

Memorias del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Celaya 2020

Elibro online con ISSN
1946-5351, Volumen 12, No. 8, 2020

Celaya, Guanajuato, México
Noviembre 4, 5, y 6 de 2020
www.AcademiaJournals.com



ACADEMIA JOURNALS

OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

Tomo	Páginas
1	1 - 179
2	180 - 372
3	373 - 561
4	562 - 735
5	736 - 936
6	937 - 1109
7	1110 - 1287
8	1288 - 1459
9	1460 - 1637
10	1638 - 1833
11	1834 - 2007
12	2008 - 2188
13	2189 - 2350
14	2351 - 2517
15	2518 - 2680
16	2681 - 2856

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TRES ESPECIES DE HONGOS MACROMICETOS DE CHIHUAHUA

Dra. Quiñonez Martínez M¹, MC. Neida Aurora Martínez Escobedo², Dr. Francisco Javier Vázquez González³, Dr. José Valero Galvan⁴, Dra. Alba Yadira Corral Avitia⁵, Dr. Emilio Alvarez Parrilla⁶, y Biól. Jesús Alejandro Najera Medellín⁷

Resumen— El aumento en la resistencia microbiana a los antibióticos comerciales ha incrementado una búsqueda intensiva de nuevas fuentes para la obtención y desarrollo de antibióticos efectivos. Los hongos macromicetos han sido empleados por diversas culturas como medicina tradicional, principalmente en el tratamiento de heridas, quemaduras, llagas y rozaduras, y podrían ser una fuente alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y metanólicos de las especies *Astraeus hygrometricus*, *Laccaria laccata* y *Lycoperdon perlatum*, colectados en los bosques de Chihuahua. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra tres microorganismos patógenos mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer. Los resultados mostraron que los extractos de las tres especies de hongos macromicetos exhibieron zonas de inhibición que van desde 4.5 – 8.25 mm contra *Streptococcus agalactiae* y *Candida* sp. Se evidencia que las especies estudiadas pueden ser empleados como agentes antimicrobianos.

Palabras clave—Actividad antimicrobiana, extractos, hongos macromicetos, Sierra Tarahumara

Introducción

Las enfermedades infecciosas representan una de las mayores amenazas a nivel mundial, causado por la aparición de resistencia a antibióticos en microorganismos que anteriormente eran susceptibles (Wright, 2010). Dentro de las enfermedades infecciosas, las infecciones dermatológicas constituyen un problema de salud pública ya que se estima que entre 30-70% de la población mundial sufre al menos un tipo de enfermedad en la piel (Hay et al. 2014). Las bacterias y hongos son considerados de los microorganismos más comunes causantes de infecciones dermatológicas. Entre los patógenos bacterianos que dan lugar a diversas infecciones de la piel se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* del grupo B (Betahemolítico) (Riain, 2013). Así mismo, numerosas especies de hongos provocan una amplia gama de infecciones dermatológicas en humanos, siendo las especies del género *Candida* de las más frecuentes (Suroowan & Mahomoodally, 2017).

En este sentido los hongos macromicetos (HM) pueden ser empleados para propósitos terapéuticos debido a que producen una amplia variedad de componentes bioactivos en la defensa contra bacterias, virus e insectos (Leyva et al. 2013), actuando como agentes antimicrobianos. Específicamente en la Sierra Tarahumara de Chihuahua se conocen alrededor de 450 especies de HM, dentro de las cuales existen especies que han sido reportadas por poseer características medicinales y alimenticias, tal es el caso de *Astraeus hygrometricus* y *Lycoperdon perlatum* cuyos carpóforos se usan contra problemas de acné, así como para aliviar el dolor e hinchazón por quemaduras y cortaduras (Quiñonez-Martínez & Garza-Ocañas, 2015). Así mismo, los carpóforos de *Laccaria laccata* presentan importancia alimenticia al ser especies apreciadas por su valor nutrimental (Quiñonez-Martínez et al. 2014). No obstante, existen pocos estudios que den base y evidencia científica a dicho conocimiento tradicional, por ello el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana, compuestos fenólicos y actividad antioxidante de las cuatro especies de HM de Chihuahua anteriormente mencionadas mediante la obtención de extractos etanólicos y metanólicos.

¹ Quiñonez Martínez M es docente investigadora de tiempo completo en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Juárez, Chihuahua. mquinone@uacj.mx (autor correspondiente)

² La MC. Neida Aurora Martínez Escobedo estudiante egresada de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas de la UACJ. al171422@alumnos.uacj.mx

³ El Dr. Francisco Javier Vázquez González es investigador y docente en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Juárez, Chihuahua.

