

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Evaluación de la actividad antifúngica de actinomicetos marinos frente a cepas de *Candida spp.* aisladas de hemocultivos-Lima,2015.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA.

Presentado por la:

Bach. BAUTISTA CARRASCO, Pamela Pilar

Ayacucho-Perú

2016

A Dios, mamá, papá a mis hermanos
y mis sobrinos porque son el motor de
mi vida y sin ellos nada sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A la Tricentennial Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, cuna del saber.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Formación Profesional de Biología y a toda la plana de docentes por sus valiosas enseñanzas y sabios conocimientos que imparten siempre contribuyendo con el desarrollo del pueblo.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos que me acogió en sus instalaciones como si fuera parte de ella.

A mi asesor externo Mg Jorge León Quispe por la oportunidad y por su orientación en la realización de esta tesis, por el tiempo dedicado así por su constante estímulo, sin los cuales este trabajo no se hubiera llevado a cabo.

A mi asesor interno Mg José Alarcón Guerrero no solo por orientarme desde lejos en la tesis sino también por su comprensión y su paciencia.

A mis estimados profesores Dr. Víctor Alegria Valeriano y Mg. Serapio Romero Gavilán por su ejemplo y consejos durante la realización de este trabajo.

A todos mis amigos de Ayacucho y Lima por preocuparse y de alguna manera apoyarme en la realización de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Ecología microbiana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Blgo. Junior Caro, Blgo. Claudia Mateo, Blgo. Nadia Galindo, Blgo. Ulrike Tarazona, Blgo. Jesel Ñañez por haberme brindado su apoyo durante la realización de este trabajo de tesis.

A la Doctora Teresa Zacarías jefa del laboratorio de microbiología de Inspectorate SAC, por su gran apoyo al haberme brindado facilidades en el horario, tiempo valioso que sirvió para poder realizar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Actinomicetos	7
2.2.1. Taxonomía	8
2.2.2. Metabolitos secundarios producidos actinomicetos	8
2.2.3. Hemocultivo	10
2.2.4. Infecciones nosocomiales	10
2.2.5. Fungemia	11
2.2.6. Candidemia	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación de la zona de trabajo	15
3.2. Materiales	15
3.3. Metodología	15
3.3.1. Preparación de los ceparios de actinomicetos	16
3.3.2. Determinación de la actividad antifúngica	16
3.3.3. Extracción del compuesto activo y pruebas de su actividad	17
3.3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	19
3.3.5. Análisis e interpretación de los resultados	20
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad inhibitoria de los Actinomicetos marinos frente a diferentes cepas de <i>Candida spp.</i> por el método de doble capa.	22
Tabla 2. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para <i>Candida spp.</i> (CLSI, 2004)	28
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de actinomicetos marinos frente a levaduras.	29
Tabla 4. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico y diclorometánico del actinomiceto de código BI-IM2 feb15 frente a cepas de <i>Candida spp.</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Medición de diámetros de halos de inhibición de la actividad antifúngica de los extractos.	18
Figura 2.	Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a una cepa patógena de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	23
Figura 3.	Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a una cepa patógena de <i>Candida albicans</i> 7516	24
Figura 4.	Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a una cepa patógena de <i>Candida tropicalis</i> 7206	25
Figura 5.	Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a una cepa patógena de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.	26
Figura 6.	Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a una cepa patógena de <i>Candida parapsilosis</i> 7307	27
Figura 7.	Actividad antimicrobiana de los extractos frente a (1) <i>Candida albicans</i> 7516 y (2) <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	30
Figura 8.	Actividad antimicrobiana de los extractos frente a (1) <i>Candida parapsilosis</i> 7307 y (2) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	31
Figura 9.	Actividad antimicrobiana de los extractos frente a <i>Candida tropicalis</i> 7606.	32
Figura 10.	Media del halo de inhibición de los extractos y el control positivo frente a <i>Candida tropicalis</i> 7206	33
Figura 11.	Media del halo de inhibición de los extractos y el control positivo frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	34
Figura 12.	Media del halo de inhibición de los extractos y el control positivo frente a <i>Candida parapsilosis</i> 7307.	35
Figura 13.	Media del halo de inhibición de los extractos y el control positivo frente a <i>Candida albicans</i> 90028	36

