se realizó cromatografía de columna para separar los componentes que constituyen la fase y aislar los componentes con actividad antimicrobiana. Para caracterizar al menos uno de los componentes que presenta la actividad se sometió a análisis fisicoquímicos como espectroscopía UV; FT-IR; pH; solubilidad; punto de fusión. Los resultados se compararon con el estándar penicilina V oral, e indican que los componentes no pertenecen a las penicilinas.

SUMMARY

There is a constant need for new antimicrobial drugs due to the inevitable development of pathogenic resistance that results from the abuse of these drugs by humans. This has led the pharmaceutical industries to study biologically active natural products from different sources, especially the fungi, which have already provided a variety of active metabolites. Our objective was to obtain and chemically characterize at least one metabolic product from rhizospheric fungal strains that presents inhibitory activity upon being extracted by filtration from liquid cultures of rhizospheric fungal strains. To this end, we studied 100 fungal strains isolated from the rhizosphere of *Trifolium repens* L., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomerata* L., which we inoculated on 2% malt agar. Later, these fungal strains were cultured in 1% malt broth, and incubated for 10 days at 1500 r.p.m., thereby obtaining the respective filtrates. We studied the antimicrobial activity of these filtrates against the control strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6639, *Escherichia coli* ATCC 25922, and the yeast, *Candida albicans* ATCC 90029. From all of the fungal filtrates with inhibitory activity, we selected five fungal filtrates from which we carried out liquid-liquid extraction to determine the phase that displays antimicrobial activity, selecting only one of these, the apolar phase of the strain, *Penicillium frequentans* / T3. We carried out a HPLC analysis of this phase. Moreover, we used column chromatography to separate the components that constitute the phase and isolate the components with antimicrobial activity. To characterize at least one of the components that displays such activity, we subjected them to physiochemical analyses such as UV spectroscopy, FT-IR, pH; solubility, and fusion point. We compared the results with the oral penicillin V standard, and these comparisons indicate that the components are not penicillins.

2. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y desarrollo de antibióticos es uno de los más significantes avances en la medicina del siglo XX. Sin embargo, muchos antimicrobianos que son usados para combatir enfermedades en humanos se han vuelto ineficientes. Por consiguiente, para asegurar que las drogas efectivas sean de utilidad en el futuro, es necesario perfeccionar los medicamentos en uso, sintetizar nuevos antibióticos u obtener nuevos antibióticos a partir de fuentes naturales.

Los productos naturales juegan un importante rol en el descubrimiento que conlleva al desarrollo de drogas para el tratamiento de enfermedades humanas y en el ambiente microbiano es una importante fuente de metabolitos de agentes activos originales (Garcia et al, 2004).

Los microorganismos han sido tradicionalmente usados por producir una importante variedad de sustancias para la industria farmacéutica y alimenticia. Por eso que los metabolitos primarios y secundarios, tales como péptidos, enzimas, ácidos orgánicos y antibióticos producidos por hongos son usados para este propósito (Garcia et al, 2004).

Los hongos son organismos eucariontes y cada célula fúngica posee al menos un núcleo, se encuentran en la naturaleza y son imprescindibles para descomponer y reciclar la materia orgánica (Jawetz et al, 2002). Se estima que el número de especies fúngicas en el mundo es de alrededor de 1.5 millones. Los hongos son una importante y original fuente de metabolitos secundarios con una pronunciada actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral. Se han

descrito aproximadamente 4.000 metabolitos secundarios con actividad biológica de origen fúngico, siendo la gran parte de estos metabolitos producidos, entre otros hongos por los pertenecientes al género *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Rodríguez et al, 2000), ejemplo de ello es la penicilina descubierta por Fleming en 1928, obtenida de la especie *Penicillium notatum* Westling, la familia de las cefalosporinas se inició en 1948 por Botzu a partir del hongo *Cephalosporium acremonium* Corda capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn), la estreptomicina aislada de *Streptomyce griseus* (Krainsky) Waksman and Henrici actúa sobre bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers) y enterobacterias (Flórez J, 1997).

En la actualidad se dispone de muchos agentes antibacterianos distintos, ya sean de origen natural o sintético, que se pueden clasificar en grupos, por ejemplo, basándose en el punto de acción en la célula bacteriana y en la estructura química, se encuentran: los inhibidores de la síntesis de la pared celular (betalactámicos y glucopéptidos), los inhibidores de la síntesis de proteínas (aminoglicosidos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas), los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (sulfamidas, trimetropim, quinolonas y rifamicinas) entre otros. Los agentes antimicóticos al contrario son muy limitados y se clasifican de la misma forma que los antibacterianos, entre ellos se encuentran: inhibidores de la síntesis de la pared celular (azoles), inhibidores de la función de la membrana celular (polienos), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (pirimidinas y benzofuranos). (Mims et al, 1999).

Entre los hongos filamentosos se encuentra la especie *Penicillium frequentans* Westling las colonias de este hongo alcanzan 5 - 6 cm de diámetro en 12 - 14 días a 25 ° en CzA, son de color verde oscuro, aterciopelado y al reverso de color variable amarillo-café. Microscópicamente presenta conidióforos de 100- 200 μm de largo. Conidias de 3,0- 3,5 μm de diámetro, globosa a subglobosa que forman columnas compactas, las conidias tienen una pared lisa o sutilmente áspera. *P. frequentans* puede crecer a 5 °C pero no a 37 °C, a un potencial de agua de 100 bars. La temperatura óptima de crecimiento es 23 °C y para la germinación de las conidias se reporta una temperatura entre los 23 – 30 °C a 200 bars (Domsch, 1980).

P. frequentans es una especie muy frecuente que se distribuye en todo el mundo, particularmente en bosques de suelos ácidos, ya que el rango de pH del suelo para el desarrollo de la especie es 3,8- 4,4, sin embargo, se ha encontrado en otros tipos de suelos. *P. frequentans* también se encuentra en la rizósfera de varias plantas forestales incluyendo helechos, abeto rojo, roble, *Lolium perenne* L y ha sido aislado de la putrefacción de nueces en Brasil, de la pulpa de maderas y papel, del intestino de gusanos, de colmenas de abejas, de la superficie de vidrios y muestra una moderada sensibilidad sobre suelos de micostasis. Además, *P. frequentans* ha sido descrito como parásito de esclerocios de varios hongos. (Domsch, 1980).

Entre los productos metabólicos obtenidos de *P. frequentans* se encuentran ácidos como el succínico, el tartárico, el cítrico y el oxálico; α -, β -, γ -hidroxibutiratos; antraquinonas como emodin, questininol y questin; palmitato de ergosterol y el antifúngico palitantin que se relaciona con el frequentin con actividad sobre semilla de mostaza, garbanzos y otros. (Domsch, 1980).

P. frequentans inhibe *Streptomyces griseus* (Krainky) Waksman and Henrici, *Erwinia carotovora* Goto and Matsumoto, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch y *Fusarium sporotrichioides* Sherb, pero su actividad antibiótica no es uniforme en las especies indicadas. (Domsch, 1980).

Es necesario destacar la importancia que *P. frequentans* se encuentre en la rizósfera de varias plantas, ya que la rizósfera es una zona de interacción única y dinámica entre las raíces de los vegetales y los microorganismos del suelo, corresponde a un sitio de máxima actividad biológica caracterizado por el aumento de la biomasa microbiana, controlado predominantemente por las propiedades de la planta, esta situación es debido a que la planta abastece de nutrientes y energía al crecimiento de la microflora. (Toro, 2004).

De las poblaciones de microorganismos que habitan en la rizósfera, las especies fúngicas son capaces de descomponer ciertos compuestos orgánicos como celulosa, quitina, lignina, proteínas, hidrocarburos, etc., desempeñando un papel fundamental en los ciclos de los elementos, tan importantes como el nitrógeno, el fósforo o el carbono, de ahí la importancia del estudio de este tipo de hongos que residen en la rizósfera, ya que cuentan con enzimas capaces de producir metabolitos secundarios útiles para el ataque de microorganismos patógenos.

Por otra parte, un problema que se presenta con bacterias y hongos patógenos, es que son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, siendo la causa más significativa de aparición y reactivación de enfermedades infecciosas. Según Walsh

(2003) el desarrollo cronológico del significado de la resistencia en la clínica es multifactorial, depende de factores, tales como: la cantidad de antibiótico usado en la terapia, cuan amplio son las prescripciones, la frecuencia en que los niveles sub-terapéuticos de antibióticos son seleccionados por organismos resistentes. De este modo hay una necesidad por nuevos antibióticos para el tratamiento de patógenos resistentes a múltiples drogas que frecuentemente se encuentran ubicados tanto en hospitales como en la comunidad (Sutcliffe, 2005).

Esto ha puesto de manifiesto la preocupación por el uso apropiado de los antibióticos y la necesidad de contar con nuevos fármacos, por lo que la industria farmacéutica ha retomado el interés por la investigación en antimicrobianos, donde las estrategias a seguir consisten en la modificación de antimicrobianos ya conocidos, la obtención de moléculas nuevas y el redescubrimiento de otras que quedaron en segundo plano (García et al, 2003).

Estas estrategias se hacen más fáciles hoy en día con el desarrollo alcanzado en los métodos y técnicas de aislamiento e identificación de productos (cromatografía de columna, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida con espectro de masa, infrarrojo (IR), HPLC-UV). El creciente desarrollo de la biotecnología y de la bioingeniería y el nivel de las investigaciones mundiales hacen que el área de los productos naturales sea la de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica (Brizuela et al, 1998).

En general, se puede concluir que los hongos son verdaderas fábricas químicas asombrosamente expertas en la síntesis de compuestos. Aunque las bacterias y levaduras ofrecen ventajas considerables con respecto a los hongos en cuanto a facilidades tecnológicas

de cultivo y conocimientos biológicos más completos, los basidiomicetos y hongos miceliares en general presentan potencialidades de biosíntesis más interesantes y numerosas, por lo que resulta conveniente profundizar en el cultivo y manejo de estos microorganismos, con el fin de identificar metabolitos nuevos y útiles para el ser humano. Es por esta razón que actualmente son objeto de un renovado interés, dado que apenas una mínima fracción de la biodiversidad ha sido explorada farmacológicamente, ya que se cuenta con eficientes técnicas de reconocimiento de la actividad biológica y de la identidad química de los compuestos presentes. Si bien, se requieren grandes esfuerzos para obtener fármacos a partir de fuentes naturales, es enteramente coherente buscar nuevas sustancias con actividad antimicrobiana a partir de moléculas de origen natural.

En base a lo señalado se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Filtrados de cultivos líquidos de cepas fúngicas rizosféricas presentan actividad antimicrobiana y antifúngica.

Para aceptar o rechazar la hipótesis se plantea el siguiente objetivo general y específico.

OBJETIVO GENERAL

Obtención y caracterización química de al menos un desecho metabólico de cepas fúngicas rizosféricas que presente actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, y *Candida albicans* (Robin) Berkhout.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Cultivar cepas fúngicas rizosféricas en medio de cultivo líquido para obtener desechos metabólicos.
- 2- Determinar actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos obtenidos desde los medios de cultivos líquidos donde se cultivaron las cepas fúngicas y seleccionar aquellos extractos que presentan mayor actividad inhibitoria.
- 3- Realizar extracciones con solventes orgánicos a los medios de cultivos líquidos de las cepas fúngicas que presentaron mayor actividad inhibitoria.
- 4- Separar mediante técnicas de cromatografía los componentes de al menos uno de los extractos fúngicos ensayados con propiedades inhibitorias.
- 5- Caracterizar químicamente el compuesto biológicamente activo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico.

Para el trabajo experimental se utilizaron 100 cepas fúngicas (ver Tabla 1 en anexo) aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L., *Lolium perenne* L. y *Dactylis glomerata* L. Las cepas bacterianas controles *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6639, *Escherichia coli* ATCC 25922 y la levadura *Candida albicans* ATCC 90029, pertenecientes al cepario del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

3.1.2 Reactivos.

Acetato de etilo extra puro Lab. Merck, acetato de etilo Lab. Equilab grado técnico, acetona pro análisis Lab. Merck, acetonitrilo pro-análisis Lab. Merck, ácido acético glacial pro-análisis Lab. Merck, agar malta al 2% (AM 2%), agar peptona al 2% (AP 2%), agua destilada desionizada, agua destilada estéril, alcohol 70°, bromuro de potasio Spectranal[®] Riedel-de Haen, caldo malta al 1%, diclorometano para análisis Lab. Merck, éter etílico Lab. Arquimed, éter de petróleo Analytic 40-60 C para análisis ACS, fenoximetil penicilina V oral 1.000.000 U.I. (penicilina V) Laboratorio Chile[®], metanol pro-análisis Lab. Hänel, metanol Omni Solv (EMDTM) MX0488-1 para HPLC, silicagel 60 (70-260 mesh ASTM) Merck, silicagel 60 GF₂₅₄ Merck, solución sulfocrómica.

3.1.3 Equipos.

Agitador orbital Lab. Line Orbil Environ-shaker, balanza Precisa 2200C, autoclave Orsa, cámara de frío Eurofrigo, cámara de incubación Kotterman GMB type S430, centrífuga Boeco Germany M-240 R, espectrofotómetro UV-vis UNICAM HELIOS α , equipo cromatógrafo Hewlett Packard modelo 1100 Agilent que utiliza bomba peristáltica cuaternaria Merck, columna C-8 Eclipse XDB-C8 5 μ L 4,6x150 mm y el software Windows NT, estufa de cultivo Trilab, estufa de secado Napco modelo 620, infrarrojo Nicolet modelo Nexus FT-IR software OMNIC, lámpara UV (200 - 900 nm) Mineralight® UVSL.25 (220 volts 50 Hz), microscopio Leitz Wetzlar Germany 761102, prensadora Carver Laboratory Press model C serie N° 24000-769, refrigerador Trotter, vórtex manual Lab. Line modelo 1291 (220 volt y 50/60 Hz), rotavapor Quimis ISO 9002, secador de pelo Sindelen® 1200.

3.1.4 Otros.

Agujas de siembra, algodón, aros sujetadores, asas de siembra, botellas de vidrio de 250 mL, columna de vidrio de 37,5 cm de largo y 1,2 de diámetro, cubetas de cuarzo de 1cm, embudo Buchner de porcelana, embudos de decantación de 250 y 5000 mL, espátulas metálicas, gradillas, jeringas de 10 mL, lápiz marcador, matraces balón de 250 y 1000 mL, matraces Erlenmeyer de 100 y 250 mL, matraz de succión, mecheros, micropipeta P-200 μ l, mortero de cuarzo, papel aluminio, papel filtro, papel filtro Whatman International Limited, parafilm, papel pH-Fix 0-14 Macherey-Nagel, pinza de sostén, pipetas graduadas 5mL, pipetas Pasteur, placa cromatográfica 25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm con silicagel 60 F₂₅₄ Merck, placas Petri de 9 cm de diámetro, placas de vidrio de 20 x 20 cm y 10 x 20 cm, portafiltras

swinnex-25 millipore, probeta graduada de 100 mL, puntillas “tips” de 200 µl, soporte universal, tómulas, tubos ensayos de 10 y 20 mL, vasos precipitados.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Masificación de cepas de microorganismos controles.

La masificación de las cepas controles bacterias y levadura se realizó como se indica: las cepas bacterias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* se sembraron por cuadruplicado en tubos que contenían agar peptona al 2% inclinado (AP) y la levadura *C. albicans* en igual número de tubos, pero que contenían agar malta al 2% inclinado (AM). Con un asa de siembra estéril se extrajo de la placa cepario un inóculo de la cepa respectiva y se sembró en cada tubo que contenía el agar correspondiente. Sembrados los tubos se incubaron a 37 °C por 24 horas. Una vez desarrollados los cultivos los tubos se sellaron con parafilm y se mantuvieron en cámara fría a 4 °C.

