

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR LÍQUENES

Hernández Jr. Camacho Moisés (1), Álvarez Mejía César (2) y López Ramírez Varinia (3)

¹[Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico:[moiseshjrc@gmail.com]

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

³[Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [valopez@itesi.edu.mx]

Resumen

Los líquenes son organismos simbióticos formados por un hongo (micobionte), dos o más algas y/o cianobacterias (fotobionte) y una levadura. Los líquenes han sido estudiados por la producción de metabolitos secundarios y su actividad biológica. El propósito de este estudio fue evaluar los metabolitos secundarios sintetizados por líquenes del estado de Guanajuato. Los metabolitos se obtuvieron por extracción orgánica empleando acetona, éter de petróleo y acetato de etilo, incubándose un trozo a 4°C. Se realizaron ensayos de inhibición en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* y *Yarrowia lipolytica* W29, inoculando 100 µL cultivo microbiano en agar BHI (bacterias) y YPD (levadura), se colocaron discos estériles impregnados con 20 µL del extracto liquénico y se dejaron incubando toda la noche a temperatura ambiente. Observamos inhibición del crecimiento microbiano con los extractos de *Usnea filipendula*, *Usnea strigosa*, *Candelaria concolor* y *Flavoparmelia sp.* Se realizaron análisis por cromatografía de capa fina y se probaron individualmente las bandas reveladas. La banda identificada por su coeficiente de retención ($R_f = 0.55$) como ácido úsnico del extracto de *Usnea filipendula* presento actividad frente a *S. aureus*. Esto sugiere que los extractos liquénicos contienen metabolitos que inhiben individualmente a los microorganismos empleados y que presentan un potencial de uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas.

Abstract

Lichens are symbiotic organisms formed by a fungi (mycobiont), an algae or cyanobacteria (photobiont) and a yeast. Lichens have been studied for the production of secondary metabolites and their biological activity. The aim of this study was to evaluate the secondary metabolites produced by lichens founded in Guanajuato. The metabolites were obtained by organic extraction using acetone, petroleum ether and ethyl acetate saving one piece at 4°C. The inhibition growth essays in *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, and *Yarrowia lipolytica* W29 were prepared inoculating 100 µL of bacterial culture in BHI agar plates (for bacteria) and YPD agar (for yeast), then 20 µL of lichen extract were added in sterile disks and incubated all night at temperature room. We observed inhibition of bacterial grow with the extracts of *Usnea filipendula*, *Usnea strigosa*, *Candelaria concolor* and *Flavoparmelia spp.* In order to evaluated the individual effect of secondary metabolites from lichens, we prepared a thin layer chromatography analysis. The band identificated for its retention coefficient ($R_f = 0.55$) as usnic acid from *Usnea strigosa* extract had activity against *S. aureus*. This result suggest that the lichens extracts contains metabolites that inhibits individually microorganisms, and this effect could have a potential use for bacterial diseases treatment.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos simbióticos constituidos por un hongo (micobionte), dos o más algas o cianobacterias (fotobionte) y una levadura [1]. El micobionte se encarga de proteger al fotobionte de las radiaciones directas del sol y brindarle agua y sales minerales. Mientras que el fotobionte a través del proceso de fotosíntesis proporciona al micobionte hidratos de carbono y vitaminas para producir metabolitos primarios y secundarios conocidos como sustancias liquénicas [2]. Dada la resistencia que presentan algunas bacterias a los antibióticos comerciales, las sustancias liquénicas son una alternativa para el desarrollo de nuevos compuestos antibacteriales [3]. El ácido úsnico aislado de la especie *Ramalina reticulata* presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y algunas bacterias ácido resistentes como *Mycobacterium tuberculosis* [3]. En el estado de Guanajuato existen escasos reportes acerca de metabolitos con actividad antimicrobiana que son producidas por los líquenes encontrados en este estado. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos liquénicos frente a distintos microorganismos. Así como encontrar el o los compuestos responsables de esta actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de extractos orgánicos