Figura 14.	Media del halo de inhibición de los extractos y el control positivo frente a <i>Candida albicans</i> 7516.	37
Figura 15.	Media del halo de inhibición de las cepas <i>Candida</i> ATCC (referencia) comparado con las medias de halo de inhibición de las cepas de <i>Candida spp</i> de hemocultivos.	38
Figura 16.	Media del halo de inhibición del extracto diclorometánico comparado con el control positivo frente a las cepas patógenas	40

INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Flujograma del método de doble capa, para la selección de los actinomicetos de mejor actividad antifúngica en función al halo	56
Anexo 2. Flujograma de la extracción del compuesto activo	57
Anexo 3. Flujograma de la prueba de su actividad inhibitoria	58
Anexo 4. Cultivos de actinomicetos en agitación (1) actinomiceto en crecimiento antes de la filtración (2) actinomiceto filtrado con la adición del solvente (3) obtención de los extractos en viales	59
Anexo 5. Flujograma de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	60
Anexo 6. Composición de agar y caldo marino	61
Anexo 7. Reactivos utilizados en el estudio.	62
Anexo 8. Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para los datos obtenidos.	63
Anexo 9. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Comparación de la efectividad de los extractos frente a <i>Candida tropicalis</i> 7206	64
Anexo 10. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a <i>Candida tropicalis</i> 7206	65
Anexo 11. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Comparación de la efectividad de los extractos frente a <i>Candida albicans</i> 10231	66
Anexo 12. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	67
Anexo 13. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Comparación de la efectividad de los extractos frente a <i>Candida parapsilosis</i> 7307	68
Anexo 14. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a <i>Candida parapsilosis</i> 7307	69

Anexo 15.	Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Comparación de la efectividad de los extractos frente a <i>Candida albicans</i> 90028	70
Anexo 16.	Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a <i>Candida albicans</i> 90028	71
Anexo 17.	Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Comparación de la efectividad de los extractos frente a <i>Candida albicans</i> 7516	72
Anexo 18.	Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a <i>Candida albicans</i> 7516	73
Anexo 19.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hexánico y diclorometánico del actinomiceto BI-IM2 feb15 frente a cepas de <i>Candida spp.</i>	74
Anexo 20.	Actividad inhibitoria por el método de doble capa.	75
Anexo 21.	Características culturales de actinomicetos marinos aislados	76
Anexo 22.	Matriz de consistencia	79

RESUMEN

Los actinomicetos son reconocidos como productores de compuestos de importancia farmacológica e industrial. En las últimas décadas el descubrimiento de nuevos metabolitos provenientes de actinomicetos del medio terrestre ha disminuido y la investigación se ha orientado a buscar nuevos hábitats poco explorados como el medio marino. Dado que la gran mayoría de estudios se enfocaron más en enfrentarlos contra bacterias y pocos contra hongos y levaduras, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el potencial antifúngico de los actinomicetos de origen marino frente a *Candida tropicalis* 7206, *Candida albicans* ATCC 90028, y *Candida albicans* 7516 *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida parapsilosis* 7307, estas cepas de *Candida spp* de origen hospitalario, fueron aisladas de hemocultivos procedentes de distintos servicios e identificadas en el servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Para ello se evaluó preliminarmente la actividad antifúngica por el método de doble capa, siendo la cepa BI-IM2 feb15 la que presentó mayor actividad inhibitoria, al extraer los metabolitos se obtuvo muy buenos resultados con el extracto diclorometánico y con el extracto hexánico, obteniéndose una CMI de 4,453125 µg/mL para *Candida tropicalis* 7206, considerándose así una cepa sensible.

