



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Actividad antimicrobiana de una proteína obtenida  
del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes* contra  
*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P r e s e n t a**

**Lilia Sánchez Minutti**

**Director  
Dr. Gerardo Díaz Godínez**

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2016

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas



Actividad antimicrobiana de una proteína obtenida  
del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes* contra  
*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Nombre del Alumno  
Lilia Sánchez Minutti

Comité Tutoral

Dr. Gerardo Diaz Godínez  
Dr. Rubén Diaz Godínez  
Dr. Gerardo Santos López  
Dr. Saúl Tlecuítl Beristain  
Dra. Maura Téllez Téllez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2016

El presente trabajo se llevó a cabo en el posgrado del CTBC de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de beca 156406.



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:

ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008

Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com



DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL  
*Adriana Montoya E.*

DR. SAÚL TLECUTLI BERRISTAIN  
*[Signature]*

DR. GERARDO SANTOS LOPEZ  
*[Signature]*

DRA. MAURITA TELLEZ TELLEZ  
*[Signature]*

DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ  
*[Signature]*

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 15 DE 2016

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que Lilia Sánchez Minutti realiza para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que esta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "Actividad antimicrobiana de una proteína obtenida del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes* contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*".

COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado  
Doctorado en Ciencias Biológicas



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado del CTBC y a la Universidad Autónoma de Tlaxcala por su apoyo brindado durante la realización de mi doctorado.

A CONACYT por la beca otorgada (No. 156406) que me permitió realizar mis estudios.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A los Drs. Saul Tlecutl Berstain, Gerardo Santos López, Maura Téllez Téllez, y Rubén Díaz Godínez por sus valiosas retroalimentaciones.

A mis padres: Lilia Minutti Gavito y Jacinto Sánchez Flores ' por el apoyo incondicional que me brindaron en mis estudios y por ayudarme a cumplir mis metas.

A mi hermano Omar Sánchez Minutti y su esposa Laura Zurita Martínez por sus consejos y palabras de aliento a lo largo de mi vida.

## Resumen

Las enfermedades causadas por bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* representan un problema de salud pública e importancia económica a nivel mundial. A pesar de los avances de la medicina moderna, las enfermedades causadas por estos patógenos no han desaparecido y estos microorganismos han adquirido resistencia a los antibióticos suministrados para su combate. Por ello, los agentes antimicrobianos novedosos y de diferentes fuentes biológicas son buscados continuamente para su posible uso como agentes terapéuticos. La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos ha girado su atención hacia algunos basidiomicetos como *Lentinula edodes*, el cual ha sido utilizado como fuente medicinal tradicional y se ha demostrado que tienen efectos benéficos en sus consumidores. Varios reportes han confirmado la actividad antimicrobiana de los hongos contra bacterias patógenas que atacan frecuentemente a la población y contra hongos fitopatógenos, sin embargo, pocos trabajos han realizado la purificación de moléculas antimicrobianas en este hongo, lo que abre una brecha para el desarrollo de la investigación en esta área. En el presente trabajo se purificó una proteína del cuerpo fructífero del hongo *L. edodes* con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*. La proteína purificada en tres pasos (isoelectroenfoque, intercambio iónico y electroforesis preparativa) fue de 87.2 kDa y mostró inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* formando halos de inhibición de hasta  $2.68 \pm 0.04$  cm, no encontrándose diferencias significativas para ambas especies. Por otra parte, la actividad específica encontrada fue de 0.28-0.26 cm/mg de proteína con una concentración de hasta 9.69 mg/l de proteína en el último paso de purificación. Se encontró un factor de purificación de 14.2-16.3. Estos hallazgos representan un avance en el conocimiento de la composición química del hongo y abren la investigación de las propiedades físico químicas de la molécula encontrada y su posible uso como un agente terapéutico.

INDICE

1	1.1 La salud pública y las enfermedades causadas por patógenos.....	1
2	1.1.1 Enfermedades causadas por patógenos.....	2
5	1.1.2 Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	5
8	1.1.3 Prevención de las enfermedades.....	8
9	1.2 Fármacos para el control de enfermedades microbianas y fúngicas.....	9
14	1.3 Mecanismos de acción de las moléculas antimicrobianas y antifúngicas.....	14
16	1.4 Resistencia microbiana.....	16
16	1.4.1 Costos generados en la salud pública por la resistencia microbiana.....	16
18	1.4.2 Mecanismos de resistencia.....	18
19	1.4.3 Microorganismos resistentes.....	19
22	1.5 Obtención y purificación de los antibióticos.....	22
24	1.5.1 Producción de penicilina.....	24
25	1.5.2 Producción de tetraciclina.....	25
26	1.5.3 Producción de nistatina.....	26
28	1.6 Organismos productores de moléculas con actividad antimicrobiana.....	28
28	1.6.1 Tipos de moléculas con actividad antimicrobiana.....	28
31	1.6.2 Moléculas producidas por mamíferos.....	31
32	1.6.3 Moléculas producidas por especies marinas.....	32
33	1.6.4 Moléculas producidas por plantas.....	33
36	1.6.5 Moléculas producidas por insectos.....	36
37	1.6.6 Moléculas producidas por microorganismos.....	37
39	1.7 Los hongos.....	39
39	1.7.1 Distribución y clasificación de los hongos.....	39
41	1.7.2 Hongos basidiomicetos.....	41
41	1.7.3 <i>Lentihula edodes</i> .....	41
42	1.7.4 Ciclo de vida.....	42
VI		VI

Page



44	1.7.5 Composición química.....
46	1.7.6 Importancia de <i>L. edodes</i> .....
48	1.7.7 Actividad antimicrobiana de los hongos.....
50	1.8 Purificación de proteínas con actividad antimicrobiana.....
50	1.8.1 Isoelectroenfoque.....
50	1.8.2 Cromatografía de intercambio iónico.....
51	1.8.3 Electroforesis en placa y columna.....
52	2. ANTECEDENTES.....
57	3. JUSTIFICACIÓN.....
57	4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....
58	5. OBJETIVOS.....
58	5.1 Objetivo general.....
58	5.2. Objetivos particulares.....
59	6. METODOLOGÍA.....
59	6.1 Material biológico.....
59	6.2 Extracción de los compuestos antimicrobianos de los cuerpos fructíferos.....
60	6.3 Determinación de la actividad antimicrobiana.....
60	6.4 Purificación de la proteína con actividad antimicrobiana.....
61	6.5 Determinación del peso molecular de la proteína purificada.....
61	6.6 Determinación de la concentración de proteína.....
62	6.7 Análisis estadístico.....
63	7. RESULTADOS.....
71	8. DISCUSIONES.....
73	9. CONCLUSIONES.....
73	10. PERSPECTIVAS.....
74	11. REFERENCIAS.....
86	12. PUBLICACIONES.....

## INDICE DE TABLAS

3	Tabla 1. Clasificación de las enfermedades infecciosas y parasitarias.....	3
4	Tabla 2. Formas de transmisión de las enfermedades.....	4
4	Tabla 3. Enfermedades que afectan a los humanos y son causadas por microorganismos.....	4
6	Tabla 4. Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	6
7	Tabla 5. Brotes epidemiológicos por contaminación de alimentos por <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	7
10	Tabla 6. Clasificación de los antibióticos.....	10
11	Tabla 7. Espectro de acción antimicrobiano de los antibióticos.....	11
14	Tabla 8. Espectro de acción de los antimicrobicos.....	14
20	Tabla 9. Microorganismos resistentes a los antibióticos.....	20
22	Tabla 10. Frecuencia de consumo de los antibióticos y resistencia antimicrobiana.....	22
32	Tabla 11. Moléculas antimicrobianas producidas por mamíferos.....	32
33	Tabla 12. Moléculas antimicrobianas producidas por especies marinas.....	33
35	Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las plantas.....	35
36	Tabla 14. Moléculas antimicrobianas producidas por insectos.....	36
38	Tabla 15. Moléculas antimicrobianas producidas por microorganismos.....	38
44	Tabla 16. Composición química de algunos los hongos.....	44
45	Tabla 17. Contenido de aminoácidos de <i>L. edodes</i> .....	45
46	Tabla 18. Minerales y vitaminas que contiene <i>L. edodes</i> .....	46
49	Tabla 19. Actividad antimicrobiana de los hongos.....	49
64	Tabla 20. Actividad antimicrobiana en la primera etapa de purificación.....	64
65	Tabla 21. Actividad antimicrobiana en la segunda etapa de purificación.....	65
67	Tabla 22. Actividad antimicrobiana en cada paso de la purificación.....	67
70	Tabla 23. Concentración de proteína soluble y actividad específica en cada paso de la purificación.....	70

## INDICE DE FIGURAS

Pag.	
13	Figura 1. Clasificación de los antimicrobicos.....
25	Figura 2. Producción de penicilina por <i>Penicillium chrysogenum</i> .....
26	Figura 3. Producción de tetraciclina por <i>Streptomyces aureofaciens</i> .....
27	Figura 4. Producción de nistatina por <i>Streptomyces noursei</i> .....
31	Figura 5. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.....
40	Figura 6. Clasificación taxonómica de los hongos.....
42	Figura 7. Partes del hongo.....
43	Figura 8. Ciclo de vida de un basidiomiceto.....
59	Figura 9. Diagrama general de trabajo.....
65	Figura 10. Cromatograma de la segunda etapa de purificación.....
66	Figura 11. Electroferograma de la tercera etapa de purificación.....
68	Figura 12. Halos de inhibición de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....
69	Figura 13. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en cada etapa de purificación.....

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La salud pública y las enfermedades causadas por patógenos

La Organización Mundial de la Salud (1946) definió la palabra salud como el estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de enfermedades o afecciones (Mandell y cols. 2002) y definió la salud pública como aquella que engloba todas las actividades relacionadas con la salud y la enfermedad, el estado sanitario y ecológico del ambiente de vida; la organización y el funcionamiento de los servicios de salud, planificación, gestión y educación. En este sentido, mantener la salud pública involucra prevenir y proteger a la población de las enfermedades infecciosas, nutricionales, genéticas, crónicas, de neoplasia, de defectos innatos del metabolismo, nosocomiales, mentales, etc., además restaurarla en caso de que alguna enfermedad los ataque y brindar los suministros e infraestructura necesaria para combatir las enfermedades.

La salud pública cobra importancia cuando se habla de los retos económicos que enfrentan los gobiernos para mantenerla, ejemplo de ello son Estados Unidos, Alemania, Canadá, Ecuador y Filipinas, quienes en 2007 destinaron un 13.4, 10.3, 8.8, 4.2 y 3.4 %, respectivamente, de su producto interno bruto (PIB) para mantener y prevenir las enfermedades (OMS 2010). Aunque no todos los países invierten de la misma forma, estos gastos son significativos en comparación con los ingresos que perciben, por ejemplo, África en 2007 gastó 100 dólares americanos per cápita y en regiones como Europa y América el gasto fue de 2,500-6,000 dólares americanos per cápita. En 2003, el gasto para mantener la salud pública en México fue de 1,060 pesos per cápita y se destinó el 5.1 % del PIB (OMS 2016), con una esperanza de vida de 73-78 años. Aunque no se ha encontrado una correlación entre el aumento de la esperanza de vida y el incremento del gasto total en la salud per cápita, los gobiernos han dedicado una parte importante de sus ingresos para preservar la salud y prevenir las enfermedades.

Según la clasificación internacional de enfermedades, en su décima revisión, clasificó en 17 grupos los diferentes tipos de enfermedades que afectan a los humanos, resaliándose en la Tabla 1 el primer grupo de esta clasificación llamado enfermedades infecciosas y parasitarias, donde se encuentran microorganismos como bacterias, hongos, parásitos y virus (OPS 1995).

Los microorganismos juegan un papel importante en todos los ecosistemas y algunos de estos acompañan al ser humano desde su nacimiento con la colonización microbiana de la piel, mucosas, tubo digestivo y vías genitourinarias. Sin embargo, otros microorganismos como algunas bacterias, virus, parásitos y hongos son perjudiciales ya que provocan enfermedades, resultado de una serie de interacciones entre el hospedero, el patógeno y el ambiente constituyendo el ciclo de la enfermedad (González 1989), en este caso, cuando un microorganismo es causante de una enfermedad o daño en la biología de su hospedero se llama patógeno.

### 1.1.1 Enfermedades causadas por patógenos

Es importante hacer mención que el gobierno Mexicano ha destinado recursos económicos para realizar investigación científica a fin de estudiar las causas, consecuencias, mecanismos de acción, alternativas de tratamiento, medios de adquisición y agentes que provocan las enfermedades. En México, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología es una de las instituciones gubernamentales que invierte en el desarrollo científico y tecnológico y en 2016 se le asignó un presupuesto de 33,706.7 millones de pesos, los cuales serán usados para la formación y fortalecimiento de capital humano, estímulo a investigadores, generación, transferencia y aprovechamiento de conocimiento en todas las áreas de la ciencia, entre ellas la médica y biotecnológica (CONACYT 2016). Resultado de estas investigaciones, se ha demostrado que muchas enfermedades son causadas por microorganismos y gracias a su estudio se ha podido dictaminar cuáles son los mecanismos de acción, sus formas de transmisión y los tratamientos para su contención y prevención.

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades infecciosas y parasitarias.

Subclasificación	Ejemplos de enfermedades
Enfermedades infecciosas intestinales	Colera, shigelosis, infecciones intestinales bacterianas, amebiasis, diarrea, etc.
Tuberculosis	Tuberculosis respiratoria bacteriana y del sistema nervioso, etc.
Zoonosis bacterianas	Carbunco, brucelosis, leptospirosis, etc.
Enfermedades bacterianas	Listeriosis, lepra, difteria, infección meningocócica y actinomicosis
Infecciones con modo de transmisión predominantemente sexual	Sifilis, chancro blando, tricomoniasis, etc.
Enfermedades debidas a espiroquetas	Sifilis no venérea, fiebres recurrentes, pinta, etc.
Enfermedades causadas por clamidias	Tracoma, Infección debida a <i>Chlamydia psittaci</i> , etc.
Rickettsiosis	Tifus, fiebre maculosa, fiebre Q, etc.
Infecciones virales del sistema nervioso central	Rabia, poliomielitis aguda, meningitis viral, encefalitis viral, etc.
Fiebres virales transmitidas por artrópodos y fiebres virales hemorrágicas	Fiebre del dengue, otras fiebres virales transmitidas por mosquitos, fiebre viral transmitida por artrópodos, etc.
Infecciones virales caracterizadas por lesiones de la piel y de las membranas mucosas	Varicela, sarampión, verrugas viricas, herpes zóster, etc.
Hepatitis viral	Hepatitis aguda tipo A y B, hepatitis viral crónica, etc.
Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	VIH: resultante en enfermedades infecciosas y parasitarias y de tumores malignos, etc.
Micosis	Dermatofitosis, candidiasis, blastomicosis, aspergilosis, etc.
Enfermedades debidas a protozoarios	Paludismo, leishmaniasis, neumocistosis, etc.
Helminiasis	Teniasis, triquinosis, parasitosis intestinales, etc.

La adquisición de una enfermedad se puede llevar a cabo por la adquisición de un agente causante ya sea por contacto directo con el mismo o por su adquisición por medio de vehículos (Tortora 2007). En la Tabla 2 se observan algunas formas de transmisión de las enfermedades microbianas.

Continúa

Clasificación	Microorganismo	Enfermedad
Bacterias aeróbicas móviles	<i>Bordetella pertussis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	Tosferina Infecciones del tracto urinario, de quemaduras y neumonía Diarrea
Bacterias aeróbicas bacilares	<i>Brucella</i> spp. <i>Legionella pneumophila</i>	Brucelosis Enfermedad de los legionarios
Bacterias entéricas	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella thypi</i>	Infecciones del tracto urinario y diarrea Fiebre tifoidea
Clamidias	<i>Chlamydia psitaci</i>	Faringitis y neumonía

Tabla 3. Enfermedades que afectan a los humanos y son causadas por microorganismos.

Debido a que los microorganismos se encuentran en todos los ambientes, la adquisición de patógenos resulta sencilla y por consiguiente el número de enfermedades es muy grande, sin embargo; no todos los patógenos tienen el mismo hospedero por lo cual algunos de ellos resultan inofensivos para otras especies y la enfermedad se presenta sólo en condiciones bien definidas. En la Tabla 3 se enlistan algunos microorganismos que comúnmente causan enfermedades en los humanos (Stanier y Villanueva 1996).

Forma de transmisión	Formas comunes de contagio	Ejemplo de enfermedad
<i>Directo:</i> de persona a persona	Besar, toser, relaciones sexuales, etc.	Gripe, Enfermedades virales respiratorias, infección por estafilococos y Rabia
<i>Indirecto:</i> El agente es transmitido desde su reservorio al huésped por medio de un objeto manimado.	Fómites	Infecciones, enfermedades respiratorias y cutáneas
<i>Vehículos:</i> El agente está inmerso en un ambiente	Agua, alimentos, aire, líquidos corporales, etc.	Leptospirosis, Salmonelosis, Tenia porcina

Tabla 2. Formas de transmisión de las enfermedades.

El género *Staphylococcus* está formado por bacterias esféricas, Gram positivas, con un tamaño promedio de 1 µm, no móviles, no formadoras de esporas, catalasa positivas y generalmente no tienen capsula, se han descrito cerca de 33 especies y 15 subespecies, sin embargo, sólo tres son frecuentemente asociadas con enfermedades en humanos, entre ellas *S. aureus* (Peralta y cols. 2006 y Baker 2009; Castro 2014; Murray 2015). Este microorganismo es el causante de

La Organización Mundial de la Salud en 2007 publicó que 1.8 millones de personas murieron por enfermedades causadas por *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia* y *Staphylococcus*, por lo cual es importante atender a las enfermedades causadas por estos patógenos.

### 1.1.2 Enfermedades causadas por *S. aureus* y *E. coli*

alrededor del mundo.

Cabe destacar de la Tabla anterior a los géneros *Staphylococcus* y *Escherichia* debido a que están relacionadas con un número significativo de enfermedades y brotes epidemiológicos

Clasificación	Microorganismo	Enfermedad
Bacterias anaeróbicas facultativas bacilares con flagelos polares	<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
Bacterias anaeróbicas bacilares no móviles	<i>Haemophilus influenzae</i>	Faringitis, infecciones del oído medio y meningitis
Micoplasma	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumonía
Neisserias	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	Gonoreya Faringitis, neumonía y meningitis
Hongos	<i>Microsporium audouinii</i> <i>Trichophyton violaceum</i> <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i>	Dermatomicosis Micosis subcutáneas Micosis sistémicas
Parasitos	<i>Leishmania tropica</i>	Leishmaniasis cutánea
Protozoos	<i>Trypanosoma brucei</i>	Enfermedad del sueño

Continuación



Aunado a las enfermedades anteriormente mencionadas, estas dos bacterias son de importancia para la salud pública debido al número de brotes por intoxicación alimentaria que generan, tan sólo en el periodo de 2011 a 2012 se detectaron 12 brotes asociados con *E. coli* y *S. aureus* relacionados con la producción, procesamiento, almacenamiento y reparto de los alimentos

Tomado y modificado de Peralta y cols. (2006) y Baker (2009).

Microorganismo	Enfermedad que genera
<i>S. aureus</i>	Tiroditis, los forúnculos, el antrax, impétigo, onfalitis, parotiditis, linfadenitis y las infecciones de heridas, endocarditis, pericarditis, neumonía, osteomielitis, meningitis, derrame pleural, abscesos de tejidos blandos, músculos o vísceras, artritis, tromboflebitis séptica de los grandes vasos, mastitis, bacteremia, intoxicación alimentaria, enterocolitis, infecciones urogenitales, síndrome del choque séptico así como necrosis epidémica de origen tóxico.
<i>E. coli</i>	Colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, púrpura trombótica trombocitopénica, complicaciones posdiarrea, diarrea aguda, diarrea crónica endémica y epidémica, diarrea de viajero, tiroditis.

Tabla 4. Enfermedades causadas por *S. aureus* y *E. coli*.

Por otro lado, *E. coli* es una especie bacteriana común en la microbiota intestinal, caracterizada por ser bacilos Gram negativos, no esporulados, con fimbrias y flagelos peritricos. Este microorganismo ha sido agrupado con base en los factores de virulencia en los nombrados patotipos: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* uropatogénica (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis (MAEC) (Peralta y cols. 2006 y Baker 2009; Castro 2014; Murray 2015). En la Tabla 4 se pueden observar las infecciones causadas por *E. coli* y *S. aureus* y algunas enfermedades producto de sus complicaciones.

una variedad de infecciones supurativas localizadas e invasoras y tres síndromes mediados por toxinas: el síndrome de shock tóxico, el síndrome de la piel escaldada y la intoxicación alimentaria (Baker 2009).

(OMS 2013). En la Tabla 5 se pueden visualizar los tipos de brotes ocasionados por estos microorganismos.