3.2.2 Masificación de las cepas fúngicas y obtención de desechos metabólicos.

Cada una de las 100 cepas fúngicas a ensayar (Tabla 1, en anexo 1) se masificaron individualmente, para lo cual del tubo del cepario respectivo se extrajo con una aguja de siembra un inóculo de agar con micelio el que se sembró por duplicado en placas Petri que contenían 15 mL de AM al 2%. Las placas sembradas se incubaron a 23 ± 2 °C por 7 días. Obtenido el cultivo del hongo en estudio, con un sacabocado de 1,4 cm. de diámetro se extrajeron 3 círculos de agar con micelio, estos círculos fueron depositados asépticamente con ayuda de una aguja de siembra en botellas de 250 mL (una botella por cepa) que contenían

100 mL de caldo malta al 1%. Las botellas sembradas se depositaron en un agitador orbital a 1500 r.p.m. a temperatura ambiente (11,6° - 18,4 °C) por 10 días. Finalizado el período de incubación, el contenido de cada botella fue filtrado independientemente, usando portafiltros millipore con papel filtro estéril (los portafiltros fueron ensamblados a jeringas estériles de 10 mL). Los filtrados obtenidos se recolectaron en tubos que se sellaron con parafilms y se conservaron en cámara fría a 4 °C.

3.2.3 Determinación de actividad antimicrobiana de los filtrados de las cepas en ensayo.

La actividad inhibitoria de los filtrados fúngicos se determinó en cultivos masificados de las cepas controles (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *C. albicans*). Del cultivo respectivo de la cepa control se extrajo con un asa de siembra una pequeña cantidad de inóculo y se depositó en un tubo que contenía 3 mL de agua destilada estéril, luego el tubo conteniendo la suspensión se agitó por 2 minutos en un vórtex y a continuación con una tórula se extrajo una pequeña cantidad de la suspensión y se sembró en placas Petri que contenían AP 2% (para las bacterias) y AM 2% (para la levadura). Sembradas las placas se incubaron a 37 °C por 15 minutos y luego en forma estéril sobre el cultivo bacteriano o fúngico se inoculó con micropipeta alícuotas de 10, 20, 30, 50, 100, 200 µl del filtrado fúngico en ensayo. Luego las placas se mantuvieron cerradas a temperatura ambiente por 2 horas y a continuación se incubaron a 37 °C por 24 horas. Por cada bacteria y levadura control ensayada se utilizaron 2 placas. Terminado el tiempo de incubación se observó y midió el halo de inhibición (si lo hay) y se determinó qué volumen de alícuota sembrada lo produjo. De acuerdo a los resultados obtenidos del total de filtrados ensayados se seleccionaron 5 (correspondiente a 5 cepas fúngicas), para lo cual se tomó como criterio, la mayor actividad inhibitoria que causaron los

filtrados sobre todas o en la mayoría de las cepas controles. Elegidas las 5 cepas fúngicas se procedió según el punto 3.2.2 (Materiales y Métodos) obteniéndose esta vez un litro del filtrado de cada cepa fúngica seleccionada y se determinó el peso seco micelial final respectivo (PSF), para esto último, el micelio del hongo en estudio que quedó retenido en el filtro fue retirado, depositado en papel filtro (previamente pesado) y pesado, luego los papeles conteniendo el micelio se secaron a 60 °C hasta peso constante (48 horas), para calcular el PSF se restó al peso húmedo micelial, el peso seco micelial obtenido.

3.2.4 Método extracción líquido-líquido de los filtrados fúngicos seleccionados.

Para determinar cual fase (polar o apolar) de cada uno de los filtrados seleccionados presentaba la actividad antimicrobiana se les realizó independientemente una extracción líquido-líquido. Para la partición de las fases se utilizó 1 litro de los filtrados en estudio, el cual fue depositado en un embudo de decantación más 200 mL de acetato de etilo, la mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar para separar las fases, estas últimas fueron recibidas en vasos precipitados independientes, obteniéndose finalmente 5 soluciones apolares u orgánicas de acetato de etilo de color amarillo y 5 fases polares o acuosas translúcidas correspondientes a cada uno de los filtrados fúngicos. Las fases apolares se concentraron en rotavapor para eliminar el solvente y una vez concentradas a sequedad se disolvieron con 0,5 mL de agua destilada estéril. A las fases polares se les extrajo el solvente en un rotavapor, con lo que se obtuvieron fases polares líquidas libres de solventes para continuar con los ensayos.

3.2.5 Determinación de la actividad antimicrobiana de fases polares y apolares obtenidas desde los filtrados fúngicos seleccionados.

Para determinar la actividad antimicrobiana de las fase polares y apolares obtenidas desde los filtrados fúngicos seleccionados se repitió el procedimiento 3.2.3 (señalado en Materiales y Métodos), pero esta vez se utilizaron alícuotas de 10, 30, 50, y 100 μl , de las fase obtenidas y se ensayaron únicamente en los controles (bacterias o levadura) donde los filtrados de las cinco cepas fúngicas seleccionadas mostraron actividad. Con esto se determinó que fase (polar y apolar) presentaba actividad inhibitoria, y a qué volumen de alícuota se obtiene la inhibición. En base a los resultados obtenidos, de las cinco cepas en estudio se seleccionó una cepa y con ella se continuó trabajando, para lo cual se procedió según el punto 3.2.2 (ver Materiales y Métodos) obteniéndose esta vez 3 litros del filtrado fúngico de la cepa escogida y se continuó con el paso 3.2.4 (ver Materiales y Métodos), para separar la fase con actividad.

3.2.6 Análisis espectroscópico de la fase escogida con actividad antimicrobiana y un antibiótico y análisis cromatográfico de la fase elegida.

Es necesario indicar que al trabajar con medicamentos se debe proceder según lo indica la bibliografía específica para estos productos, por lo que se procedió según sus protocolos e información.

3.2.6.1 Medición del espectro UV-visible de la fase con actividad inhibitoria y de un antibiótico (penicilina V).

Realizados los ensayos comparativos de actividad de los extractos en estudio, se seleccionó la cepa correspondiente a *Penicillium frequentans* por ser la mas efectiva. Por el origen de la cepa seleccionada se estimó necesario realizar análisis comparativo de absorción UV-visible con una muestra patrón de penicilina V. Para el análisis se utilizó como disolvente metanol, y las lecturas de los espectros se realizaron en un equipo UV-visible haciendo un barrido desde 200 hasta 700 nm. Los datos espectrales de absorción fueron analizados con el software Visión 32, finalmente se obtienen los gráficos de absorbancia (A) versus longitud de onda (λ) para cada sustancia analizada. Con los espectros obtenidos se pudo relacionar la fase en estudio con el antibiótico (penicilina V).

3.2.6.2 Análisis en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a la fase con actividad escogida.

Para el análisis en HPLC se utilizó un equipo HP 1100 y el software Windows NT, siguiendo el protocolo para penicilina V según United States Pharmacopeial Convention (2000), utilizando una columna C-8 y como fase móvil una mezcla de Agua / Acetonitrilo / Ac. Acético glacial en una proporción de 64,4 : 35,0 : 0,6.

La muestra se corrió con un flujo constante de 0,5 ml/min. durante un tiempo de 15 minutos y el detector UV-visible fue programado a 254 nm.

3.2.7 Aislamiento y fraccionamiento de la fase con actividad inhibitoria obtenida desde el filtrado fúngico seleccionado.

3.2.7.1 Cromatografía de capa fina para seleccionar solventes.

A la fase apolar con actividad inhibitoria del extracto de la cepa fúngica seleccionada de acuerdo al punto 3.2.5 (Materiales y Métodos), se le realizó una cromatografía de capa fina, para determinar los mejores solventes que permitan separar los distintos componentes de ella y luego ser utilizados en cromatografía en columna.

Para el análisis se utilizó como fase estacionaria cromatoplacas de silicagel 60 GF₂₅₄, la muestra se disolvió en metanol, se sembró con un capilar bajo corriente de aire caliente y como fase móvil se utilizó una mezcla de: Acetato de etilo / Metanol / Éter etílico en proporción 6: 3: 1, una vez eluida la muestra se reveló utilizando lámpara UV, verificando de esta manera los componentes presentes en la muestra.

3.2.7.2 Cromatografía en columna de la fase con actividad inhibitoria obtenida desde el filtrado fúngico seleccionado.

Para realizar cromatografía en columna al filtrado fúngico de la cepa seleccionada y separar los componentes que constituyen la fase con actividad, se dejó la fase útil en estado sólido, al ser obtenida en el procedimiento 3.2.4 (Ver Materiales y Métodos). Se preparó la columna cromatográfica de vidrio, de 37,5 cm. de largo y 1,2 cm. de diámetro, que contenía un algodón en su base, luego se agregó silicagel 60 (16 grs.) se empapó con éter de petróleo

(disolvente de polaridad menor) y sobre esto se depositó la cabeza de columna, que corresponde a una mezcla de silicagel 60 (1 gr.) con la muestra apolar seca (2 grs.), montada la columna se eluyó con una batería de solventes orgánicos de polaridad creciente, los que arrastraron los componentes de la fase apolar que se encontraban adsorbidos en la fase estacionaria y se recolectaron fracciones de 15 mL. para disminuir el número de tubos con fracciones obtenidas, luego de eluir la columna cromatográfica se unieron de a dos las fracciones según las características físicas (color y consistencia) a excepción de las 4 primeras recolecciones las cuales se unieron en un solo tubo, por considerar que correspondían al solvente éter de petróleo agregado antes de colocar la cabeza de columna.

3.2.7.3 Cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna.

A cada fracción obtenida según el punto 3.2.7.2 se le realizó análisis en cromatografía de capa fina preparativa con el objetivo de unir las fracciones que revelaron igual migración al UV y de esta forma reducir el número de fracciones en estudio.

Se prepararon placas de vidrio recubiertas con una capa de silicagel 60 GF₂₅₄ de 3,5 mm. de espesor, estas se sembraron con cada una de las fracciones concentradas, luego se llevaron a la cámara cromatográfica y fueron eluidas con una mezcla de Acetato de etilo / Metanol / Éter etílico en proporción 6: 3: 1. Una vez reveladas las placas se demarcó la zona que contenía los productos y se raspó con una espátula para luego lavar con una mezcla de solventes y filtrar al vacío en un embudo Büchner, de esta manera se obtuvieron finalmente 13 fracciones.

3.2.7.4 Determinación de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas por cromatografía de capa fina.

Las fracciones (13) disueltas en mezclas de solventes se depositaron por separado en matraces balón y se llevaron a sequedad en un rotavapor a 55 °C y presión reducida. Los sólidos correspondientes a las fracciones se retiraron con una espátula desde los matraces balones y se depositaron en tubos a los que se les agregó 1 mL de agua destilada estéril. A continuación se realizó el ensayo de actividad inhibitoria de cada fracción de acuerdo al punto 3.2.3, utilizando la cepa control *B. subtilis* y alícuotas de 50 µl de la fracciones diluidas.

Como las fracciones (finales) con actividad inhibitoria están constituidas por un grupo de subfracciones que se unieron según los criterios indicados en el punto 3.2.7.3, se decidió estudiar qué fracciones originales o conjunto de ellas eran las que presentaban la actividad inhibitoria, para esto se realizó una cromatografía de capa fina preparativa, utilizando algunas fracciones originales o mezclas de ellas que se conservaron disueltas en solventes a una temperatura ambiente de 10 °C no expuestas a la luz. Para el análisis cromatográfico se procedió según el punto 3.2.7.1, previamente a las muestras sólidas (por evaporación de solvente) se les agregó un poco de solvente y temperatura (baño María 30 °C) para poder sembrarlas en las placas cromatográficas y fueron reveladas con lámpara UV. Luego se extrajeron y juntaron las fracciones originales que presentaron iguales bandas que constituían la fracción final. Además, al existir fracciones que no concuerdan con las fracciones originales, pero que estaban dentro del grupo de la fracción final, estas fracciones se analizaron por separado. Realizado lo anterior, se determinó que fracciones originales presentaban la actividad inhibitoria, para lo cual fue necesario eliminar el adsorbente unido a las fracciones, para ello se filtro al vacío en embudo Buchner con papel filtro y el uso de

solventes como metanol, acetona, éter de petróleo, acetato de etilo para arrastrar la fracción unida al adsorbente. Luego las fracciones originales se depositaron por separado en matraces balón y se rotavaporizaron (para eliminar solventes) a 55 °C y presión reducida. Finalmente las fracciones originales fueron disueltas en agua destilada estéril y se procedió según el punto 3.2.3 utilizando la cepa control *B. subtilis*.

3.2.8 Separación de componentes por cromatografía de capa fina preparativa obtenidos desde las fracciones originales con actividad inhibitoria.

Determinadas las fracciones originales que presentan actividad, se planteó establecer si algunos de los componentes que conforman estas fracciones son comunes. Para ello se utilizaron las fracciones originales 33-34 y 91-92 (con actividad antimicrobiana) y la fracción 27-32 (sin actividad antimicrobiana) y se realizó el procedimiento indicado en el punto 3.2.7.3, luego la placa cromatográfica fue revelada con lámpara UV. Las bandas observadas en la placa se marcaron, numeraron, extrajeron y se trataron con filtración al vacío para eliminar el adsorbente. Luego las bandas diluidas en solventes (éter etílico y/o metanol y baño María 30 °C) fueron recolectadas en tubos que se rotularon con números (indicando el color observado al UV) los tubos se taparon con algodón y se conservaron por 7 días a 20 °C para la evaporación del solvente.

3.2.9 Identificación y caracterización por métodos cromatográfico y espectrales de al menos un componente con actividad antibacteriana.

3.2.9.1 Determinación de la pureza de los componentes obtenidos de las fracciones originales con actividad mediante cromatografía de capa fina.

Como se señaló en el punto 3.2.8, las bandas recolectadas se depositaron en tubos con solventes y luego se procedió a evaporar el solvente, como consecuencia de lo anterior en algunos tubos se formaron precipitados y también se observó un líquido viscoso de color café oscuro. Para determinar si los precipitados corresponden a componentes puros se realizó una cromatografía de capa fina de acuerdo al punto 3.2.7.1 con las siguientes modificaciones: (a) los precipitados obtenidos fueron disueltos en una pequeña cantidad de metanol a baño María (30 °C); (b) se utilizó una placa cromatográfica de aluminio que contenía el adsorbente, silicagel, y (c) la fase móvil utilizada consistió en acetato de etilo y metanol en una relación de 70:30. Los componentes analizados fueron los designados como 2 y 3 (obtenidos de las fracciones originales 33-34), 4 y 5 (obtenidos de las fracciones originales 91-92), el componente 1 (obtenido de las fracciones originales 33-34 y 91-92) no se consideró por ser la base de la inoculación por lo que separaría los componentes ya observados. Concluida la cromatografía, se reveló con lámpara UV y se determinó el Rf, como indicador de la pureza del componente.

3.2.9.2 Espectrofotometría UV-visible de los componentes obtenidos por cromatografía en capa fina.

Los componentes sólidos en estudio designados 1, 2, 3, 4, 5 (obtenidos a partir de las fracciones originales activas 33-34 y 91-92) se disolvieron en metanol previo a ser calentados a baño María (30 °C) y se procedió según el punto 3.2.6.1 (ver Materiales y Métodos). Los gráficos obtenidos de absorbancia versus longitud de onda de los componentes serán analizados en conjunto con los gráficos resultantes de las mediciones realizadas a la fase apolar y a la penicilina V en el punto 3.2.6.1.