⁴ El Dr. José Valero Galvan es docente investigador de tiempo completo en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Juárez, Chihuahua. jose.valero@uacj.mx

⁵ La Dra. Alba Yadira Corral Avitia es docente investigadora de tiempo completo en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Juárez, Chihuahua. acorral@uacj.mx

⁶ El Dr. Emilio Alvarez Parrilla es docente investigador de tiempo completo en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Juárez, Chihuahua. ealvarez@uacj.mx

⁷ El Biól. Jesús Alejandro Najera Medellín es estudiante de tiempo completo de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas de la UACJ. al198940@alumnos.uacj.mx

Descripción del Método

Colecta de los carpóforos de las especies

Las especies de hongos que se utilizaron para este estudio fueron: *A. hygrometricus* (Pers.) Morg., *L. laccata* Scop. Fr. y *L. perlatum* Pers. Los carpóforos de dichas especies se colectaron en los bosques del municipio de Bocoyna, Chihuahua, durante los meses de agosto y septiembre los años 2017 y 2018. Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Biodiversidad del ICB-UACJ, donde se corroboró su identificación y se resguardaron hasta su uso.

Tratamiento de las muestras

Los carpóforos se limpiaron, se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y con el fin de eliminar por completo el agua de las muestras se sometieron a un proceso de liofilización mediante la sublimación del hielo y en condiciones de vacío. Una vez liofilizadas las muestras se pulverizaron en un procesador de alimentos hasta obtener un polvo fino, posteriormente se almacenaron en bolsas de plástico con su debida etiqueta y se resguardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Extracción de las muestras para determinación de la capacidad antimicrobiana

Los extractos para determinar la capacidad antimicrobiana se prepararon usando 10 g de los hongos pulverizados los cuales se extrajeron con 200 mL de los solventes etanol y metanol durante 24 h por separado. Posteriormente, para romper las paredes celulares y liberar el contenido de las células, se sonicaron, en un baño ultrasónico durante 30 min (Bala et al. 2011). Las muestras se centrifugaron durante 10 min para su sedimentación a una velocidad de 3 000 rpm, se decantó el sobrenadante y para concentrar el extracto se evaporó el solvente hasta sequedad bajo presión reducida con ayuda de un rotavapor. Finalmente, el polvo obtenido se re-disolvió en el solvente a una concentración de 50 mg/mL y se esterilizó con un filtro membrana de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (Giri et al. 2012). Los extractos se almacenaron a hasta su uso en las pruebas.

Microorganismos y condiciones de crecimiento

Los microorganismos seleccionados para las pruebas de actividad antimicrobiana fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Candida albicans*, los cuales se donaron por el Departamento de Microbiología de la UACJ. Dependiendo de las exigencias nutritivas de los microorganismos, estos se sembraron en distintos medios selectivos de cultivos sólidos. En este caso *S. aureus* se sembró en Agar Mueller-Hint, *S. agalactiae* en Agar Infusión Cerebro y Corazón y *C. albicans* en Agar Dextrosa y Papa. Las bacterias se incubaron (SHEL LAB, SL) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h y la levadura a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 h. Posteriormente, se transfirieron a diferentes caldos de cultivos, *S. aureus* y *C. albicans* se inocularon en Caldo de Soya Tripticaseína y *S. agalactiae* en Caldo Infusión Cerebro y Corazón, los cuales se incubaron empleando las mismas condiciones previamente mencionadas. Una vez obtenidas las cepas, se ajustaron a una turbidez equivalente 0.5 en la escala de McFarland (10^6 UFC/mL) usando una solución de cloruro de sodio al 0.9% y a una longitud de onda de 625 nm con ayuda de un espectrofotómetro.

Evaluación antimicrobiana mediante el método de difusión en disco

La evaluación de la actividad antimicrobiana por el método difusión en disco (Kirby Bauer, 1969) fue determinada siguiendo la metodología propuesta por Kalyoncu et al. (2010), modificada. Para ello, se impregnaron discos (6 mm de diámetro) de papel filtro (Whatman®, No. 1) con los extractos y se dejaron secar hasta la completa evaporación del solvente, para evitar alguna interferencia residual que pudiera sesgar los resultados. Las superficies de las placas se inocularon usando 1 μL de los microorganismos, previamente ajustados a una turbidez equivalente al 0.5 en la escala de McFarland (10^6 UFC/mL) con ayuda de un hisopo estéril. Los discos se aplicaron firmemente a la superficie de la placa (4 discos por placa), posteriormente las placas se pre incubaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 h, para permitir una difusión uniforme del extracto sobre el agar. Pasado el tiempo, para las bacterias, las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h y para la levadura, a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición. Se usaron como controles negativos los solventes de extracción y como controles positivos el antibiótico comercial eritromicina de 250 mg (More Pharma, Pharmaceutical Company) por ser un antibiótico que exhibe mayor actividad frente a bacterias gram positivas (Lovmar et al. 2006) y clotrimazol 2% (Genomma Lab®) para la levadura, debido a que es un agente antifúngico que actúa sobre la membrana citoplasmática. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Evaluación antimicrobiana mediante la concentración mínima inhibitoria

La actividad se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Padilla (2012), modificada para esta investigación. En una primera etapa se preparó 1 mL de caldo de cultivo con el extracto respectivo. Posteriormente se agregó 1 μL de los microorganismos, previamente ajustados a una turbidez equivalente a 0.5 (10^6 UFC/mL) en la escala de McFarland, y se incubaron por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las bacterias y a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 h para la levadura.