**Tabla 5.** Brotes epidemiológicos por contaminación de alimentos por *E. coli* y *S. aureus*.

<b>Países afectados</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Tipo de alimento</b>	<b>Alimento específico</b>
<i>Brotes en 2011</i>			
Canadá, E. U.	<i>E. coli</i> O157:H7	Nueces y semillas oleaginosas	Avellanas con cáscara
Japón	<i>E. coli</i> O111	Carne y productos cárnicos	Yukhoe (carne de vacuno cruda)
Austria, Canadá, República Checa, Egipto, Grecia, E.U., España, entre otros.	<i>E. coli</i> O104:H4	Leguminosas y legumbres	Brotes de fenogreco
Myanmar, Tailandia	<i>E. coli</i>	Fruita y productos a base de fruta	Aguaacales
Canadá, E.U.	<i>E. coli</i> O157:H7	Nueces y semillas oleaginosas	Nueces y refrigerios
Belgica, Alemania, Finlandia, entre otros.	<i>E. coli</i> O157: H7	Desconocido	-
<i>Brotes en 2012</i>			
Canadá, E.U.	<i>E. coli</i> O157:H7	Carne y productos cárnicos	Carne de vacuno picada
Austria, Italia, Eslovenia	<i>Staphylococcus</i> spp.	Cereales y productos a base de cereales	Espaguetis exentos de gluten
Canadá, E.U., Japón, China, Tailandia, México, entre otros	<i>E. coli</i> O157:H7	Carne y productos cárnicos	Diversas carnes
Australia, Hong Kong, Singapur, Emiratos Arabes Unidos	<i>E. coli</i>	Leche y productos lácteos	Yogur de albaricoque
E.U.	<i>E. coli</i> O157	Verduras, hortalizas y productos a base de verduras y hortalizas	Espinacas

Además de las enfermedades infecciosas y la intoxicación alimentaria, estos microorganismos son causantes de algunas enfermedades nosocomiales afectando cerca de 1.4 millones de personas hospitalizadas alrededor del mundo (OMS 2002), ya que pueden colonizar varios

La adquisición de enfermedades (no nosocomiales) provocadas por *E. coli* y *S. aureus* se pueden prevenir operando adecuadamente los mataderos para reducir la contaminación debida al contenido estomacal de los animales, pasteurizando la leche y alimentos lácteos, cocinando

adecuada de materiales y uso adecuado de catéteres y sondas. del entorno hospitalario, desinfección del equipo empleado con el paciente, esterilización de salud, uso adecuado de la ropa de trabajo, buenas prácticas inocuas de inyección, limpieza infecciones nosocomiales, recomendando buenas técnicas de lavado de manos por el personal Organización Mundial de la Salud (2003) ha establecido algunas acciones para evitar las incidencia de las mismas y controlando los brotes. Para ello, algunas instituciones como la en establecer pautas que logren la prevención de las enfermedades, disminuyendo con esto la Debido a los altos costos que representa la salud pública, los gobiernos han dedicado esfuerzos

### 1.1.3 Prevención de las enfermedades

A fin de evitar las enfermedades, el gobierno ha implementado acciones preventivas para evitar su incidencia ya que como se ha descrito anteriormente, una infección microbiana puede traer algunas complicaciones que desencadenen en otras patologías y compliquen su tratamiento.

malas asistencia médica, etc. contaminación de agua, tiempos de hospitalización prolongados, resistencia a antibióticos y manejo del catéter o de una cánula, sonda vesical, malas técnicas de ventilación mecánica, (Secretaría de Salud 2011). Estas enfermedades son generalmente ocasionadas por el mal puntual de las enfermedades nosocomiales del doble de los estándares internacionales encontrándolo en el 13 % de los casos, además se estima que México tiene una prevalencia es el segundo microorganismo frecuentemente asociado con las infecciones hospitalarias, 100,000 habitantes por año (OMS 2002) y según la Secretaría de Salud en México, *S. aureus* México, se calcula que 450,000 casos de infecciones hospitalarias causan 32 muertes por cada sitios cuando las defensas del hospedero están comprometidas y causar infecciones graves. En

adecuadamente las carnes, protegiendo y purificando los sistemas de abastecimiento de agua, desinfectando jardines y juegos infantiles, lavándose adecuadamente las manos, llevando a cabo la eliminación de heces humanas adecuadamente, combatiendo las moscas e insectos, teniendo un manejo adecuado de alimentos y una preparación sanitaria de bebidas, limitando la pesca y venta de mariscos en lugares no establecidos y fomentando la lactancia natural (Chin 2001). Las enfermedades infecciosas causadas por estos dos microorganismos presentes en los alimentos pueden prevenirse manteniendo zonas de trabajo limpias, separando alimentos crudos de los cocidos, usando técnicas de cocción adecuadas, manteniendo una buena higiene personal, evitando la manipulación de alimentos por personas con enfermedades infecciosas y teniendo un buen almacenaje de los alimentos y agua (Nicolle y cols. 2013). Sin embargo, las buenas prácticas clínicas, sanitarias y alimentarias no siempre son suficientes para eliminar los agentes infecciosos y evitar los contagios. De esta manera, cuando la prevención de las enfermedades no es posible y los agentes infecciosos han afectado el cuerpo humano, es necesario aplicar fármacos que ayuden a combatirlos.

#### 1.2 Fármacos para el control de enfermedades microbianas y fúngicas

Las enfermedades microbianas como las diarreas, resfriados, etc. en el pasado resultaban peligrosas para la población y estas culminaban normalmente en la muerte de los individuos, sin embargo, con el descubrimiento y aplicación de los fármacos estas enfermedades ya no representan la principal causa de muerte. Entre los fármacos tienen la capacidad de combatir a los agentes infecciosos se encuentran los antibióticos. Los antibióticos biológicos son compuestos químicos derivados de organismos vivos, generalmente microorganismos o una modificación química de los compuestos producidos por ellos, que inhiben la reproducción y crecimiento de otros microorganismos y células anormales (Cruz 2001). El primer antibiótico fue descubierto por Alexander Fleming en 1928 en el microorganismo *Penicillium notatum*, pero fue hasta 1940 que se logró su purificación (Katzung 2013), a partir de esta fecha, los investigadores se dieron a la tarea de buscar en diferentes organismos moléculas antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias y producto de ello, en la actualidad existen

aproximadamente 300 tipos de antibióticos y estos han sido agrupados en 23 categorías. En la Tabla 6 se muestra la clasificación de dichos antibióticos.

Tabla 6. Clasificación de los antibióticos.

Grupo	Ejemplo	Grupo	Ejemplo
<i>Penicilinas</i>	Penicilina	<i>Diaminopterimidinas</i>	Trimetoprim/ Sulfametoxazol
<i>Cefalosporinas</i>	Cefalexina	<i>Rifamicinas</i>	Rifampicina
<i>Carbapenems</i>	Imipenem	<i>Tetraciclinas</i>	Doxiciclina Tigeciclina
<i>Monobactamicos</i>	Aztreonam	<i>Nitrofurranos</i>	Nitrofuratoína
<i>Glucopéptidos</i>	Vancomicina	<i>Fosfonados</i>	Fosfomicina
<i>Aminoglucidos</i>	Gentamicina	<i>Polimixinas</i>	Colistina
<i>Macrólidos</i>	Eritromicina	<i>Aminociclitolos</i>	Espectinomicina
<i>Quinolonas</i>	Ciprofloxacina	<i>Oxazolidonas</i>	Linezolid Eperzolid
<i>Lincosaminas</i>	Cindamicina	<i>Ketolidos</i>	Telitromicina
<i>Nitroimidazoles</i>	Metronidazol	<i>Streptograminas</i>	Quinupristina/ dalopristina
<i>Fenicoles</i>	Cloranfenicol	<i>Diaminopterimidinas</i>	Trimetoprim
<i>Sulfonamidas</i>	Sulfisozazol		Sulfametoxazol

Tomado y modificado de Valety-Márquez y cols. (2007).

Los antibióticos son específicos para bacterias, hongos u otros microorganismos, destacando los que combaten enfermedades bacterianas como las penicilinas, cefalosporinas y

carbepenems, entre las cuales se encuentran a las betalactamicas las cuales son eficaces para infecciones estreptococicas, gonococicas y meningococicas, antrax, difteria, gangrena gaseosa, etc. Por otro lado, la ampicilina es especifica para bacterias Gram negativas y positivas y eficaz para la otitis media, infecciones de las vias respiratorias y urinarias y gonorrea por bacterias sensibles, sin embargo, su uso se ve interferido por algunas penicilinasas producidas por *S. aureus*, *E. coli*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, etc.

Otro antibiotico efectivo contra bacterias es la cefazidima, eficaz para las infecciones como la septicemia, neumonias y meningitis, atacando a *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas. El cloranfenicol, es un antibiotico usado para infecciones graves como las producidas por *H. influenzae* (OMS 2004). Como es de notarse, una misma enfermedad puede tratarse clinicamente con mas de un antibiotico, debido a que estos han resultado efectivos para grupos de bacterias, esta especificidad es llamada espectro antimicrobiano o de accion del antibiotico y es importante conocerlo para combatir eficientemente las enfermedades. En la Tabla 7 se puede observar el espectro antimicrobiano de algunos antibioticos comunes.

Tabla 7. Espectro de accion antimicrobiano de los antibioticos.

Antibiotico	Efectivo contra	Antibiotico	Efectivo contra
Penicilina G	<i>S. pneumoniae</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>N. meningitidis</i> , anaerobios Gram negativos pueden ser susceptibles a todas las penicilinas, excepto algunas especies de bacteroides	Tetracicclina	Cocos Gram positivos aerobios y <i>S. pneumoniae</i>
Penicilina V	Gram positivos ( <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> y estafilococos coagulasa negativos metilino sensibles, <i>S. pyogenes</i> ) y Gram negativos ( <i>M. catarrhalis</i> ), etc.	Sulfametoxazol	Gram positivos negativos, <i>Chlamydia</i> , <i>Actinomyces</i> sp. y algunos protozoarios
Azitromicina	<i>Lasiera monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. <i>E. coli</i> no productor de betalactamasas	Ofloxacina	Enterobacterias, <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Enterococcus</i> sp.
Eritromicina			
Amoxicilina			

Continua

Aunado a las enfermedades bacterianas, las enfermedades causadas por hongos también son de importancia clínica y para su tratamiento se usan antimicóticos, que en comparación con los antimicrobianos, se han descubierto muy pocos de ellos. Los antimicóticos pueden ser antibióticos, sustancias químicas o tratamientos físicos que inhiben el crecimiento de estos agentes patógenos. Es importante mencionar que la medicina moderna ha ido sustituyendo los antimicóticos químicos por antibióticos producidos por microorganismos. La Figura 1 muestra la clasificación de los antimicóticos, entre los que se encuentran los producidos por hongos, por actinomicetos y mixobacterias (Arenas 2003).

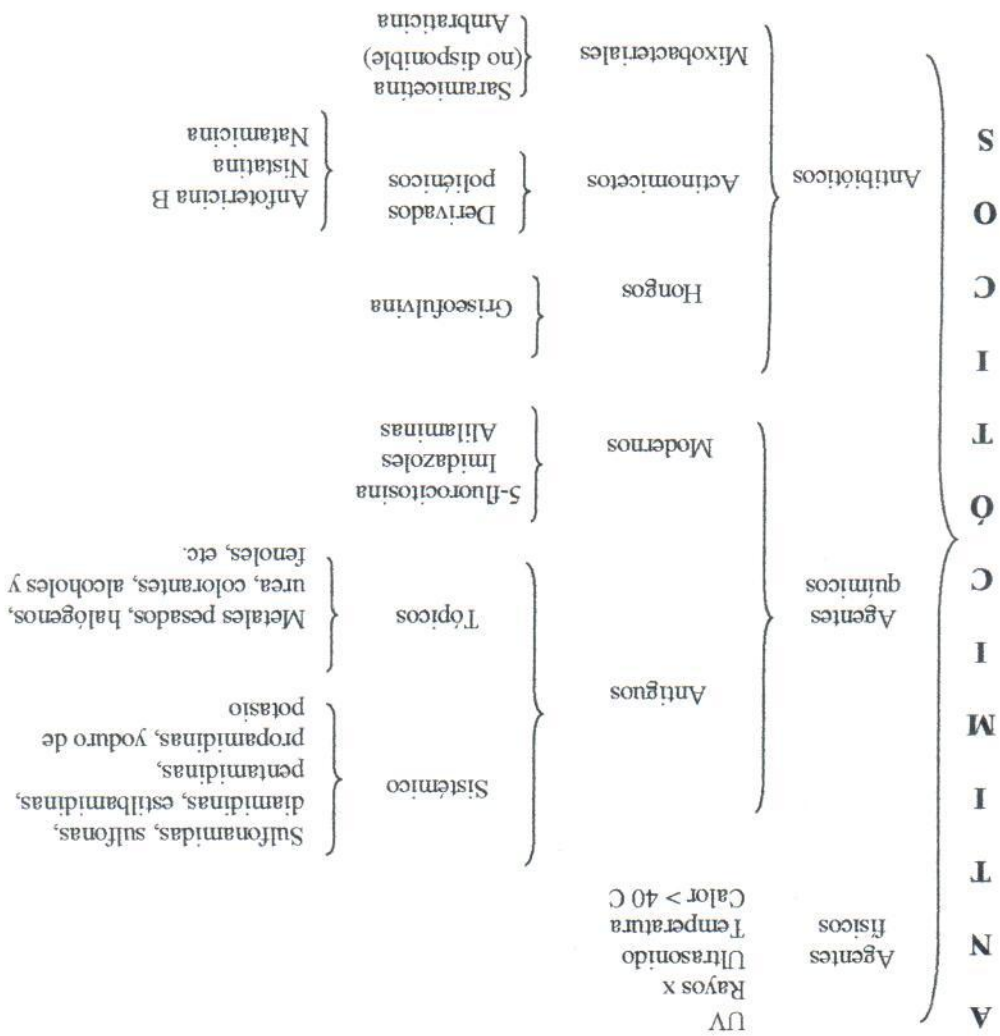
Tomado y modificado de Seija y Vignoli (2006).

Antibiótico	Efectivo contra	Antibiótico	Efectivo contra
Cloxacilina Oxacilina Dicloxacilina	<i>Staphylococcus</i> spp. metilino sensibles	Impidemen	<i>Streptococcus</i> sp. betahemolítico, <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
Ticarcilina	Eficaces contra la hidrólisis por betalactamasas producidas por enterobacterias y <i>P. aeruginosa</i>	Tetraciclina	Gram positivas y negativas, espiroquetas, micoplasmas, rickettsias y clamidias
Cefalosporinas	<i>Staphylococcus</i> spp. metilino sensibles, <i>S. pyogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	<i>Vancomicina</i> , <i>Tetraplanina</i>	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> (productores de penicilinas y metilino sensibles) y <i>S. epidermidis</i>
Ertapenem	<i>Staphylococcus</i> spp. metilino sensibles, <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> y <i>S. pneumoniae</i> sensible a penicilina	Gentamicina <i>Kanamicina</i> , <i>Streptomicina</i>	Activos sobre bacilos Gram negativos aeróbicos y <i>S. aureus</i>

Continuación

De la misma forma que los antibióticos bacterianos, los antimicrobicos tienen una selectividad para cierto tipo de patógenos, por lo cual su uso depende del tipo de enfermedad a tratar y del estado de salud del individuo. En la Tabla 8 se muestran algunos antimicrobicos y su efectividad contra los agentes patógenos más frecuentes.

Figura 1. Clasificación de los antimicrobicos. Tomado y modificado de Arenas (2003).





Los antimicrobianos normalmente atacan a los microorganismos patógenos produciéndoles daño en sus componentes celulares, principalmente en la membrana plasmática, haciendo que la célula colapse y muera. Tales afectaciones dependen del tipo de células, ya que las membranas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas se diferencian por sus constituyentes. Por

### 1.3 Mecanismos de acción de las moléculas antimicrobianas y antifúngicas

Dado que muchas moléculas antimicrobianas o antimicrobicas tienen efectos similares en algunos microorganismos, es importante conocer cual es su forma de absorción, dosis, interacción con otros antibióticos, contraindicaciones y resistencia antimicrobiana que le permitan a los médicos hacer elecciones basadas en estos criterios. Además es necesario comprender cuáles son los mecanismos de acción de estas moléculas y los efectos colaterales e interacciones entre ellos.

Tomado y modificado de Arenas (2003); Seija y Vignoli (2006).

Antimicrobico	Efectivo contra
Nistatina	<i>Candida</i> sp.
Antifúngica B	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Aspergillus</i> sp., etc. y mucorales
Griseofulvina	Infecciones por dermatofitos
Itraconazol	<i>C. immitis</i> y <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Fluconazol	<i>Cryptococcus neoformans</i> no meníngea, <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicales</i> , <i>C. parastitosis</i>
Voriconazol	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> y <i>Scedosporium apiospermum</i>
Caspofungina	<i>C. krusei</i> y <i>C. glabrata</i>
Amfotericina	<i>Rhizopus</i> sp. y <i>Rhizomucor</i> sp.
Terbinafina	<i>Microsporium</i> sp. y <i>Trichophyton tonsurans</i>
Imidazoles	<i>Tinea corporis</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> y <i>Epidermophyton floccosum</i>
Ketoconazol	<i>Pityrosporum ovale</i> , <i>Malassezia furfur</i> y <i>P. orbicularis</i>

Tabla 8. Espectro de acción de los antimicrobicos.

ejemplo, los antibióticos llamados betalactámicos como las penicilinas se unen covalentemente a las proteínas fijadoras de penicilinas disminuyendo la síntesis de peptidoglicano, deteniendo el crecimiento celular del agente infeccioso y generando la lisis del mismo. Las cetalosporinas actúan de forma similar a los betalactámicos. Los aminoglucósidos actúan sobre los ribosomas, pero para ser posible esto, se debe generar un poro en la pared bacteriana y como consecuencia el antibiótico puede penetrar la célula fijándose en los ribosomas e impidiendo la síntesis proteica. Por otro lado, los glucopéptidos se unen a los precursores del peptidoglicano inhibiendo su síntesis y ensamblaje, lesionando los protoplastos al alterar la permeabilidad de la membrana, aunado a que pueden afectar la síntesis de RNA. El grupo de los ketólidos inhiben la síntesis proteica al unirse a una subunidad ribosomal y también afecta al ensamblaje de unidades de ribosomas. Los macrólidos inhiben la síntesis proteica, uniéndose a la subunidad ribosomal y bloqueando la reacción de translocación y/o transpeptidación. Las rifamicinas inhiben la RNA polimerasa bacteriana, las sulfonamidas interfieren con el metabolismo del ácido fólico y originan la disminución de ácidos nucleicos. El grupo de las quinolonas inhiben la enzima DNA-girasa generando un corte de DNA que no puede ser reparado e impiden la replicación del DNA. Las tetraciclinas se unen a la subunidad de los ribosomas 30S impidiendo que se agreguen nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica (OPS 2004).

El mecanismo de acción de los antimicrobicos es diferente al de los antibióticos, ello debido a la constitución celular de los hongos, caracterizados por la presencia de ergosterol y no de colesterol, así como la producción de quitina y  $\beta$ -glicanos como parte su estructura celular, aunado a los procesos de división celular (OPS 2004). Algunos antimicrobicos como la nistatina inhiben la respiración celular e inactivan el metabolismo del fósforo inorgánico y causan alteraciones secundarias la membrana fungica. La griseofulvina interrumpe la formación de microtubulos del huso mitótico produciendo alteraciones de la mitosis en la metafase (Fitzpatrick 2009). Algunos polienos afectan la molécula de ergosterol de las membranas fungicas. Los imidazoles y triazoles afectan el metabolismo del ergosterol; algunos antimicrobicos como las neomocandinas son capaces de inhibir la síntesis de  $\beta$ -glicanos y quitina (OPS 2004). Aunque los mecanismos de acción de las moléculas antimicrobianas o antifúngicas

son efectivos, los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos de resistencia, haciendo que su efectividad se reduzca.

#### 1.4 Resistencia microbiana

##### 1.4.1 Costos generados en la salud pública por la resistencia microbiana

Los antibióticos desde su descubrimiento se han utilizado para tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales, sin embargo, su uso indiscriminado ha puesto en riesgo su efectividad. La susceptibilidad disminuida o nula de un microorganismo a determinado antibiótico es llamada resistencia microbiana y aunque constituye un fenómeno biológico natural, representa una amenaza para el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus.

En contraste con la poca efectividad de algunos antibióticos para tratar las enfermedades, esta la derrama económica que genera la venta de estos fármacos, siendo los medicamentos más vendidos y consumidos en México con un mercado de 960 millones de dólares y el segundo lugar en ventas anuales en las farmacias privadas del país (14.3%), por debajo de países como Estados Unidos, Argentina, Brasil, Chile y España (Dreser y cols. 2008). Aunque la venta de fármacos pudiera representar un negocio profliguo para algunas instituciones e industrias, el incremento de cepas resistentes representa un alto costo económico para los gobiernos, en primera instancia porque los medicamentos prescritos ya no resultan efectivos para combatir la enfermedad y es necesario incrementar los tratamientos y tiempos de hospitalización y en segunda instancia porque se incrementa el número de defunciones.

El impacto económico debido a la resistencia microbiana no se ha estudiado a profundidad, sin embargo, se cuentan con algunas estimaciones, por ejemplo, en los Estados Unidos el Centro de Control de Enfermedades estimó que las enfermedades asociadas a la resistencia microbiana suman entre 4,000 y 5,000 millones de dólares a los costos de salud (Ibarra y cols. 2009). En

México se ha reportado que la prescripción injustificada y el uso inapropiado de los antibióticos en enfermedades respiratorias agudas (IRAS) e infecciones gastrointestinales diarreicas agudas (EDAS) representó el 11 % del gasto anual en medicamentos en una institución de salud, aunada a que la mala prescripción genera un costo adicional a los pacientes de 3.57 a 8.37 dólares, para las IRAS y EDAS, respectivamente (Dreser y cols. 2008).

Los datos anteriores indican que la resistencia microbiana se ha potencializado por malas prácticas de los médicos con su prescripción, de los dispensadores de los medicamentos con la venta indiscriminada, de los pacientes por automedicarse e incumplir el tratamiento terapéutico, por la administración sanitaria la cual no cuenta con una política de gestión del uso adecuado de los antibióticos y por las industrias farmacéuticas, químicas y agroalimentarias quienes promueven y los usan inadecuadamente.

La resistencia microbiana es un proceso natural por el cual los patógenos se adaptan a las condiciones adversas de su entorno, sin embargo, esta se puede prevenir si se tiene un uso adecuado de los antibióticos, por ello la Organización Mundial de la Salud (2005) lanzó un plan de acción mundial sobre la resistencia microbiana con cinco objetivos estratégicos: 1) mejorar la concientización y la comprensión con respecto a la resistencia microbiana; 2) reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación; 3) reducir la incidencia de las infecciones; 4) utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos; y 5) asegurar una inversión sostenible para combatir la resistencia a los microbiana.

La aplicación de medidas preventivas, no siempre resulta efectiva y aunque la medicina cree que eliminando la causa podrá ser imposible la enfermedad, la enfermedad es tan flexible que puede buscar y hallar nuevas causas para seguir manifestándose (Dethlefsen y Dahlike 2000), esto sugiere que los microorganismos pueden adaptarse en poco tiempo a las condiciones ambientales y fisiológicas, lo que probablemente se deba a la capacidad de cambiar su estructura y expresión celular y con ello resistir a los antibióticos, estas modificaciones constituyen los llamados mecanismos de resistencia microbiana.

El mal uso de los antibióticos ha generado microorganismos llamados: a) multiresistentes, b) de resistencia extrema y c) con resistencia a todos los antibióticos. Los primeros de ellos se caracterizan por no tener sensibilidad al menos a un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos, los segundos por carecer de sensibilidad al menos a un agente en todas las categorías de antimicrobianos, excepto en dos de ellas o menos y los últimos presentan resistencia a todas las categorías de antibióticos (Magiorakos y cols. 2012). Esta resistencia, no ha sido un evento azaroso sino el resultado de múltiples interacciones y modificaciones en los constituyentes celulares y expresión de genes, la cual se ve favorecida por las condiciones ambientales, tales como el pH, altas concentraciones de cationes o alteraciones microbianas naturales o adquiridas como mutaciones cromosómicas o fenómenos de transferencia genética mediados por transposones o plásmidos (Pastor-Sánchez 2006), todas ellas dando como resultado cambios en la membranas celulares o en la modificación de los sitios blanco.

Es importante mencionar, que los mecanismos de resistencia son muy variados y dependen del tipo de microorganismo y del antibiótico suministrado, por ejemplo, bacterias como *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *P. mirabilis*, etc. han adquirido resistencia a los antibióticos betalactámicos por medio de varios mecanismos, entre ellos, por la disminución de afinidad entre las proteínas fijadoras de penicilina (PFP) y el antibiótico, por la secreción de betalactamasas, por la disminución en la permeabilidad de la membrana externa y por modificaciones en las porinas. El grupo de antibióticos llamado catálopsorinas, no son efectivas para *L. monocytogenes*, *Legionella* sp., *Clostridium difficile*, *P. putida*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis* meticilino resistente, entre otras, esto debido a que tienen la capacidad de producir betalactamasas y lograr la inactivación de antibióticos en el espacio periplasmático. Bacterias como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. y *Streptococcus* sp. son resistentes a los carbapenems por la producción de betalactamasas, la ineffectividad en el transporte del antibiótico, por los defectos causados en la permeabilidad de la pared, por limitar la producción de proteínas de membrana externa y por generar alteraciones

en el sitio blanco. Por otro lado, los microorganismos resistentes a los glucopéptidos generan compuestos que se unen a precursores de la síntesis del peptidoglicano impidiendo la síntesis y ensamblaje del mismo, aunado a que lesionan los protoplastos. Microorganismos como *E. faecium* y *S. aureus* resistente a metilina bloquean a los antibióticos llamados ketólidos por que causan modificaciones en el RNA ribosomal. Bacterias como *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *C. diptheriae*, *B. fragilis*, *C. perfringens* y especies de *Listeria* y *Legionella* impiden que los antibióticos llamados macrólidos actúen por la disminución en la permeabilidad de la pared celular, por la alteración en el blanco ribosomal y la hidrólisis del antibiótico. Otro ejemplo de los mecanismos de acción es la resistencia encontrada en *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. jejuni* hacia las quinolonas, debido a que se generan mutaciones cromosómicas en la DNA-girasa, aunado a la alteración de las porinas y la expulsión del medicamento de la célula. Los microorganismos resistentes a las sulfonamidas se caracterizan por producir la enzima dihidropteroato sintetasa la cual impide la unión del antibiótico, además limita la producción de ácidos nucleicos. Por último, los mecanismos de resistencia de las tetraciclinas involucran la disminución en la permeabilidad de las membranas de la célula (OPS 2004).