3.2.9.3 Espectroscopía Infrarroja (IR) de dos de los componentes obtenidos por cromatografía en capa fina.

Se utilizó 1 mg. del componente 2 y 1 mg. del componente 3, los cuales fueron finamente triturados y macerados por separado con 100 mg. de KBr. Cada producto pulverizado se llevó por separado a prensa aplicando alta presión hasta obtener una pastilla para análisis en el equipo FT-IR. Para procesar los datos del análisis se utilizó el software OMNIC. Los gráficos transmitancia (%T) versus números de ondas (cm^{-1}), indican los posibles grupos funcionales.

3.2.10 Caracterización física y química de al menos un componente con actividad inhibitoria.

Para esta caracterización se utilizaron los componentes que formaron mayor cantidad de cristales, (componentes 2 y 3), siendo el componente 3 el que presento más cristales.

3.2.10.1 Medición de pH.

Para indicar a que pH se encuentran los componentes 2 y 3, fue necesario retirar con una espátula una pequeña cantidad del sólido correspondiente a cada uno de los componentes antes indicados, los que se depositaron en tubos de ensayo y se les agregó 1 mL de agua destilada luego se revolvió hasta disolver la mayor cantidad de sólido, echo esto se introdujo una tira de pH a cada tubo, las que fueron empapadas de solución, luego se retiran y se comparan los colores obtenidos con la tabla de pH que contiene el envase de las tiras de pH.

3.2.10.2 Determinación de la solubilidad.

Para determinar la solubilidad de los componentes 2 y 3 fue necesario depositar una cantidad pequeña de cada uno de los compuestos sólidos en cuatro tubos de ensayo por componente, luego se les agregó a cada tubo 1 ml de solvente (agua, metanol, éter etílico, acetona) se agitaron los tubos y se observa si hay disolución.

3.2.10.3 Punto de Fusión.

Como método de caracterización del componente se utilizó el punto de fusión.

Se realizó según el procedimiento guía de trabajos prácticos de Química Orgánica (QUIM 114). Una pequeña cantidad de producto pertenecientes al componente 3, se molieron en un mortero de cuarzo y se colocaron sobre un porta objeto y fueron cubiertos con un cubre objetos, el conjunto se llevó al microscopio para punto de fusión que tiene conectado un amperímetro el cual se programó a 3 amperes (para otorgar el calor necesario para fundir la

muestra), además el instrumento tiene anexo un termómetro de mercurio en el que se observa la temperatura a la cual los cristales se funden.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de actividad antimicrobiana de filtrados fúngicos.

En la Tabla 1, se indican los tamaños de los halos producidos por alícuotas de 200 µl de los filtrados obtenidos desde cepas fúngicas aisladas desde *Lolium perenne* (ballica inglesa), que fueron ensayados sobre tapices de las cepas bacterianas y fúngica control.

Tabla 1. Tamaño de halos producidos por alícuotas de filtrados de cepas fúngicas aisladas desde *Lolium perenne* (ballica inglesa) sobre tapices bacterianos y fúngico control.

Cepa fúngica	Tamaño de halo (cm)			
	A	B	C	D
<i>Acremonium strictum</i> / B1	2,7 x 3,3	2,8 x 2,7	-	-
<i>Acremonium strictum</i> / B2	2,5 x 3,0	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> / B3	2,9 x 3,2	2,0 x 2,0	-	-
<i>Epicoccum purpurascens</i> / B4	2,6 x 3,6	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i> / B5	-	-	-	2,2 x 3,0
<i>Penicillium restrictum</i> / B6	3,0 x 2,6	-	2,3 x 2,4	-
<i>Penicillium restrictum</i> / B7	3,0 x 3,3	-	-	-

A: Tapiz de *Bacillus subtilis*; B: Tapiz de *Escherichia coli*; C: Tapiz de *Staphylococcus aureus*; D: Tapiz de *Candida albicans*; (-): No hubo formación de halo.

En la Tabla 1, se observa que del total de las cepas fúngicas (32) aisladas desde ballica inglesa, sólo los filtrados de 7 cepas presentaron actividad inhibitoria para algunas de las cepas bacterianas y fúngica control, los filtrados de 6 cepas inhibieron el crecimiento de *B.*

subtilis y los filtrados de *A. strictum* / B2; *A. niger* / B3 y *P. restrictum* / B7 inhibieron el crecimiento de más de una de las cepas controles. También se observa en la Tabla 1, que el filtrado obtenido de la cepa de *P. expansum* / B5 fue el único que produjo halo de inhibición sobre el tapiz de la cepa levaduriforme control *C. albicans*. Por último, el mayor halo de inhibición (3,0 x 3,3 cm) lo produjo el filtrado obtenido desde *P. restrictum* / B7 sobre el tapiz de la cepa control *B. subtilis*.

En la Tabla 2, se indican los tamaños de los halos producidos por alícuotas de 200 µl. de filtrados obtenidos desde cepas fúngicas aisladas desde *Dactylis glomerata* (pasto ovillo), ensayados sobre tapices de las cepas bacterianas y fúngica control.

En la Tabla 2, se observa que del total de las cepas fúngicas (35) aisladas desde pasto ovillo, los filtrados de 10 cepas presentaron actividad inhibitoria para las cepas controles. Los filtrados de 9 de las 10 cepas fúngicas inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* y los filtrados de *A. niger* / P1; *Ch. globosum* / P3; *M. gypseum* / P4; *Penicillium serie raistricke* / P6 y *P. restrictum* / P10, inhibieron el crecimiento de mas de una de las cepas controles. También se observa en la Tabla 2, que el filtrado obtenido de la cepa de *P. restrictum* / P10 fue el único que produjo halo de inhibición en el tapiz de la cepa levaduriforme control de *C. albicans*. Por último, el mayor halo de inhibición (5,6 x 5,4cm) lo produjo el filtrado obtenido desde *M. gypseum* / P4 sobre el tapiz de la cepa control *E. coli*.

Tabla 2, Tamaño de halos producidos por alícuotas de 200 µl de filtrados de cepas fúngicas aisladas desde *Dactylis glomerata* (pasto ovillo), sobre tapices bacterianos y fúngico control.

Cepa fúngica	Tamaño de halo (cm) en tapiz de			
	A	B	C	D
<i>Aspergillus niger</i> / P1	2,7 x 2,6	1,0 x 0,5	2,5 x 2,0	-
<i>Aspergillus niger</i> / P2	2,5 x 2,5	-	-	-
<i>Chaetomium globosum</i> / P3	-	2,4 x 2,2	2,0 x 2,0	-
<i>Microsporum gypseum</i> / P4	1,7 x 1,4	5,6 x 5,4	-	-
<i>Penicillium commune</i> / P5	2,5 x 2,5	-	-	-
<i>Penicillium serie raistricke</i> / P6	1,5 x 2,0	2,4 x 3,0	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / P7	2,3 x 3,4	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / P8	2,5 x 2,9	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / P9	2,9 x 3,2	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / P10	3,9 x 4,0	-	2,5 x 2,5	2,4 x 2,4

A: Tapiz de *Bacillus subtilis*; B: Tapiz de *Escherichia coli*; C: Tapiz de *Staphylococcus aureus*; D: Tapiz de *Candida albicans*; (-): No hubo formación de halo.

En la Tabla 3, se indican los tamaños de los halos producidos por alícuotas de 200 µl. de filtrados obtenidos desde cepas fúngicas aisladas desde *Trifolium repens* (trébol blanco), que fueron ensayados sobre tapices de las cepas bacterianas y fúngica control.

Tabla 3, Tamaño de halos producidos por alícuotas de 200 µl de filtrados de cepas fúngicas aisladas desde *Trifolium repens* (trébol blanco), sobre tapices bacterianos y fúngico control.

Cepa fúngicas	Tamaño de halo (cm) en tapiz de			
	A	B	C	D
<i>Absidia spinosa</i> / T1	-	-	-	2,0 x 2,5
<i>Penicillium frequentans</i> / T2	2,3 x 3,0	-	3,0 x 3,5	3,0 x 3,5
<i>Penicillium frequentans</i> / T3	2,0 x 2,2	-	1,3 x 1,4	2,5 x 4,0
<i>Penicillium frequentans</i> / T4	3,0 x 3,2	-	-	
<i>Penicillium frequentans</i> / T5	2,0 x 3,0	-	-	-
<i>Penicillium frequentans</i> / T6	2,4 x 2,3	-	-	2,3 x 3,0
<i>Penicillium restrictum</i> / T7	2,4 x 3,0	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / T8	3,4 x 3,0	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / T9	3,2 x 3,0	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / T10	2,5 x 3,0	-	-	-

A: Tapiz de *Bacillus subtilis*; B: Tapiz de *Escherichia coli*; C: Tapiz de *Staphylococcus aureus*; D: Tapiz de *Candida albicans*; (-): No hubo formación de halo.

Como se observa en la Tabla 3, del total de las cepas fúngicas (33) aisladas desde trébol blanco los filtrados de 10 cepas presentaron actividad inhibitoria para las cepas controles. De las 10 cepas que presentaron actividad inhibitoria, los filtrados de 9 de ellas inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* y los filtrados de *P. frequentans* / T2; *P. frequentans* / T3 y *P. frequentans* / T6 inhibieron el crecimiento de más de una cepa control. Por otra parte, los filtrados de las cepas fúngicas de *A. spinosa* / T1; *P. frequentans* / T2; *P. frequentans* / T3 y

P. frequentans / T6 fueron los únicos que produjeron halos de inhibición sobre el tapiz de la cepa levaduriforme control *C. albicans*. Por último, el mayor halo de inhibición (3,0 x 3,5 cm.) lo produjo el filtrado obtenido desde *P. frequentans* / T2 sobre los tapices de las cepas control *S. aureus* y *C. albicans*. Es necesario indicar que no se consideró esta cepa para el siguiente punto por estar contaminada.

4.2 Selección de cepas fúngicas.

De las cepas fúngicas cuyos filtrados presentaron actividad antimicrobiana (Tablas 1, 2, 3) se seleccionaron 5 cepas para continuar trabajando. Los criterios de selección fueron: tamaño del halo producido en los tapices de las cepas controles, la capacidad de inhibir la mayor cantidad de cepas controles y el peso seco del micelio fúngico rescatado luego de obtener los filtrados. En la Tabla 4, se indican las 5 cepas seleccionadas de acuerdo a los criterios señalados.

Tabla 4. Cepas fúngicas seleccionadas, tamaño del halo y peso seco del micelio.

Cepa fúngica	Tamaño del halo (cm)				Peso seco del micelio (grs.)
	A	B	C	D	
<i>Aspergillus niger</i> / P1	2,7 x 2,6	1,0 x 0,5	2,5 x 2,0	-	0,4
<i>Chaetomium globosum</i> / P3	-	2,4 x 2,2	2,0 x 2,0	-	0,3
<i>Microsporum gypseum</i> / P4	1,7 x 1,4	5,6 x 5,4	-	-	0,3
<i>Penicillium frequentans</i> / T3	2,0 x 2,2	-	1,3 x 1,4	2,5 x 4,0	0,4
<i>Penicillium restrictum</i> / P10	3,9 x 4,0	-	2,5 x 2,5	2,4 x 2,4	0,4

A: Tapiz de *Bacillus subtilis*; B: Tapiz de *Escherichia coli*; C: Tapiz de *Staphylococcus aureus*; D: Tapiz de *Candida albicans*; (-): No hubo formación de halo.

En la Tabla 4, se observa que de las 5 cepas seleccionadas la que produjo el halo de mayor tamaño (5,6 x 5,4 cm) es *M. gypseum* / P4. Los filtrados de las cepas que inhiben un mayor número de cepas controles son los obtenidos desde *A. niger* / P1; *P. frequentans* / T3 y *P. restrictum* / P10, siendo estas cepas fúngicas las que además presentaron un mayor peso seco micelial (0,4 grs.).

4.3 Determinación de actividad antimicrobiana de fracciones apolares y polares obtenidas desde los filtrados de cepas fúngicas seleccionadas.

En la Figura 1, se muestra una fotografía de la extracción líquido - líquido realizada.



Figura 1. Extracción líquido-líquido de filtrados de cepas fúngicas seleccionadas.

Como se muestra en la Figura 1, al realizar las extracciones líquido-líquido de los filtrados de las cepas fúngicas seleccionadas (ver punto 3.2.4 de Materiales y Método), se obtuvieron de cada filtrado extractos apolares de color amarillo (fase acetato de etilo) y extractos polares (fase acuosa) de color translúcido. Alícuotas de 10, 30, 50, y 100 µl de los extractos apolares y polares fueron ensayadas sobre los tapices de las cepas microbianas controles. En la Tabla 5, se indica cualitativamente la actividad de las fracciones apolares y polares determinadas sobre tapices de las cepas microbianas controles.

Tabla 5. Determinación cualitativa de extractos apolares y polares obtenidos desde filtrados fúngicos de cepas seleccionadas ensayados en tapices de cepa microbianas controles.

Cepa fúngica (filtrado)	Fracción apolar				Fracción polar			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Aspergillus niger</i> / P1	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Chaetomium globosum</i> / P3	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporium gypseum</i> / P4	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium frequentans</i> / T3	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Penicillium restrictum</i> / P10	+	-	+	+	-	-	-	-

A: Tapiz de *Bacillus subtilis*; B: Tapiz de *Escherichia coli*; C: Tapiz de *Staphylococcus aureus*; D: Tapiz de *Candida albicans*; (+): Hay inhibición; (-): No hubo inhibición.

En la Tabla 5, se observa las alícuotas de 10, 30, 50, y 100 µl de las fracciones polares obtenidas desde los respectivos extractos fúngicos que no inhibieron el crecimiento de las cepas microbianas controles, excepto las alícuota de 100 µl de la fracción apolar de *A. niger* / P1 que presentó inhibición sobre el tapiz de *E. coli*. Por su parte, alícuotas de las fracciones

apolares presentaron actividad inhibitoria para más de una de las cepas controles, excepto alícuotas apolares del extracto de *Ch. Globosum* / P3 que sólo formaron halo de inhibición en el tapiz de *E. coli*. En base a estos resultados se seleccionó la fracción apolar obtenida del extracto de *P. frequentans* / T3, pues la alícuota de 100 µl de esta fracción presentaron halos de mayor inhibición sobre tapices de *B. subtilis*; *S. aureus* y *C. albicans*, lo anterior se muestra en la Figura 2.

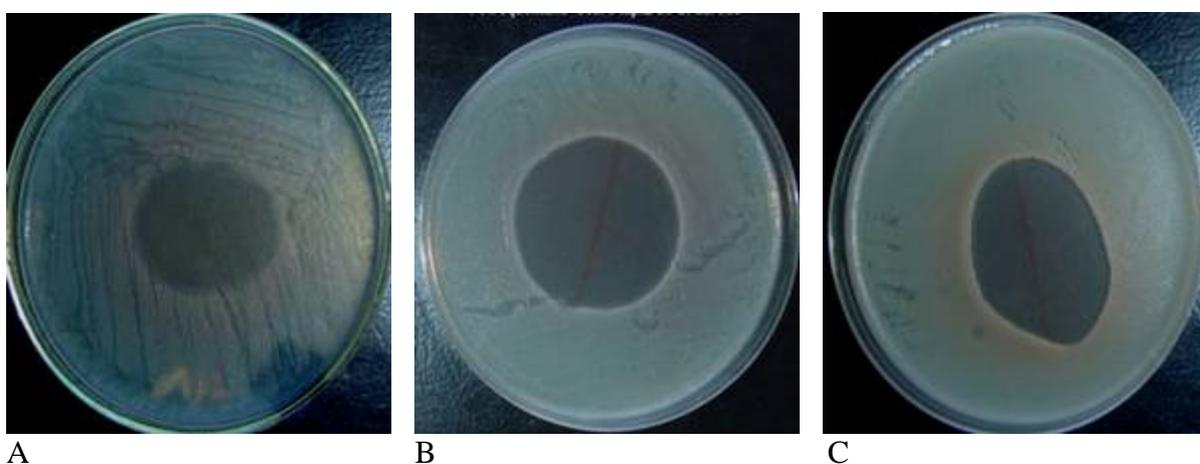


Figura 2. Halos de inhibición producida por la fracción apolar de 100 µl obtenida del extracto de *Penicillium frequentans* / T3 sobre tapiz de A: *Bacillus subtilis*. B: *Staphylococcus aureus* y C: *Candida albicans* respectivamente.