En conclusión los resultados demuestran la producción de metabolitos con actividad antifúngica procedentes de actinomicetos marinos, los cuales tienen potencial en el campo biomédico y farmacológico.

Palabras clave: *Candida spp*, Actinomiceto, actividad antifúngica.

I. INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en el control y prevención de enfermedades ha provocado la aparición de nuevas formas clínicas, así como localizaciones no habituales y diseminación de nuevos mecanismos de resistencias antimicrobiana, lo que justifica los diferentes cambios en el perfil de sensibilidad y resistencia presentados por los agentes etiológicos de infecciones nosocomiales.

Esto conlleva a un problema que va cada vez en aumento y que plantea una grave amenaza a la salud pública.¹ Involucrando nuevas especies bacterianas y fúngicas consideradas antiguamente como no patógenas pero que excepcionalmente producían enfermedad en individuos inmunodeprimidos.²

La resistencia a los antimicrobianos tiene su costo en dinero, medios de subsistencia y vidas humanas, pone en peligro la eficacia de los programas de atención de la salud y podría llegar a constituir una amenaza para la estabilidad mundial y la seguridad de los países.³

Las infecciones nosocomiales (IN) son frecuentes principalmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), donde presentan hasta en un 20% de pacientes internados.² De estos casos las más frecuentes son las infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia) con un total de 60,5%.⁴

La bacteriemia nosocomial es una causa importante de infección intrahospitalaria, asociada con una alta morbi-mortalidad permaneciendo con un índice que varía según distintos estudios entre 17,5% a 40%.⁵

Flores y colaboradores en el 2011 en un reporte de datos sobre la susceptibilidad antimicrobiana en el servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo

Almenara entre los años 2009 y 2010, señalan que la frecuencia de aislamiento de *Candida*, correspondieron al 20% de las infecciones del torrente sanguíneo en UCI, siendo la primera infección más frecuente en esta localización y de las cuales presentan una predominancia de las *Candida no albicans* 59%, seguido de *Estafilococo coagulasa* negativo 18%, *Escherichia coli* 9%, *Staphylococcus aureus* 9% y *Klebsiella pneumoniae* 7%.

Candida albicans es considerada como una causa importante de candidemias sistémicas, sin embargo en los últimos años el 61% de casos que se presentan en las UCI se deben a otras especies “no albicans”, lo que conlleva a pensar que existe un aumento significativo de nuevas especies patógenas.²

La Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo un llamado a los países para que incrementen sus esfuerzos en controlar la resistencia antimicrobiana; promover las políticas nacionales de desarrollo sustentable y el uso racional de antimicrobianos; desarrollar sistemas de comunicación para recabar y compartir datos sobre resistencia de patógenos específicos, además de promover la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.³

En la actualidad, las posibilidades terapéuticas se ven notablemente menguadas por la ausencia de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos; y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presenta problemas de resistencia, espectro de acción, costo y efectos adversos en el paciente como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y fototoxicidad.⁶ Por estas razones se debe orientar los esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones.

Existe interés, tanto académico como industrial, por los microorganismos marinos, en parte por el creciente número de metabolitos secundarios únicos y biológicamente activos reportados a partir de bacterias marinas. Aunque el descubrimiento de fármacos naturales del mundo oceánico data desde 1970, en los últimos años las investigaciones se vieron incrementadas por la necesidad de desarrollar fármacos activos contra el número cada vez mayor de patógenos resistentes⁷

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS)³, el exceso de prescripción y el uso indebido de antibióticos ha llevado a la resistencia de muchos agentes patógenos. Hoy en día, las nuevas cepas resistentes aparecen con mayor rapidez,

mientras que la tasa de descubrimiento de nuevos antibióticos ha disminuido notoriamente.