Los mecanismos antes descritos se han podido dilucidar gracias a la investigación científica y por ello se ha informado a las instituciones gubernamentales del riesgo que se genera con una prescripción inadecuada de los antibióticos, aunado a que se ha puesto en alerta a las instituciones de salud sobre ciertos grupos de microorganismos que han adquirido resistencia y que deben de ser monitoreados frecuentemente.

#### 1.4.3 Microorganismos resistentes

La Organización Mundial de la Salud (2004), en su informe llamado *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, menciona que siete son los microorganismos en donde se centra la atención de la resistencia microbiana: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* no tifoidea, especies de *Shigella* y *N. gonorrhoeae*, los cuales son asociados con diarreas.

neumonías, infecciones urinarias, septicemia y gonorrea. En la Tabla 9 se indica el tipo de resistencia de cada uno de ellos.

Tabla 9. Microorganismos resistentes a los antibióticos.

Microorganismo	Antibiótico al cual ha adquirido resistencia	Enfermedad causante
<i>Escherichia coli</i>	Cefalosporinas de 3ra generación y fluorquinolonas	Infecciones del tracto urinario e infecciones del torrente sanguíneo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cefalosporinas de 3ra generación y carbapenems	Neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones del torrente sanguíneo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina	Infecciones en heridas e infecciones del torrente sanguíneo
<i>Salmonella</i> no tifoidea	Fluoroquinolonas	Diarrea transmitida por alimentos e infecciones del torrente sanguíneo
Especies de <i>Shigella</i>	Fluoroquinolonas	Diarrea y disentería
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	Cefalosporinas de 3ra generación	Gonorrea
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina	Neumonía, meningitis y otitis

La Organización Mundial de la Salud, menciona que en América hay una grave resistencia generada por *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y las fluoroquinolonas y en algunas partes el 90 % de las infecciones causadas por *S. aureus* son resistentes a meticilina. En México, desde la década de los noventas se han detectado microorganismos resistentes a antibióticos, tal como lo compilaron Rodríguez-Noriega y cols. (2014), quienes reportaron que 91.7 % del total de cepas de *S. typhi* es resistente a cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina y a las sulfas. En 1987 la bacteria *E. coli* enterotoxigénica fue reportada como resistente a ampicilina, tetraciclina, estreptomina y kanamicina. En 1998 se indicó que *S. pneumoniae* es resistente a las penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina. Así mismo en el periodo de 1960-1980 se describió la sensibilidad de *Shigella* spp. a los antibióticos. De igual forma, en 2007 fue descrita

la resistencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* a la ampicilina y se reportó una disminución en la efectividad de la furazolidona. Entre 2007 y 2009 se descubrió la producción de betalactamasas del tipo AmpC por *S. typhimurium* y en 2011 *H. pylori* fue reportada como resistente a claritromicina. La producción de metalobetalactamasas fue reportada en 1986 en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multiresistente. Aunado a esto, la resistencia bacteriana a los antibióticos mediada por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ha sido reportada en *E. coli* (2000), *K. pneumoniae* (2001) y *E. cloacae* (2009). Mención especial merecen las bacterias del género *Staphylococcus*, ya que son responsables de un gran porcentaje de las infecciones nosocomiales y las cuales se ha reportado que son resistentes a la metilicina, así como algunas cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a gentamicina.

El uso inapropiado de los antibióticos, como se ha mencionado anteriormente, es la principal causa de la resistencia antimicrobiana (Tabla 10) y con escasas excepciones se asume que una vez que el antibiótico se ha introducido en el mercado, la aparición de estirpes resistentes es solo cuestión de tiempo (Pastor-Sánchez 2006), tal como lo deja ver la Secretaría de Salud Pública (2005) quien reportó los niveles de uso de los antibióticos y la resistencia microbiana generados en el periodo de 1994-1995 en 6 hospitales de México encontrando una alta resistencia a los antibióticos frecuentemente usados (Benavides-Plascencia y cols. 2005).

Tabla 10. Frecuencia de consumo de los antibióticos y resistencia antimicrobiana.

Nivel de consumo	Tipo de antibiótico	No. de cepas resistentes
Bajo	Tetraciclinas Monobactámicos Anticólicos Carbapenems Glucopéptidos	1 7 4 12 1
Medio	Macrólidos Nitrofuranos Quinolonas Lincosamidas Sulfonamidas	10 1 51 8 20
Alto	Aminoglucósidos Betalactámicos Cefalosporinas	56 131 117



Los compuestos antimicrobianos y antifúngicos producidos por vía biotecnológica pueden ser obtenidos de bacterias, hongos, insectos, plantas y mamíferos; sin embargo, los antibióticos actualmente comercializados solo provienen de bacterias y hongos. Estas moléculas pueden ser sintetizadas por los microorganismos de forma natural (sin modificación genética alguna) o por medio de modificaciones genéticas hechas para incrementar su rendimiento. Del total de antibióticos producidos por microorganismos el 14 % lo producen las bacterias, el 22 % los hongos y el 64 % los actinomicetos. Aunado a esto, más de la mitad de los antibióticos comerciales obtenidos vía biotecnológica son producidos por unas cuantas especies de

Las moléculas con actividad antimicrobiana o antifúngica pueden ser obtenidas de tres formas diferentes; ya sea por la síntesis química, por producción biológica o una mezcla de ambas, llamándose antibióticos sintéticos, biológicos o naturales y semi-sintéticos, respectivamente. Cada uno de ellos tiene ventajas sobre el otro relacionadas con el espectro antimicrobiano, efectividad, costos de producción, estabilidad del antibiótico, biodisponibilidad, etc. En los siguientes apartados se hablará de los antibióticos biológicos.

### 1.5 Obtención y purificación de los antibióticos

Debido a la problemática planteada anteriormente, los científicos se han dado a la tarea de buscar nuevos compuestos que presenten acción antagonista contra los patógenos, sin embargo, para ser posible esto, es necesario comprender los procesos de producción y purificación de estas moléculas.

El desecho inapropiado de los antibióticos y materiales que están en contacto directo con ellos, además de generar problemas de salud, ha perjudicado al ecosistema, ocasionando problemas de contaminación y un ciclo de transmisión de los vectores que confieren resistencia ya que estos son depositados en los mantos acuíferos, suelo y alimentos, hasta que llegan nuevamente al humano y animales, acarreado los genes de resistencia por el mecanismo de transferencia horizontal de genes (Xu y cols. 2015).

La obtención de los antibióticos naturales se basa en los sistemas de producción industrial establecidos por las empresas farmacéuticas, siendo la fermentación el principal método utilizado debido a que pueden controlarse fácilmente las condiciones ambientales como el pH, temperatura, la oxigenación, agitación, entre otros, y por facilitar la purificación de los mismos. De forma general, los procesos de obtención y purificación de los antibióticos comerciales siguen metodologías similares, comenzando con el crecimiento del microorganismo en un cultivo líquido enriquecido que favorezca la producción del antibiótico, seguida por la eliminación de la biomasa del medio de cultivo o la ruptura de células para lograr la liberación del antibiótico y finalmente la extracción del mismo con solventes de diferentes polaridades para lograr su cristalización y total purificación. A continuación se describen algunos procesos de obtención de antibióticos.

El género *Streptomyces* es considerado uno de los mayores productores de antibióticos comerciales, entre los cuales se encuentra la anfotericina B, la nistatina, el cloranfenicol, la tetraciclina, la estreptomina y la neomicina y la carbomicina producidos por *S. nodosus*, *S. novessii*, *S. venezuelae*, *S. aureofaciens*, *S. griseus*, *S. fradiae* y *S. halstedii*, respectivamente. (Stanier y Villanueva 1996; Tortora y cols. 2007).

microorganismos, entre ellos *Penicillium* sp., *Bacillus* sp., *Cephalosporium* sp. y *Streptomyces* sp., sin embargo, esto no significa que sean los únicos microorganismos productores de antibióticos, sino que son los únicos que están disponibles comercialmente. Algunos ejemplos representativos de los antibióticos producidos por microorganismos son: la penicilina, el primer antibiótico descubierto y aislado del hongo *P. notatum*, la griseofluvina producida por el hongo *P. griseofulvum*, la cefalotina, aislada de *Cephalosporium* sp. La bacitracina y la polimixina G, clasificados como antibióticos polipeptídicos y producidos por los bacilos Gram positivos *B. subtilis* y *B. polymyxa*, respectivamente. La gentamicina obtenida un actinomiceto llamado *Micromonospora purpurea*.

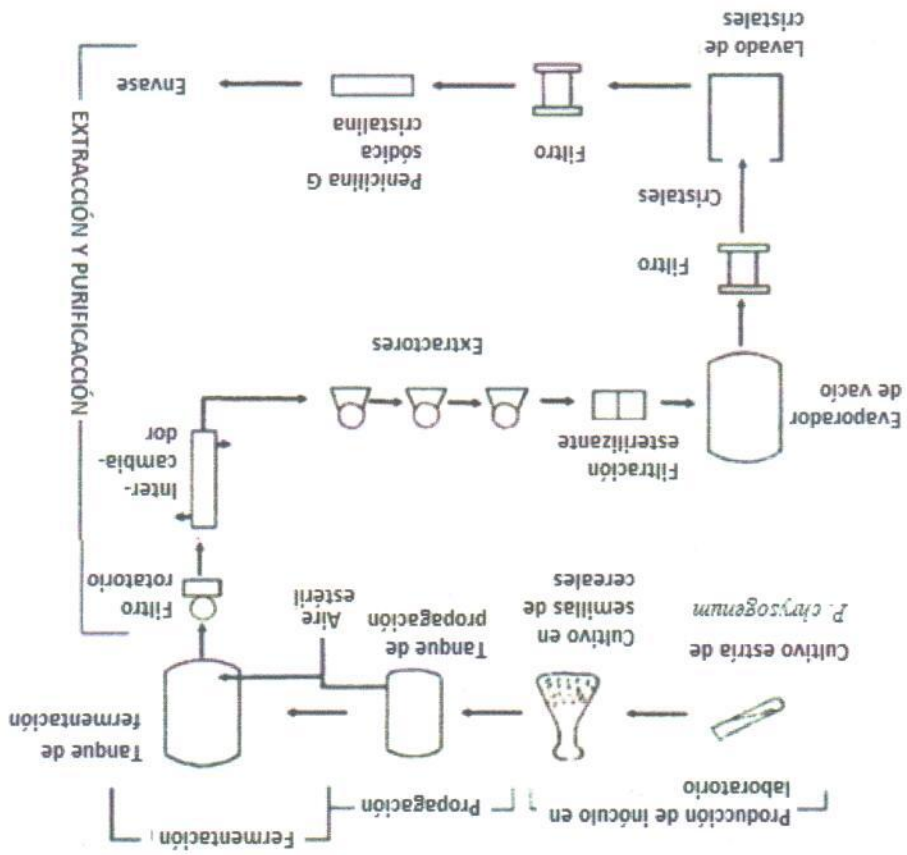
### 1.5.1 Producción de penicilina

La producción de penicilina usando *P. chrysogenum* comienza con la propagación de la cepa en laboratorio, para asegurar que las características morfológicas, fisiológicas y genéticas del microorganismo sean las adecuadas y garantizar la obtención del antibiótico. Enseguida, se realiza la preparación de cultivos semilla que servirán para inocular un biorreactor o tanque de fermentación donde es regulado el pH, temperatura, agitación, cantidad de oxígeno, etc. Una vez alcanzada la máxima concentración de antibiótico, las células son filtradas con ayuda de vacío, obteniéndose un sobrenadante líquido y el cual contiene la penicilina. Este líquido debe de enfriarse y ponerse en contacto con solventes como el ácido fosfórico, acetato de amilo, acetato de butilo e isobutilcetona, hasta obtener una solución concentrada del antibiótico, que se debe de esterilizar por filtración para posteriormente evaporar el agua mediante vacío hasta que se cristalice el antibiótico. Las impurezas de estos cristales son eliminadas y el antibiótico es secado en una cámara al vacío para finalmente envasarlo (Freyre 1997). En la Figura 2 se observa el diagrama de flujo de este proceso.

La obtención de tetraciclina por *S. aureofaciens* (Figura 3), se realiza en biorreactores de aproximadamente 24,700 l con un inóculo y con medio de cultivo líquido adecuado para obtener el antibiótico deseado, la fermentación se termina cuando se encuentra la máxima producción del mismo. Hecho esto se acidifica el sobrenadante con ácido clorhídrico y se adiciona sulfato de sodio a fin de evitar la degradación del compuesto de interés para posteriormente filtrarlo y retirar el micelio del microorganismo, este procedimiento es repetido varias veces a fin de extraer los residuos del antibiótico del filtrado. A continuación, el antibiótico es precipitado por la adición de hidróxido de sodio, el cual debe ser agitado

1.5.2 Producción de tetraciclina

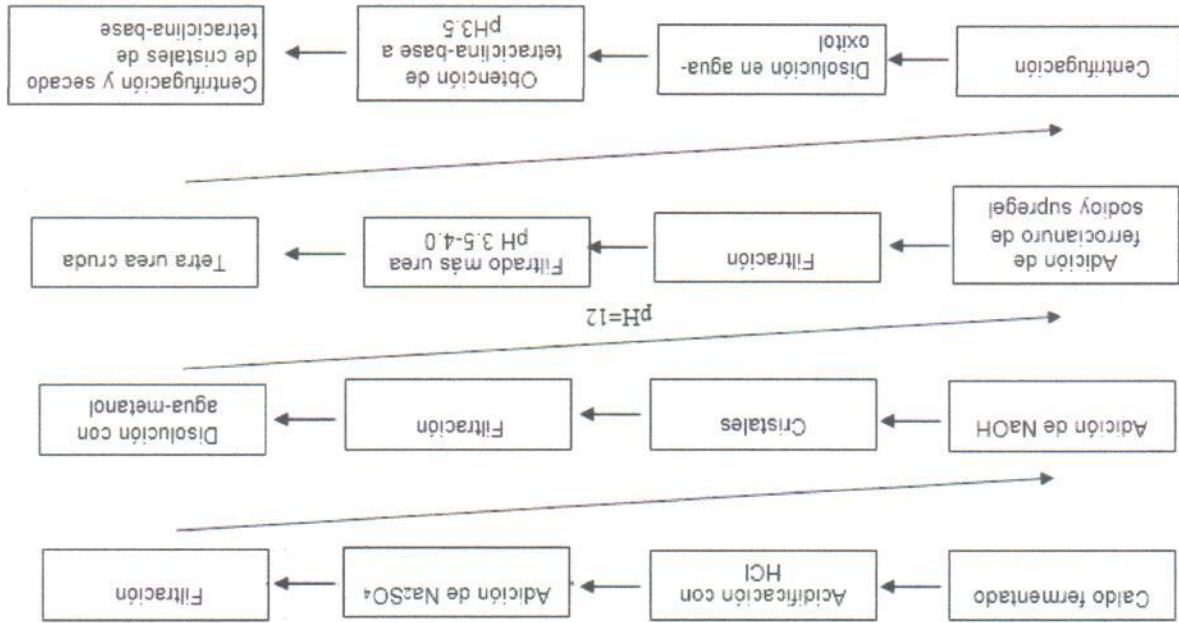
Figura 2. Producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*. Tomado de Freyre (1997).



La producción de nistatina comienza con la fermentación en medio líquido del microorganismo *S. noursei* (Figura 4). Una vez alcanzada la máxima producción de antibiótico, el microorganismo es retirado del líquido de la fermentación para posteriormente recuperar el antibiótico agregando algún alcohol alifático inferior, por ejemplo

1.5.3 Producción de nistatina

Figura 3. Producción de tetraciclina por *Streptomyces aureofaciens*. Tomado de Canale-Guerrero y cols. (2012).



cols. 2012).

constantemente para provocar la formación de cristales y posteriormente se agrega dicalite®, se filtra y se desecha el sobrenadante, reservando el filtrado al cual se le agrega una mezcla de agua-metanol, hecho esto, se integra el ferrocianuro de sodio y sulfato de calcio para hacer que las impurezas se precipiten, se filtra y se agrega urea recuperándose los cristales formados, los cuales son centrifugados y secados para finalmente envasar el antibiótico (Canale-Guerrero y

acetona, etc. Hecho esto, se centrifuga al vacío para eliminar el solvente y se resuspende en butanol y cloruro de sodio, esta suspensión se separa por centrifugación y filtración en tres partes, descartando la fase acuosa inferior y la fase superior del butanol. La interfaz de estas dos fracciones es lavada y disuelta en metanol, se agrega acetato de etilo para precipitar la fase, finalmente la nistatina es secada y obtenida de forma pura (Hazen y Brown 1957).

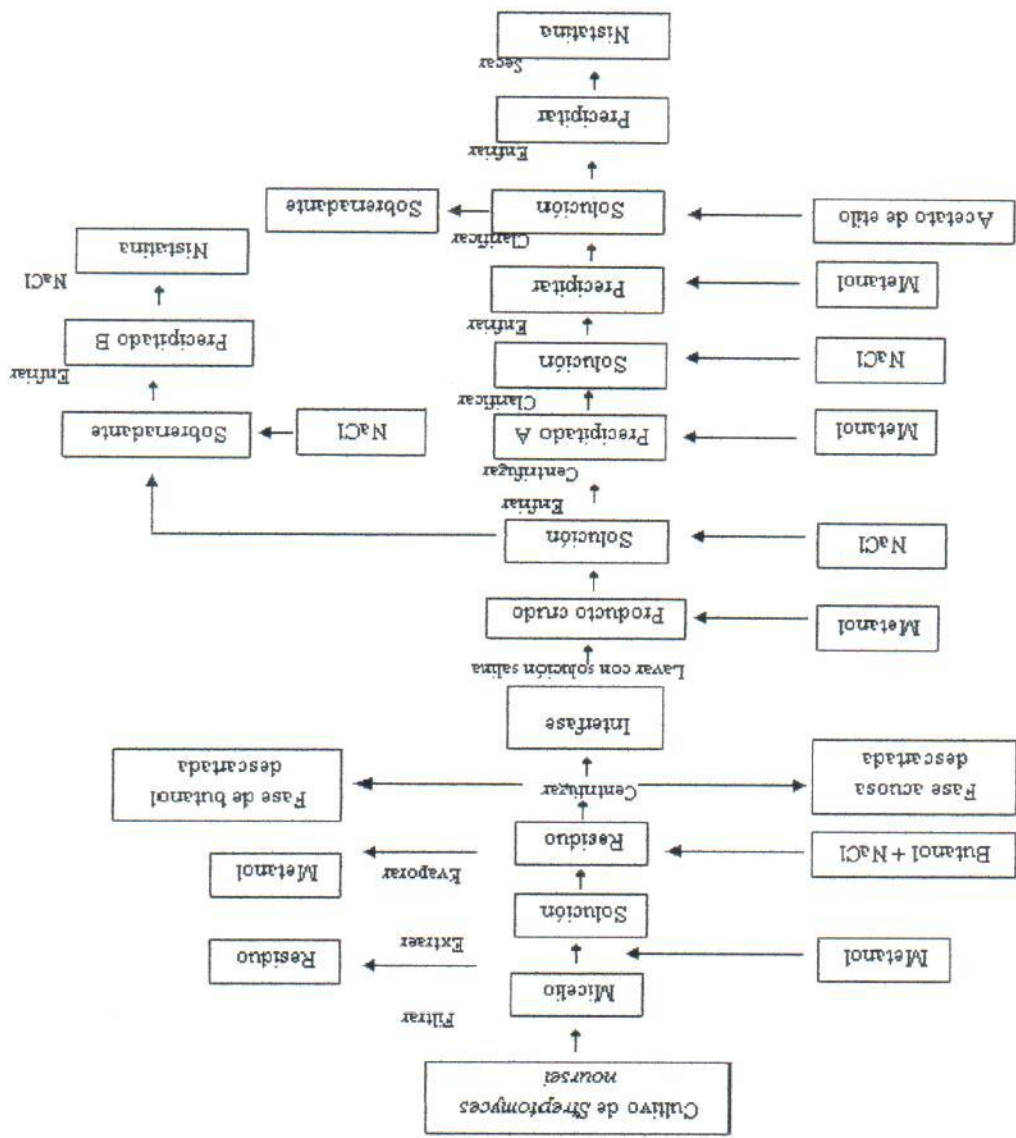


Figura 4. Producción de nistatina por *Streptomyces noursei*. Tomado de Hazen y Brown (1957).

Las nuevas moléculas reportadas con actividad antimicrobiana no han sido clasificadas y agrupadas formalmente como se ha hecho con los antibióticos comerciales, sin embargo existen varias clases, tales como los péptidos antimicrobianos, polisacáridos, alcaloides, esteroides, taninos, terpenos, flavonoides, fenoles y quinonas. En esta sección definiremos a los péptidos antimicrobianos entre los cuales se encuentran gran número de moléculas antimicrobianas tales como las defensinas y las bacteriocinas.

#### 1.6.1 Tipos de moléculas con actividad antimicrobiana

Dada la gran diversidad de organismos encontrados en el planeta y al interés científico por conocer su biología, metabolismo y organización, se ha podido evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos que producen y en algunos casos dilucidar el tipo de compuestos que le confiere tal actividad, pudiendo ser una alternativa futura para sustituir o complementar los tratamientos terapéuticos.

#### 1.6 Organismos productores de moléculas con actividad antimicrobiana

Los antibióticos obtenidos por la vía biotecnológica, aunque existen muchos, no todos son usados en las prácticas clínicas ni producidos por las industrias farmacéuticas, esto debido a los altos costos que genera la puesta en marcha del sistema productivo y los costos generados por las pruebas clínicas que deben realizarse al antibiótico para ser validado y aprobado por las instituciones gubernamentales y de salud, sin embargo, este panorama ha ido cambiando en los últimos años debido a la resistencia microbiana y la ineficacia de algunos antibióticos, por lo cual, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana o antifúngica pueden ser una alternativa para solucionar los problemas de salud pública y reducir los costos que el gobierno debe pagar por la prescripción de antibióticos ineficaces por parte de las instituciones de salud.