Se usaron 15 especies liquénicas recolectadas en diversos puntos del estado de Guanajuato por compañeros del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, las cuáles fueron identificadas como: *Cladonia rangiferina* (Cr), *Evernia* sp (E), *Hypogymnia* sp (Hy), *Imshaugia* sp (Im), *Telochistes* sp (Te), *Usnea filipendula* (Uf), *Usnea strigosa* (Us), *Candelaria concolor* (Cc), *Pseudovernia furfuracea* (Pf), *Hypotrachyna* sp (Hyp), *Melanelixia* sp (Me), *Lecanora* sp (L), *Xanthoria* sp (X), *Umbilicaria muhlenbergii* (Um) y *Flavoparmelia* sp (F). Se tomó un trozo del líquen y se suspendió en 100 µL del solvente orgánico (acetona (Ac), acetato de etilo (At) y éter de

petróleo (Ep)), este se conservó a 4°C toda la noche hasta su empleo.

Identificación química de las especies de líquenes y microcristalización de metabolitos secundarios.

Para la identificación química de las especies de líquenes, se tomó un trozo de muestra, y se le agregó una gota de los siguientes reactivos: Cloro comercial (C), hidróxido de potasio al 10% (K) y sus combinaciones, Lugol (L), y Ácido nítrico al 50% (N). Se observó el cambio de coloración de cada una de las muestras. En el caso de la microcristalización se colocó un trozo de muestra en un portaobjetos y se le agregaron 4-5 gotas de acetona, se retiró el trozo de muestra y se le agregó una gota de agente cristizador Glicerina:Alcohol:Agua (GAA; 1:1:1) y Glicerina:Ácido acético (GA; 1:3). Se colocó un cubreobjetos y se flameó la muestra hasta la aparición de pequeñas burbujas. Se dejó enfriar y posteriormente se observó en el microscopio las distintas formas y tamaños de cristales [4].

Ensayos de inhibición

Los microorganismos usados en el estudio fueron: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp y *Yarrowia lipolytica* W 29. Se espatularon 100 µL de cada cultivo bacteriano ajustado previamente a D.O_{600nm} de 0.5 en placas de agar BHI para las bacterias y agar YPD para la levadura. Posteriormente se impregnaron discos de papel filtro estériles con 20 µL del extracto orgánico y se colocaron sobre el agar, se incubaron a temperatura ambiente por toda la noche. Se observaron y midieron los halos de inhibición.

Determinación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina

Se colocaron 5 gotas de los extractos liquénicos preparados previamente en placas de sílice gel de 5x10 cm (Fluka, analytical®, 70644-50EA, sílice gel on TLC Al foils), se usaron distintas mezclas de elución como tolueno:ácido acético (17:3) y hexano:dietileter:ácido acético (5:4:1), los

metabolitos secundarios se revelaron con yodo metálico hasta la aparición de manchas amarillentas.

Determinación de actividad individual de los metabolitos secundarios

Una vez resuelta la placa, ésta se colocó en una caja Petri y se añadieron 10 ml de agar BHI, ya solidificada se añadió agar suave mezclando 10 mL de agar BHI con 5 mL de cultivo bacteriano y se le agregaron formando así una segunda capa, una vez solidificado se incubó a temperatura ambiente por toda la noche. [5].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación química y microcristalización

Por medio de la identificación química se apreció el cambio de coloración de la muestra debido a la producción de metabolitos secundarios. Para el caso del líquen *Usnea strigosa* se observó un cambio de coloración de verde a amarillo cuando se le agregó la mezcla KC (Tabla 1), esto nos indica que este líquen produce ácido úsnico [4].