Actualmente, muchos científicos se han centrado en programas de búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen actinomicetal, por su prolífica producción de antibióticos naturales ⁸. Se ha evidenciado que muchos de ellos son productores de metabolitos con actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, antitumoral, citotóxica, etc; cuyas estructuras químicas son únicas. ⁹

Con el presente trabajo se busca contribuir al conocimiento de la actividad antifúngica de los actinomicetos marinos, lo que ayudaría a controlar la presencia de microorganismos drogoresistentes, promover el manejo racional de los antibióticos y obtener un tratamiento confiable, seguro y de menor costo.

Objetivo general

- Determinar la actividad antifúngica de los actinomicetos marinos frente a cepas de *Candida spp* aisladas de hemocultivos. Lima 2015

Objetivos específicos

- Determinar la actividad antifúngica cualitativa de los actinomicetos marinos frente a cepas de *Candida spp*.
- Evaluar la actividad antifúngica cuantitativa de los metabolitos secundarios extraídos de los actinomicetos marinos frente a cepas de *Candida spp*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades infecciosas, ha constituido un acontecimiento sin precedentes, porque la curación y control de las infecciones permitió modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del adulto, en el que estas afecciones ocupan el primer lugar entre las causas de muerte.¹⁰

El desarrollo de la antibioticoterapia en la actualidad, permite un eficaz tratamiento de infecciones bacterianas agudas y algunas enfermedades crónicas, como la tuberculosis, pues los nuevos antibióticos resultan alentadores para el control de enfermedades virales e infecciones parasitarias y micóticas.

El desarrollo alcanzado por la microbiología en nuestros días, ha permitido identificar otros tipos de microorganismos e infecciones, por lo que se hace necesario el uso de nuevos fármacos para su tratamiento.

El empleo de agentes farmacológicos en el tratamiento de infecciones comienza cuando los chinos hace más de 2 500 años, utilizaron la cáscara enmohecida de la soja en el tratamiento de carbuncos, forúnculos e infecciones similares. En el año 1877 *Pasteur y Joubert* reconocen las potencialidades clínicas de los microorganismos como agentes terapéuticos. *Ehrlich* fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva y en reconocer las relaciones químicas específicas entre los parásitos y los medicamentos, el desarrollo de resistencia a medicamentos en los parásitos y el papel de la terapéutica combinada para combatir dicha resistencia. Los experimentos de *Ehrlich* en la primera década de

este siglo condujeron al descubrimiento de las arsfenaminas, primer triunfo importante de la quimioterapia planeada.¹⁰

La llamada "Edad de Oro" de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos. En la actualidad se calcula que aproximadamente el 40 % de todos los pacientes hospitalizados reciben tratamiento con antimicrobianos, por lo que en la últimas décadas se han obtenido numerosos compuestos de esta índole, los que resultan de utilidad incuestionable, sin embargo, su amplio uso fomenta el aumento de la resistencia de los gérmenes, lo que crea una necesidad cada vez mayor de nuevas drogas, y se encarece el tratamiento. En este sentido, podemos citar algunos trabajos que se siguen realizando para conocer criterios farmacológicos y sobre todo microbiológicos que permitan el uso racional de estos compuestos y también demuestran que los actinomicetos tienen gran capacidad antagónica frente a cepas clínicas y hasta frente a hongos de importancia agrícola.

En Lima, Perú. Jorge León realizó el "estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa Central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes", para lo cual determinó el potencial antimicrobiano de actinomicetos marinos. La mayoría de los actinomicetos aislados correspondieron a un grupo homogéneo de blanco-grisáceos (62%) con buen nivel de crecimiento en agar marino. Los porcentajes inhibitorios fueron superiores a 85% para ambos patógenos con halos de inhibición mayores a 69 y 78 mm de diámetro para MRSA y VRE respectivamente. Los extractos diclorometánicos de tres de los actinomicetos aislados (I-400A, B1-T61, M10-77) mostraron gran potencial inhibitorio de ambos patógenos, siendo M10-77 la cepa de actinomiceto de mayor actividad antibiótica frente a *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina y *E. faecalis* ATCC 51299 resistente a vancomicina con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 7,9 y 31,7 µg/ mL respectivamente. El análisis filogenético de la cepa M10-77 presenta un 99% de similitud con la especie marina *Streptomyces erythrogriseus*. León concluyó afirmando que el sedimento marino de la costa central del Perú es fuente promisorio de cepas de actinomicetos con gran capacidad de producir compuestos bioactivos capaces de inhibir patógenos tipificados como multidrogo-resistentes tales como *S. aureus* meticilino resistentes y *E. faecalis* vancomicina resistentes.