Los péptidos antimicrobianos son moléculas formadas por 15-30 aminoácidos, caracterizados por poseer un peso molecular que no sobrepasa los 10 kDa y marcos de lecturas de 100-200 pares de bases, tienen una carga neta positiva y son termoestables (Tossi y Sandri 2002; Yan y cols. 2011; Zhang y cols. 2011). Se han descrito cerca de 800 diferentes tipos de péptidos antimicrobianos y estos han sido agrupados en dos clases: los no ribosomales y los ribosomales. La diferencia entre una y otra categoría se fundamenta en cómo es sintetizado el péptido, estando en la primera clasificación, moléculas que no son producidas en el ribosoma o que han sufrido alguna modificación posttranslacional después de ser sintetizadas en los ribosomas, tal como las proteínas, aminoglúcidos, péptidos, entre otras. La segunda clasificación se refiere a moléculas sintetizadas en los ribosomas y que comprenden propiamente los péptidos antimicrobianos ribosomales. Otra clasificación dada a estos péptidos ha sido con base en su estructura, composición de aminoácidos y tamaño, clasificándolos como péptidos antimicrobianos: a)  $\alpha$ -hélice, b) ricos en sistema, c) hoja beta plegada, d) ricos en un aminoácido en particular e) y péptidos con algún aminoácido no convencional (Reddy y cols. 2004).

Las moléculas antimicrobianas no ribosomales generalmente son producidas por bacterias y hongos con ayuda de complejos multi-enzimáticos que polimerizan la secuencia peptídica por glicosilación, metilación, acilación o formación de un anillo heterocíclico, llegando a agregar hasta 300 diferentes residuos (Stein y cols. 1996; Hancock y Chapple 1999). Por otro lado, los péptidos antimicrobianos ribosomales son producidos por una amplia gama de organismos entre ellos mamíferos, anfibios, insectos, bacterias, hongos y virus. Estos péptidos, son reconocidos como moléculas importantes de inmunidad innata y presentan variación en su secuencia de un organismo a otro, debido a que han evolucionado para eliminar microorganismos locales específicos (Hancock y cols. 1995).



Entre los péptidos antimicrobianos descubiertos destacan las bacteriocinas y las defensinas. Las bacteriocinas son péptidos ribosomales, producidas generalmente por bacterias ácido lácticas y algunas de ellas han sido usadas como bioconservadores de los alimentos debido al estatus otorgado a los microorganismos de donde provienen (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, entre otros), que los identifica como seguros e inocuos (GRAS). Se caracterizan por resistir pH bajos, resistentes a la acción de algunas enzimas y son estables en los alimentos (Tonarelli y Simonetta 2014).

Por otra parte, las defensinas son moléculas abundantes en células y tejidos que participan en la defensa del hospedero contra infecciones microbianas. Estas moléculas normalmente son de naturaleza catiónica y ricas en argininas, con 29-42 aminoácidos y pesos moleculares de 3.5-4.5 kDa y han sido clasificadas con base a la posición de los puentes disulfuro que forman como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$  (Rivas-Santiago y cols. 2006; Rivera y cols. 2007).

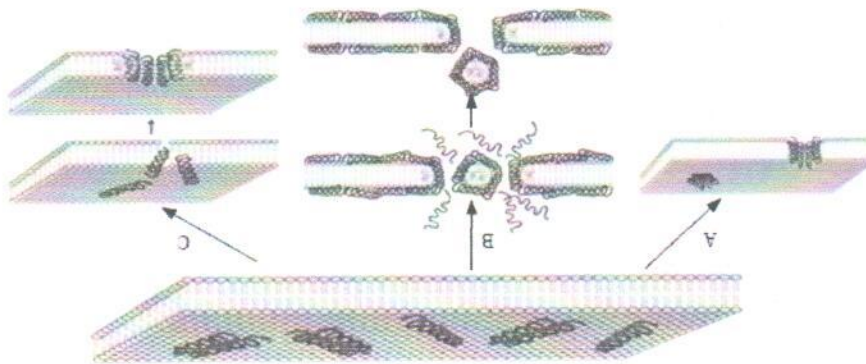
Dada la naturaleza catiónica de los péptidos antimicrobianos, estos pueden interaccionar con la membrana externa del microorganismo blanco o generar grietas a través de las cuales el péptido puede cruzar la membrana y con ello causar daño a la célula. Aunado a esto, también se pueden asociar a sitios de unión de cationes y romper la membrana celular y una vez que el péptido ha cruzado la membrana celular se une a la membrana plasmática formando canales para la circulación de iones y moléculas solubles en agua causando daño al microorganismo (Dathe y Wieprecht 1999; Wu y cols. 1999) En general, el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos ha sido agrupado en tres modelos descritos en la Figura 5. El modelo tapón de barril, donde los péptidos generan un poro en la membrana celular con un lumen central que asemeja un tapón compuesto por péptidos helicoidales, otro modelo es el llamado hoyo de porilla, nombrado así por la analogía del daño que genera una porilla en una alfombra, en este caso, existe un acumulamiento de los péptidos en la membrana celular donde se orientan paralelamente, actuando como detergentes y logrando romper la membrana por la formación de micelas; el tercer modelo es el llamado poro toroidal, donde los péptidos se agregan e inducen a la monocapa de lípidos a plegarse sobre sí misma formando un poro (Castañeda-Casimiro y cols. 2009).

Las moléculas antimicrobianas sintetizadas por los mamíferos generalmente son utilizadas por ellos mismos como una primera forma de protección contra el ataque de patógenos, representando una defensa innata para estos. Estas moléculas generalmente son de naturaleza peptídica y son sintetizadas por aquellas células u órganos que estén expuestos a ataques microbianos, tales como los queratinocitos, células epiteliales del tracto respiratorio, del tracto genitourinario, células de Paneth del intestino delgado, neutrófilos y células asesinas naturales o natural killer, en células cebadas y en glándulas endocrinas (Castañeda-Casimiro y cols. 2009). La importancia de estas moléculas radica en que han demostrado ser capaces de atacar a los microorganismos de interés para la salud pública, tales como *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, entre otros. En la Tabla 11 se puede observar algunas moléculas de carácter peptídico que corresponden a defensas y las cuales han sido extraídas de células de bovino, vaca, ratón y humano.

#### 1.6.2 Moléculas producidas por mamíferos

Dada la gran diversidad de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana, ha resultado difícil su clasificación, por lo cual a continuación se mencionan algunas de ellas según los organismos que las producen.

**Figura 5.** Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos. A) Modelo tapón de barril, B) hoyo de polilla y C) toroidal. Tomado de Yan y cols. (2011).



La actividad antimicrobiana de las moléculas aisladas de los organismos marinos es evidente debido a la diversidad de patógenos que podrían afectar su integridad y salud. Tal actividad es encontrada regularmente en los invertebrados como las esponjas, celenterados y equinodermos (Marquez y cols. 2009). Ejemplo de ello son el crustáceo *Scylla paramamosain* y el camarón *Penaeus chinensis* los cuales producen el péptido llamado crustin. En el ostión *Crassostrea gigas* se ha identificado una defensiva con actividad antimicrobiana. En algunos peces como *Paralichthys olivaceus* se ha encontrado un péptido llamado hepcidina (Parachin y

Gracias al desarrollo tecnológico y conocimiento sobre la vida marina, se han podido estudiar los seres que habitan los océanos y mantos acuíferos, resultado de ello, se ha descubierto un gran número de especies no descritas anteriormente y moléculas que no se encuentran presentes en los organismos terrestres, tales como las plantas, insectos o animales.

### 1.6.3 Moléculas producidas por especies marinas

Tipo de célula, órgano o tejido	Mamífero	Tipos de molécula	Actividad antimicrobiana reportada
Células mieloides	Bovino	Péptido: Catelicidina	<i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>E. coli</i> ML35, <i>E. coli</i> D21, <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>S. marcescens</i> ATCC 8100, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> Cowan 1, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, <i>B. megaterium</i> Bm11, <i>C. albicans</i> y <i>C. neoformans</i>
Granulocitos de sangre	Vaca lechera	Proteína enlazada a un oligosacárido	<i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>S. typhimurium</i>
Intestino delgado	Ratón	Defensinas	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> mutante sensible a defensinas
Hígado	Hombre	Hepcidina	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>Streptococcus</i> del grupo B.

Tomado y modificado de Marquez y cols. (2009).

Tabla 11. Moléculas antimicrobianas producidas por mamíferos.

cols. 2012). En la Tabla 12 se describen algunos organismos marinos productores de compuestos antimicrobianos.

Tabla 12. Moléculas antimicrobianas producidas por especies marinas.

Especie marina	Nombre común	Actividad antimicrobiana reportada	Tipo de molécula
<i>Asterias Rubens</i>	Estrella de mar	Antibacterial	ND
<i>Axinella corrugata</i>	España	Antibacterial	ND
<i>Cynthia savignyi</i>	Tunicado	<i>Borytis cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Verticillium albo atrum</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Estero: 5,8- $\alpha$ -epidioxi-5 $\alpha$ -colest-6-en-3 $\beta$ -ol
<i>Didiscus oxeata</i>	España	<i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>S. aureus</i> resistente a metilina	Péptido: Curcutenol
<i>Gadus morhua</i>	Pez	<i>C. brusei</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>I. orientalis</i>	ND
<i>Meretriz petechialis</i>	Almeja	Inhibición del VIH	Polisacárido sulfatado: $\beta$ -glucano sulfatado
<i>Penaus vannamei</i>	Crustáceo	<i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> 363, <i>N. crassa</i> , y <i>F. oxysporum</i>	Péptido: Penaedina-3
<i>Plocamium hamatum</i>	Alga	<i>M. tuberculosis</i>	Monoterpenos
<i>Polycitor</i> sp.	Ascidia	Inhibición <i>in vitro</i> contra retrovirus	Alcaloide: Policetona A
<i>Solea solea</i>	Pez	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , etc.	ND

ND: No determinado. Tomado y modificado de Márquez y cols. (2009).

#### 1.6.4 Moléculas producidas por plantas

Desde hace siglos, las plantas han sido utilizadas por las poblaciones como parte de su medicina tradicional, atribuyéndoles efectos beneficios por su consumo, tal como la cura de trastornos gastrointestinales, enfermedades respiratorias, cura de infecciones en las vías urinarias e infecciones cutáneas (Brantner A y Grein 1994). Estos efectos se deben a que las plantas son

ricas en gran variedad de metabolitos secundarios, entre ellos, los taninos, terpenos, alcaloides, flavonoides, fenoles, quinonas y péptidos (Gupta y cols. 2016). Dada las propiedades que presentan, la Organización Mundial de la Salud ha anunciado que las plantas son una fuente rica de múltiples drogas y ha aprobado el uso de estas medicinas tradicionales para curar enfermedades microbianas y no microbianas (OMS 1978). Aunado a esto, aproximadamente el 20 % de las plantas que se encuentran en el mundo se han estudiado y comprobado que tienen aplicación farmacéutica o biológica, por lo que se han considerado como potenciales para la producción de nuevos antibióticos.

La forma de obtener los metabolitos antimicrobianos de las plantas consiste en realizar una extracción de las hojas, tallos, frutos, troncos o raíces con solventes de diferentes polaridades para la posterior evaluación de su actividad antimicrobiana, tal y como se ha demostrado con los árboles *Torreya grandis*, *Euphorbia hirta*, *Persoonia longifolia* y *Terminalia arjuna* donde se elaboraron extractos con agua, etanol, metanol y éter de petróleo y se encontró actividad contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *P. acnes* y *S. aureus* (Gupta y cols. 2016). En algunos aceites esenciales obtenidos de las plantas *Thymus zygis*, *T. vulgaris* y *T. hymnalis* se ha reportado la actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, entre otros (Rota y cols. 2008), aunado a que en los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Laurus nobilis*, *Psidium arguta*, *Piper betle*, *Pimenta dioica*, *Psidium terebinthina*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Schinus terebinthifolius* se ha reportado la actividad contra *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. aureus* resistente a meticilina (Aunmeeruddy-Elalfi y cols. 2015). En otras plantas como *Hypoxis hemerocallidea*, *Tulbaghia violacea*, *L. dysophylla*, *Bulbine frutescens* se ha encontrado que tienen actividad contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis* (Netshiluvhi y Eloff 2016).

Las plantas no solo han demostrado tener actividad antibacteriana sino también antifúngica, tal como se ha reportado en los extractos realizados a las raíces, hojas y troncos de *Amrodia cinnamomea*, *Clausena excavata*, *H. alternata*, *Chromolaena odorata*, *Pogostemon* sp. y

Espece	Microorganismo que inhibe	Espece	Microorganismo que inhibe
<i>Achyranthes aspera</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>Proteus vulgaris</i>	<i>Euphorbia hirta</i>	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>
<i>Alternanthera sessile</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>Oxytelam esculentum</i>	<i>E. coli</i>
<i>Aristolochia indica</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> y <i>A. fumigatus</i>	<i>Ocimum sanctum</i>	<i>S. aureus</i> y <i>S. saprophytic</i>
<i>Azadirachta indica</i>	<i>M. luteus</i> y <i>P. vulgaris</i>	<i>Plumeria alba</i>	<i>E. coli</i>
<i>Capiscum frutescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Polyalthia cerasoides</i>	<i>Corynebacterium diphteriae</i>
<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	<i>A. solani</i> y <i>C. lunai</i>	<i>Plumeria rubra</i>	<i>S. epidermidis</i> y <i>E. coli</i>
<i>Clerodendrum ineme</i>	<i>S. aureus</i> y <i>A. niger</i>	<i>Piper nigrum</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. fecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. typhi</i>
<i>Cola acuminata</i>	<i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	<i>Phyllanthus amarus</i>	<i>S. typhi</i>
<i>Dahlia pinnata</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>P. aeruginosa</i>	<i>Spinfex littoreus</i>	<i>Dermatophytes</i> sp.

Tomado y modificado de Munuswamy y cols. (2013).

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las plantas.

La actividad antimicrobiana de las plantas ha sido estudiada, sin embargo, no en todos los casos se ha realizado la identificación de los compuestos con tal actividad, pero en muchos casos se ha dilucidado cuales son tales moléculas, ejemplo de ello son el compuesto llamado piperina obtenido de *Piper nigrum*, la luteolina obtenida de *Senna petersiana*, el compuesto llamado 5-[1,5-dimetil-2-4-hexenil] metifenol obtenido de *Meniha piperita*, un cinamaldehído obtenido de *Cinnamomun zeylanicum*, la alicina obtenida de *Allium sativum* y el compuesto b-cariofenil, fenil benzofuran-6-ol obtenido de *Ageratum fastigiatum* (Munuswamy y cols. 2013).

13 se muestran algunas otras plantas con actividad antibacteriana y antifúngica. *Cananga odorata* resultando efectiva contra *C. albicans* (Kusuma y col. 2014). En la Tabla

Continúa

Insecto	Nombre común	Actividad antimicrobiana reportada	Tipo de molécula
<i>Aedes aegypti</i>	Mosquito	Bacterias Gram positivas y negativas. Actividad antimicrobica	Cecropina A
<i>Boophilus aegypti</i>	Garrapata	Bacterias Gram positivas tales como <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>B. megaterium</i> y actividad contra los hongos filamentosos como <i>A. nidulans</i> , <i>N. crassa</i> y contra la levadura <i>C. albicans</i>	Péptido
<i>Heliothis virescens</i>	Gusano cogollero	Actividad antibacterial y antimicrobica	Péptido rico en cisteína

Tabla 14. Moléculas antimicrobianas producida por insectos.

De forma general, en algunos insectos han sido identificados cuatro tipos de moléculas con actividad antimicrobiana, las llamadas cecropinas, las defensinas, péptidos pequeños cuyo peso es de 2-3 kDa y los cuales son ricos en prolina y péptidos grandes cuyo peso es de 10-30 kDa y son ricos en glicina (Fehlbaum y cols. 1996).

En el insecto transmisor de la fiebre amarilla llamado *Aedes aegypti*, se ha reportado la producción del péptido nombrado cecropina A que es efectivo contra bacterias Gram positivas y negativas como *Aerococcus viridans*, *B. megaterium* y *S. pyogenes*, *E. coli* D22, *E. coli* D31, *E. coli* SBS363, *E. coli* 1106, *E. cloacae* b12, *F. carotovora*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *X. campestris*, también se ha demostrado que este compuesto tiene actividad antimicrobica para los hongos *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *N. crassa* y contra las levaduras *C. albicans*, *C. neoformans* y *S. cerevisiae* (Lowenberger y cols. 1999). Esta molécula (cecropina) no solo ha sido encontrada en el insecto de la fiebre amarilla, sino también en la mosca doméstica, en el gusano *Bombyx mori* donde se ha reportado la cecropina CM-4 y en la palomilla *Plutella xylostella* la cecropina pxCCECA1 (Parachin y cols. 2012). En la Tabla 14 se ejemplifican los nombres de otros insectos y las moléculas con actividad antimicrobiana y antifúngica reportada.

#### 1.6.5 Moléculas producidas por insectos

Los antibióticos comerciales son producidos solo por unos cuantos microorganismos, o por modificaciones genéticas de los mismos, sin embargo, el número de cepas que presentan actividad antimicrobiana y que se encuentran en el ambiente es muy grande. Por lo cual es necesario impulsar el estudio y validación de nuevos fármacos que pudieran ayudar a resolver la problemática de resistencia microbiana. Entre los microorganismos que presentan actividad antimicrobiana se encuentran *Bacillus amyloliquefaciens* el cual produce péptidos contra *S. aureus* y *A. parasiticus* (Leães y cols. 2015). Otro género importante es *Streptomyces* sp. el cual se ha caracterizado por producir una gran variedad de antibióticos comerciales, sin

Los microorganismos, desde su descubrimiento, se han utilizado para la producción de alimentos, proteína unicelular, colorantes, saborizantes, enzimas, vitaminas y gran variedad de metabolitos secundarios entre los que se encuentran los antibióticos. El uso de los microorganismos para la producción de metabolitos presenta la ventaja de requerir tiempos cortos para su producción, aunado a que las condiciones de cultivo pueden ser fácilmente controladas y replicadas y que el conocimiento sobre su fisiología y genética se ha incrementado recientemente con el avance de la tecnología y la investigación científica.

#### 1.6.6 Moléculas producidas por microorganismos

Tomado de Lowenberger y cols. (1999); Fogaca y cols. (1999); Lambert y cols. (1999); Kauschal y cols. (2016) y Tonarelli G y Simonetta (2014).

Insecto	Nombre común	Actividad antimicrobiana reportada	Tipo de molécula
<i>Cimex lectularius</i>	Chinche	<i>M. luteus</i> , <i>Corynebacterium renale</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	Defensina
<i>Boophilus microplus</i>	Garrapata	Gram positivas: <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> ; Hongos filamentosos: <i>A. nidulans</i> , <i>N. crassa</i> y contra la levadura <i>C. albicans</i>	Péptido
<i>Bombyx mori</i>	Mariposa de seda	Actividad antimicrobiana	Cecropina A

Continuación



embargo, las nuevas investigaciones han mostrado que es capaz de producir otros compuestos llamados fujimicina A, B y C y etamincina, los cuales han resultado efectivos contra *S. aureus* resistente a metilina. En la Tabla 15 se enlistan algunos microorganismos de mayor importancia donde se han descubierto la producción de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana.

Tabla 15. Moléculas antimicrobianas producidas por microorganismos.

Microorganismo	Actividad antimicrobiana reportada	Tipo de molécula
<i>Halobacillus litoralis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Trycophyton rubrum</i> , <i>Gaenmannomyces graminis</i> , etc.	Halicinidramida D
<i>Pseudomonas</i> UJ-6	<i>S. aureus</i> resistente a metilina	l-acetil-β-carbolina
<i>Streptomycetes</i> sp.	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>M. luteus</i>	Espiramicina
<i>Rhodococcus</i> sp., <i>Erythropolis</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>S. aureus</i> y bacterias Gram positivas	ND
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y otros	ND
<i>P. fluorescens</i> H40, H41 y <i>P. aeruginosa</i> H51	<i>E. faecium</i> y <i>K. pneumoniae</i>	ND
<i>P. flavipulchra</i>	Contra 21 aislados clínicos	ND
<i>Flavobacteria</i> sp., <i>Proteobacteria</i> sp. y <i>Actinobacteria</i> sp.	<i>E. coli</i> , <i>S. lentus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>C. glabrata</i>	ND

ND: No determinado. Tomado y modificado de Márquez y cols. (2009); Habbu y cols. (2016).

Los géneros de *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., entre otros, son de importancia debido a que han sido usados tradicionalmente para la producción de alimentos lácteos como el yogurt y los quesos, además, han sido utilizado para la producción de moléculas llamadas bacteriocinas las cuales son de naturaleza catiónica y son capaces de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, por lo cual han sido utilizadas para aumentar la vida de anaquel de los alimentos y evitar las enfermedades de transmisión por alimentos. De

Estos organismos se encuentran generalmente distribuidos en las regiones tropicales templadas donde la temperatura oscila entre los 12 y 36 °C, aunque también pueden habitar otras regiones con ambientes extremos. Algunas estimaciones mencionan que en total deben de existir unos 5.1 millones de hongos en el planeta y sólo una pequeña parte de ellos ha sido descubierta,

Los hongos son organismos formados por células eucariotas, con un DNA organizado en cromosomas que se hallan envueltos por una membrana nuclear, el citoplasma está delimitado por una membrana citoplasmática rica en ergosterol y recubriendo esta membrana se encuentra una estructura polisacárida compleja formada principalmente por quitina, mananos y glicanos, los cuales protegen de la lisis osmótica a la célula y regulan el paso de moléculas. Tienen un metabolismo del tipo quimioheterótrofo absorbitivo, es decir, obtienen energía y carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica (Prats 2005).

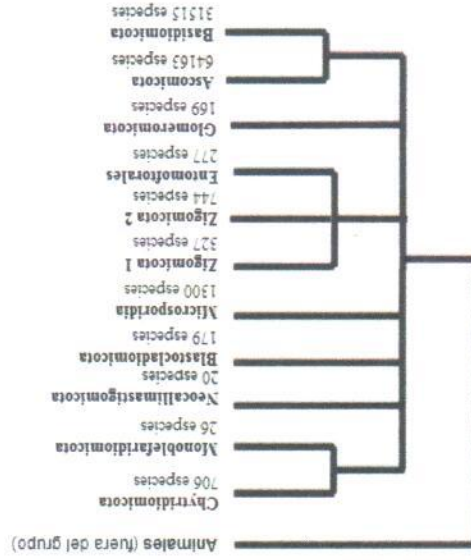
#### 1.7.1 Distribución y clasificación de los hongos

##### 1.7 Los hongos

Aunado a los mamíferos, especies marinas, plantas, insectos y microorganismos, los hongos también han demostrado tener actividad antimicrobiana y antifúngica.

esta forma, *L. lactis* subsp. *lactis* produce la bacteriocina llamada nisina, la cual ha sido aprobada por la FDA como un conservador de los alimentos, algunas otras especies de *Lactococcus* producen la lactocina, *Pediococcus acidilactici* produce la pediocina PA1. Otras bacterias ácido lácticas producen la lactostrepcina 1, 2, 3, las bacteriocinas llamadas bac V, VI y VII, la lacticina 481, la dricina y la lactococina. *L. brevis* produce la lactobrevina y brevicina 37. *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* produce la bulgaricana, *Carnobacterium piscicola* produce la carnobacteriocina A, B1 y B2, la piscicolina 61 y la carnocina UI49. El microorganismo *L. mesenteroides* produce la mesenterocina 5, Y105 y 52. *Streptococcus thermophilus* produce la bacteriocina llamada STB40, STB78, ST10 y la termofilina 13 (Tonarelli y Simonetta 2014).