4.4 Determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

Como una manera de determinar cuantos componentes diferentes conformarían la fracción apolar obtenido del filtrado de *P. frequentans* / T3, se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cuyo gráfico se muestra en la Figura 3.

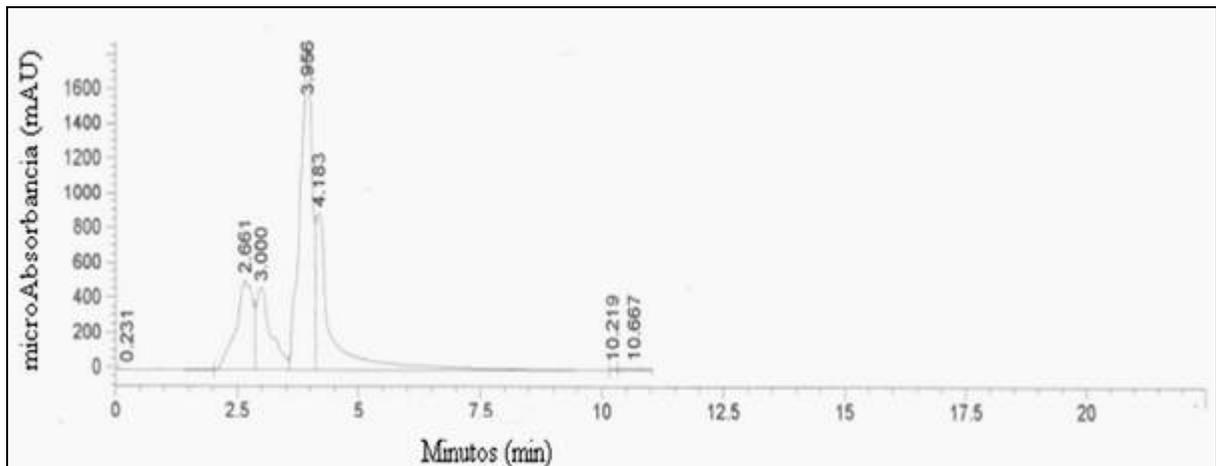


Figura 3. Gráfico de determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fase apolar obtenida a partir del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3, leído a una longitud de onda de 254 nm.

Como se observa en la Figura 3, la fase apolar obtenida desde el extracto de *P. frequentans* es posible determinar a lo menos 7 componentes diferentes, cuyos tiempos de retención y absorbancia (A) son: componente 1 = tiempo de retención: 0,231, A: $1,57478e^{-1}$ (mAU) ; componente 2 = tiempo de retención: 2,661, A: 513,01550 (mAU); componente 3 = tiempo de retención: 3,000, A: 4,6688443 (mAU); componente 4 = tiempo de retención: 3,956, A: 1796,07349 (mAU); componente 5 tiempo de retención: 4,183, A: 892,83746 (mAU); componente 6 tiempo de retención: 10,219, A: 12,88798 (mAU) y componente 7 tiempo de retención: 10,667, A: 14,62765.

4.5 Separación por cromatografía de capa fina de la fracción apolar obtenida del extracto de la cepa seleccionada *Penicillium frequentans* / T3.

Seleccionada la fase apolar del extracto de la cepa fúngica *P. frequentans* / T3 se realizó un ensayo de cromatografía de capa fina, utilizando silicagel como fase estacionaria. Con este ensayo además de lograr separar constituyentes de la fracción apolar, se determinaron los solventes (con los que se obtiene una mejor separación de los constituyentes de dicha fase), los cuales se usaron en una posterior cromatografía en columna. Los resultados indicaron que los solventes adecuados son: acetato de etilo, metanol, éter etílico (6: 3: 1). Por otra parte, al iluminar la placa cromatográfica con lámpara UV se determinó la presencia de 5 constituyentes en orden ascendente a la inoculación y a distintas alturas, presentado éstos colores: café, amarillo, amarillo, celeste y amarillo, respectivamente.

Un esquema de los colores y posición en la placa cromatográfica se muestra en la Figura 4.

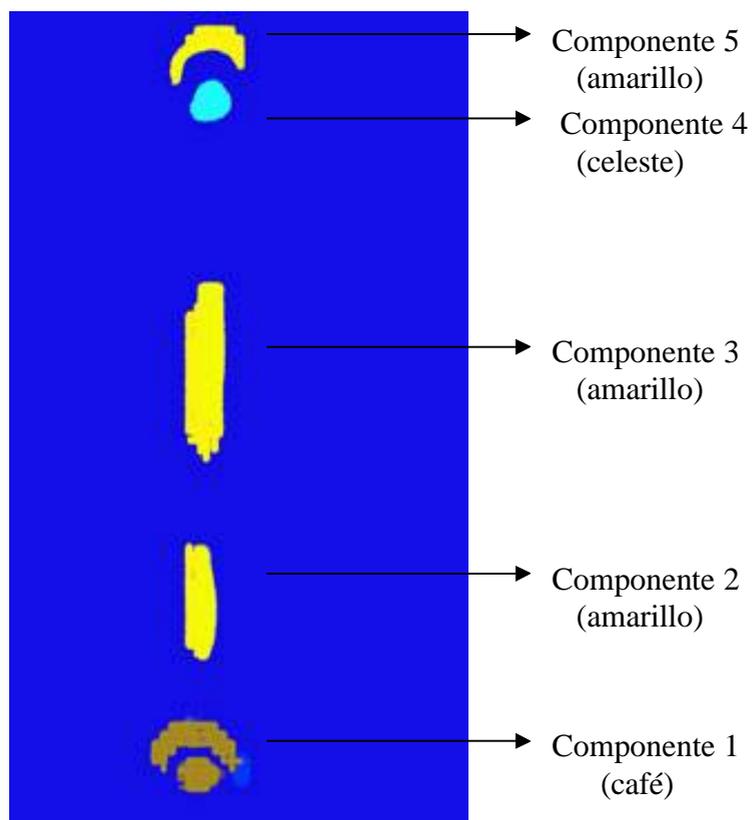


Figura 4. Cromatografía de capa fina, los colores corresponden a los distintos constituyentes de la fase apolar obtenida del extracto de *Penicillium frequentans* / T3.

4.6 Separación por cromatografía en columna de constituyentes del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

Detectados distintos constituyentes en la fase apolar del filtrado de *P. frequentans* / T3 y haber determinado con cual fase móvil se logra una mejor separación de ellos, se realizó la separación de éstos por cromatografía en columna, se utilizaron 2 g de la fase apolar seca (ver puntos 3.2.7.1 y 3.2.7.2 en Materiales y Métodos). En la Figura 5, se muestra una fotografía de la cromatografía realizada.



Figura 5. Columna que muestra los diferentes colores correspondientes a los distintos constituyentes de la fase apolar del extracto de *Penicillium frequentans* / T3.

Como se observa en la Figura 5, a medida que se agregaban solventes que variaban de polaridad, la columna adquiere distintos colores, alícuotas de 15 mL de las fracciones que avanzaban por la columna fueron recolectadas independientemente.

En la Tabla 6, se indican los volúmenes (mL) totales de solvente y las relaciones de éstos utilizados para variar la polaridad de la columna cromatográfica y así eluir la muestra en estudio, el número de fracciones recolectadas con cada uno o mezcla de los solventes y los volúmenes (mL) recolectados al eluir la columna.

Tabla 6. Volúmenes totales, relación de solventes utilizados y número de fracciones recolectadas

Volumen total de solvente utilizado (mL)	Solventes utilizados y su relación	Número de fracciones recolectadas por total de mL de solvente	Volumen de cada una de las fracciones recolectadas (mL)
200	Éter de petróleo	1 – 16	15
250	Ét. de petróleo /Ac. de etilo 8 : 2	17 – 31	15
100	Ét. de petróleo /Ac. de etilo 7: 3	32 – 37	15
100	Ét. de petróleo /Ac. de etilo 6 : 4	38 - 43	15
100	Ét. de petróleo /Ac. de etilo 5 : 5	44 - 49	15
100	Ac. de etilo/ Ét.de petróleo 7 : 3	50 - 55	15
200	Ac. de etilo/ Ét. de petróleo 8 : 2	56 - 58	15
200	Acetato de etilo	60 - 81	15
100	Ac. de etilo/ metanol 9 : 1	82 - 88	15
100	Ac. de etilo/ metanol 8 : 2	89 - 95	15
100	Ac. de etilo/ metanol 7 : 3	96 - 102	15
224	Ac. de etilo/ metanol 5 : 5	103 - 116	15
86	Metanol/ Ac. de etilo 48 : 38	117 - 122	15
150	Metanol/ Ac. de etilo 7 : 3	123 - 132	15
100	Metanol/ Ac. de etilo 8 : 2	133 - 139	15
350	Metanol	140 – 144 145- 147	15 50

Et. de petróleo = Éter de petróleo. Ac. de etilo = Acetato de etilo

Como se observa en la Tabla 6, los eluentes utilizados van de menor a mayor polaridad, siendo el metanol el más polar y del cual se utilizó un mayor volumen (350 mL). Por otra

parte, las fracciones totales recolectadas según el total de mL de solvente, varían en cantidad, pues el criterio para cambiar la mezcla de solventes fue eluir hasta que el color presente en la base de la columna desaparezca o cambie, siendo el solvente acetato de etilo el que demoró más en provocar un cambio del color. También como se muestra en la Tabla 6, se recolectaron 21 fracciones de 15 mL a excepción de las fracciones 145, 146 y 147 que fueron de 50 mL, siendo en total 147 fracciones recolectadas.

Como se señaló anteriormente con la cromatografía en columna se obtuvieron 147 fracciones que fueron recolectadas en igual número de tubos de ensayo, para continuar con el estudio se decidió disminuir el número de fracciones, para ello en forma independiente se unió el contenido de dos tubos según el orden de extracción. Con este proceso (ver Tabla 2, en anexo 2) se logró disminuir la cantidad de fracciones y por ende el número de tubos de 147 a 71. Por otra parte, a las 71 muestras se les realizó una cromatografía de capa fina preparativa, para considerar nuevas uniones de las fracciones que presentan iguales bandas al UV. Con este procedimiento (ver Tabla 3, en anexo 3) se restringió el número de 71 fracciones a un total de 13 fracciones que fueron identificadas mediante letras.

4.7 Determinación de actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina preparativa.

Se determinan en la Tabla 7 las fracciones con actividad inhibitoria obtenidas por cromatografía en capa fina preparativa, para lo cual fue necesario que las fracciones recolectadas y unidas como se señaló anteriormente fueran solubilizadas en 150 µl de agua

destilada estéril, utilizándose alícuotas de 50 µl de las soluciones obtenidas que fueron ensayadas sobre tapices de la cepa control *B. subtilis*.

En la Tabla 7, en la primera columna se indican con letras las fracciones ensayadas, en la columna dos la actividad antibacteriana para *B. subtilis* y en la columna tres el tamaño del halo (cm.) y las características observadas en el halo de inhibición.

Como se observa en la Tabla 7, de las 13 fracciones 6 (A, B, H, K, L y M) no presentan actividad inhibitoria, el resto de las fracciones presentan halos relativamente pequeños de inhibición (en promedio 1,4 x 1,5 cm.). Además, como se desprende de la Tabla 7, en los halos de las fracciones C, D, E, F, G, I y J se desarrollaron colonias mutantes resistentes de *B. subtilis*.

De acuerdo a los resultados anteriores, se decidió determinar la actividad inhibitoria de las fracciones originales (que tras su unión conformaron las fracciones finales presentadas en la Tabla 7) para *B. subtilis*.

Tabla 7. Fracción ensayada, actividad inhibitoria, tamaño del halo formado (cm.) y características observadas en el halo de inhibición.

Fracción	Actividad inhibitoria	Tamaño del halo (cm) y características observadas en el halo de inhibición
A	-	-
B	-	-
C	+	0,5 x 1,0 Desarrollo de colonias de mutantes resistentes.
D	+	0,5 x 0,5 Desarrollo de colonias de mutantes resistentes.
E	+	1,9 x 2,0 Desarrollo de pocas colonias de mutantes resistentes alrededor del halo.
F	+	1,5 x 2,0 Desarrollo de pocas colonias de mutantes resistentes alrededor del halo.
G	+	1,8 x 1,7 Desarrollo de colonias de mutantes resistentes en el centro del halo.
H	-	-
I	+	1,9 x 2,0 Desarrollo de muy pocas colonias de mutantes resistentes dispersas por el halo.
J	+	1,7 x 1,7 Desarrollo de muy pocas colonias de mutantes resistentes dispersas por el halo.
K	-	-
L	-	-
M	-	-

(+) = hubo inhibición; (-) = no hubo inhibición.

En la Tabla 8, se indican las fracciones finales con actividad inhibitoria, las fracciones originales y su actividad inhibitoria para *B. subtilis*.

Tabla 8. Fracción final con actividad inhibitoria, fracciones originales y su actividad inhibitoria.

Fracción final con actividad inhibitoria	Fracciones originales que conforman la fracción final con actividad inhibitoria.	Actividad inhibitoria de fracciones originales.
C	19-20	-
	21-22	-
D	23-24	-
	25-26	-
E	27-32	-
	33-34	+
F	35-38	+
G	39-48	+
I	83-84	+
	85-86	+
	87-88	+
	89-90	+
J	91-92	+
	93-94	+
	95-96	+
	97-98	+
	99-100	+

(+) = hubo inhibición; (-) = no hubo inhibición.

En la Tabla 8, se observa que de las 7 fracciones finales (C, D, E, F, G, I y J) con actividad inhibitoria, no todas las fracciones originales que las conforman presenta actividad inhibitoria para *B. subtilis*, tal es el caso de las fracciones C y D. Por su parte, la fracción final E, constituida por dos fracciones originales (27-32 y 33-34) indica que solo la fracción original 33-34 presenta actividad inhibitoria para *B. subtilis*. Por otra parte, las fracciones originales correspondientes que conforman las fracciones finales F, G, I y J presentan independientemente actividad inhibitoria.

4.8 Identificación y separación de componentes por cromatografía de capa fina preparativa de tres fracciones originales, dos con actividad inhibitoria y una sin actividad inhibitoria.

En la Figura 6, se muestra un esquema de la cromatografía de capa fina preparativa que permitió separar los componentes (en colores) que constituyen parte de una fracción original sin actividad inhibitoria para *B. subtilis* y de dos de las fracciones originales seleccionadas con actividad antibacteriana para esta misma bacteria.

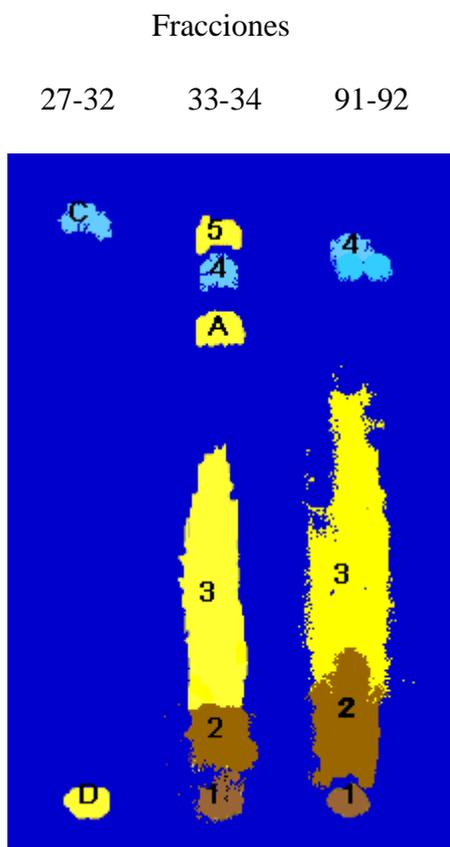


Figura 6: Cromatografía de capa fina preparativa correspondiente a la fracción original (27 – 32) sin actividad antibacteriana y las fracciones originales (33-34 y 91-92) con actividad antibacteriana.