En Medellín, España. Laura Marcos Zambrano hizo un estudio sobre *Candida* y candidiasis invasora: “estudio de la actividad antifúngica in vitro de arasertaconazol frente a cepas clínicas de *Candida* y caracterización molecular de cepas productoras de candidemia relacionada con el catéter”. Donde se estudió la actividad antifúngica de arasertaconazol frente a aislados clínicos de *Candida*, así como el establecimiento de rangos de CMI aceptables con cepas de colección ATCC según los estándares establecidos en el documento CLSI M27-A3. Por otra parte, para estudiar si el catéter era el origen de la candidemia, se estudió la presencia de genotipos idénticos en muestras de sangre y catéter aislados simultáneamente en pacientes con candidemia y portadores de catéter intravascular. El otro objetivo del proyecto fue recoger prospectivamente y genotipar mediante el análisis de microsatélites las cepas mencionadas pertenecientes a las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

También encontramos este tipo de estudios en la agricultura para evitar la propagación de algunas plagas, como a Miriam Desireé Dávila Medina en México que realizó el “Estudio Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola” quien concluyó que se encontró altos niveles de antagonismo de actinomicetos contra los hongos fitopatógenos *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp., la actividad varió conforme el aislamiento del streptomiceto y dependiendo del hongo confrontado.

2.2. ACTINOMICETOS

Las Actinobacterias o actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas. La mayoría de ellas se encuentran en la tierra, e incluyen algunas de las más típicas formas de vida terrestre, jugando un importante rol en la descomposición de materia orgánica, tales como la celulosa y quitina. Estas bacterias renuevan las reservas de nutrientes en la tierra y son fundamentales en la formación de humus. La adaptación al hábitat terrestre es muy antigua, en el suelo son los seres más abundantes, promediando un 64% de la biomasa bacteriana. ¹¹

Otras actinobacterias habitan en las plantas y animales, incluyendo algunos patógenos, tales como las *Mycobacterium*.

Algunas actinobacterias forman filamentos ramificados que se asemejan en cierta forma a los micelios de los no relacionados fungi, entre los cuales fueron clasificados originalmente con el antiguo nombre de Actinomycetes. La mayoría son aerobias, pero algunas, tales como *Actinomyces israelii*, pueden crecer bajo condiciones anaerobias.

Muchas actinobacterias se destacan por su capacidad para producir compuestos que tienen características útiles en farmacología. En 1940 Selman Waksman descubrió en el suelo las bacterias que producen actinomicina, un descubrimiento que le valió el premio Nobel. Se han descubierto desde entonces centenares de antibióticos naturales en estos microorganismos terrestres, tanto como marinos especialmente en el género *Streptomyces*.²⁵

Representantes de este grupo: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*.

2.2.1. Taxonomía³⁷

- Phylum : Actinobacteria
- Clase : Actinobacteria
- Orden : Actinomycetales

2.2.2. Metabolitos secundarios producidos por actinomicetos

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas. Esta gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza se ve reflejada en cerca de los más de 23,000 metabolitos microbianos conocidos, de los cuales el 42% los producen hongos, 32% actinomicetos y el resto producidos por otros grupos de bacterias.¹³

En el caso de los actinomicetos, es ampliamente reconocida la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios. ¹³ Algunos de los cuales se describen a continuación y que son relevantes por su uso como fármacos.