Figura 6. Clasificación taxonómica de los hongos. Tomado de Blackwell (2011).



Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares, los primeros se caracterizan por ser células ovaladas y son llamadas levaduras. Los hongos pluricelulares están formados por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos formando largos filamentos llamados hifas, entre estos se encuentran los mohos y los hongos filamentosos macroscópicos, estos últimos forman estructuras con alto nivel de complejidad y organización de hifas, constituyendo las llamadas setas (Prats 2006). Sin embargo, la clasificación formal de estos se realiza con base en las características morfológicas de las estructuras involucradas en su reproducción y se han agrupado en los filios: Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Zigomycota 1, Zigomycota 2, Entomoflorales, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota. En la Figura 6 se representan estos filos y el número de especies que contiene cada una de ellas.

amado a esto, se estima que la cantidad de hongos supera a las plantas en una proporción de 6:1 (Blackwell 2011). Si bien, el total de hongos estimados es muy grande, el diccionario de hongos menciona que sólo 97,330 especies han sido descubiertas, entre los cuales se incluyen los mohos, hongos chytridiales, hongos liquenizados, levaduras y hongos filamentosos (Patel y cols. 2012).

De especial interés son los hongos llamados basidiomicetos que se encuentran en el filo basidiomicota, esto debido a las propiedades benéficas que conlleva el consumo de algunos de ellos.

### 1.7.2 Hongos basidiomicetos

Los hongos basidiomicetos provienen del filo basidiomicota, nombre que deriva del término basidium que en latín significa pequeño pedestal (Campbell y Reece 2007), llamados comúnmente setas debido a que contienen un cuerpo fructífero visible y pueden recogerse a mano y cuya característica principal está relacionada con la capacidad de formación de estructuras fructíferas llamadas basidiocarpos y la capacidad de descomponer materia orgánica muerta, esto es, la degradación de compuestos lignocelulósicos encontrados en las maderas de árboles débiles o dañados y otras especies vegetales (Sadava y cols. 2009). Existen cerca de 32,000 especies diferentes (Blackwell 2011), sin embargo, de éstas sólo unas 2,000 especies son comestibles y sólo una docena de ellas se cultivan comercialmente (Patel y cols. 2012). Las especies no comestibles son productoras de compuestos tóxicos para los humanos tal como las moléculas producidas por algunas especies del género de *Amanita*.

Entre los basidiomicetos destacan los hongos *Lentinula edodes* (Shiitake), *Ganoderma lucidum*, *Tremella fuciformis*, *Grifola frondosa* (Maitake), *Hericium erinaceus*, *Agaricus bisporus* (champiñón), *Pleurotus ostreatus* (seta) y *Portia cocos*, debido a que se han utilizado como fuente alternativa para la obtención de moléculas activas y algunos de ellos son producidos a escala industrial.

### 1.7.3 *Lentinula edodes*

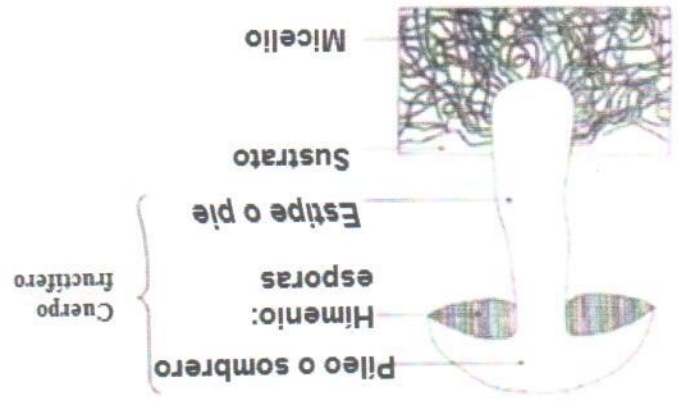
El hongo *L. edodes*, conocido como shiitake, es un hongo perteneciente al filo Basidiomicota, clase Basidiomicetes, orden Agaricales, género *Lentinula* y especie *edodes*. Este hongo se caracteriza por poseer un cuerpo fructífero, el cual puede medir de 4-13 cm con un color café

El ciclo de vida de algunos hongos basidiomicetos (como *L. edodes*) comienza con la germinación de una basidiospora, contenida en una estructura llamada basidio, cada basidio lleva cuatro basidiosporas y cada basidiospora contiene un núcleo haploide (Bisen y cols. 2010). La germinación de la basidiospora da lugar a una hifa homocariótica (conteniendo núcleos haploides), las hifas son ricas en quitina y algunos glicanos y forman complejas redes

1.7.4 Ciclo de vida

*L. edodes*, conocido como shiikate, crece sobre la madera del roble, castaña, haya, arce, encino, álamo, aliso, carpe, palo de hierro y chinquapin y su cultivo se realiza en el norte y sur de Japón, el este de Tasmánia, Nueva Zelanda, las regiones del Himalaya, Nepal y la India (Bisen y cols. 2010).

Figura 7. Partes del hongo. Modificado de Kalac (2009).



característico. Estos hongos están formados por el estipe o pie y el cual sostiene al pileo o sombrero con forma convexa. Bajo el pileo se alojan las esporas (6.5-9 × 2.8-3.5 micras) en una estructura conocida como himenio. Los cuerpos fructíferos surgen de la diferenciación celular del micelio (Hilber 1982). En la Figura 7 se observamos estas estructuras.

Llamadas micelio. Los micelios homocarióticos crecen hasta que se produce un apareamiento compatible y se fusionan, después de la fusión, hay una migración nuclear y se produce un micelio heterocariótico. El crecimiento posterior implica la división sincrónica de los dos núcleos en cada compartimiento y su distribución regular como par nuclear en todo el micelio (Casselton 1995).

El micelio del hongo es el responsable de la captación de nutrientes, de esta forma, los micelios heterocarióticos con suficiente biomasa y condiciones ambientales adecuadas pueden formar los cuerpos fructíferos, que son los que comúnmente se conocen y consumen. Durante la formación del cuerpo fructífero, la fusión nuclear y la meiosis ocurren sólo en los basidios especializados y los núcleos haploides migran a las basidiosporas hasta que estas germinan en hifas homocarióticas y comienza nuevamente el ciclo (Casselton 1995) (Figura 8).

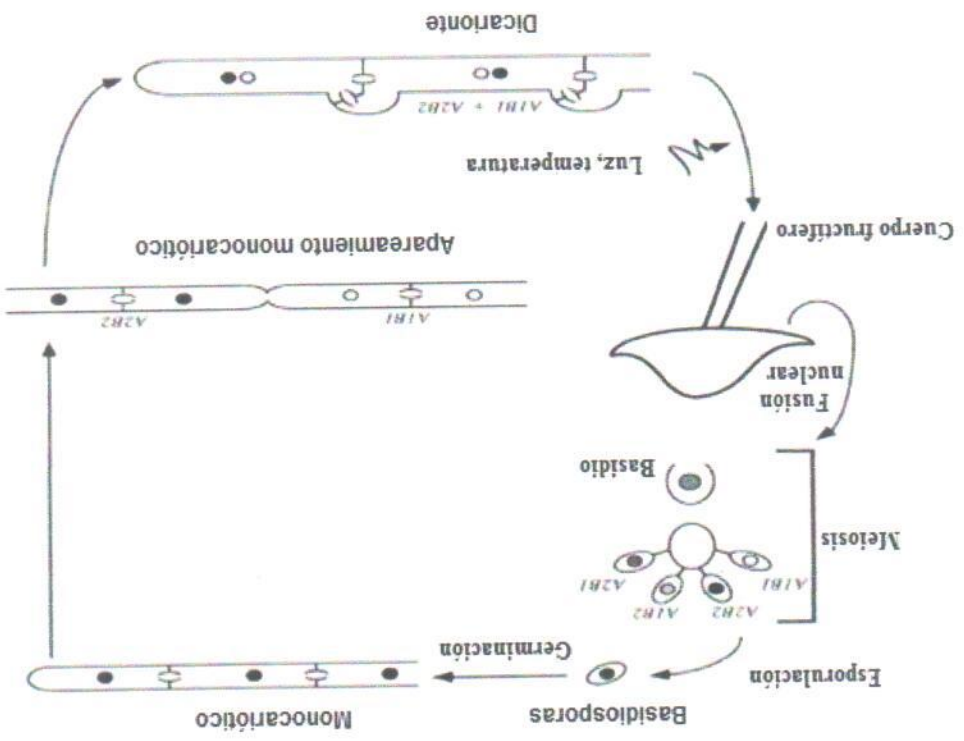


Figura 8. Ciclo de vida de un basidiomiceto. Tomado y modificado de Casselton (1995).

1.7.5 Composición química

El hongo *L. edodes* ha sido consumido desde hace siglos debido al sabor y aroma característico, los basidiomicetos se caracterizan por tener un porcentaje de humedad alto y poseer sólo el 10 % de materia seca, contener una alta concentración de proteína y reducido contenido de grasas. Además proporciona minerales y vitaminas, en particular la vitamina D (Correa y cols. 2016). El hongo *L. edodes* contiene aproximadamente 17.1 % de proteína, 30.2 % de carbohidratos y 1.9 % de grasas (Wang y cols. 2014). En la Tabla 16 se puede observar la composición química de algunos hongos entre ellos *L. edodes*.

Tabla 16. Composición química de algunos hongos.

Hongo	Carbohidratos	Fibra	Proteína	Grasa	Cenizas
<i>L. edodes</i>	30.2	39.4	17.1	1.9	4.3
<i>B. aereus</i>	34.0	17.0	26.9	2.1	8.5
<i>B. edulis</i>	30.6	15.3	28.7	4.1	9.2
<i>B. speciosus</i>	28.6	21.0	28.1	2.9	7.6
<i>C. aureus</i>	61.5	5.2	14.1	4.0	9.2
<i>L. deliciosus</i>	25.0	36.3	20.2	2.5	7.5
<i>L. hatsudake</i>	38.2	31.8	15.3	1.0	7.3
<i>L. volens</i>	15.0	40.0	17.6	6.7	13.3
<i>L. crocispodium</i>	12.8	37.9	29.3	1.0	5.8
<i>R. virescens</i>	13.4	32.8	28.3	1.5	11.9
<i>S. aspratus</i>	64.6	5.1	12.0	2.8	10.4
<i>T. matsutake</i>	36.7	29.1	14.3	5.0	8.9
<i>C. cibarius</i>	66.07	ND	21.57	2.88	ND
<i>R. delica</i>	63.87	ND	26.10	4.44	ND
<i>L. munda</i>	56.33	ND	34.37	3.23	ND
<i>B. badius</i>	81.86	ND	10.65	2.23	5.26

ND: No determinado. Tomado y modificado de Ouzouni y cols. (2009); Wang y cols. (2014) y Heleno y cols. (2015).

El contenido de quitina en *L. edodes* es esencial ya que funciona como fibra dietética al consumirse, además contiene otros micronutrientes como timina, riboflavina, ácido ascórbico, niacina fósforo y hierro (Maftoun y col., 2015) y ácidos grasos como el palmítico, oleico, linoleico, etc. (Tabla 18).

Tomado y modificado de Longvah y Deosthale (1998).

Aminoácido	Concentración (g de aminoácido/16g de nitrógeno)	Aminoácido	Concentración (g de aminoácido/16g de nitrógeno)
Treonina	3.2	Arginina	8.0
Valina	6.7	Aspartato	9.9
Cisteína	1.4	Serina	5.3
Metionina	0.8	Glutamato	12.6
Isoleucina	4.9	Prolina	8.0
Leucina	7.3	Glicina	5.1
Tirosina	3.3	Alanina	7.8
Fenilalanina	4.2	Histidina	2.3
Lisina	6.4		

Tabla 17. Contenido de aminoácidos de *L. edodes*.

*L. edodes* contiene un porcentaje alto de carbohidratos, entre los que se encuentran el manitol, la glucosa, el glucógeno, algunos oligosacáridos, quitina, fibra cruda y  $\beta$ -glicanos, estos últimos con actividad biológica (Heleno y cols. 2015).

La importancia nutricional del shiitake y otros hongos radica en el contenido de proteína que poseen, ya que se considera que tienen contenido inferior a las carnes pero superior a otros alimentos como la leche (Correa y cols. 2016), además de que *L. edodes* contiene 17 aminoácidos entre ellos algunos esenciales para el ser humano (Tabla 17).



La producción de *L. edodes* representa una actividad de importancia social, económica y ecológica realizada alrededor del mundo no sólo con los hongos producidos industrialmente, sino también con los hongos recolectados y cuyo valor cultural es significativo para las comunidades. *L. edodes* es el segundo hongo más cultivado en el mundo, después de *A. bisporus* y seguido por *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* y *Volvariella volvacea*.

La importancia del hongo *L. edodes* radica en dos líneas principales, la primera de ellas, la producción y comercialización del hongo y la segunda las propiedades medicinales que se le han atribuido por su consumo.

#### 1.7.6 Importancia de *L. edodes*

Aunado al aporte nutricional proporcionado por *L. edodes*, la principal razón de su consumo se debe a su aroma y sabor, el cual es atribuido a compuestos como los terpenos, lactonas, aminoácidos y los hidratos de carbono que posee (Correa y cols. 2016). La composición química de los hongos está directamente relacionada con la actividad biológica que poseen sus compuestos.

\*mg por 100 g de muestra seca. Tomado y modificado de Longvah y Deosthale (1998).

Minerales	mg*	Vitaminas	mg*	Ácidos grasos	%
P	439	Tiamina	0.05	Ácido palmítico	19.2
Mg	200	Riboflavina	0.15	Ácido esteárico	2.7
Ca	127	Niacina	2.6	Ácido araquidónico	0.4
Fe	20.1	Ácido ascórbico	2.1	Ácido oleico	8.3
Zn	4.3	Ácido fólico	0.03	Ácido linoleico	68.8
Mn	5.1	Ergosterol	679	Ácido linoléico	0.6
Cu	0.9				
Cl	140 ug				

Tabla 18. Minerales, vitaminas y ácidos grasos que contiene *L. edodes*.

La comercialización de cuerpos fructíferos es de importancia económica y también lo es su uso medicinal y en la biotecnología, ya que ha sido utilizado para la producción de metabolitos secundarios y algunos compuestos con actividad biológica debido a sus propiedades terapéuticas, representando una forma tradicional de curar enfermedades en algunas culturas occidentales y orientales. Entre los géneros con mayor uso medicinal se encuentra *Ganoderma*, seguido de *Lentinula* y *Pleurotus* (Tam y cols. 1986). El hongo *L. edodes* se ha usado en la

La producción industrial de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* comienza con la obtención de un inóculo utilizando medios sólidos comerciales o industriales, este inóculo es usado para producir micelio en cantidad suficiente para llevar a cabo su resiembra y generar la llamada semilla, la cual se puede realizar en granos de trigo, arroz, etc. para posteriormente depositarla en algún sustrato pasteurizado como la paja de trigo y arroz o sustratos como troncos de tronco. La fructificación de lo hongo debe de ser inducida con las condiciones ambientales adecuadas, tales como humedad y temperatura.

La producción de hongos a nivel mundial, se estima que es de aproximadamente 7 millones de toneladas cuyo valor supera los 30 billones de dólares. Por otro lado, los hongos silvestres (que no son producidos a nivel industrial) generan una derrama económica importante, comercializándose cerca de 200,000 toneladas cuyo valor supera los 1,6 billones de dólares. En 1997 los países que más hongos produjeron fueron China, Estados Unidos, Canadá, India, Indonesia, Corea, Irán, Vietnam, Tailandia, Israel, Jordania, Kazajistán y Signapur, los cuales según las estimaciones, han incrementado su producción en los últimos 10 años entre un 10-100 % (Aida y cols. 2009). En México, la producción de hongos se ha ido incrementando en las últimas décadas, debido al acceso a la tecnología y la creación de empresas e institutos que producen inóculo. Tan solo de 1945 a 1991 México pasó de cultivar 5 toneladas a 9,036 toneladas de hongos y para 2004 produjo 47,648 toneladas. El hongo más cultivado en México es *A. bisporus* con cerca de 45,260 toneladas, seguido de *P. ostreatus* con 2,190 toneladas y *L. edodes* con 18,2 toneladas de (Martínez-Carrera y cols. 2007).

La actividad antimicrobiana en los hongos ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, los primeros trabajos empleando basidiomicetos son los reportados Anchel, Hervey y Wilkins (1941), quienes examinaron extractos de cuerpos fructíferos y cultivos miceliales de más de 2,000 especies de hongos, detectando en los mismos diversas actividades antibióticas y cuyos resultados conllevaron al identificación del pleuromutilina, compuesto utilizado para el tratamiento de las enfermedades producidas por micoplasmas en el ganado vacuno (Brizuela y cols. 1998). Aunque no en todos los reportes se ha llevado a cabo la purificación de los compuestos con actividad antimicrobiana y/o antifúngica, en algunos sí se ha realizado, atribuyéndoles tales efectos a las policetonas, sales de diazonio, aldehídos, sesquiterpenos, diterpenoides, benzoquinonas, proteínas, péptidos y glicosiliceramidas. En la Tabla 19 se muestran algunos hongos y los microorganismos que combaten.

#### 1.7.7 Actividad antimicrobiana de los hongos

Los beneficios reportados por el consumo de hongos se deben a los compuestos químicos que estos poseen y los cuales se han asociado a actividades inmunomoduladoras, hipocolésterolémicas, anticarcinogénicas, hepatoprotectoras, antivirales, antiparasitarias, antifúngicas y antimicrobianas (Wang y Lin 1996; Enman y cols. 2007; Wasser 2005b; Akamatsu y cols. 2004; Suzuki y cols. 1989 y Bender y cols. 2003). Estas moléculas no solo se pueden obtener de los cuerpos fructíferos, sino también se pueden aislar del micelio, medios de cultivo y sustratos donde se han crecido los hongos.

medicina tradicional desde la dinastía Ming (1368-1644) como un tónico para contrarrestar dolores y fatiga asociada al envejecimiento, mejorar la salud del corazón, eficiencia en las enfermedades pulmonares e intestinales y también se ha asociado con las enfermedades cancerígenas, aunque en esa época existía poca evidencia experimental que avalara estos efectos (Money 2016).

Naturaliza química	Hongo	Actividad	Compuesto	Referencia
Polietonas	<i>Marasmius scorodoni</i>	Antimicrobiana	Escorodina	Anke y cols. (1980)
Sales de diazonio	<i>Agaricus xanthodermus</i>	Antibacterial y citotóxica	Agaritina	Dornberger y cols. (1989)
Aldehídos insaturados	<i>Lactarius flavidulus</i>	Antimicrobiana	ND	Takahashi y cols. (1988)
	<i>Mycena leiana</i>	Antimicrobiana	Leianafulvina	Hartig y cols. (1990)
Sesquiterpenos	<i>Marasmius fulvoferrugineus</i>	Antimicrobiana	Fulvoferrugina	Klein y cols. (1990)
	<i>Merulius tremellosus</i>	Antimicrobiana, antifúngica y citotóxica	Merulidial	Sternier y cols. (1990)
Diterpenoides	<i>Boletinus capines</i>	Antibacteriana, antifúngica y citotóxica	Cavipetina	Toyota y Hostettmann (1990)
Derivado de benzoquinona	<i>Lentinellus omphalodes</i>	Antimicrobiana	Omfalona	Stark y Anke (1991)
Proteína inactivadora de ribosomas	<i>Lophyllum shimeji</i>	Antifúngica	Liofilina	Lam y Ng (2001)
Péptido	<i>Lentinula edodes</i>	Antifúngica	Lentin	Ngai y Ng (2003)
Péptido	<i>Pleurotus eryngii</i>	Antifúngica	Eryngin	Wang y Ng (2004)
Proteína	<i>Tricholoma giganteum</i>	Antifúngica	Trichogin	Guo y cols. (2005)
Extractos	<i>Lentinula edodes</i>	Antimicrobiana	ND	Kitzberger y cols. (2007)
Extractos	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Antimicrobiana y antifúngica	ND	Ivalokum y cols. (2007)
Proteína	<i>Mycena pura</i>	Antimicrobiana y antifúngica	ND	Hearst y cols. (2010)
Proteína	<i>Clitocybe sinopica</i>	Antimicrobiana	ND	Zheng y cols. (2010)
Péptido	<i>Pseudoplectanina Nigella</i>	Antifúngica	Plectasin	Zhang y cols. (2011)
Proteína	<i>Agaricus bisporus</i>	Antibacteriana y antifúngica	ND	Tehrani y cols. (2012)
Glucosilceramida	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Antimicrobiana	ND	Meng y cols. (2012)
Extractos	<i>Pleurotus djamor</i>	Antimicrobiana y antifúngica	ND	Dharmaraj y cols. (2014)

Tabla 19. Actividad antimicrobiana de los hongos.

La cromatografía de intercambio iónico es un procedimiento que consiste en lograr el equilibrio de intercambio entre iones de una solución y los iones de signo contrario que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular llamado columna. Al hacer pasar la solución por la columna se quedan retenidas aquellas moléculas con signo contrario al sólido y las de signo igual serán eluidas. Las proteínas con densidades bajas de carga negativa o positiva

## 1.8.2 Cromatografía de intercambio iónico

Es procedimiento que sirve para separar moléculas con base en su punto isoeléctrico. Una mezcla de proteínas con diferentes puntos isoeléctricos puede separarse al existir un gradiente de pH haciendo que las proteínas pueden migrar hacia el ánodo o cátodo dependiendo su carga y al mismo tiempo ir cambiando su carga hasta que este coincide con su punto isoeléctrico, esto es cuando su carga neta sea igual a cero. Cuando se ha logrado este punto, las moléculas dejarán de migrar hacia los electrodos y podrán ser recuperadas en un valor de pH específico.

### 1.8.1 Isoelectroenfoque

En la literatura se han reportado una gran cantidad de extractos provenientes de hongos con propiedades antimicrobianas, sin embargo, pocos han realizado la purificación de los mismos, en algunos estudios se ha determinado que las moléculas pueden ser de origen proteico, por lo cual, propiedades como su polaridad, punto isoeléctrico y peso molecular han sido utilizadas para purificarlas.

## 1.8 Purificación de proteínas con actividad antimicrobiana

Las moléculas descritas anteriormente no son utilizadas como antimicrobianos comerciales y su estudio deja en claro el potencial que tienen como agentes terapéuticos. Aunado a esto, es de importancia mencionar las nuevas técnicas de purificación de moléculas que pueden contribuir con la ingeniería de bioprocesos.

La electroforesis en columna, es una técnica electroforética que puede ser usada para separar las proteínas, donde se separan las biomoléculas dependiendo su carga y su masa. Aquí, las proteínas son colocadas en un gel cilíndrico de poliacrilamida y por medio de corriente eléctrica y una elución, las proteínas son desplazadas y sacadas del gel para su posterior recuperación, teniendo la ventaja de recuperar fracciones no desnaturalizadas y con actividad biológica. Para conocer el peso molecular de estas proteínas se utiliza el proceso denominado electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), donde se tiene un gel colocado entre dos placas de vidrio y las proteínas desnaturalizadas son colocadas sobre esta matriz, al aplicarle una corriente eléctrica se logra su separación (Lodish y cols. 2006), estas proteínas deben de ser reveladas con tinciones como la de azul de comassie o con nitrato de plata y utilizar un patrón de proteínas con masas moleculares conocidas.