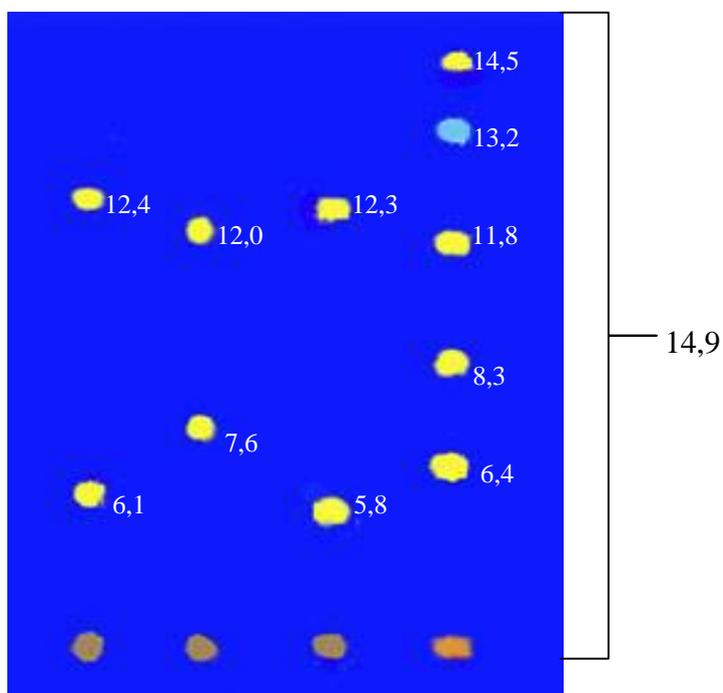
Como se observa en la Figura 6, la fracción inactiva (27-32) no presenta los mismos componentes (indicados con las letras C y D) que las fracciones con actividad. De las fracciones originales con actividad, se observa que presentan componentes similares, tanto en color como por el índice de migración (R_f) calculado el cual no se indica y sólo se diferencian porque la fracción 33-34 presenta dos componentes en posiciones diferentes (A y 5).

A partir de la placa cromatográfica preparativa utilizada para separar los constituyentes de las fracciones originales, se extrajeron los componentes 2, 3, 4, 5 y se analizaron en cromatografía en capa fina con el fin de determinar posibles diferencias o similitudes que podría existir entre ellos y que los hacía mantener la actividad inhibitoria, por lo cual, no solo fue necesario observar con lámpara UV la placa cromatográfica, además se tuvo que determinar los R_f .

En la Figura 7, se muestra un esquema de la cromatografía de capa fina para los componentes 2, 3, 4, 5 y en la Tabla 9, se indican los valores R_f para cada uno de las bandas que se observaron al UV.

Como se observa en la Figura 7, los componentes 2, 3 y 4 estarían constituidos por dos subcomponentes, en tanto el componente 5 estaría constituido por 5 subcomponentes. Por su parte, los valores R_f (Tabla 6) indican que los subcomponentes 2a, 4a y 5a serían similares, pues presentan R_f que varían entre 0,389 a 0,429. Por otra parte, los R_f de los subcomponentes 2b, 3b, 4b y 5c presentan valores similares cuyos R_f varían entre 0,791 a

0,832. Al presentar cada componente más de un Rf se indica que los componentes obtenidos y analizados no estarían puros.



Componentes: 2 3 4 5

Figura 7. Cromatografía de capa fina para los componentes 2, 3, 4 y 5.

Tabla 9. Valores de Rf determinados para bandas observadas al UV.

Rf	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Rf a	$6,1/14,9 = 0,409$	$7,6/14,9 = 0,510$	$5,8/14,9 = 0,389$	$6,4/14,9 = 0,429$
Rf b	$12,4/14,9 = 0,832$	$12,0/14,9 = 0,805$	$12,3/14,9 = 0,825$	$8,3/14,9 = 0,557$
Rf c	-	-	-	$11,8/14,9 = 0,791$
Rf d	-	-	-	$13,2/14,9 = 0,885$
Rf e	-	-	-	$14,5/14,9 = 0,973$

(-): no existe banda.

4.9 Espectrofotometría UV- visible para componentes determinados desde fracciones originales mediante cromatografía de capa fina

Finalizada la separación mediante cromatografía de capa fina de los componentes de tres fracciones originales obtenidas a partir de la fase apolar del filtrado de *P. frequentans* / T3, estos componentes (1, 2, 3, 4 y 5) fueron extraídos desde la placa cromatográfica y disueltos en metanol. Luego se realizó a cada uno de los componentes, a la penicilina V (patrón), a la fase apolar y al metanol la determinación de la absorbancia (A) en el espectro UV- visible en un rango de longitud de onda 200 a 750 nm. Tanto la penicilina V como la fase apolar se disolvieron en metanol (ver 3.2.6.1 en Materiales y Método).

En la Tabla 10, se indica el componente analizado, la máxima longitud de onda determinada y su respectiva absorbancia (A) y en el anexo 4 se muestran los gráficos de los espectros al UV- visible del blanco (metanol), patrón (penicilina V), la fase apolar y los componentes analizados.

En la Tabla 10 y en los gráficos del anexo 4, se observa que todos los componentes, el patrón y el control absorben en el espectro UV. El metanol utilizado como blanco absorbe a una longitud de onda de 202 nm (0,2098 A). Por su parte, los componentes 1 y 3 presentan más de un pico absorción. El componente 3 registró el mayor (286) y menor (212) pico de absorción a las longitudes de onda leído. Por último, la mayor A (3,9101) se determinó para el componente 4 y aparte del control, la menor A (0,8929) se determinó para el componente 1. Además la fase apolar registro tres picos de absorción 208 (1,6256 A), 264 (2,7086 A) y a 360

(1,1298 Å). Por último la penicilina V registro dos picos de absorción a 224 (2,6584 Å) y a 264 (2,2670 Å).

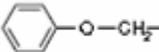
Tabla 10. Datos de la máxima longitud de onda y absorbancia en el espectro UV para componentes de fracciones originales obtenidas a partir de la fase apolar, de la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3 y de la penicilina V.

Blanco y componentes	Máxima longitud de onda (nm)	Absorbancia (A)
Blanco	202	0,2098
Componente 1	226	2,8909
Componente 1	274	0,8929
Componente 2	240	3,6925
Componente 3	212	2,8627
Componente 3	286	2,8493
Componente 4	244	3,9101
Componente 5	254	3,8097
Fase apolar	208	1,6256
Fase apolar	264	2,7086
Fase apolar	360	1,1298
Penicilina V	224	2,6584
Penicilina V	264	2,2670

4.10 Espectroscopía infrarroja para los componente 2 y 3 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

En la Tabla 11, se indican los números de onda característicos que se encuentran en la región 900 al 4000 cm^{-1} , los grupos funcionales correspondiente a esta región y la presencia o ausencia de los grupos funcionales en los componentes 2 y 3 según sus números de onda obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de *P. frequentans* / T3. Se seleccionó la región 900 al 4000 cm^{-1} pues presenta grupos funcionales que permiten realizar una caracterización química parcial de los componentes 2 y 3. Por último, en el anexo 5, se muestran los gráficos 5a y 5b de los espectros de absorción IR de los componentes antes señalados.

Tabla 11. Números de onda y los respectivos grupos funcionales según literatura y los números de onda determinados en los componentes 2 y 3 obtenidos desde la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

Números de onda (cm^{-1})	Grupos funcional	Componente 2 Nº de onda (cm^{-1})	Componente 3 Nº de onda (cm^{-1})
3500 – 3400	N- H (R- NH ₂)	NO	3409,69
3000 – 2500	O- H (COOH)	3041,96	NO
1750 – 1630	C=O (R- CONH-)	1690,39	1646,28
1450 – 1300	- CH ₃	1418,34	1409,39
1270 – 1230		NO	1234,94
1220 – 1020	C- N (R ₂ - NH)	1203,70	1039,17

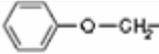
NO: el componente no presenta el grupo funcional.

Como se observa en la Tabla 11, el componente 2 y 3 se relacionan al presentar en sus moléculas los grupos funcionales siguientes: C–N de aminas secundarias (1220 – 1020), C=O de amidas (1700 – 1630) y -CH₃ terminales (1450 – 1375), ya que encontramos bandas en estos rangos de frecuencia. Pero, se diferencian en que el componente 2, presenta además de estos grupos funcionales un pico a 3041,96 cm⁻¹ atribuible a un O-H correspondiente a un ácido carboxílico. El componente 3, en cambio, presenta una banda a 3409,69 cm⁻¹ perteneciente a un N-H del grupo amino y una banda a 1234,94 cm⁻¹ que correspondiente a un éter.

En la Tabla 12, se indican los números de onda (cm⁻¹) con sus grupos funcionales y la frecuencia (cm⁻¹) de las bandas características de la penicilina V, al interpretar el espectro infrarrojo de la penicilina V, obtenido en la literatura (ver anexo 5, grafico 5c), de esta forma podemos relacionar la similitud existente entre los grupos funcionales de los componentes 2 y 3 con los de la penicilina V.

Como se observa en la Tabla 12, los números de onda para penicilina V en algunos grupos funcionales presentan mas de una banda, por ejemplo en el caso de rango 1750-1630, donde encontramos tres bandas, esto se debe a que el C=O a 1750 cm⁻¹ corresponde al anillo β-lactámico característico de las penicilinas, el C=O a 1710 cm⁻¹ a un ácido carboxílico y el C=O a 1640 cm⁻¹ a una amida que forman parte de la estructura molecular de la penicilina V. En el caso del rango 1450–1300 encontramos el grupo funcional C–H en que se consideran los metilos terminales.

Tabla 12, Números de onda (cm^{-1}) y los grupos funcionales según literatura y la frecuencia (cm^{-1}) de la penicilina V.

Números de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Frecuencia (cm^{-1})
3500 – 3400	N- H (R_2 - NH)	3500
3000 – 2500	O- H (COOH)	3000
1750 – 1630	C=O (β -lactámico) C=O (COOH) C=O (R- CONH-)	1750 1710 1640
1450 – 1300	- CH_3	1440, 1400, 1380 y 1300
1270 – 1230		1270
1220 – 1020	C- N	1200 y 1050

4.11 Caracterización química y física de los componentes con actividad inhibitoria obtenidos desde la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

4.11.1 Determinación del pH de los componentes 2 y 3, obtenidos desde la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

Al disolver separadamente los cristales de los componentes 2 y 3 en agua destilada y determinar el pH con tiras de papel indicadora de pH, se determinó que ambos componentes presentan el mismo pH ($\text{pH} = 4$). Estos valores de pH indicarían que los componentes 2 y 3 son de carácter ácido.

4.11.2 Determinación de la solubilidad de los componentes 2 y 3, obtenidos desde la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

En la Tabla 13, se indican los solventes a los que se sometieron los componentes 2 y 3 con el fin de determinar su solubilidad.

Tabla 13. Solventes y determinación de la solubilidad de los componente 2 y 3.

Solvente	Componente 2	Componente 3
Agua	Soluble	Soluble
Metanol	Muy poco soluble	Poco soluble
Acetona	Poco soluble	Poco soluble
Éter etílico	Poco soluble	Insoluble

Como se observa en la Tabla 13, por una parte, el componente 2 y 3 se asemejan en solubilidad tanto en agua como en acetona, pero el componente 3 a diferencia del componente 2 es insoluble en éter etílico y poco soluble en metanol, lo que indicaría que ambos componentes son distintos.

4.11.3 Determinación del punto de fusión del componente 3, obtenido desde la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

En la Tabla 14, se indican los puntos de fusión para el componente 3, obtenido desde la fase apolar del filtrado de *P. frequentans* / T3. No se analizó el componente 2 por contar con muy poca muestra. Esta caracterización física indica la pureza del componente analizado.

Tabla 14. Punto de fusión de cristales del componente 3 obtenido desde la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

Punto de fusión (°C)	Observaciones
230	Se fundieron dos cristales.
244	Se fundieron menos de la mitad del total de los cristales.
255	Se fundió el total de los cristales.

De acuerdo a los resultados (Tabla 14), sobre el punto de fusión de los cristales del componente, estos indicarían que el componente 3 contiene más de un constituyente y no estaría puro, pues si así lo fuera se debería haber registrado una sola temperatura a la cual todos los cristales deberían haber fundido y en el caso que existieran distintas temperaturas para un mismo componente, estas deberían estar dentro de un intervalo no mayor a 0,5 °C.

5. DISCUSIÓN

En el reino fungi se dispone de una serie de taxa que son fuente importante de metabolitos secundarios con actividad biológica. Por ejemplo, se obtienen enzimas que actúan en las rutas metabólicas que se usan en procesos industriales de alimentos o fármacos, antibióticos como: penicilina producido por *Penicillium notatum*, *P. chrysogenum*; cefalosporinas excretados por el hongo *Cephalosporium acremonium* (Schlegel et al, 1997), además se encuentran antimicóticos como equinocandinas producida por *Aspergillus nidulans*, *A. sydowi* y *Zalerion arboricola*; griseofulvina obtenida de *P. griseofulvum* (Mesa et al, 2004), con estos antecedentes se determinó la actividad antimicrobiana de las cepas en estudio de las cuales se escogieron cinco (ver Resultados, Tabla 4), las que corresponden a las especies *A. niger*, *Chaetomium globosum*, *Microsporium gypseum*, *P. frequentans* y *P. restrictum*. De estas especies escogidas se describen en la literatura metabolitos activos, siendo especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* los que presentan mayor cantidad de micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxin A y citrinine (Pepeljnjak et al 2002 y Bugno et al 2006). Con respecto *A. niger* se destaca por la producción de enzimas, ejemplo de ello es la enzima que describe Pinto et al (2001), tannase, utilizada como sustrato para síntesis química de propilgalato y trimetropim los que son usados en la industria alimenticia y farmacéutica. Con respecto *C. globosum*, Di Pietro et al (1992) se refiere a dos metabolitos antifúngicos el 2-(buta-1,3-dienyl)-3-hydroxy-4-(penta-1,3-dienyl)-tetrahydrofuran (BHT) y el epidithia-diketopiperazine, chaetomin, y Kanokmedhakul et al (2002) describe dos productos con actividad antibacteriana chaetomanone y echinulin. En *M. gypseum* no se han encontrado metabolitos activos con actividad antimicrobiana, lo que si es descrito por Bentley et al (1986) que produce dos sideroforas que actúan como agentes quelantes para el fierro.

P. frequentans presenta diversos metabolitos activos con actividad antimicótica y antibacteriana como enzimas, ejemplo de ellas son las pectinasas mencionadas por Yoshiko et al (1999) y Barensse et al (2001). El *P. restrictum* según Jackson et al (1993), produce un complejo antibiótico, el calbistrins, siendo el calbistrin A el que presenta mayor potencia dentro de los cuatro miembros del complejo contra *Candida albicans*. Brill et al (1993) nombra como agentes antifúngicos originales a calbistrin A, B, C y D aislados de filtrados de *P. restrictum*. Otro metabolito antifúngico es el que cita Hansens et al (1991) y Schwartz et al (1991) llamado restrictin.