En una segunda etapa, transcurrido el tiempo de incubación se sembró 1 µL de la muestra de manera homogénea en placas con diferentes medios de cultivo: *S. aureus* se sembró en Agar Mueller-Hinton, *S. agalactiae* en Agar Infusión Cerebro y Corazón y *C. albicans* en Agar Dextrosa y Papa. Posteriormente se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas. Finalmente, se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada placa. Para los testigos se realizaron distintas diluciones para cada microorganismo: *S. aureus* y *S. agalactiae* se diluyeron 1:1000, donde 1 µL de los microorganismos se inocularon en 999 µL del caldo nutritivo y *C. albicans* se diluyó 1:100, donde 1 µL del microorganismo se inocularon en 99 µL del caldo nutritivo. Todos los experimentos se realizaron de manera independiente por triplicado.

Análisis estadístico

Todos los resultados mostrados son la media ± el error estándar. Se asumió que los datos seguían una distribución normal según lo determinado por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$). Los efectos de los extractos en los microorganismos se analizaron utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar si existía diferencias significativas ($p \leq 0.05$) seguido de una prueba múltiple de medias de Tukey. Este análisis se llevó a cabo usando los softwares IBM SPSS Statistics 20 y GraphPad Prism 8.1.2.

Los resultados mostrados para las pruebas de ICM son la media ± el error estándar. Para el porcentaje de inhibición se obtuvo la media de las UFC y se analizó mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{UFC_t - UFC_e}{UFC_t} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde UFC_t corresponde al número de UFC de los testigos, es decir los microorganismos inoculados solamente en el caldo de cultivo y UFC_e se refiere al número de UFC obtenidas mediante la adición de los extractos. El porcentaje de inhibición mide la capacidad de inhibir el crecimiento del número de UFC por parte de los extractos. Los datos se analizaron utilizando los softwares Microsoft Excel 2017 y GraphPad Prism 8.1.2.

Comentarios Finales

Resumen de resultados

Los resultados de la evaluación antimicrobiana indican que los extractos presentan moderada actividad antimicrobiana, comparado con los controles positivos los cuales fueron más potentes en la respuesta de inhibición (Cuadro 1 y 2).

Los extractos obtenidos tuvieron una respuesta de inhibición contra *S. agalactiae* y *C. albicans* a una concentración de 50 mg/mL. Esto podría atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos extraíbles con solventes polares, tales como fenoles, taninos, alcaloides y lípidos polares que tienen potencial antimicrobiano (Adhikari et al. 2018).

Especie	Promedio zonas de inhibición (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>Candida sp.</i>
<i>Astraeus hygrometricus</i>	-	5.79±0.17 ^{de}	4.5±0.29 ^c
<i>Laccaria laccata</i>	-	6.43±0.38 ^{cd}	-
<i>Lycoperdon perlatum</i>	-	8.25±0.25 ^c	-
Eritromicina	13.5±0.20 ^b	19.375±0.47 ^a	-
Clotrimazol	-	-	13.5±0.28 ^b
Solventes	-	-	-

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de cuatro especies de hongos macromicetos de Chihuahua. Letras diferentes indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey HSD ($p \leq 0.05$). – No inhibición.

Especie	Promedio zonas de inhibición (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>Candida sp.</i>
<i>Astraeus hygrometricus</i>	-	6.58±0.31 ^c	-
<i>Laccaria laccata</i>	-	6.25±0.47 ^c	-
<i>Lycoperdon perlatum</i>	-	5.75±0.25 ^c	-
Eritromicina	13.5±0.20 ^b	19.375±0.47 ^a	-
Clotrimazol	-	-	13.5±0.28 ^b
Solventes	-	-	-

Cuadro 2. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de cuatro especies de hongos macromicetos de Chihuahua. Letras diferentes indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey HSD ($p \leq 0.05$). - No inhibición.