La electroforesis es un método de separación de biomoléculas de una mezcla mediante la aplicación de un campo eléctrico, migrando a una velocidad determinada dependiendo la relación carga: masa. Dadas las características de los péptidos antimicrobianos (peso molecular y carga), este proceso ha sido usado para identificarlos y separarlos.

### 1.8.3 Electroforesis en placa y columna

(según sea el caso) que no son retenidas saldrán primero de la columna seguidas de las moléculas con densidades de carga más alta (Berg y cols. 2007; Skoog y cols. 2008). La naturaleza de la columna es crucial para lograr una buena separación de los compuestos y algunos de los rellenos de columnas catiónicas contienen ácido sulfónico o ácido carbónico. Las columnas aniónicas generalmente contienen grupos amino fuertemente básicos o grupos amino débilmente básicos.

## 2. ANTECEDENTES

En diversas investigaciones se ha realizado la extracción de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica a partir de hongos, sin embargo, las metodologías utilizadas son diferentes debido a la diversidad de compuestos químicos que contienen. En los hongos, se ha utilizado agua y alcohol para generar extractos con una amplia gama de compuestos antimicrobianos efectivos contra especies de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Candida*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Salmonella* y líneas celulares, entre otras (Akyuz y Kirbag 2009; Hearst y cols. 2009; Vamanu y cols. 2011). Además de agua y alcoholes, otros solventes como el éter de petróleo y acetona, han resultado efectivos para bacterias Gram negativas y positivas (Iwalokun y cols. 2007). Por otro lado, el buffer Tris 50 mM y acetona también se han usado en la evaluación de los compuestos antimicrobianos de *A. bisporus*, encontrando que son capaces de inhibir a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, entre otras (Tehrani y cols. 2012). En el hongo *P. cystidiosus* se ha utilizado la acetona, dicloro metano y hexano para extraer un compuesto con actividad antifúngica (Menikpurage y cols. 2009) y en *P. eous* se utilizó el éter de petróleo para extraer un éster de ácido graso el cual posee actividad antimicrobiana (Sussem y Saral 2013). Varios autores, entre ellos Das y cols. (2012) y Nehra y cols. (2012) han reportado una mayor eficacia de los extractos alcohólicos que los acuosos; sin embargo, es necesario evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos removiendo los solventes utilizados, en especial los alcoholes, debido a que se ha demostrado que estos son antagonistas de algunas bacterias (Benedict y Brady 1972).

En el hongo *L. edodes* se han utilizado varios solventes para extraer los compuestos con actividad antimicrobiana, entre ellos, el cloroformo, acetato de etilo y agua (Koremushi y cols. 1996; Ishikawa y cols. 2001). Aunado a esto, se ha usado hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etanol y permanganato de potasio, para la extracción de la quitina de los estípites de *L. edodes* y se ha demostrado que ésta es capaz de inhibir el crecimiento de *B. cereus*, *E. coli*, *Flavobacterium* sp. y *Vibrio parahaemolyticus*, resultando más efectiva que la quitina extraída de cangrejos la cual solo inhibe a *Flavobacterium* sp. (Chien y cols. 2016). Hearts y

cols. (2009) elaboraron extractos acuosos del cuerpo fructífero de *L. edodes* liofilizado y reportaron que estos tenían actividad antimicrobiana. Por otro lado, Casaril y cols. (2011) elaboraron extractos con agua y metanol encontrando actividad antimicrobiana. Otro trabajo representativo es el de Ngai y Ng (2003) quienes realizaron una extracción a partir de los cuerpos fructíferos de *L. edodes* usando NaCl 50 mM con lo que se obtuvo un péptido con propiedades antifúngicas.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos, generalmente se lleva a cabo con la técnica llamada difusión en disco (Collins y Lynes 1987), en donde se evalúa la formación de halos de inhibición en cajas Petri que han sido inoculadas con los patógenos, reportando la actividad en centímetros; resultando más eficaces aquellos extractos que inhiban en mayor proporción a los microorganismos evaluados. La actividad antimicrobiana de los hongos ha sido reportada en varios estudios como el llevado a cabo por Vamanu y cols. (2011) quienes encontraron que el hongo *P. ostreatus* tiene la capacidad de inhibir a *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, entre otros microorganismos formando halos de inhibición de 1.0-2.4 cm. Por otro lado, Saskiawan (2009) reportó que el hongo *P. ostreatus* genera un porcentaje de inhibición bacteriana de 25% y 60% para *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente. Gbolagade y cols. (2007) reportaron la actividad antimicrobiana de los hongos *Fomes lignosus*, *Marasmius jodocodo*, *P. tuber-regium*, *Psathyrella atroummonata*, *Polyporus giganteus*, *Termitomyces microcarpus* y *T. robustus* contra bacterias Gram positivas y negativas. Los hongos *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* y *A. bisporus* fueron estudiados por Akyuz y cols. (2010) quienes demostraron que podían inhibir a *B. megaterium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Epidermophyton* spp. y *Trichophyton* spp.

La actividad antimicrobiana del hongo *L. edodes* se ha evaluado contra microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus*, *B. cereus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *A. flavus*, *A. niger*, entre otros. (Kitzberger y cols. 2007; Hearst y cols. 2009), aunado a esto, también se ha evaluado la actividad antitumoral de este hongo según lo reportado por Finimundy y cols. (2013) y Zhang y cols. (2015). El cuerpo



La actividad antimicrobiana de los hongos ha sido reportada, sin embargo, los compuestos antimicrobianos no son identificados en todos los trabajos. Algunas moléculas identificadas en los hongos basidiomicetos han sido descritas en los reportes de Lam y Ng (2001) quienes encontraron una proteína antifúngica de 14 kDa purificada de los cuerpos fructíferos del hongo *Lycopodium shimaji*. Lacadena y cols. (1995) purificaron y caracterizaron un péptido antifúngico aislado de *A. giganteus* el cual exhibió propiedades inhibitorias contra los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme*, *Magnaporthe grisea* y *Phytophthora infestans*, pero esta desprovisto de cualquier efecto sobre las levaduras y bacterias. Guo y cols. (2005) aislaron una proteína antifúngica del hongo *Tricholoma giganteum*, la cual muestra actividad contra *M. arachidicola*, *F. oxysporum* y *F. piricola*. Zheng y cols. (2010) aislaron una proteína antifúngica de 44 kDa del cuerpo fructífero del hongo silvestre *Clitocybe sinopica* el cual mostró inhibición del crecimiento de *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *Xanthomonas oryzae* y *X. malvacearum*, la concentración mínima inhibitoria encontrada fue de <0.6 mM, sin embargo, no tenía ninguna actividad contra varias especies de bacterias. En el hongo *P. eryngii*

El micelio de *L. edodes*, cultivado en medios líquidos, produce sustancias antimicrobianas capaces de inhibir el crecimiento de *B. megaterium*, *S. aureus*, *S. pyogenes* y *C. albicans* dejándolos con una supervivencia del 0, 11, 5, 43 %, respectivamente (Hatvani 2001). Ishikawa y cols. (2001) evaluaron la actividad antimicrobiana del micelio de *L. edodes* encontrando que puede inhibir el crecimiento de *B. cereus* F4433, *B. subtilis*, *L. innocua* 12570, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* y *S. epidermidis* generando halos de inhibición de 12, 28, 8, 4, 19 y 27 mm, respectivamente; sin embargo, no fue capaz de inhibir bacterias Gram negativas como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. anatum*, *C. amalonii*, *S. marcescens*, entre otras.

Fructífero de *L. edodes* puede generar halos de inhibición bacteriana de 8 a 12 mm para las cepas de *B. cereus* NCTC 7464, *B. subtilis* NCTC 10400, *E. coli* NCTC 25922, *E. coli* NCTC 9001, *K. aerogenes* NCTC 9528, *S. poona* NCTC 4840, *S. aureus* (MSSA) 25923, *S. aureus* (MRSA) 43300, entre otras (Harts y cols. 2009).

Los métodos usados para la identificación y purificación de moléculas con actividad antimicrobiana o antifúngica dependen de la naturaleza química del compuesto de interés. Ejemplo de ello es el trabajo de Menikpurage y cols. (2009) quienes identificaron algunos ácidos grasos con actividad antimicrobiana del hongo *P. eous* usando un cromatograma de gases acoplado a un detector de masas (CGMS). Grenier y cols. (2000) utilizaron varias técnicas instrumentales para identificar el compuesto llamado lentinamicina de *L. edodes*, tales como espectrofotometría UV, IR, MS y IH-NMR. Algunos polisacáridos como el lentinan han sido purificados usando solventes de diferentes polaridades, precipitaciones proteicas y cromatografía de intercambio iónico (Chihara y cols. 1969). Para la purificación de péptidos antimicrobianos generalmente se utiliza cromatografía, como la de intercambio iónico, extracción molecular y afinidad, a fin de separar las moléculas por carga eléctrica, tamaño y afinidad a determinado sustrato, respectivamente. Algunos reportes de purificación de estas moléculas con actividad antimicrobiana utilizando las técnicas arriba mencionadas son los reportes de Wang y Ng (2004) quienes purificaron el péptido llamado eryngin de *P. eryngii*, Wang y col. (2004) purificaron en péptido llamado alveolarina de *P. alveolaris*, Chu y cols. (2005) purificaron el péptido llamado pleurostin de *P. ostreatus*, Wang y Ng (2006)

En *L. edodes* se ha identificado una  $\beta$ -1-3 glucanasa similar a las proteínas de la familia de las taumatinas con actividad contra *S. cerevisiae* (Grenier y cols. 2000). En los caldos de cultivo de este hongo también se ha identificado un compuesto llamado lentinamicina ( $\beta$ -feneetil alcohol y octa-2,3-dieno-5,7 diyne-1-ol) con actividad para *S. aureus* (Koremushi y cols. 1996). El compuesto llamado lentinan fue identificado en los cuerpos fructíferos del hongo *L. edodes* mostrando actividad antitumoral y antiviral (Chihara y cols. 1969; Wasser y Weiss 1999). Por otro lado, Ngai y Ng (2003), identificaron un péptido con actividad antifúngica de *L. edodes* llamado lentin y el cual tiene un peso molecular de 27,5 kDa y es capaz de inhibir el crecimiento micelial de *P. piricola*, *B. cinerea* y *M. arachidicola*.

Se ha reportado un péptido llamado eryngin el cual inhibe el crecimiento de *F. oxysporum* y *M. arachidicola* (Wang y Ng en 2004).

purificaron el compuesto llamado ganodermin, de *G. lucidum* y Tehrani y cols. (2011) extraerón y purificaron una proteína de *A. bisporus* con actividad antimicrobiana. La utilización de una u otra técnica dependen de las propiedades químicas de las moléculas y se pueden usar más de una para obtener mayor grado de purificación.

Hoy en día existe un creciente interés en la búsqueda de metabolitos secundarios a partir de hongos para el descubrimiento de nuevos fármacos, llamando la atención la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades químicas diferentes a las ya existentes y aislados de organismos diferentes (Parachin y cols. 2012). Debido a lo anterior, el hongo *L. edodes* puede ser una posible fuente de obtención de proteínas antimicrobianas; sin embargo, es importante identificar los compuestos para su posterior uso y aplicación. En el presente trabajo se purificó una proteína proveniente del hongo *L. edodes* con actividad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el uso inapropiado de los antibióticos ha generado resistencia bacteriana trayendo como consecuencia una menor efectividad de los antibióticos y por ende mayor riesgo de la población a enfermarse por infecciones causadas por *E. coli* y *S. aureus*, entre otros. Esta situación representa un problema de salud pública mundial y debido a esto ha surgido la necesidad de búsqueda de nuevas fuentes de aislamiento y purificación de los compuestos con actividad antimicrobiana, lo cual representa una alternativa para subsanar esta problemática.

En el hongo *L. edodes* se han identificado moléculas con actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus, sin embargo, no se ha purificado una proteína con estas propiedades, por lo cual se abre la brecha del estudio de estas sustancias y en un futuro su utilización como posibles agentes terapéuticos.

### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tiene el hongo *L. edodes* una proteína que sea capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*?

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Purificar una molécula de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* a partir de *L. edodes*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto acuoso proveniente del cuerpo fructífero de *L. edodes* contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*.
- Estandarizar un proceso de fraccionamiento proteico del extracto acuoso con actividad antimicrobiana.
- Purificar la proteina con actividad antimicrobiana.

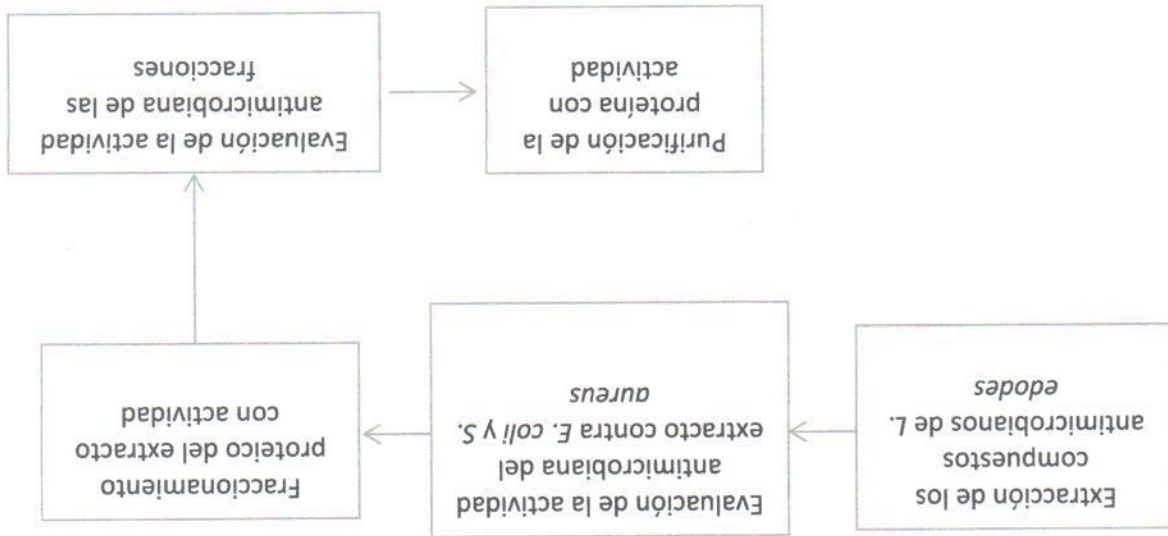
Se realizó un extracto acuoso (AE) del hongo *L. edodes*, en una relación 1:3 p/v (hongo: agua) el cual fue homogenizado por 24 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó la mezcla a 15000 x g

6.2 Extracción de los compuestos antimicrobianos de los cuerpos fructíferos

Para llevar a cabo los objetivos planteados se utilizaron cuerpos fructíferos secos de *L. edodes* obtenidos de un mercado local. Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y *E. coli* ATCC 700927.

### 6.1 Material biológico

Figura 9. Diagrama general de trabajo.



objetivos de este estudio.

En la Figura 9 se muestra el diagrama general de trabajo propuesto para cumplir con los

## 6. METODOLOGÍA

En la segunda etapa de purificación, 5 ml de la fracción 3 (F3), proveniente del Rotor y con actividad antimicrobiana, fue fraccionada (FPLC Biologic System LP, Bio-Rad) usando una columna de intercambio iónico (Econo-Pac High Q Anion Exchange Cartridge, Bio-Rad), la cual

La proteína con actividad antimicrobiana fue purificada con una metodología de tres etapas. En la primera etapa el AE de *L. edodes* fue fraccionado por isoelectroforesis (Rotor, Bio-Rad) usando una cámara de 60 ml y anfolitos de pH 3-10 (Bio-Lyte 40%). La membrana de intercambio catiónico fue sumergida en una solución 0.1 M de ácido fosfórico y la membrana de intercambio aniónico fue sumergida en una solución 0.1 M de hidróxido de sodio, la corrida se llevó a cabo aplicando un voltaje de 300 a 500 V hasta que el voltaje se mantuvo constante. A las fracciones colectadas se les determinó el pH y se evaluó su actividad antimicrobiana.

#### 6.4 Purificación de la proteína con actividad antimicrobiana

Tanto al AE como a las fracciones obtenidas en cada etapa de purificación se les determinó la actividad antimicrobiana, siguiendo la técnica de difusión en disco reportada por Collins y Lynes (1987), con algunas modificaciones. Para ello, se ajustó un inóculo inicial de bacterias patógenas con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland y se depositaron en 20 ml de agar Muller-Hinton para sembrarlas por la técnica de vertido en placa, en cajas Petri de vidrio de 10 x 15 mm. Se realizaron 4 pozos dentro de cada caja y se depositaron 125 µL del extracto a analizar, hecho esto, se dejó absorber el extracto por 30 min y se incubaron las cajas Petri por 18 h a 37 °C. Los halos de inhibición fueron medidos con un vernier, reportando la inhibición en cm. Como control positivo fue utilizada gentamicina a la concentración de 50 mg/l y como control negativo agua.

#### 6.3 Determinación de la actividad antimicrobiana

El sobrenadante fue filtrado y mezclado con amortiguador de acetatos 1M pH 5.5 en la proporción 1:10 (v/v), éste se almacenó en refrigeración hasta su uso.

fue estabilizada con amortiguador tris 25 mM pH 8.1 (amortiguador A) a un flujo de 1.75 ml/min, la fracción absorbida por la columna fue eluida con un gradiente de concentración lineal de NaCl (amortiguador B) (0-0.5 M). La separación se logró eluyendo 10 min con el amortiguador A, 15 min con el amortiguador B en gradiente de 0-100%, 12 min el amortiguador B al 100% y finalmente 20 min con el amortiguador A.

En la tercera etapa, el pico 1 (P1), obtenido de la cromatografía de intercambio iónico, se fraccionó por peso molecular (Mini Prep Cell, Bio-Rad), usando una columna de vidrio de 0.5 x 10 cm, la cual fue llenada con 5 ml de poliacrilamida al 12 % y en la cual se depositó la fracción P1. La elución se realizó con un flujo de 0.1 µl/min con amortiguador tris-glicina sin SDS, el equipo de electroforesis fue acoplado a una bomba peristáltica y al FPLC a fin de registrar el cromatograma.

En cada paso de la purificación, las fracciones fueron dializadas con una membrana de 10 kDa (Standard RC) y concentradas por medio de liofilización para posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana.

#### 6.5 Determinación del peso molecular de la proteína purificada

Los pesos moleculares de las fracciones obtenidas fueron determinados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) descrita por Laemmli (1970), usando como referencia el marcador de peso molecular SDS-PAGE broad range standards (Bio-Rad), la tinción del gel se realizó con nitrato de plata.

#### 6.6 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se realizó con el método de Bradford (1976), para lo cual se agregaron 100 µl de la fracción proteica a analizar, 860 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad) y 40 µl de agua, se homogenizó esta mezcla y se incubó por 5 min, posteriormente se leyó la



absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de UV-visible. La curva de calibración se realizó con albumina sérica bovina (0-100 mg/l).

#### 6.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron con sus respectivas réplicas, las medias de los resultados fueron analizadas mediante ANOVA ( $p < 0.05$ ) y se utilizó el programa Statgraphics Plus version 5.1 para determinar las diferencias significativas entre las medias individuales usando la prueba de Tukey.

## 7. RESULTADOS

El AE de *L. edodes* con una concentración de 57.4 mg/l de proteína mostró inhibición bacteriana formando halos de 0.90 y 1.10 cm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. El control positivo realizado con gentamicina en una concentración de 50 mg/l formó un halo de inhibición de 3.2 y 2.75 cm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. En la primera etapa de purificación, el AE fue separado por punto isoelectrico, obteniendo 20 fracciones proteicas, las cuales presentaron una variación en pH desde 3 hasta 9. Las fracciones 2 a 5, cuyos puntos isoelectricos se presentaron a un pH de 3-4 mostraron actividad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus* con halos de inhibición desde 0.73 hasta 1.17 cm.

Se encontró una diferencia significativa entre los halos formados para ambas cepas, siendo la fracción F3 la que mayor inhibición bacteriana presentó y las fracciones F2 y F5 las que inhibieron menos el crecimiento de los patógenos. En las demás fracciones no se observaron halos de inhibición para los microorganismos evaluados.

La fracción F3, cuyos halos de inhibición fueron estadísticamente significativos, presentó una concentración proteica de 17.2 mg/l y formó halos de inhibición de 1.10 y 1.17 cm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, observándose un incremento en el halo de inhibición formado en comparación con el AE. En la Tabla 20 se pueden observar los resultados obtenidos. Esta fracción fue seleccionada para continuar con la segunda etapa del proceso de purificación de la proteína antimicrobiana.

De la segunda etapa de purificación, realizada por intercambio iónico, se colectaron 36 fracciones y en el cromatograma se observó un pico nombrado como P1 con aproximadamente 0.3 unidades de absorbancia, este pico fue obtenido dentro de los primeros 10 minutos de elución. En el tiempo restante de la corrida se observaron diversos picos los cuales no presentaron una buena separación, presentando una absorbancia máxima de 0.13 unidades (Figura 10).

\*Media  $\pm$  desviación estándar. (-) Sin actividad antimicrobiana. Letras diferentes indican una diferencia significativa, comparación entre filas ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

Zonas de inhibición (cm)		pH		No. de fracción
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>			
-	-	3.0	F1	
0.73 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.03* <sup>a</sup>	3.5	F2	
1.10 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.17 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	4.0	F3	
0.89 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.10 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	4.0	F4	
0.75 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	4.5	F5	
-	-	4.5	F6	
-	-	4.5	F7	
-	-	4.5	F8	
-	-	4.5	F9	
-	-	5.0	F10	
-	-	5.0	F11	
-	-	5.5	F12	
-	-	5.5	F13	
-	-	6.0	F14	
-	-	6.5	F15	
-	-	7.0	F16	
-	-	8.0	F17	
-	-	8.0	F18	
-	-	9.0	F19	
-	-	9.0	F20	

Tabla 20. Actividad antimicrobiana en la primera etapa de purificación.