Antibióticos. Los metabolitos microbianos más importantes son los antibióticos, sustancias que a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de diferentes especies de microorganismos y que ejercen su mayor efecto sobre la salud,

nutrición y economía de la sociedad. Un aspecto importante es el gran número de antibióticos existentes, de los aproximadamente 8,000 reportados hasta 1999, 45,6% eran producidos por estreptomicetos, 16% por otros actinomicetos, 16,9% por otras bacterias y 21,5% por hongos.¹³ Otro aspecto importante de los antibióticos se refiere a la variedad de estructuras químicas que presentan, en donde todas las clases de moléculas de la química orgánica están representadas: cadenas alifáticas, anillos aromáticos aislados o condensados, anillos heterocíclicos, oligopéptidos y oligosacáridos entre otros muchos más.

La propiedad que hace que los antibióticos sean considerados como “fármacos maravillosos”, es la selectividad de su mecanismo de acción, que los distingue de germicidas y desinfectantes sintéticos. Su toxicidad selectiva contra algunas clases de organismos, con pocas excepciones, los ha convertido en los compuestos más utilizados para la terapia contra microorganismos patógenos.

Agentes antitumorales. La mayoría de los compuestos usados para quimioterapia de tumores son antibióticos producidos por actinomicetos.¹⁴ Dentro de los que se encuentran actinomicina D, mitomicina, bleomicina, neomicina y las antraciclinas, daunorubicina y doxorubicina. Por ejemplo, en humanos la neomicina inhibe angiogénesis inducida por angiogenina en células endoteliales¹⁵, mecanismo que al parecer actúa vía la capacidad de la neomicina para inhibir la fosfolipasa C. Sorprendentemente, otros aminoglucósidos como la gentamicina, estreptomina, kanamicina, amikacina y paronomina no tienen la propiedad antitumoral, a pesar de que entre algunos de estos compuestos exista una pequeña diferencia; por ejemplo, la paronomina difiere de la neomicina solamente porque presenta un -OH en la posición 6 de la glucosa en lugar de un grupo -NH₂.

Por su parte, la actinomicina D es un antibiótico polipeptídico aislado de *Streptomyces* al que se le reconoció actividad anticancerígena, aunque debido a su elevada toxicidad no es un compuesto muy usado.¹⁴

Agentes Inmunosupresores. Durante muchos años la Ciclosporina A, originalmente descubierta como un péptido antifúngico de espectro de acción limitado producido por un hongo,¹³ se empleó como agente inmunosupresor en pacientes que reciben trasplantes de corazón, riñón e hígado, sin embargo, dos productos producidos por actinomicetos han dado buenos resultados como inmunosupresores. Tal es el caso de los policétidos FK-506 (tacrolimus) aislado

de *Streptomyces tsukubaensis* y de la rapamicina (Sirolimus) aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. El uso de FK-506, tacrolimus o Prograf su nombre comercial, fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 para usarse en un principio en pacientes sometidos a transplante de riñón y posteriormente para trasplantes de hígado, corazón, páncreas, tráquea, piel y córnea. La rapamicina originalmente se empleó como agente antifúngico, aunque se dejó de utilizar como tal una vez que se descubrió que tenía propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas.¹⁵

2.2.3. Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales (IN) son aquellas que no están presentes en periodo de incubación cuando el paciente ingresa al hospital, y en general se considera que estas se presentan posterior a las 72 horas de ingreso al centro asistencial. Las infecciones nosocomiales son consecuencia directa de la atención integral a pacientes hospitalizados relacionados con diversos factores, como foco de infección, tipo de microorganismo aislado, enfermedades concomitantes, tratamiento antibiótico y contaminación de soluciones intravenosas, determinan la evolución de los pacientes; además del medio ambiente juega un papel muy importante ya que a partir de él se diseminan al huésped por diferentes vías de patógenos nosocomiales, que se caracterizan por una mayor virulencia y resistencia antimicrobiana.¹⁶