En el presente estudio la especie escogida por inducir mayores halos de inhibición y actuar sobre mayor número de cepas controles fue *P. frequentans* / T3, se puede mencionar que los siguientes autores indican que se han encontrado productos con actividad antimicrobiana proveniente de esta especie, según Yamaji et al (2005), *P. frequentans*, produce el antibiótico ácido penicílico además Yamaji et al. (1999) y (2001) menciona los compuestos antifúngicos patulin, citrinin, palitantin y frequentin siendo estos dos últimos ya conocidos en el año 1967 por Korzybski. De cal et al, (2002) y Guijarro et al (2006) describe que existe un agente biocontrol con actividad antifúngico proveniente de las conidias de *P. frequentans*.

La penicilina V oral es también conocida como fenoximetilpenicilina potásica en comprimidos, es descrita por la Organización Mundial de Salud (1996), Florey (1972) y Clarke (1969) indican que el comprimido de Penicilina V disuelto en agua y filtrado tiene un espectro de absorción máximos a 268 y 274 nm. O`Neil (2001) concuerda con estos autores en que los espectros máximos de absorción de la penicilina V son 268 y 274 nm, pero no menciona cual es el disolvente utilizado para la medición del espectro UV. Florey (1972) y

Clarke (1969) además informa que penicilina V disuelta en metanol tiene 3 UV máximos a 263, 268 y 275 nm. Es de considerar que en el presente estudio los resultados obtenidos del espectro UV realizados para la fase apolar y el componente 1 obtenidos desde *P. frequentans* / T3 y la penicilina V concuerdan en al menos un espectro de absorción máximo (ver Resultados punto 4.9, Tabla 10).

El análisis infrarrojo realizado a los componentes 2 y 3 obtenidos desde *P. frequentans* / T3 (ver Resultados 4.10, Tabla 11) indicaría que los componentes tienen similitud en algunos grupos funcionales y estos a la vez tendrían semejanza con el espectro infrarrojo de la penicilina V (ver Resultados, Tabla 12). Se interpreta el gráfico del espectro IR de la penicilina V que expone Florey (1972), este señala que es característico encontrar un pico a 3500 cm^{-1} debido al N-H del grupo funcional amida secundaria, el cual puede estar dentro del rango $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, al considerar este rango se puede decir que el componente 3 obtenido desde *P. frequentans* / T3 contiene un grupo amida secundaria a una frecuencia de $3409,69\text{ cm}^{-1}$. Se encuentra un pico a 1750 cm^{-1} que indica un C=O característico del β -lactámico, este carbonilo propio de este grupo se puede encontrar en el rango $1760\text{-}1730$ en el presente estudio (ver Tabla 11), se indica que el componente 2 y el 3 no contienen el carbonilo que corresponde al β -lactámico. También fue detectado un C=O a 1640 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de una amida, el cual es posible encontrarlo en el rango $1700\text{ al }1630\text{ cm}^{-1}$, este carbonilo fue detectado por los espectros IR de los componentes 2 y 3 (ver Resultados, Tabla 11) este grupo funcional formaría parte de la estructura molecular de estos componentes. Además, entre el rango $1220\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ se encuentra C-N en dos bandas a 1200 y 1050 cm^{-1} , este C-N también se detectó en el componentes 2 ($1203,70\text{ cm}^{-1}$) y en el componente 3 ($1039,17\text{ cm}^{-1}$). Al analizar estos datos se puede indicar que los componentes en estudio (2 y

3) no presentan el anillo β -lactámico característico de las penicilinas por lo que no serían penicilinas.

Ahora si los grupos funcionales obtenidos del análisis IR de los componentes 2 y 3 los relacionamos con los compuestos antifúngicos descritos por Yamaji et al (1999 y 2001) y el antibacteriano mencionado por Yamaji et al (2005) de los cuales solo presentamos sus moléculas (ver anexo 7), se observa a simple vista que ninguno de los antimicrobianos posee en su molécula el átomo nitrógeno, por lo que se descarta alguna relación entre los componentes en estudio y los descritos en la literatura, aunque éstos antifúngicos y antibacteriano descritos presenten grupos carboxilos.

En lo referente a los parámetros químicos y físicos la United States Pharmacopeial Convention (2000) establece que el pH esta entre 2,5 y 4,0 en una suspensión que contiene 30 mg de penicilina V por mL. Este rango de pH concuerda con el pH de cada uno de los componentes (2 y 3, ver Resultados 4.11.1), ya que el pH de estos fue de 4.

Clarke (1969) y en United States Pharmacopoeia 29 (USP29) y Pharmacopoeia European 5.5 (Ph. Eur. 5.5) por Sweetman (2006) indican que la penicilina V es muy soluble en agua, lo cual se asemeja a la solubilidad en agua que tienen los componentes 2 y 3 del presente estudio. Clarke (1969) y USP 29 por Sweetman (2006) establecen que la penicilina V es soluble en una relación de 1:150 de alcohol. O'Neil et al (2001) menciona que este antibiótico es soluble en solventes orgánicos polares, en cambio Ph. Eur. 5.5 por Sweetman (2006) dice que la penicilina V es prácticamente insoluble en alcohol, con respecto a los componentes del presente estudio estos presentan solubilidad distinta frente al metanol, siendo el componente 2

muy poco soluble en metanol por lo que se iguala a lo descrito en Ph. Eur. 5.5 por Sweetman (2006). En la USP 29 por Sweetman (2006) describe que la penicilina V es insoluble en acetona, lo que se diferencia de los componentes 2 y 3 que presentan poca solubilidad en este solvente. Clarke (1969) además establece que la penicilina V es insoluble en éter lo que se asemeja al comportamiento del componente 3 no así al componente 2 el cual es poco soluble en este solvente.

Florey (1972), indica que la temperatura a la que funde la penicilina V es a 127-128° C, para O`Neil et al (2001) corresponde entre 120-128° C. El componente 3 del presente estudio presentó tres distintos puntos de fusión (ver Tabla 14, en Resultados) que discrepan totalmente de las temperaturas que informan los autores, por lo que no se puede establecer una relación entre los valores obtenidos y los que indica la literatura.

6. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

- Se determinó actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de cultivos líquidos de las cepas *Aspergillus niger* / P1, *Chaetomium globosum* / P3, *Microsporium gypseum* / P4, *Penicillium frequentans* / T3, *Penicillium restrictum* / P10 contra las cepas controles: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.
- Se logró separar, identificar y aislar los componentes que forman parte de la fase con actividad antimicrobiana correspondiente al filtrado del cultivo líquido de *P. frequentans* / T3 mediante técnicas cromatográficas y se determinó cuales componentes presentan actividad inhibitoria frente a la cepa control *B. subtilis*.
- Se determino que existen desechos metabólicos con actividad antibacteriana proveniente de la cepa *Penicillium frequentans* distinta a la penicilina y que para conocer y elucidar cual es la molécula que presenta esta actividad inhibitoria se debe contar con análisis mas específicos como la espectrometría de masa.

Al considerar los resultados y conclusiones indicadas se confirma la hipótesis de esta investigación, ya que se logró obtener filtrados de cultivos líquidos de cepas fúngicas rizosféricas con actividad antimicrobiana y/o antifúngica.

7. LITERATURA CITADA

Barense, R., Chellegetti, M., Fonseca, M. & Said, S. (2001). Partial purification and characterization of exopoligalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. Brazilian Journal of Microbiology. 32: 327-330.

Bentley, M., Anderegg, R., Szaniszló, P. & Davenport, R. (1986). Isolation and identification of the principal siderophore of the dermatophyte *Microsporum gypseum*. Biochemistry. 25: 1455.

Brill, G., Chen, R., Rasmussen, R., Whittern, D., & McAlpine, J. (1993). Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. II. Isolation and elucidation of structure. J. Antibiot. (Tokyo). 46: 39 - 47.

Brizuela, M., Garcia, L., Perez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15: 69-74.

Bugnol, A., Buzzo, A., Caldas, T., Andreoli, T., & Sabino, M. (2006). Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 47-51.

Clarke, E. (1969). Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. The Pharmaceutical. London. Vol. 1. 870 p.

De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B. & Melgarejo, P. (2002). Mass production of conidia of *Penicillium frequentans*, a biocontrol agent against brown rot of stone fruits. *Biocontrol Science and Technology*. 12: 715-725.

Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J. & Schwinn, F. (1992). Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology*, 82: 131-135.

Domsch, K., Gams, W. & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi*. Academic press London. 859 p.

Florey, K. (1972). *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic press: New York. Vol.1. 203 p.

Flórez, J. (1997). *Farmacología humana*. Editorial Masson S.A.: Barcelona, España. 1.355 p.

García, E., Azanza, J., Sádaba, B. & Gil, I. (2003). Farmacología de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de las infecciones graves por bacterias Gram positivas. *Rev. Esp. Quimioterap*. 16: 277-288.

Garcia, M., Cardoso, N., Tallarico, M., Vieira, M., Said, S., Alves da Silva, A. & Kenupp, J. (2004). Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. *Microbiological Research*. 159: 317- 322.

Guía de trabajos prácticos de Química Orgánica, QUIM 114 (1997). Instituto de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 24 p.

Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P. & De Cal, A. (2006). Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. *Biocontrol Science and Technology*, 16: 257-269.

Hensens, O., Wichmann, C., Liesch, J., Van Middlesworth, F., Wilson, K. & Schwartz, R. (1991). Structure elucidation of restricticin, a novel antifungal agent from *Penicillium restrictum*. *Tetrahedron*. 47: 3915-3924.

Jackson, M., Karwowski, J., Humprey, P., Kohl, W., Barlow, G. & Tanaka, S. (1993). Calbistrin, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. I. Production, taxonomy of the producing organism and biological activity. *J. Antibiot (Tokyo)*. 46: 34-8.

Jawetz, E., Adelberg, E., Melnick, J., Broks, G., Butel, J. & Morse, S. (2002). *Microbiología médica*. Editorial Manual Moderno, México. Cap.45: 709- 747 p.

Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Phonkerd, N., Soyong, K., Kongsaree, P. & Suksamrarn, A. (2002). Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 68: 834-836.

Mesa, A., Bueno, J. & Betancur, L. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17: 325 - 331.

Mims, C., Playfair, R. J., Roitt, I., Wakelin, D. & Williams, R. (1999). *Microbiología médica*. Editorial Harcourt Brace, Madrid: España. 584 p.

O'Neil, M., Smith, A., Heckelmann, P., Obenchain, J., Gallipeau, J., D'Arecca, M. & Budavari, S. (2001) *The merck Index: - an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Whitehouse Station. Merck & CO. 13^a ed. 380 p.

Organización Mundial de la Salud, OMS. (1996). *Farmacopea Internacional*. Ginebra: OMS. 3^a ed. Vol. 4. 531 p.

Pepeljnjak, S., Maja, E. & Ozegovic, L. (2002). Citrininogenicity of *Penicillium* sp. Isolated from decaying apples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 134-137.

Pinto, G., Leite, S. & Courin, S. (2001). Selection of tannase- producing *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 24-26.

Rodríguez, K., Hesse, M. & Werner, Ch. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *J. Basic. Microbiol.* 40: 261-267.

Schlegel, H. (1997). *Microbiología general*. Omega: Barcelona. 654 p.

Schwartz, R., Dufresne, C., Flor, J., Kempf, A., Wilson, K., Lam, T., Onishi, J., Milligan, J., Fromtling, R. & Abruzzo, G. (1991). Restricticin, a novel glycine-containing antifungal agent. *J. Antibiot (Tokyo)*. 44: 463-71.

Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. & Holt, J. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Williams & Wilkins, Baltimore: USA. Vol 2: 1599 p.

Sutcliffe J. (2005). Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Current Opinion in Microbiology* 8: 534- 542.

Sweetman, S. (2006), *MARTINDALE: The complete Drug Reference*. London: Pharmaceutical press. Electronic version (CD), Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado. (15 Junio del 2006)

Toro, V. (2004). Perfil bioquímico de cepas fúngicas rizosféricas. Tesis de Grado, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile, 112 p.

United States Pharmacopeial Convention. (2000). *The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24)*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville: E.E.U.U. 2569 p.

Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from?. *Perspectives. Nature Reviews / Microbiology*. 1: 65-70.

Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko, Y., Yoshida, T. & Tahara, S. (1999). Characterization of antifungal metabolites produced by *Penicillium* species isolated from seeds of *Picea glehnii*. *Journal of Chemical Ecology*. 25: 1643-1653.

Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko, Y., Yoshida, T. & Tahara, T. (2001). *Penicillium* fungi from *Picea glehnii* seeds protect the seedlings from damping-off. *New Phytologist*. 152: 521.

Yamaji, K., Fukushi, Y., Hashidoko, Y. & Tahara, T. (2005). *Penicillium frequentans* isolated from *Picea glehnii* seedling roots as a possible biological control agent against damping-off. *Ecol. Res.* 20:103-107.

Yoshiko, C., dos Santos, M., Said, S. & Veira, M. (1999). Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 133-140.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Taxa y números de cepas fúngicas a las cuales se les determinó la capacidad de producir metabolitos con capacidad inhibitoria para bacterias y hongos.

Taxa	Número de cepas fúngicas			Total
	A	B	C	
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagen	1	1	1	3
<i>Absidia spinosa</i> Lend	-	-	1	1
<i>Acremonium breve</i> Sukapure & Thirum	-	-	1	1
<i>Acremonium strictum</i> Gams	2	-	-	2
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	3	2	2	7
<i>Aspergillus subsessilis</i> Raper & Fennell	-	1	-	1
<i>Beuveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	-	1	-	1
<i>Cladosporium cladosporoides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1	-	1	2
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	-	-	1	1
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb	1	-	-	1
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl	-	1	-	1
<i>Geotrichum candidum</i> Link	-	-	1	1
<i>Gliocladium catelunatum</i> Gilman & Abbott	-	-	1	1
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier	-	1	-	1
<i>Microsporium gypseum</i> (E. Bodin) Guiart & Grigoraki	-	-	1	1
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	1	-	1	2
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Masse) S. Hughes	-	-	1	1
<i>Penicillium commune</i> Thom	3	-	2	5
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	3	2	4	9
<i>Penicillium expansum</i> Link	1	-	1	2
<i>Penicillium frequentans</i> Westling	4	10	1	15
<i>Penicillium purpurascens</i> (Sopp) Biourge	-	2	3	5
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman & Abbott	10	10	9	29
<i>Penicillium serie raistricke</i>	-	-	1	1
<i>Trichoderma koninngii</i> Oudem.	2	3	-	5
<i>Trichoderma piluliferum</i> J. Webster & Rifai	-	1	-	1
Total	32	35	33	100

A: Ballica inglesa; B: Pasto ovillo; C: Trébol blanco; (-): No presente en forrajera.

ANEXO 2

Tabla 2. Número de fracciones recolectadas y Número de fracciones unidas.

Número de fracciones recolectadas por mL total de solvente	Fracciones a ser unidas	Número total de fracciones unidas según orden de recolección
16	1-2-3-4; 5-6; 7-8; 9-10; 11-12; 13-14; 15-16	7
13	17-18; 19-20; 21-22; 23-24; 25-26; 27-28; 29-30	7
6	31-32; 33-34; 35-36	3
6	37-38; 39-40; 41-42	3
6	43-44; 45-46; 47-48	3
6	49-50; 51-52; 53-54	3
4	55-56; 57-58	2
22	59-60; 61-62; 63-64; 65-66; 67-68; 69-70; 71-72; 73-74; 75-76; 77-78; 79-80	11
8	81-82; 83-84; 85-86; 87-88	4
6	89-90; 91-92; 93-94	3
8	95-96; 97-98; 99-100; 101-102	4
14	103-104; 105-106; 107-108; 109-110; 111-112; 113-114; 115-116	7
6	117-118; 119-120; 121-122	3
10	123-124; 125-126; 127-128; 129-130; 131-132	5
6	133-134; 135-136; 137-138	3
9	139-140; 141-142; 143-144-145-146-147	3
Total fracciones 147		Total fracciones 71

ANEXO 3

Tabla 3, se indican las fracciones unidas que fueron analizadas por cromatografía de capa fina preparativa, lo que permitió unir fracciones que presentaban iguales bandas al UV.