Como es de notarse, el halo de inhibición formado en esta etapa de purificación fue superior al formado por el AE y la fracción F3. En este ensayo no se encontró una diferencia significativa entre los halos formados para ambas cepas patógenas; sin embargo, la tracción colectada en el

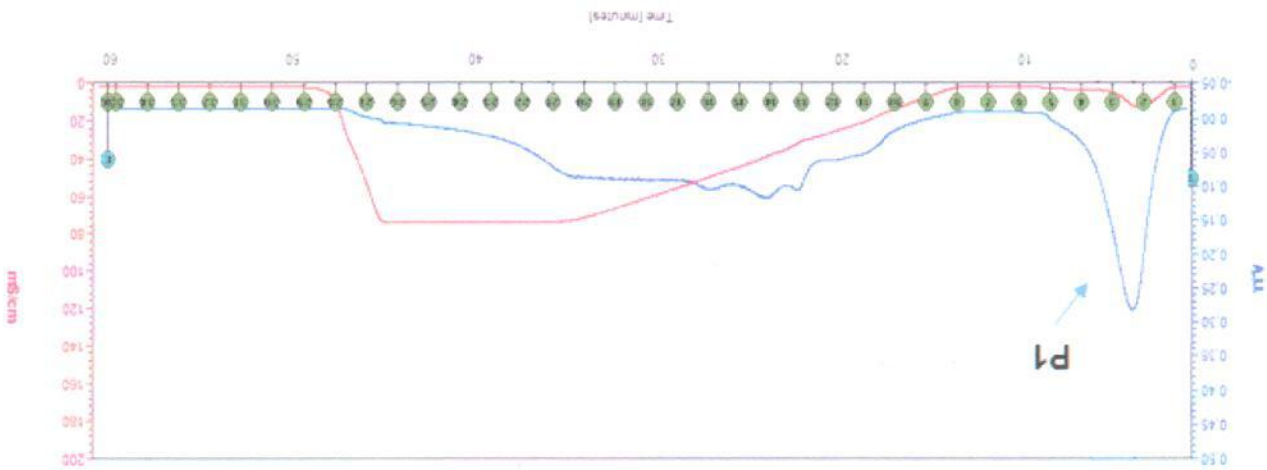
\*Media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican una diferencia significativa, comparación entre filas ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

Halos de inhibición (cm)		No. de fracción	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
P0	2.20 $\pm$ 0.14* <sup>a</sup>	1.85 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
P1	2.53 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>		

Tabla 21. Actividad antimicrobiana en la segunda etapa de purificación.

De las 36 fracciones obtenidas de la segunda etapa de purificación solo las fracciones colectadas en el segundo (P0) y tercer (P1) tubo, presentaron inhibición bacteriana con halos de 1.85 hasta 2.53 cm (Tabla 21).

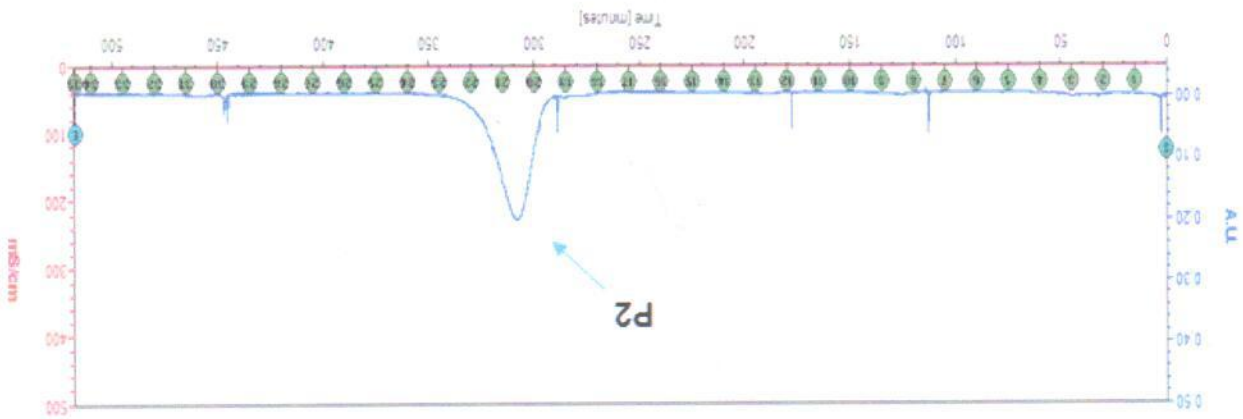
Figura 10. Cromatograma de la segunda etapa de purificación. Línea azul: muestra eluida. Línea roja: gradiente de NaCl.



En la Tabla 22 se resumen los halos de inhibición encontrados en cada etapa de purificación, donde se puede observar que los halos de inhibición se fueron incrementando de 0.90 a 2.48 cm para *E. coli* y de 1.10 a 2.68 cm para *S. aureus*, logrando con esto un aumento de actividad antimicrobiana de 275 y 243 %, respectivamente. Aunado a esto, no se encontró

inhibición encontrados no presentaron diferencias significativas entre ambas cepas. De todas las fracciones colectadas sólo la del tubo 20, nombrada como P2 presentó actividad antimicrobiana formando halos de inhibición de  $2.48 \pm 0.03$  y  $2.68 \pm 0.04$  cm para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente con una concentración de proteína de 9.69 mg/l. Los halos de

Figura 11. Electroferograma de la tercera etapa de purificación. Línea azul: muestra eluida. Línea roja: gradiente de NaCl.



P1 presentó un mayor promedio en los halos medidos, por lo cual fue seleccionada para el siguiente paso de purificación, la fracción P1 presentó un contenido de proteína de 10.08 mg/l. Finalmente, en la tercera etapa de purificación, llevada a cabo por pesos moleculares, se obtuvieron 35 fracciones, observándose un único pico llamado P2, el cual se obtuvo en el tiempo de elución de 290 al 330 min con una absorbancia de 0.20 (Figura 11).

diferencia significativa en el halo de inhibición formado por la fracción P2 y el control positivo para la cepa de *S. aureus*. Para la cepa de *E. coli* si se observaron diferencias estadísticas entre el control positivo y la proteína purificada.

**Tabla 22.** Actividad antimicrobiana en cada paso de la purificación.

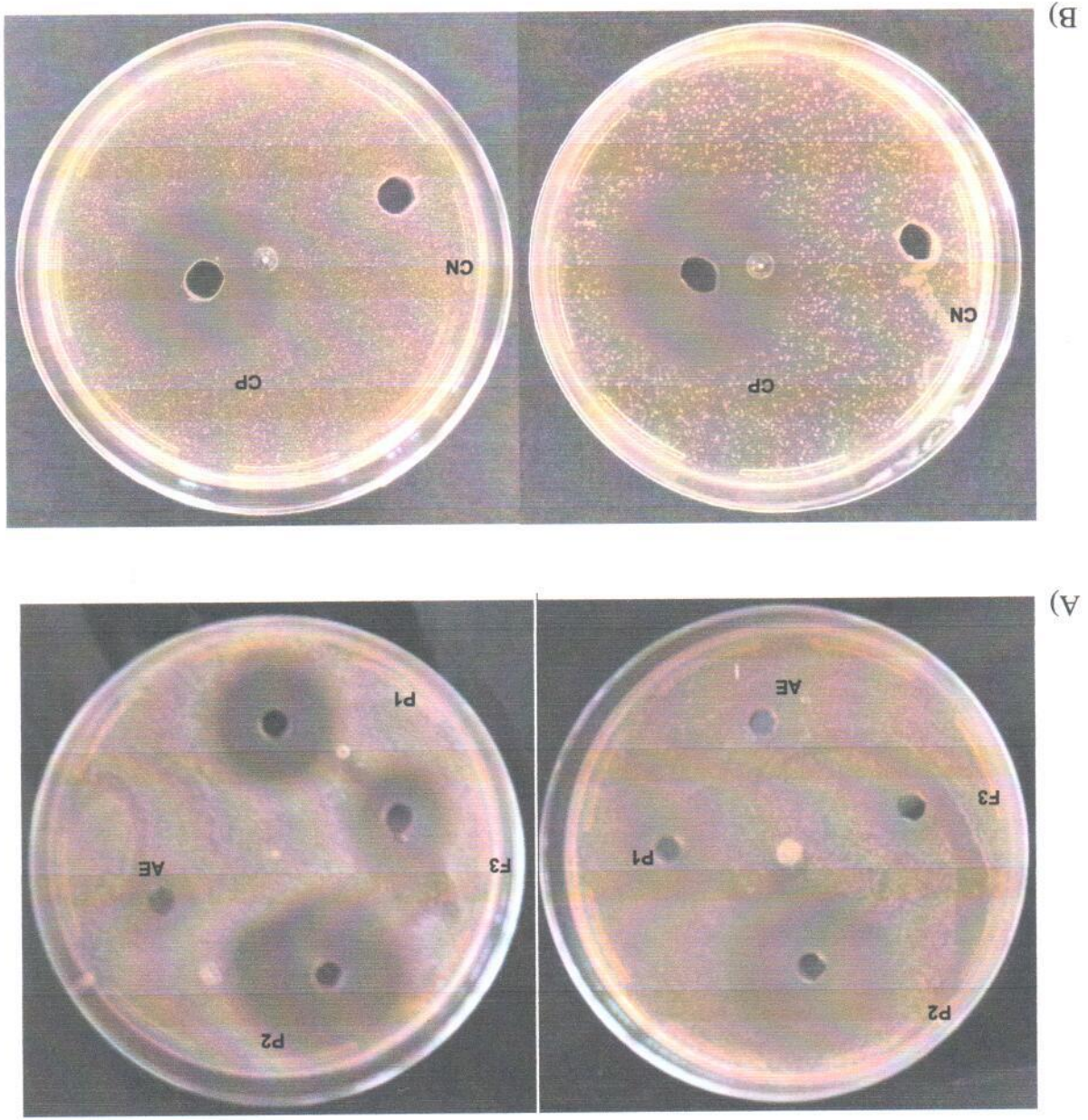
Etapa de purificación	Halos de inhibición (cm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
AE	1.10 ± 0.10*	0.90 ± 0.10
F3	1.17 ± 0.06	1.10 ± 0.00
P1	2.53 ± 0.04	2.00 ± 0.00
P2	2.68 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.48 ± 0.03 <sup>b</sup>
Gentamicina	2.75 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.20 ± 0.11 <sup>a</sup>
Control negativo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.0

\*Media ± desviación estándar. Letras diferentes indican una diferencia significativa, comparación entre columnas ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

En la Figura 12 se muestran los halos de inhibición formados en las cajas Petri conteniendo a las bacterias patógenas de *E. coli* y *S. aureus* y el control positivo y negativo.

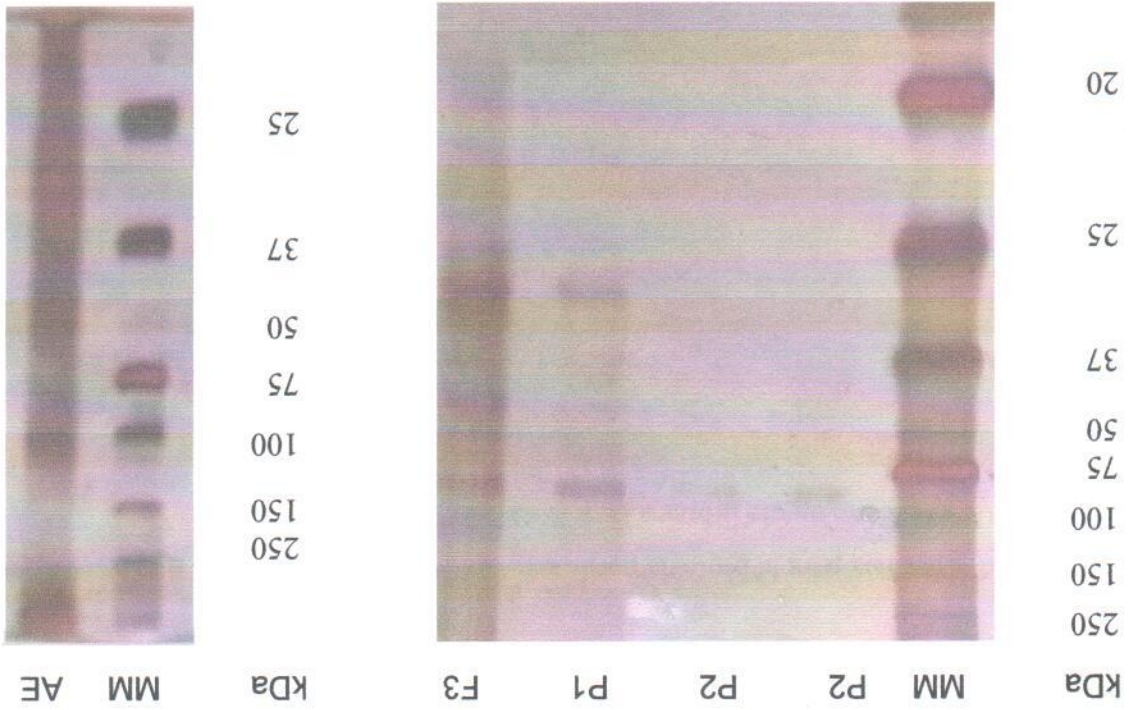
Los pesos moleculares fueron determinados en cada etapa de purificación por medio de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). En la Figura 13 se pueden observar las bandas obtenidas en el

Figura 12. Halos de inhibición de *E. coli* (izquierda) y *S. aureus* (derecha). A) Extracto crudo (AE) y las fracciones obtenidas por su separación por punto isoelectrico (F3), intercambio iónico (P1) y peso molecular (P2). B) Halos de inhibición de gentamicina (CP) y negativo (CN).



En la Tabla 23, se muestra la actividad específica en cada etapa de la purificación, resaltando que se logró concentrar la proteína 16.3 y 14.2 veces para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

**Figura. 13:** SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en cada etapa de purificación. Marcador de peso molecular (MM), separación por peso molecular (P2), intercambio iónico (P1), punto isoelectrico (F3) y extracto acuoso (AE).



AE, haciéndose notar una gran cantidad de proteínas que varían en el peso molecular desde 25 hasta los 250 kDa. Para la primera etapa de purificación, la fracción F3 presentó al menos 6 bandas con pesos moleculares de 26-116 kDa, en la segunda etapa de purificación, el pico P1 presentó tres bandas con un peso de 87.2, 32.2 y 26.2 kDa y finalmente en la última etapa de purificación el pico P2 presentó una sola banda de 87.2 kDa.



Tabla 23. Concentración de proteína soluble y actividad específica en cada paso de la purificación.

Etapa de purificación	Proteína soluble (mg/l)	Actividad antimicrobiana (cm)		Actividad específica (cm/mg proteína)		Factor de purificación	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
AE	57.40	0.90 ± 0.10	1.10 ± 0.10	0.02	0.02	1	1
F3	17.20	1.1 ± 0.00	1.17 ± 0.06	0.06	0.07	4.0	3.5
P1	10.08	2.00 ± 0.00	2.53 ± 0.04	0.20	0.25	12.6	13.1
P2	9.69	2.48 ± 0.03	2.68 ± 0.04	0.26	0.28	16.3	14.2

La actividad específica para la proteína purificada fue de 0.02 a 0.26 cm/mg de proteína para *E. coli* y de 0.02 a 0.28 cm/mg de proteína para *S. aureus*.

## 8. DISCUSIONES

Varios extractos realizados con basidiomicetos han sido investigados por su actividad antimicrobiana, algunos de ellos son los de Akuz y cols. (2010) quienes evaluaron extractos alcohólicos de *A. bisporus* y *P. eryngii* y observaron la formación de halos de inhibición para *E. coli* y *S. aureus* de 0.75-0.85 mm. Por su parte, Yamac y Bilgili (2006) elaboraron extractos con etanol y acetona de *Ganoderma carnosum* y *C. geotropa* y encontraron la formación de halos de inhibición para *E. coli* y *S. aureus* de > 10 mm, resultados que son superados usando un extracto acuoso tal como se hizo en este trabajo, lo cual indica que *L. edodes* puede tener mayor actividad antimicrobiana que otros hongos.

Cabe resaltar que la polaridad del disolvente usado en el extracto es crucial para obtener una mayor o menor actividad antimicrobiana y por lo tanto la naturaleza de las moléculas obtenidas, ejemplo de esto es el reporte de Hearst y cols. (2010) quienes elaboraron extractos proteicos de *L. edodes* usando un kit de extracción proteica y no encontraron halos de inhibición para bacterias Gram positivas y negativas, sin embargo, en otros reportes como el de Hearst y cols. (2009) se evaluó un extracto acuoso de *L. edodes* y se encontró la formación de halos de inhibición similares a los hallados en este trabajo. El extracto acuoso elaborado en el presente trabajo a partir de los cuerpos fructíferos de *L. edodes*, resultó efectivo para inhibir a los patógenos evaluados.

Si bien muchos trabajos han evaluado la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos provenientes de basidiomicetos, pocos trabajos han realizado la purificación de proteínas con actividad antimicrobiana, excepción de ello es el reporte de Tehrani y cols. (2012) quienes purificaron una proteína de 22.5 kDa de *A. bisporus* efectiva para *E. coli*, *S. aureus* y otras bacterias, aunado a este reporte está el de Zheng y cols. (2010) quienes encontraron una proteína de *C. sinopica* con actividad antimicrobiana para *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *X. oryzae* y *X. malvacearum*, pero no resultó efectiva para *E. coli* y *S. aureus*. En la mayoría de trabajos sólo se reporta la actividad antifúngica de las proteínas purificadas de los

Para el hongo *L. edodes*, Ngai y Ng (2003) reportaron la purificación de un péptido antimicrobiano de 27,5 kDa llamado lentin efectivo contra *P. piricola*, *B. cinerea* y *M. arachidicola*, siguiendo un protocolo de purificación similar al mencionado arriba, sin embargo, no se ha evaluado su actividad de este compuesto contra bacterias Gram positivas y negativas. Es importante mencionar que no existe reporte alguno sobre la purificación de una proteína antimicrobiana proveniente de *L. edodes* y tampoco se ha evaluado la técnica de isoelectrofoque, cromatografía de intercambio iónico y separación por peso molecular para su purificación, por lo cual, en este trabajo se encontró una nueva forma de purificar una proteína no reportada con actividad antimicrobiana y proveniente de *L. edodes*.

El protocolo frecuentemente usado para la purificación de proteínas con actividad antimicrobiana, antifúngica o antiviral incluye la cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y filtración en gel. Ejemplo de reportes que usan esta metodología de purificación es el trabajo de Wang y Ng (2004) quienes purificaron una molécula de 28 kDa llamada alveolarina del hongo *P. alveolaris* con actividad para *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *M. arachidicola* y *P. piricola*. Aunado a esto, Wang y Ng (2004) purificaron un péptido antifúngico de 14,4 kDa llamado eryngin de una cepa de *P. eryngii* efectivo contra *F. oxysporum* y *M. arachidicola*. Por su parte, Chu y cols. (2005) purificaron una molécula de 7 kDa de *P. ostryatus* con actividad para *F. oxysporum*, *M. arachidicola* y *P. piricola* y Guo y cols. (2005) purificaron una proteína de *Tricholoma giganteum* con actividad para *F. oxysporum*, *M. arachidicola* y *P. piricola*, todos ellos usando una metodología de purificación de proteínas similar. En este trabajo se realizó la purificación proteica con una metodología diferente a la ya reportada.

hongos y en algunos casos las moléculas carecen de actividad antimicrobiana o no se ha evaluado, tal como lo reportaron Ngai y Ng (2003) para un compuesto peptídico purificado, el cual es efectivo contra otros hongos pero se desconoce si es efectivo contra bacterias, lo que deja ver que la bibliografía relacionada con los péptidos y proteínas antimicrobianas es escasa (Zheng y cols. 2010). En este trabajo se demuestra que *L. edodes* tiene una proteína con actividad contra bacterias patógenas.

## 9. CONCLUSIONES

El cuerpo fructífero de *L. edodes* contiene una proteína de 87.2 kDa, la cual se logró purificar con una metodología de tres etapas: isoelectroenfoque, intercambio iónico y electroforesis preparativa. Tal molécula presenta actividad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus*.

## 10. PERSPECTIVAS

La proteína purificada se podría caracterizar determinando a que pH, temperatura, punto isoelectrico y estabilidad a iones mantiene su actividad antimicrobiana. Aunado determinar si contiene modificaciones post-traduccionales. Por otra parte, se podría realizar la secuenciación de aminoácidos que conforman a la proteína y verificar si coincide con alguna proteína antimicrobiana reportada en otro organismo.

Se podría obtener el RNAm y su correspondiente DNAc con el fin de hacer una transformación en un sistema heterólogo para la producción de la proteína en menor tiempo y mayor concentración.

Aida FMNA, Shuhanni M, Yazid M y Maaruf AG. 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends Food Sci Tech 20(11): 567-575.

Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Nakamura R, Hayashi S, Kodama D, Kawase M y Yagi K. 2004. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biol Pharm Bull 27: 1957-60.

Akyuz M y Kirbag S. 2009. Antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* grown on various agro-wastes. EurAsia J BioSci 3: 58-63.

Anke T, Kupka J, Schramm G y Steglich W. 1980. Antibiotics from basidiomycetes. X. Scordomin, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorodominus* (Fr.) Fr. J antibiot 33(5): 463-467.

Arenas R. 2003. Micología médica ilustrada. León JF, Romero GA, Rivera B, Rocha A y Salas A (eds). Editorial McGraw Hill México. pp 368

Aumeeruddy-Elalfi Z, Gurib-Fakim A y Mahomoodally F. 2015. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. Industrial Crops and Products 71: 197-204.

Baker CJ. 2009. Red book: atlas de enfermedades infecciosas en pediatría (No. 616.9-053.2). Baker (Ed). Editorial Médica Panamericana. Barcelona.

Benavides-Plascencia L, Aldama-Ojeda AL y Vázquez HJ. 2005. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. Salud Pública de México 47(3): 219-226.

Bender S, Dumitrache-Anghel CN, Backhaus J, Christie G, Cross RF, Lonergan GT y Baker WL. 2003. A case for caution in assessing the antibiotic activity of extracts of culinary-medicinal Shiitake mushroom [*Lentinus edodes* (Berk.) Singer](Agaricomycetidae). Int J Med Mushrooms 5(1).

Benedict RG y Brady LR. 1972. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. J Pharm Sci 61: 1820-1822.

Berg JM, Stryer L y Tymoczko JL. 2007. Bioquímica. Editorial Reverte SA. España

Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS y Prasad GBKS. 2010. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. Curr Med Chem 17(22): 2419-2430.