En la microcristalización fue posible distinguir distintos cristales que se lograron identificar por su tamaño y forma. La antranoria (Figura 1A) se caracteriza por tener forma de aguja delgada, recta y alargada, se reveló con la mezcla GA en el líquen *Candelaria concolor*. Mientras que el ácido úsnico (Figura 1B) se caracteriza por tener forma aguja rectangular y alargada este compuesto fue revelado con el reactivo GA del líquen *Usnea strigosa*.

Tabla 1. Identificación química de las especies líquénicas.

Especie líquénica	K	C	KC	CK	L	N
<i>Us</i>	■	-	■	-	■	■
<i>Uf</i>	■	-	■	■	-	-
<i>Fl</i>	■	-	■	-	-	-

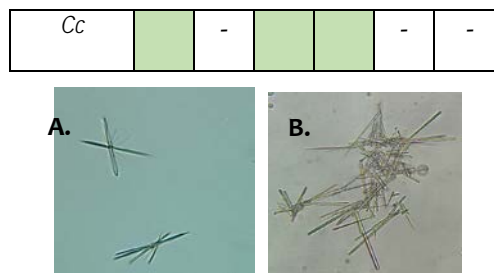


Figura 1. Ejemplos de microcristales de sustancias líquénicas. A. Antranorina B. Ácido úsnico.

Ensayos de inhibición

Se probaron los extractos orgánicos de 15 especies líquénicas. Las especies líquénicas que presentaron actividad inhibitoria fueron: *Uf*, *Us*, *Cc* y *Fl*. Los extractos de *Ac*, *At* y *Ep* de las especies *Usnea filipendula*, *Usnea strigosa*, y *Flavoparmelia sp.* lograron inhibir la cepa de *S. aureus*. Se presentó el mismo caso para los extractos de *At* y *Ac* de *Candelaria concolor*. Los extractos de *At* y *Ac* del líquen *Usnea filipendula* logro inhibir a *Y. lipolytica* W2, se pudo observar que el extracto de *At* tuvo un mejor efecto que el extracto de *Ac* (Figura 2A). En el caso de *S. aureus* los extractos de *Ac* y *At* de las especies *Usnea strigosa*, *Usnea filipendula*, *Flavoparmelia sp.* y *Candelaria concolor* fueron en los que observamos mayor poder inhibitorio (Figura 2B). En ninguno de los extractos evaluados se logró inhibir el aislado de *Pseudomonas sp.*

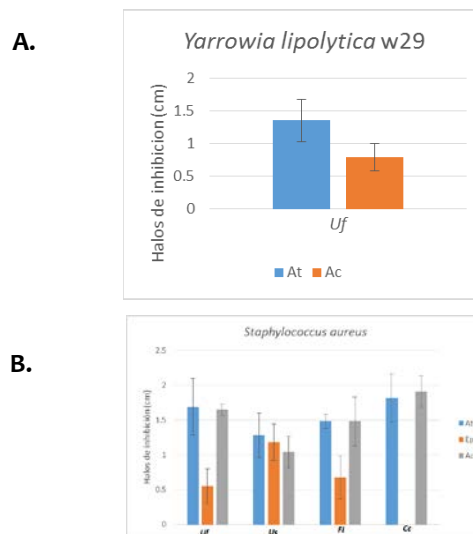


Figura 2. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de especies líquénicas sobre microorganismos. A. El extracto de

acetato de etilo de *Usnea filipendula* tuvo un mayor poder inhibitorio sobre la cepa de *Y. lipolytica* W29 B. Los extractos de acetato de etilo y Acetona de los líquenes *Usnea filipendula* y *Candelaria concolor* presentaron mayor poder inhibitorio frente a *S. aureus*.

En el caso de la cepa de *Y. lipolytica* W29 no se tiene información sobre la actividad biológica de los metabolitos secundarios frente a este microorganismo. Sin embargo, Mitrović y col. (2011) [5] probaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico del líquen *Evernia prunastri* en la levadura *Rhodotorula sp.* la cual presentó una mayor inhibición que *Saccharomyces boulardii* y *Candida albicans*. Para el caso de las bacterias, Lauterwein y col. (1995) reportaron que el ácido usnico y el ácido vulpínico tenían actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, en comparación de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* [6].