Tabla 3. Fracciones unidas y clasificación de fracciones con iguales revelados al UV.

Fracciones unidas	Clasificación de fracciones con igual revelado al UV
1 - 10	A
11 - 18	B
19 - 22	C
23 - 26	D
27 - 34	E
35 - 38	F
39 - 48	G
49 - 82	H
83 - 90	I
91 - 100	J
101 - 104	K
105 - 110	L
111 - 147	M

En la Tabla 3, se aprecia que de las 71 fracciones analizadas por cromatografía en capa fina preparativa se determinó que varias de las fracciones no unidas presentaban iguales bandas al UV, por lo que las fracciones se agruparon, siendo identificadas por letras, quedando un total de 13 fracciones.

ANEXO 4

Gráficos de espectros al UV- visible del blanco (metanol), las fracciones analizadas, la fase apolar y de la Penicilina V.

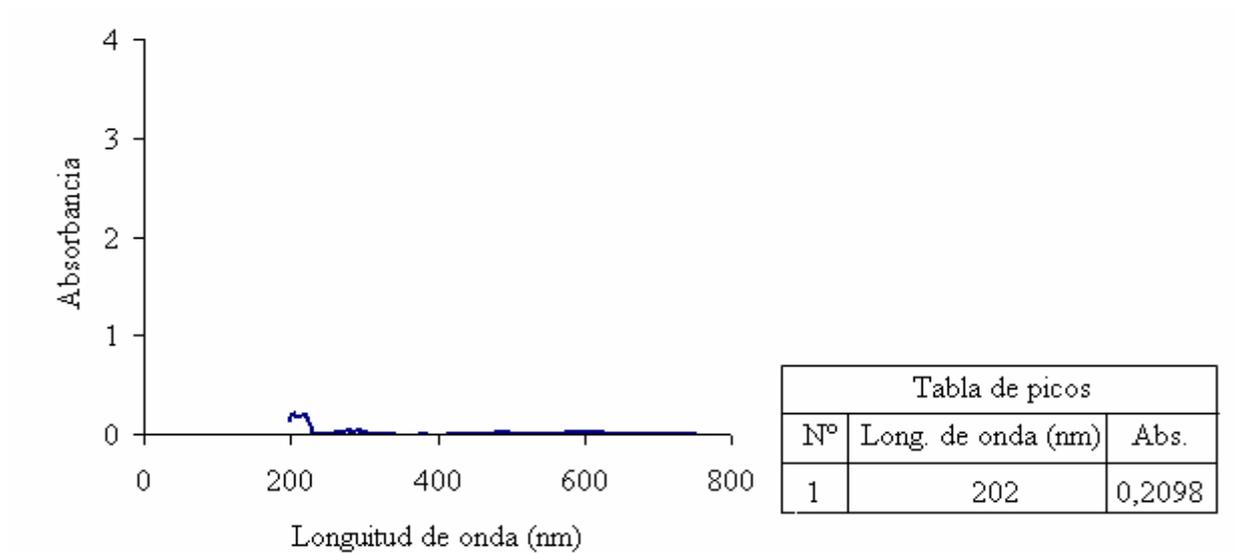


Figura 1. Gráfico del espectro UV- visible del metanol (blanco) determinado entre 200 y 750 nm.

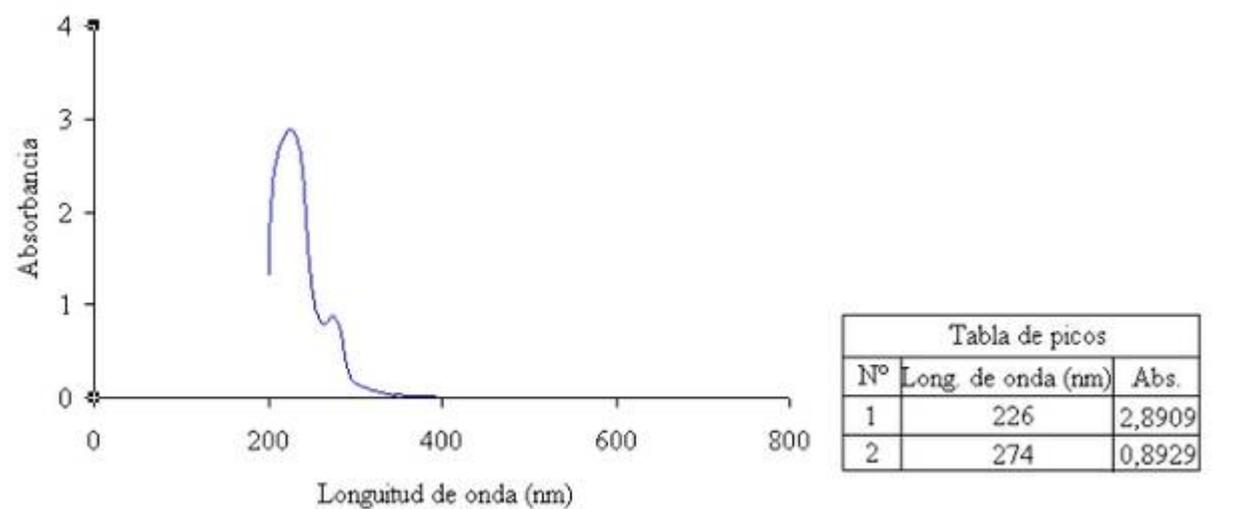


Figura 2. Gráfico del espectro UV- visible del componente 1 determinado entre 200 y 750 nm.

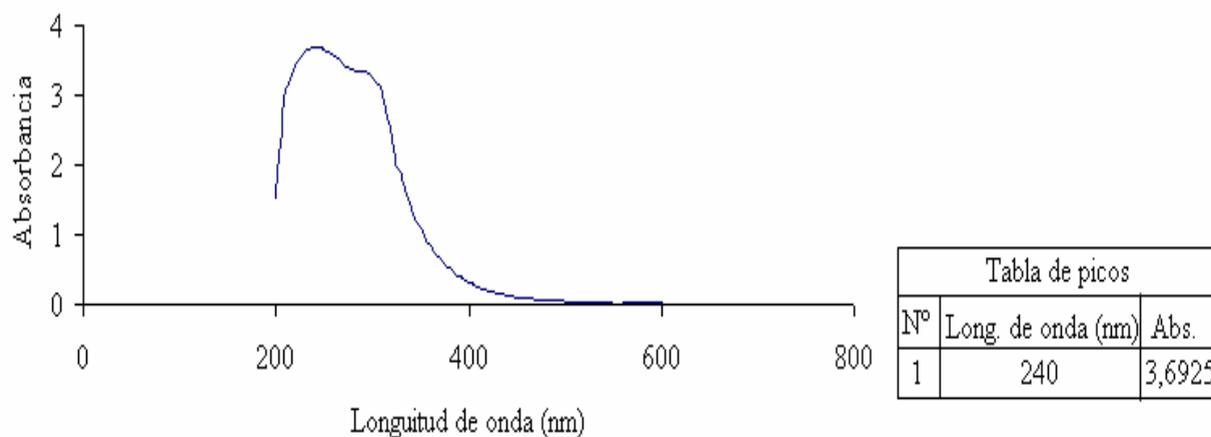


Figura 3. Gráfico del espectro UV del componente 2 determinado entre 200 y 750 nm.

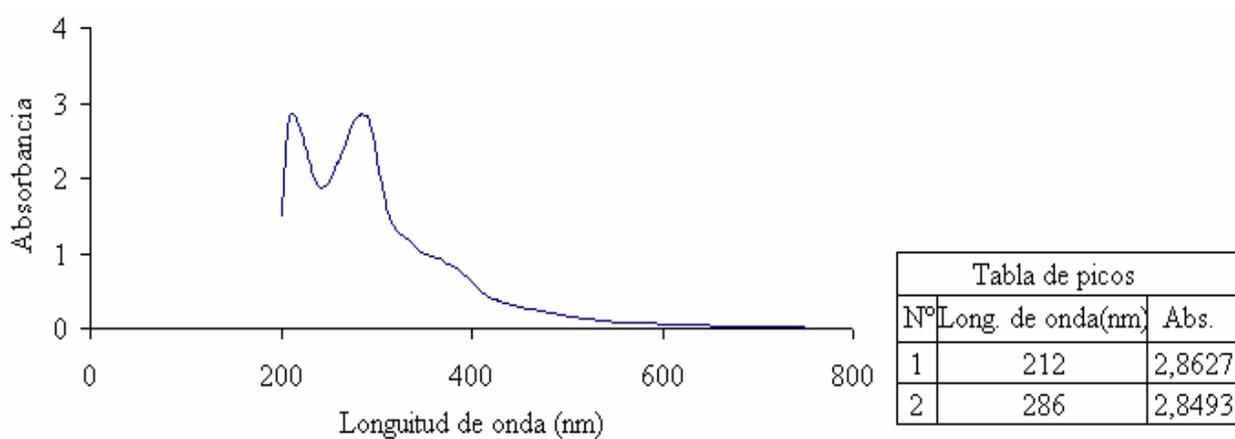


Figura 4. Gráfico del espectro UV del componente 3 determinado entre 200 y 750 nm.

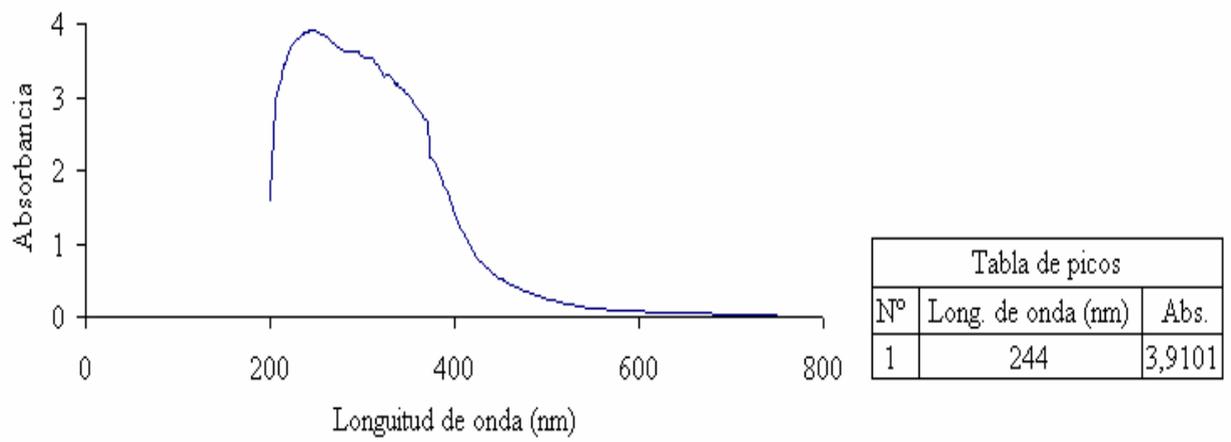


Figura 5. Gráfico del espectro UV- visible del componente 4 determinado entre 200 y 750 nm.

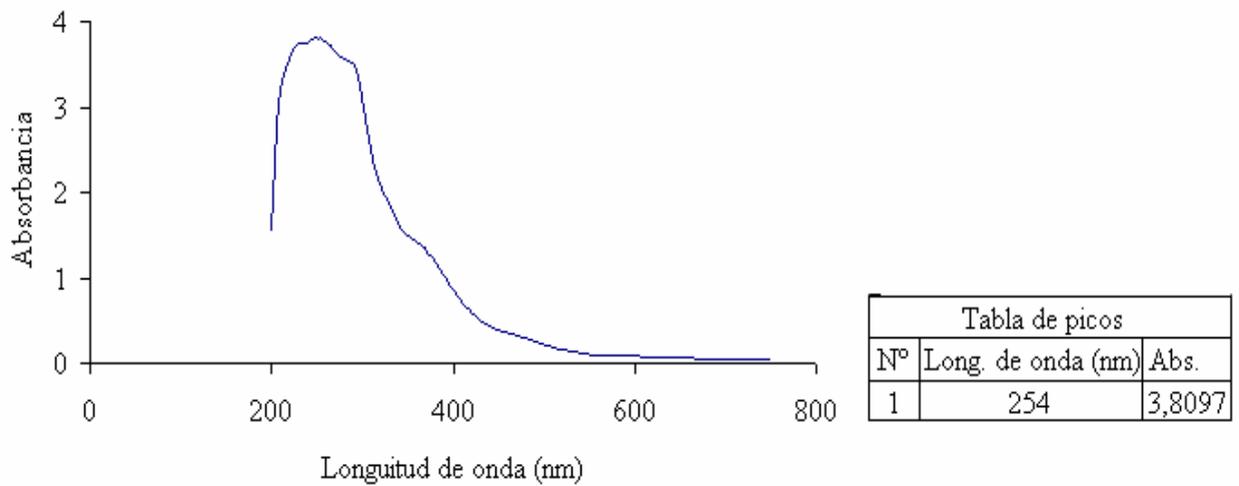


Figura 6. Gráfico del espectro UV- visible del componente 5 determinado entre 200 y 750 nm.

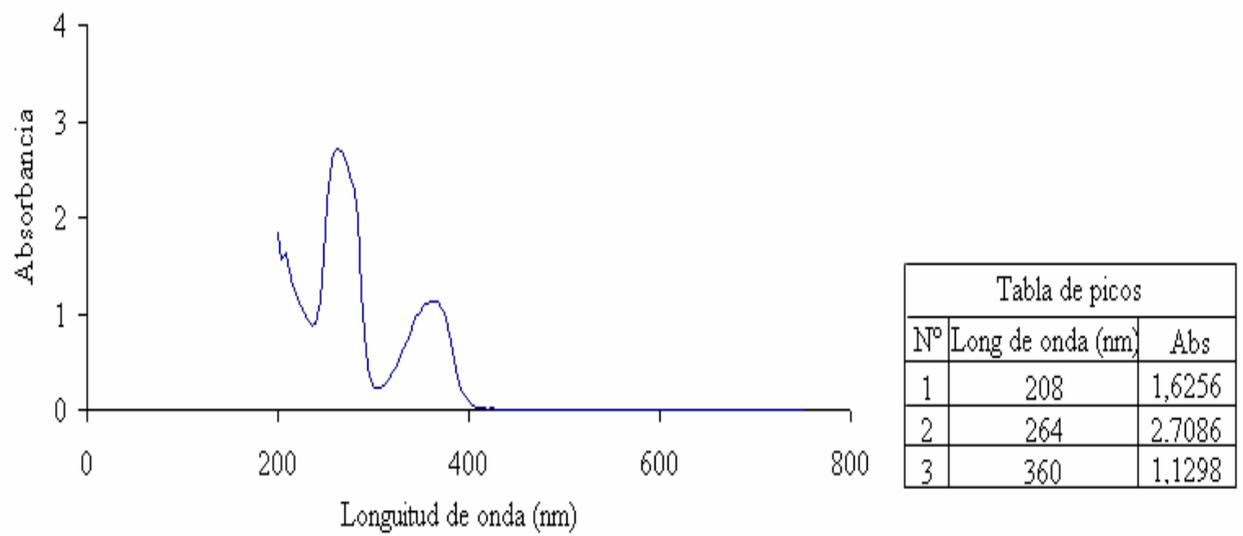


Figura 7. Gráfico del espectro UV- visible de la fase apolar determinado entre 200 y 750 nm.