## 11. REFERENCIAS

- Blackwell M. 2011. The Fungit: 1, 2, 3... 5.1 million species? *Am J Bot* 98(3): 426-438.
- Bohn JA y BeMiller JN. 1995. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 28(1): 3-14.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brantner A y Grein E. 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 44(1): 35-40.
- Brizuela MA, García L, Pérez L y Mansur M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol* 15: 69-74.
- Campbell NA y Reece JB. 2007. Biología. Editorial Médica Panamericana. California
- Canale-Guerrero A, Chombo-Morales P, Soto-Velazco C, Sigüenza-López R y Feria-Velasco AI. 2012. Biosíntesis de tetraciclinas. *e-Gnosis* 10:1-10.
- Casaril KBPB, Kasuya MCM y Vanetti MCD. 2011. Antimicrobial activity and mineral composition of shiitake mushrooms cultivated on agricultural waste. *Braz Arch Biol Technol* 54(5): 991-1002.
- Cassleton LA. 1995. Genetics of *Coprinus*. En *The mycota II Genetics and Biotechnology*. Editorial Springer Berlin Heidelberg. UK. pp. 36
- Castañeda-Casimiro J, Ortega-Roque JA, Venegas-Medina AM, Aquino-Andrade A, Serafin-López J, Estrada-Parra S y Estrada I. 2009. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alerg Asma Immunol Pediatr* 18(1): 16-29.
- Castro, A. M. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas*. Editorial El Manual Moderno.
- Chien RC, Yen MT y Mau JL. 2016. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym* 138: 259-264.
- Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T y Fukunoka F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* 222: 687-688.
- Chin J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles. *Chin J y Ascher MS* (eds). Editorial Pan American Health Organization. Washington. pp 288

- Chu KT, Xia L y Ng TB. 2005. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* 26: 2098-2103.
- Collin CH y Line PM. 2012. Antimicrobial susceptibility test in Microbiological Methods. Collin CH, Lyne PM, Grange JM y Falkinham III JO (eds). Editorial Arnold. London. pp 168.
- Correa RCG, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM y Ferreira I C. 2016. Biotecnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends Food Sci Technol* 50: 103-117.
- Cruz A. 2001. Antibióticos naturales. Editorial Selector. México.
- Das N, Pasman B, Mishra S, Bhattacharya B y Sengupta C. 2012 Comparative studies of antibacterial properties of three *Pleurotus* species (Oyster Mushroom). *Nature Sci* 10: 178-183.
- Dathe M y Wieprecht T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *BBA Biomem* 1462(1): 71-87.
- Detlefsen T y Dahlke R. 2000. La enfermedad como camino. Un método para el descubrimiento profundo de las enfermedades. Editorial Debolsillo. Barcelona.
- Dharmaraj K, Kuberan T y Mahalakshmi R. 2014. Comparison of Nutrient Contents and Antimicrobial Properties of *Pleurotus djamor*, *Agaricus bisporus* and *Ganoderma tsugae*. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3(6): 518-526.
- Dornberger K, Lich H y Zureck A. 1989. Antibiotics from basidiomycetes. The 4-hydroxybenzenediazonium ion, an antimicrobial, cytotoxic and antineoplastic metabolite from the basidiomycete *Agaricus xanthodermus* (Agaricales). *Prog Ind Microbiol* 27: 67-77.
- Dreser A, Witz VJ, Corbett KK y Echaniz G. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México* 50: S480-S487.
- Enman J, Rova U y Berglund KA. 2007. Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J Agr Food Chem* 55(4): 1177-1180.
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L y Hoffmann JA. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci* 93(3): 1221-1225.

- Frimundy TC, Gambato G, Fontana R, Camassola M, Salvador M, Moura S y Roesch-Ely M. 2013. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutr Res* 33(1): 76-84.
- Fitzpatrick TB. 2009. *Dermatología en medicina general*. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS y Leffell DJ (eds). Editorial Médica Panamericana. España. pp 1819.
- Fogaça AC, Da Silva PI, Miranda MTM, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE y Daffre S. 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 274(36): 25330-25334.
- Freyre LB. 1997. Introducción al estudio de la micología. Lura MCC, González AM, Basílico JC, Sarsotti PVF, Gómez RG, Freyre LB (eds). Editorial Universidad Nacional del Litoral. Argentina. pp 63.
- Gbolagade J, Kigigha L y Ohimain L. 2007. Antagonistic effect of extracts of some Nigerian higher fungi against selected pathogenic microorganisms. *J Agric Environ Sci* 2(4): 364-368.
- González LC. 1989. Introducción a la Fitopatología. Editorial IICA/CATIE. Costa Rica.
- Grenier J, Potvin C y Asselin A. 2000. Some fungi express  $\beta$ -1, 3-glucanases similar to thaumatin-like proteins. *Mycologia* 92(5): 841-848.
- Guo Y, Wang H y Ng TB. 2005. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 26(4): 575-580.
- Guo YX, Wang HX y Ng TB. 2005. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 26(4): 575-80.
- Gupta D, Dubey J y Kumar M. 2016. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. *Asian Pac J Trop Dis* 6(1): 15-20.
- Habbu P, Warad V, Shastri R, Madagundi S y Kulkarni VH. 2016. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chin J Nat Med* 14 (2): 101-116.
- Hancock REW y Chaple SD. 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Ch* 43(6): 1317.
- Hancock REW, Falla T y Brown MH. 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv Microb Physiol* 37: 135-175.
- Hartig U, Anke T, Scherer A y Steglich W. 1990. Leaiananulvene, a sesquiterpenoid fulvene derivative from cultures of *Mycena leaiana*. *Phytochemistry* 29(12): 3942-3944.



Hatvani N. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int J Antimicrob Agents* 17(1): 71-74.

Hazen EL y Brown RF. 1957. U.S. Patent No. 2,797,183. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Hearst M, Nelson D, McCollum G, Ballard LM, Millar BC, Moore S y Rao JR. 2010. Antibacterial properties of protein extracts from wild mushroom fungi and native plant species against hospital pathogens. *J Pharmacognosy Phytother* 2(8): 103-107.

Hearst R, Nelson DWVA, McCollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Rao JR, y Moore JE. 2009. An examination of the antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Compl Ther Clin Pract* 15(1): 5-7.

Heleno SA, Ferreira RC, Antonio AL, Queiroz MJR, Barros L y Ferreira IC. 2015. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Biosc* 11: 48-55.

Hilber O. 1982. Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer: unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii*-*Formenkomplexes* *Bibl Mycol* 87: 23-24

Ibarra FJO, Méndez IM, Acevedo AG, Figueroa JR, Benítez A, Velasco JA y Lerma D L. 2009. El reto de la resistencia bacteriana en México: los beneficios de contar con una nueva alternativa de manejo antimicrobiano eficaz. *Med Int Mex* 25(5): 361-371.

Ishikawa NK, Kasuya MCM, Vanetti MCD. 2001. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Braz. J. Microbiol* 32: 206-210.

Iwalokun BA, Usen UA, Otunba AA y Olukoya DK. 2007. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *Afr J Biotechnol* 6(15):1732-1739.

Kalac P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem* 113(1): 9-16.

Katzung BG. 2013. *Farmacología básica y clínica*. Katzung BG, Masters SB y Trevor AJ (eds). Editorial Mcgraw-hill. Buenos Aires. pp 790.

Kaushal A, Gupta K y Van Hoek ML. 2016. Characterization of *Cimex lectularius* (bedbug) defensin peptide and its antimicrobial activity against human skin microflora. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 955-960.

- Kitzberger CSG, Smania A, Pedrosa RC y Ferreira SRS. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *J Food Eng* 80(2): 631-638.
- Klein J, Anke T, Sheldrick WS, Bross M, Steffan B y Steglich W. 1990. Fulvoferruginin, a Carotane Antibiotic from *Marasmius fulvoferrugineus* Gilliam [1]. *Z Naturforsch C* 45(7-8): 845-850.
- Komemushi S, Yamamoto Y y Fujita TT. 1996. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. *J Antibact Antifung Agents*. 24(1): 21-25.
- Kusuma IW, Arung ET y Kim YU. 2014. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science Human Wellness* 3(3): 191-196.
- Lacadena J, Martinez del Pozo A, Gasset M, Campos-Olivas R, Vazquez C, Martinez-Ruiz A y Manchego JM, Onaderra M y Gavilanes JG. 1995. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch Biochem Biophys* 324:273-81.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam SK y Ng TB. 2001. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lycophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Arch Biochem Biophys* 393: 271-280.
- Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookhart G, Bushey D, Hoffmann JA y Bulet P. 1999. Insect Immunity isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J Biol Chem* 274(14): 9320-9326.
- Leaes FL, Velho RV, Caldas DGG, Ritter AC, Tsai SM y Brandelli A. 2015. Expression of essential genes for biosynthesis of antimicrobial peptides of *Bacillus* is modulated by inactivated cells of target microorganisms. *Res Microbiol* 167: 83-89.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL y Darnell J. 2005. *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. EU.
- Longvah T y Deosthale YG. 1998. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chem* 63(3), 331-334.
- Lowenberger C, Charlet M, Vizoli J, Kamal S, Richman A, Christensen BM y Bulet P. 1999. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 274(29): 20092-20097.

Maftoun P, Johari H, Soltani M, Malik R, Othman NZ y El Enshasy HA. 2015. The edible mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and nutritional values. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 4: 67-83.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT y Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(3): 268-281.

Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, y Dolin R. 2002. *Enfermedades infecciosas: principios y práctica*. Editorial Elsevier. España.

Marquez DM, Galeano E y Martinez A. 2009. Productos naturales con actividad antimicrobiana. *Parte II. Vitae* 11(1): 35-41.

Martinez-Carrera D, Morales P, Sobal M, Bonilla M y Martinez W. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. *En: el Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Sánchez JE, Martínez-Carrera D, Mata G y Leal H (Eds.). Editorial ECOSUR-CONACYT. México DF. pp 20.

Meng TX, Ishikawa H, Shimizu K, Ohga S y Kondo R. 2012. A glucosylceramide with antimicrobial activity from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *J Wood Sci* 58(1): 81-86.

Menikpurage IP, Abeytunga DTU, Jacobsen NE y Wijesundara RLC. 2009. An oxidized ergosterol from *Pleurotus cystidiosus* active against anthracnose causing *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycopathologia* 167(3): 155-162.

Money NP. 2016. Are mushrooms medicinal? *Fungal Biol* 120 (4): 449-453

Munuswamy H, Thirunavukkarasu T, Rajamani S, Elumalai EK y Ernest D. 2013. A review on antimicrobial efficacy of some traditional medicinal plants in Tamilnadu. *J Acute Dis* 2(2): 99-105.

Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología médica*. Elsevier Brasil.

Nehra K, Mukesh MK y Yadav A. 2012. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Int J. Microbial Res Technol* 4: 2278-3822.

Netshiluvhi TR y Eloff JN. 2016. Effect of water stress on antimicrobial activity of selected medicinal plant species. *S Afr J Bot* 102: 202-207.

Ngai PH y Ng TB. 2003. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sci* 73(26): 3363-3374.

OPS. 1995. Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud: décima revisión: CIE-10. Pan American Health Org.  
OPS. (2004). Guía para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Ouzouni PK, Petridis D, Koller WD y Riganakos KA. 2009. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chem* 115(4): 1575-1580.

Pastor-Sánchez R. 2006. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. *Gac Sanit* 20: 175-181.

Parachin NS, Mulder KC, Viana AAB, Dias SC y Franco OL. 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38(2): 446-456.

Patel Y, Narayan R y Singh VK. 2012. Medicinal properties of *Pleurotus* species (Oyster mushroom): A review. *World Journal of Fungal and Plant Biology* 3(1): 1-12.

Peralta M, Roa C, Pines PJ, Anton T, Peñalver D y Alvarez-Santirso R. 2006. Tiroiditis aguda causada por *Escherichia coli*. *Endocrinol Nutr* 53(1): 53-55.

Prats G. 2005. Microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. Argentina

Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R y Tsutsumi V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública Mex* 48(1): 62-71.

Rivera LEC, Ramos AP y Desgarennes CP. 2007. Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Rev Mex* 51: 57-67.

Rodríguez-Noriega E, León-Garnica G, Petersen-Morfin S, Pérez-Gómez H, González-Díaz E y Morfin-Otero R. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomedica* 34: 181-190.

Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA y Jordan MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hymenalis* essential oils. *Food control* 19(7): 681-687.

Sadava D, Heller C, Orians G y Hillis BPYD. 2009. Vida, la ciencia de la Biología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

- Saskiawan I. (2009). Exopolysaccharide production and its bioactives of the edible *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. *Biotropia* 16: 96-104.
- Sejva V y Vignoli R. 2006. Principales grupos de antibióticos. En bacteriología y virología médica. Editorial Médica Panamericana. Uruguay
- Skoog DA, Holler FJ y Crouch SR. 2008. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Cengage learning. México
- Stein T, Vater J, Kruff V, Otto A, Wittmann-Liebold B, Franke P, Panico M, McDowell R y Morris HR. 1996. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzyme templates. *J Biol Chem* 271: 15428-15435.
- Stark A y Anke T. 1991. Omphalone, an antibiologically active benzoguinone derivative from fermentations of *Leptinellus omphalodes*. *Z Naturforsch C* 46(11-12): 989-992.
- Stanier RY y Villanueva JR. 1996. Microbiología. Editorial Reverte. Barcelona
- Sternor O, Anke T, Sheldrick WS y Steglich W. 1990. New sterpurne and isolactarane sesquiterpenes from the fungus *Merrillius tremellosus*. *Tetrahedron* 46(7): 2389-2400.
- Suseem SR y Saral MA. 2013. Analysis on essential fatty acid esters of mushroom *Pleurotus* *ous* and its antibacterial activity. *Asian J Pharm Clin Res* 6(1): 188-191.
- Suzuki H, Okubo A, Yamazaki S, Suzuki K, Mitsuya H, y Toda S. 1989. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Leptinellus edodes* mycelia (LEM). *Biochem Biophys Res Commun* 60: 367-73.
- Takahashi A, Kusano G, Ohta T y Nozoe S. 1988. The constituents of *Lactarius flavidulus* Imai. *Chem Pharm Bulletin* 36(7): 2366-2370.
- Tam SC, Yip KP, Fund KP y Chang ST. 1986. Hypotensive and renal effect of an extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Life Sci* 38: 1155-1161.
- Tehrani MHH, Fakhrehosseini E, Nejad MK, Mehregan H y Hakemi-Vala M. 2012. Search for Proteins in the Liquid Extract of Edible Mushroom, *Agaricus bisporus*, and Studying their Antibacterial Effects. *Iran J Pharm Res* 11(1): 145-150.
- Tonarelli G y Simonetta A. 2014. Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *FABICIB* 17: 137-177.

Tortora GJ, Funke BR y Case CL. 2007. Introduccion a la Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Argentina

Tossi A y Sandri L. 2002. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr Pharm Design* 8(9): 743-761.

Toyota M y Hostettmann K. 1990. Antifungal diterpenic esters from the mushroom *Boletinus caevipes*. *Phytochemistry* 29(5): 1485-1489.

Vamannu E, Mihaela ENE, Vamannu A, Pelinescu D, Sultana NIT y Barcari V. 2011. Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Pleurotus ostreatus* KM2191 and PQMZ91109. *Bulletin UASVM. Animal Science and Biotechnologies* 68(1-2):381-388.

Valety-Marguez FJ, Siciliano-Sabalera L y López-García MG. 2007. Manual de antibióticos en pediatría. Editorial Panamericana. Venezuela.

Wang H y Ng T.B., Liu Q. 2004. Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolatus*. *Peptides* 25: 693-696.

Wang H y Ng T.B. 2004. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25(1): 1-5.

Wang H y Ng T.B. 2006. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27: 27-30.

Wang XM, Zhang J, Wu LH, Zhao YL, Li T, Li JQ, Wang YZ y Liu HG. (2014). A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown. *Food Chem* 151: 279-285.

Wang GL y Lin ZB. 1996. The immunomodulatory effect of lentinan. *Yao Xue Bao* 31(2): 86-90.

Wasser SP. 2005b. Shiitake (*Lentinus edodes*). In: *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Coates PM, Blackman MR, Gordon MC, Levine M, Moss J y White JD (eds). Editorial Marcel Dekker. NY. pp 653-664.

Wasser SP y Weiss AL. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushrooms* 1: 31-62.

Wu M, Maier E, Benz R y Hancock RE. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38: 7235-7242.

Xu J, Xu Y, Wang H, Guo C, Qiu H, He Y, Zhang Y, Li X y Meng W. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere* 119: 1379-1385.

Yan SUN, Yufeng WANG, Hongyan CHEN, Xingming SHI, Mei WANG, Tingting HUANG, Peung SUN y Guihua YANG. 2011. Advances in Antimicrobial Peptides and Expression Strategy. *J Northeast Agric Univ* 18(1): 85-90.

Yamac M y Bilgili F. 2006. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharm Biol* 44(9): 660-667.

Zhang Y, Li Q, Shu Y, Wang H, Zheng Z, Wang J y Wang K. 2015. Induction of apoptosis in S180 tumour bearing mice by polysaccharide from *Lentinus edodes* via mitochondria apoptotic pathway. *J Func Foods* 15: 151-159.

Zhang J, Yang Y, Teng D, Tian Z, Wang S y Wang J. 2011. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphylococcus* and *Streptococcus*. *Protein Express Purif* 78(2): 189-196.

Zheng S, Liu Q, Zhang G, Wang H y Ng TB. 2010. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Citricybe sinopica*. *Acta Biochim Pol* 57(1): 43-48.



Website: [www.jeb.co.in](http://www.jeb.co.in)  
E-mail: [editor@jeb.co.in](mailto:editor@jeb.co.in)

Journal of Environmental Biology

ISSN: 0254-4704 (Print)  
ISSN: 2394-0379 (Online)  
CODEN: JEBO



## Antimicrobial activity of a protein obtained from fruiting body of *Leptinula edodes* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Lilia Sánchez-Minutti<sup>1,2</sup>, Maura Téllez-Téllez<sup>1,3</sup>, Sauli Tlecutli-Beristain<sup>1</sup>, Gerardo Santos-López<sup>1</sup>, Ruben Diaz<sup>2</sup>, Vijai Kumar Gupta<sup>4</sup>, Gerardo Diaz-Godínez<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate of Biological Sciences, Autonomous University of Tlaxcala, Tlaxcala, 90000, México

<sup>2</sup>Laboratory of Biotechnology, Research Center for Biological Sciences, Autonomous University of Tlaxcala, Tlaxcala, 90000, México

<sup>3</sup>Biotechnology Laboratory, Polytechnical University of Tlaxcala, Tepeyanco, Tlaxcala, 90180, México

<sup>4</sup>Center for Biological Research, Autonomous University of State of Morelos, Morelos, 62209, México

<sup>5</sup>East Center for Biomedical Research, Mexican Social Security Institute, Puebla, 74360, México

<sup>6</sup>Molecular Glycobiotechnology Group, Discipline of Biochemistry, National University of Ireland Galway, Galway, 12074, Ireland

\*Corresponding Author E-mail: [diazgd@hotmial.com](mailto:diazgd@hotmial.com)

### Publication Info

Paper received: 16 March 2016

Revised received: 14 April 2016

Accepted: 30 April 2016

Antimicrobial activity, *Leptinula edodes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

### Key words

In the present study, a protein extracted from the fruiting body of *Leptinula edodes* showed growth inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. An aqueous extract from the dry fruiting body for purification process was used. This process was carried out in three stages: isoelectric focusing, ion exchange, preparative electrophoresis. The antimicrobial activity was evaluated by diffusion disc technique. The aqueous extract reported a protein concentration of 57.4 mg l<sup>-1</sup> and showed bacterial inhibition zone of 0.90 and 1.10 cm for *E. coli* and *S. aureus*, respectively; the isolated protein (9.69 mg l<sup>-1</sup>) formed bacterial inhibition zone of 2.48 cm for *E. coli* and 2.68 cm for *S. aureus*. This protein with a purification factor of 16 showed molecular weight of 87.2 kDa and specific activity of 28 cm mg<sup>-1</sup>. The isolated protein showed 2.8 and 2.4 times higher antimicrobial inhibition zone than aqueous extract for *E. coli* and *S. aureus*, respectively, and their size was almost equal to that observed with 50 mg l<sup>-1</sup> gentamicin.

### Abstract





Dr. Leonardo Peraza Reyes

Dra. Martha D. Bibbins Martinez

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'L. Peraza'.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Bibbins'.

Atentamente  
Por el Comité Organizador

En la modalidad de cartel durante el XI Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos del 25 al 29 de octubre de 2015 en la ciudad de Puebla, Puebla.

por:  
Lilia Sánchez-Minutti, Maura Téllez-Téllez, Saúl Tecuítl-Berstein,  
Gerardo Santos-López, Rubén Díaz-Godínez, Gerardo Díaz-Godínez

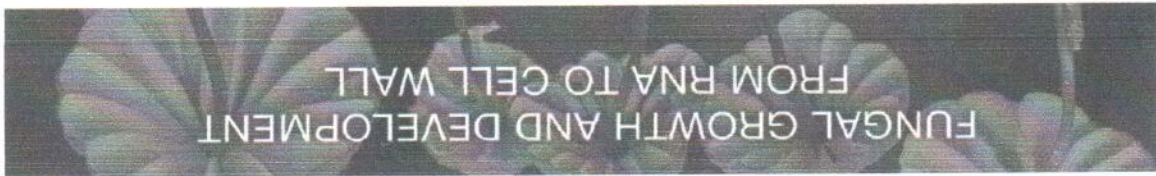
Purification of a protein of *Lentihula edodes* with antimicrobial activity

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Lilia Sánchez Minutti**

CONSTANCIA a:

Se otorga la presente



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL CUERPO FRUCTIFERO  
Y MEDIOS DE CULTIVO PRODUCIDOS POR *Pleurotus ostreatus* Y PERFIL  
PROTEICO**

CIBB-SS-P88

**CIBB 2014**  
II Congreso Internacional de  
Biotecnología y Biodiversidad



Sanchez-Minutti L.<sup>1,2</sup>, Téllez-Telíz M.<sup>2</sup>, Santos-López G.<sup>1</sup>, Trecuill-Berstein S.<sup>3</sup>, Ayerdi I.<sup>1,2</sup>, Diaz-Godínez G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. E-mail: diazgd@hotmail.com

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México.

<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica de Oriente/Instituto Mexicano del Seguro Social CIBIOR, Puebla, México.

<sup>5</sup>Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Enfermedades causadas por bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y la resistencia a antibióticos ha motivado la búsqueda de compuestos bioactivos en diversos organismos. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Se elaboraron 9 medios de cultivo líquido los cuales fueron inoculados con *P. ostreatus* e incubados a 25 °C/360 h. Se analizaron: el sobrenadante, el sobrenadante liofilizado, el sobrenadante extraído con etanol 95 % y con acetona. Por otro lado, primordios y cuerpos fructíferos de diferentes tamaños (1, 2, 2.5, 5 y 10 cm) fueron macerados e extraídos con glicerol, alcohol y agua y por otro lado con etanol al 70 %. La actividad antimicrobiana de cada extracto se evaluó contra *S. aureus* y *E. coli* utilizando la técnica de difusión en disco y el perfil proteico determinado por SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie. Se encontró un halo de inhibición de 1.4±0.3 cm contra *S. aureus* con el liofilizado del medio M7, pudiéndose deber a que este medio contenía micronutrientes como K, B, Co, Mo, Na, entre otros, actuando como cofactores o en la síntesis metabólica de compuestos. El perfil proteico fue similar en todos los medios evaluados, por lo que se sugiere realizar una tinción con plata para determinar diferencias. Los resultados sugieren que *P. ostreatus* produce compuestos con actividad antimicrobiana y los excreta posiblemente como respuesta de defensa ante situaciones de estrés.

**Palabras clave:** *P. ostreatus*, resistencia antibióticos, actividad antimicrobiana

**1er Encuentro Nacional sobre Biotecnología**  
 Universidad Autónoma de Tlaxcala

Otorga la presente  
**CONSTANCIA**  
 A:

Sánchez-Minutti, L., Tecuili-Berristain, S., Santos-López G., García-Barrantos R.,  
 Téllez-Tellez M., Díaz-Godínez, G.

Por la presentación en cartel del trabajo:  
 FRACCIONAMIENTO PROTEICO DE UN EXTRACTO DE LENTÍJULA EDODES CON ACTIVIDAD  
 ANTIMICROBIANA

en el "Primer Encuentro Nacional sobre Biotecnología en la UATX",  
 celebrado en la ciudad de Tlaxcala, México los días 7-10 de diciembre de 2014.

Dr. Berardo Díaz Godínez  
 Líder del Cuerpo Académico  
 de Biotecnología

Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández  
 Presidente del 1er Encuentro Nacional  
 sobre Biotecnología

Dr. Rubén Díaz Godínez  
 Jefe del Laboratorio de Biotecnología