Los resultados evaluados mediante el método de la CMI muestran que todos los extractos registraron inhibición de los microorganismos en distintas concentraciones (3.75 a 10 mg) (Cuadro 3, 4 y 5), a diferencia del método de difusión en disco, lo cual coincide con otros estudios que reportan una mayor efectividad del método de dilución en caldo en comparación con el de difusión en disco al momento de evaluar la actividad antimicrobiana de extractos fúngicos (Hleba et al. 2016). El método de difusión en disco como su nombre lo indica depende en gran medida de la capacidad de difusión de las sustancias presentes en los extractos (Ren et al. 2014), dando como resultado poca movilidad de los compuestos en el agar a causa de su baja solubilidad o alta masa molecular.

Volumen extracto (µL)	Concentración Extracto (mg)	Etanol	Inhibición (%)	Metanol	Inhibición (%)
<i>Astraeus hygrometricus</i>					
100	5	660±11	99.7	1205.3±165.4	99.5
125	6.25	21.7±11.1	99.9	65.7±20.7	99.9
150	7.5	0	100	1.0±1.0	99.9
175	8.75	-	-	0	100
200	10	-	-	-	-
<i>Laccaria laccata</i>					
100	5	60645.3±44968.3	78.3	16310.0±202.2	94.1
125	6.25	18.7±8.8	99.9	1526.0±783.6	99.4
150	7.5	1.3±0.7	99.9	51.3±1.8	99.9
175	8.75	0	100	16.0±2.6	99.9
200	10	-	-	0	100
<i>Lycoperdon perlatum</i>					
100	5	141.7±34.2	99.9	15869.3±237.8	94.3
125	6.25	40.0±5.7	99.9	153.3±47.2	99.9
150	7.5	0	100	37.3±4.6	99.9
175	8.75	0	100	33.3±11.7	99.9
200	10	-	-	0	100
Testigo					
Dilución 1:1000	-	280333.3±38407.2			

Cuadro 3. Concentración Mínima Inhibitoria y porcentaje de inhibición de los extractos etanolicos y metanolicos contra *S. aureus*

Volumen extracto (µL)	Concentración Extracto (mg)	Etanol	Porcentaje de Inhibición	Metanol	Porcentaje de Inhibición
<i>Astraeus hygrometricus</i>					
25	1.25	4676.0±230.2	81.9	4228.0±459.4	83.7
50	2.5	329.7±4.9	98.7	3580.7±799.2	86.2
75	3.75	8.0±0.6	99.9	812.3±62.2	96.8
100	5.0	4.0±0.6	99.9	8.7±0.9	99.9
125	6.25	0	100	0	100
150	7.5	-	-	-	-
<i>Laccaria laccata</i>					
25	1.25	6505.3±287.3	74.9	8018.7±963.0	69.1
50	2.5	237.0±56.0	99.1	4961.3±514.8	80.8
75	3.75	11.3±2.4	99.9	1128.3±540.1	95.6
100	5	4.0±1.0	99.9	7.3±0.3	99.9
125	6.25	0	100	3.7±1.2	99.9
150	7.5	0	100	1.3±0.9	99.9
175	10	-	-	0.0	100
<i>Lycoperdon perlatum</i>					
25	1.25	1894.0±121.3	92.7	5918.7±301.6	77.2
50	2.5	126.0±11.6	99.5	4406.7±306.4	83.0
75	3.75	8.7±2.7	99.9	1692.0±402.0	93.4
100	5	5.3±0.3	99.9	11.0±3.6	99.9
125	6.25	2.0±0.6	99.9	4.0±0.6	99.9
150	7.5	0.0±0	100	0	100
Testigo					
Dilución 1:100			25966.7±2667.3		

Cuadro 4. Concentración Mínima Inhibitoria y porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos y metanólicos contra *C. albicans*

Volumen extracto (µL)	Concentración Extracto (mg)	Etanol	Porcentaje de Inhibición	Metanol	Porcentaje de Inhibición
<i>Astraeus hygrometricus</i>					
50	2.5	6968.0±13.9	98.8	15408.0±1320.5	97.3
75	3.75	0	100	2745.3±2731.3	99.5
100	5	0	100	0	100
<i>Laccaria laccata</i>					
50	2.5	6643.0±5246.5	98.8	24933.3±1204.7	95.7
75	3.75	1.0±1.0	99.9	5467.3±2575.5	99.1
100	5	0	100	0	100
<i>Lycoperdon perlatum</i>					
50	2.5	15877.3±1990.3	97.2	29813.3±954.7	94.8
75	3.75	0	100	3127.7±2403.2	99.4
100	5	0	100	0	100
Testigo					
Dilución 1:1000	-	581666.7±33785.3		581666.7±33785.3	

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria y porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos y metanólicos contra *S. agalactiae*.

Conclusiones

Las especies de hongos micromicetos (HM) evaluadas presentaron actividad antimicrobiana, la cual varió dependiendo el solvente, método empleado y el microorganismo probado, destacando *A. hygrometricus* y *L.*