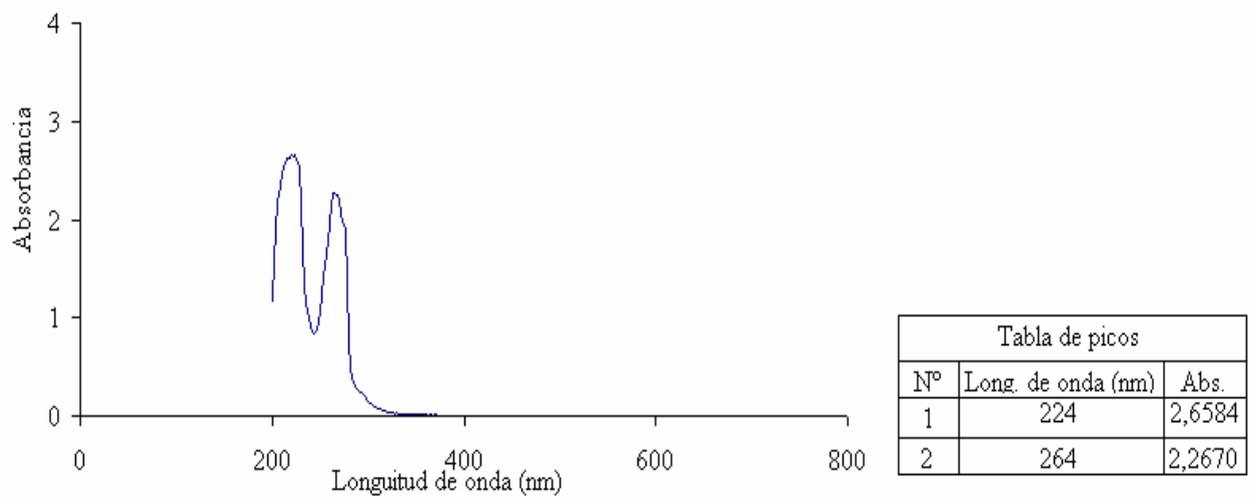


Figura 8. Gráfico del espectro UV- visible de la penicilina V determinado entre 200 y 750 nm.

ANEXO 5

Gráficos de espectroscopía infrarroja para los componente 2 y 3 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3 y el gráfico de la penicilina V, según literatura.

Las gráficas 9 y 10 muestran la posición de las bandas de absorción expresadas en porcentaje (%) de transmitancia versus número de onda (cm^{-1}) correspondientes a los grupos funcionales presentes en el componente 2 y 3 respectivamente. La gráfica 11 indica las bandas de absorción características de la penicilina V en números de onda (cm^{-1}) y longitudes de onda (μ).

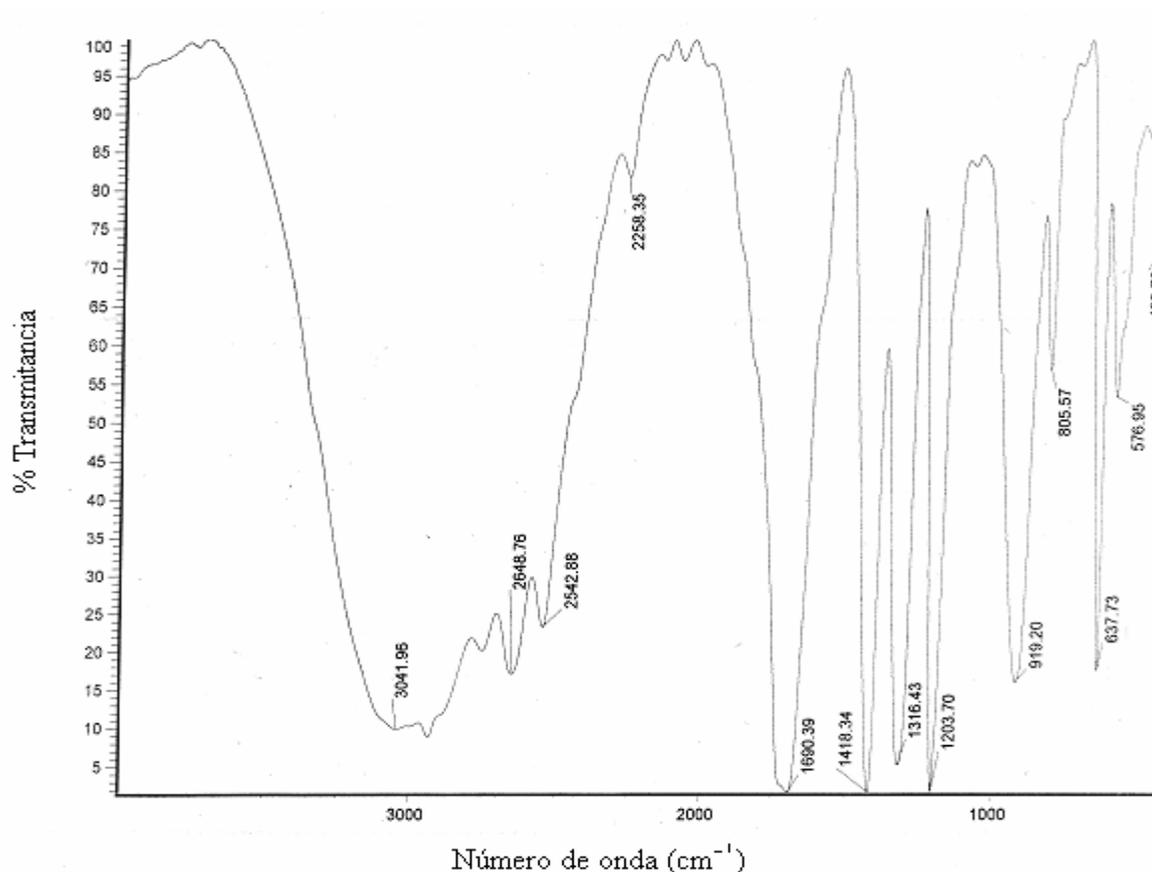


Figura 9. Gráfico de espectroscopía infrarroja para el componente 2 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* /T3.

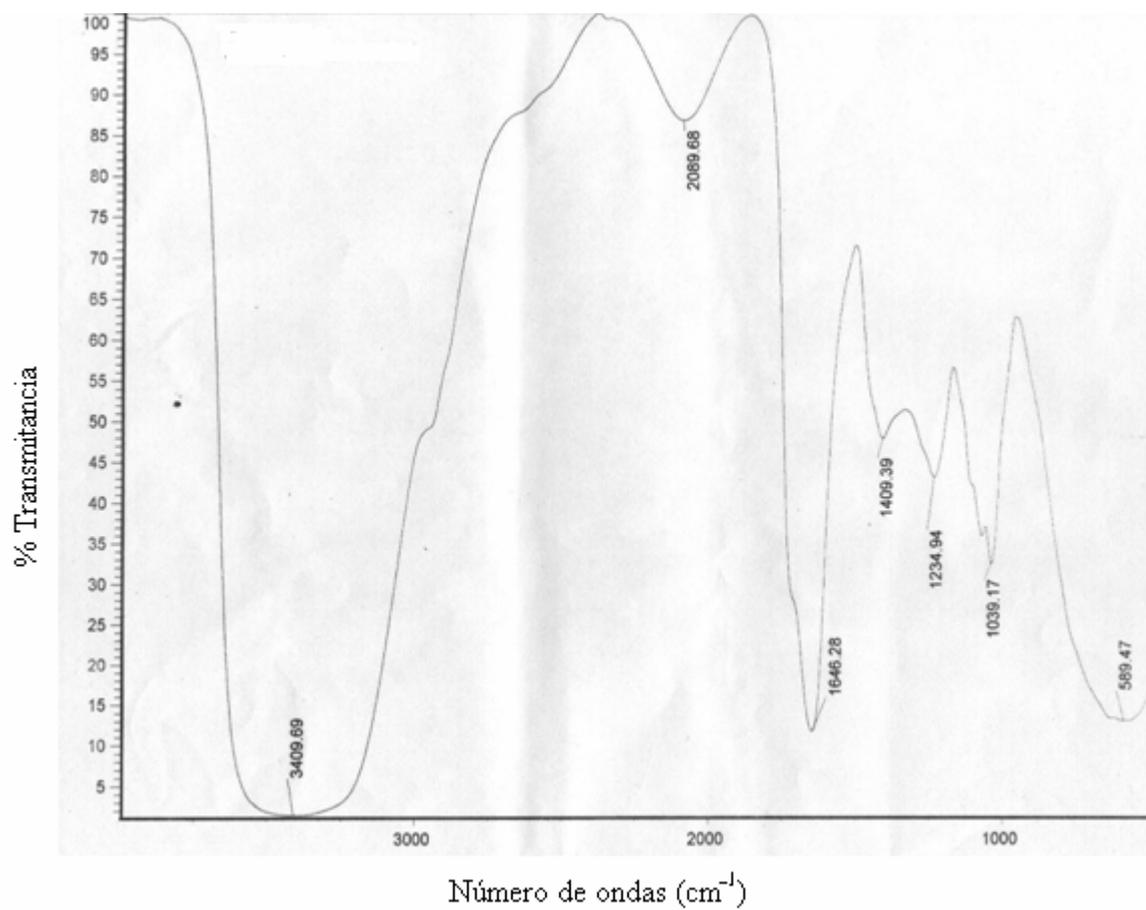


Figura 10. Gráfico de espectroscopía infrarroja para el componente 3 obtenidos a partir de la fase apolar del filtrado de *Penicillium frequentans* / T3.

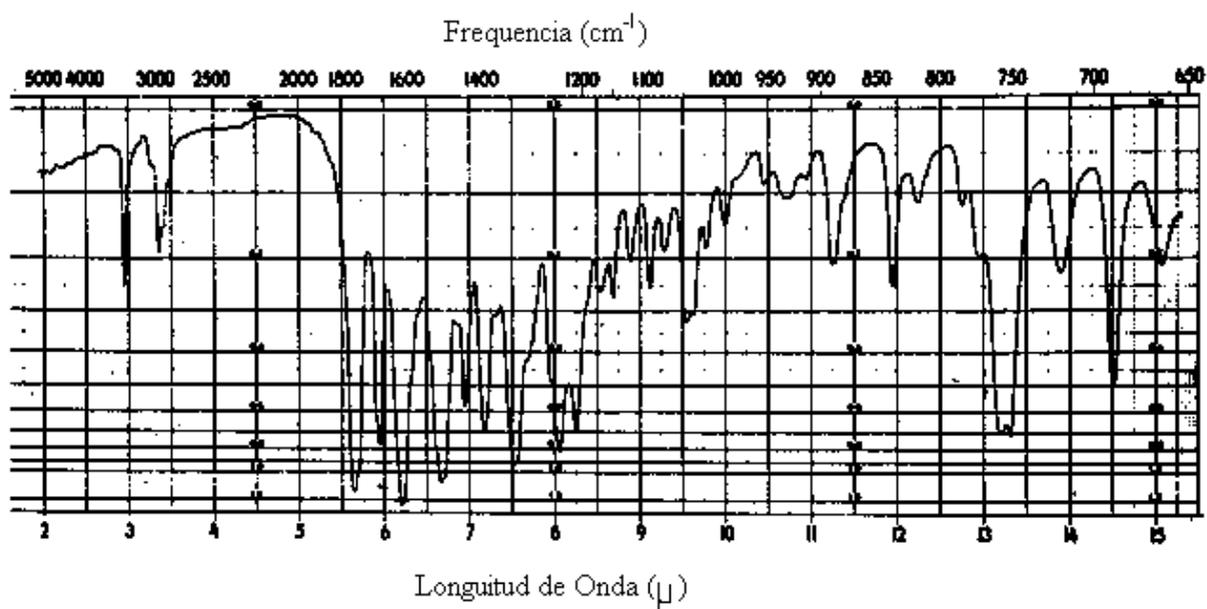
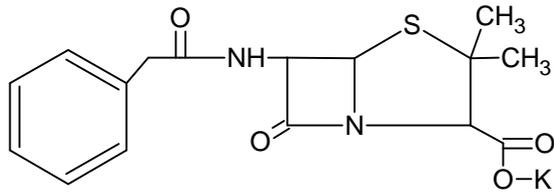


Figura 11. Gráfico de espectroscopía infrarroja de la penicilina V.

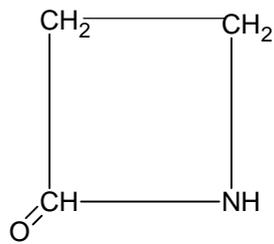
ANEXO 6

Estructura química de la penicilina V y del anillo β -lactámico

A) Penicilina V



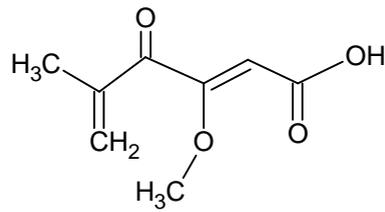
B) Anillo β -lactámico



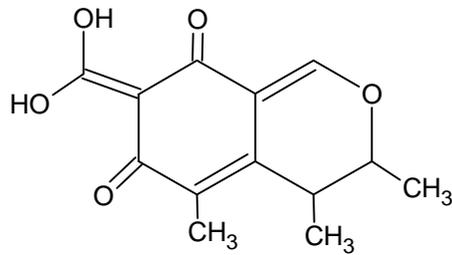
ANEXO 7

Estructuras químicas de metabolitos activos extraídos del *Penicillium frequentans*.

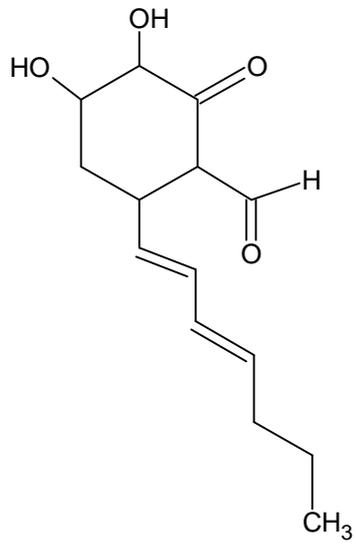
A) Ácido penicílico



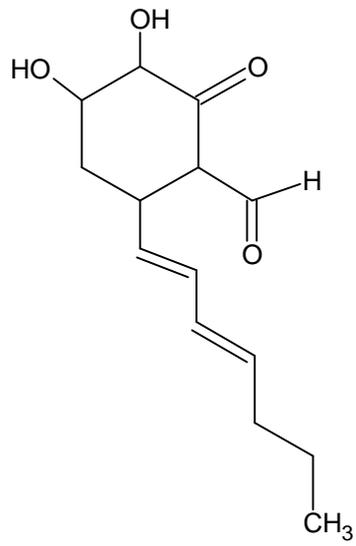
B) Citrinin



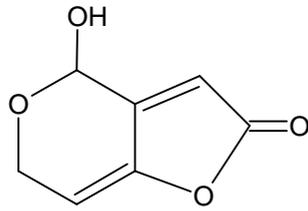
C) Frequentin



D) Palitantin



E) Patulin



ANEXO 8

Preparación de medios de cultivos:

A) Agar malta al 2%:

Extracto malta	2 g.
Agar-agar	2 g.
Agua destilada estéril c.s.p	100 mL

Se mezclan ambos reactivos con el agua en un vaso precipitado, luego la mezcla se deposita en una botella y posteriormente se esteriliza en autoclave a 121 °C y 1 atm por 20 minutos.

B) Agar peptona al 2%:

Extracto de carne	0,3 g.
NaCl	0,5 g.
Peptona	1,0 g.
Agar- agar	2,0 g.
Agua destilada c.s.p	100 mL

Se mezclan los reactivos con el agua en un vaso precipitado, luego la mezcla se deposita en una botella y posteriormente se esteriliza en autoclave a 121 °C y 1 atm por 20 minutos.

C) Caldo malta al 1%:

Extracto malta	1 g.
Agua destilada c.s.p	100 mL

Se mezcla el reactivo con el agua en un vaso precipitado, luego la mezcla se deposita en una botella y posteriormente se esteriliza en autoclave a 121 °C y 1 atm por 20 minutos.