Los halos de inhibición se lograron observar sobre bandas individuales, estas representan un compuesto y se identificaron por medio de sus Rf's. El compuesto identificado como ácido usnico con un Rf de 0.55 del líquen *Uf* y el ácido prasinico con un Rf de 0.65 del líquen *Cc* como los responsables de la inhibición a la cepa de *S. aureus* (Figura 3). El ácido usnico ha sido reportado como un antibiótico potente contra bacterias Gram positivas así como Gram negativas [7]. En el caso del ácido prasinico se tiene reportada su actividad anticancerígena [8], aunque cabe resaltar que no se tiene reportado que lo sinteticen esta especie de líquen ni si éste presenta actividad antimicrobiana.

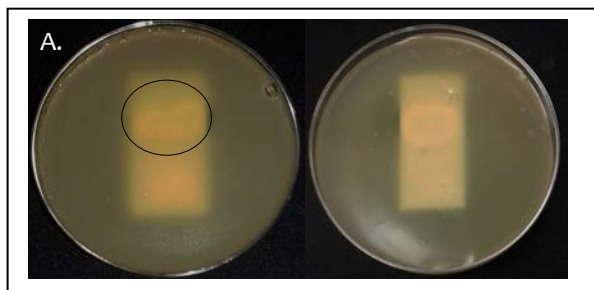


Figura 3. Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. A. Halo de inhibición mostrado en una banda (Rf=0.55; Ácido usnico) del extracto de At, Ep y Ac del líquen *Uf*. B. Halo de

inhibición mostrado en una banda (Rf=0.65; Ácido prasinico) de los extractos de At y Ac del líquen *Cc*.

CONCLUSIONES

Se lograron identificar dos compuestos como probables responsables de la inhibición en la cepa de *S. aureus* que fueron el ácido usnico del líquen *Usnea filipendula* colectado en la Sierra de Santa Rosa y el ácido prasinico del líquen *Candelaria concolor* colectado en la Sierra Gorda de Guanajuato. Se sugiere realizar cromatografía líquida de alta presión para confirmar la identidad de los compuestos que presentaron actividad antimicrobiana.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana a cargo de la Dra. Varinia López Ramírez, al Dr. Cesar Álvarez Mejía y al Dr. Adán Topiltzin Morales Vargas por las facilidades y el material brindado así como al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y al TecNM por el financiamiento al proyecto 286.15-PD.

REFERENCIAS

- [1]. Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M., Schneider, K., Stabenheimer, E., Toomey, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H. & McCurcheon, J. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353:488-491.
- [2]. Flores, D., Carballo, C., Gómez, M. y Ramírez, R. (2014). Actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxospora pustulata* sobre *Rhizoctonia solani*. *Ciencia y Tecnología*. 21:12-14.
- [3]. Nasimento, A., Braz-Filho, R., Mussi-Dias, V. & Curcino, I. (2015). Chemistry and Biological Activity of Ramalina Lichenized Fungi. *Molecules*. 20:8952-8987.
- [4]. Hale, M. (1969). *How to know lichens*. Brown Company publishers.
- [5]. Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., & Marre, R. (1995). In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)-Usnic Acid, and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms, 39(11), 2541-2543.
- [6]. Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. *Zeitschrift Fur Naturforschung-Section C. Journal of Biosciences*, 65(3-4), 157-173.

- [7]. Yilmaz, M., Ozdemir, A., Tay, T. & Kivanic, M. (2004). The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and Its (D)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 250-251.
- [8]. Chakor, N., Patil, G., Writer, D., Periyasamy, G., Sharma, R., Roychowdhury, A. & Dutt, P. (2012). First total synthesis of prasinic acid and its anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22:6608-6610. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.116>