Una IN prolonga el tiempo de estancia hospitalaria, incrementa la mortalidad, eleva los costos de atención y afecta la calidad de vida del individuo durante la recuperación de su enfermedad de base. Estas infecciones afectan más las áreas hospitalarias donde se atienden pacientes en estado crítico como las salas quirúrgicas, de inmunocomprometidos o UCI.¹⁶

2.2.4. Hemocultivo

Un hemocultivo se define como el cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por punción venosa sencilla o acceso intravenoso. Es un estudio recomendado para confirmar una bacteriemia o fungemia cuando esta se sospecha en pacientes con o sin foco obvio de infección. Un cultivo de sangre positivo sugiere un diagnóstico definitivo en la orientación de una terapia eficaz contra organismos específicos, así como el estudio de patrones de resistencia a antimicrobianos en la terapia médica.¹⁷

2.2.5. Fungemia

La fungemia, generalmente causada por *Candida spp.*, es la micosis profunda más frecuente en el enfermo crítico y muchas veces es clínicamente indistinguible de la septicemia bacteriana. En menor frecuencia en estos pacientes también se describen micosis respiratorias o diseminadas producidas por *Aspergillus* u otros hongos filamentosos, como *Scedosporium*, *Fusarium*, *Pneumocystis*, *Acremonium* o zigomicetos (*Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* y *Absidia*), así como manifestaciones meníngeas o sistémicas producidas por otras especies de levaduras (*Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*).¹⁶

2.2.6. Candidemia

Es una infección primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, mucocutáneas, profundos ó diseminados.

Agentes etiológicos: El principal agente es *Candida albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies de *Candida*, como, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candida krusei*; *C. lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, etc. Levaduras de otros géneros distintos de *Candida* como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* pueden dar cuadros clínicos similares a la candidiasis.¹⁹

Clasificación taxonómica: Teniendo en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye en las subdivisiones Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (cuando no se conoce la reproducción sexuada).¹⁹

- Dominio: Eucarya
- Reino: Fungi
- División: Eumycota
- Subdivisión: Deuteromycotina
- Clase: Blastomycetes
- Familia: Cryptococaceae
- Género: *Candida*
- Especies: *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. krusei*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*

Genero Candida

Las levaduras del género *Candida* son comensales humanos muy ubicuos, que pueden causar infección oportunista en casi cualquier localización del organismo. Existen más de 150 especies de *Candida*, de ellas aproximadamente 17 se consideran patógenas habituales para el ser humano. De las 17, sólo 5 producen más del 90 % de las infecciones invasivas estas son: *C. albicans*, *C. parapsilopsis*, *C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. tropicalis*. Otras menos frecuentes son: *C. lusitaniae*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. farmata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. dubiniensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa*, *C. dublinensis* es una especie de reciente descripción que antes se incluía dentro de *C. albicans*.¹⁹

La virulencia y patogenicidad de algunas de estas especies de *Candida* no *albicans* han mostrado un aumento importante en la mortalidad, además de implicar un reto terapéutico ante el aumento de resistencia a los tratamientos usados.²⁰

Candida albicans

C. albicans es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50% y 70% de las cepas procedentes de pacientes con infecciones septicémicas. Normalmente en candidemias y enfermedad invasora, *Candida albicans* es la más frecuente, sin embargo, debido al uso indiscriminado de antibióticos y azoles, el aislamiento de otras especies del género *Candida* cada vez más común.¹⁹

Candida tropicalis

Es una de las principales causas de septicemia y candidiasis diseminada, especialmente en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes. Es el segundo patógeno médico más frecuentemente encontrado, próximo a *C. albicans*, y se encuentra formando parte de la flora normal mucocutánea. *Candida tropicalis* fue inicialmente catalogada como susceptible a Fluconazol y Anfotericina B, sin embargo reportes en los últimos cinco años indican un rápido desarrollo de resistencia a estos agentes.¹⁹

Candida parapsilosis

Candida parapsilosis ha emergido como un patógeno importante, además de estar asociado de manera creciente a un amplio espectro clínico de infecciones. En el entorno clínico esta levadura oportunista se ha asociado con las manos de trabajadores del área de salud, y es particularmente frecuente en infecciones sistémicas en neonatos prematuros de bajo peso, pacientes cateterizados, además de pacientes bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa.²⁰

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de trabajo

El proyecto de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En el laboratorio de investigación de Ecología Microbiana, ubicado en el departamento de Lima, provincia de Lima, distrito de Lima.

3.2. Materiales

3.2.1. Material Biológico

Selección de cepas de actinomicetos

Los actinomicetos utilizados en el presente estudio fueron originalmente obtenidos de sedimento marino, las cuales fueron colectadas en dos diferentes localidades de las costas peruanas (bahía de Ancón y Reserva Natural de Paracas) a profundidades de 34 y 100 m. El procesamiento y aislamiento respectivo de los actinomicetos en el laboratorio se encuentran descritas en el informe técnico 2012 del Proyecto de Estudios del Vicerrectorado de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (RR N° 00715-R-12, código 121001281). Para el presente estudio se seleccionaron 30 cepas de actinomicetos marinos de las cuales después de realizar la prueba de determinación de la actividad antifúngica por el método de “doble capa” de Westerdahl modificado, se seleccionaron 2 cepas de actinomicetos en función a la formación del halo, dichas cepas identificadas con los códigos: BI-IM2 feb15 y AN8-ESP feb15, las cuales fueron propagadas y conservadas en agar marino para evaluar su actividad antifúngica posteriormente.

Cepas de *Candida* spp utilizadas

Se emplearon las cepas de *Candida* spp de origen hospitalario, aisladas de hemocultivos procedentes de distintos servicios e identificadas en el servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen ubicado en la provincia de Lima, Perú. Estas cepas fueron las siguientes: *Candida parapsilopsis* 7307 obtenido del servicio de cardiología, *Candida tropicalis* 7206 obtenido del servicio de nefrología, *Candida albicans* 7516 obtenida de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

Las cepas de referencia como *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* ATCC 90028, fueron proporcionadas por el laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

3.3. Metodología

3.3.1. Preparación de los ceparios de actinomicetos

Se realizaron mediante diluciones, y pases a caldo y agar marino hasta obtener una colonia libre de contaminantes, donde se logró describir las características culturales de estas cepas en el agar marino y así mismo mantenidas en estado de pureza en el mismo medio pero en estado semisólido y con adición de glicerina al 20% (v/v) a la temperatura de -20°C.

3.3.2. Prueba cualitativa de antagonismo mediante el bioensayo de “doble capa”

Se realizó mediante el método de “doble capa” de Westerdahl (1991) modificado por León²⁹. Los actinomicetos fueron sembrados como macrocolonias en agar marino pH 7,6 e incubados a 28°C por 5 a 7 días.

Transcurrido este tiempo, reactivamos las cepas de *Candida* spp 24 horas antes de realizar la prueba de antagonismo, en caldo sabouraud a 30°C por 24 horas, luego ajustadas a 106 UFC/mL según la escala 0,5 de Mc Farland.

La prueba de antagonismo se realizó mediante la inoculación de 1 ml de las cepas de *Candida* spp. en 1 L de agar semisólido glucosado Sabouraud a modo de “segunda capa” sobre los cultivos de actinomicetos marinos. Las placas en prueba fueron incubadas a 30°C por 24 horas, realizándose luego las lecturas correspondientes mediante la medida del diámetro de los halos de inhibición.

*ATCC: American Type Culture Collection

3.3.3. Extracción del compuesto activo y pruebas de su actividad inhibitoria

Extracción del compuesto activo

Para la obtención de compuestos bioactivos se seleccionaron 2 cepas de actinomicetos en función a la formación de halos.

Los extractos se obtuvieron utilizando dos solventes: el diclorometano y el hexano, según procedimientos descritos por Zheng (2014) .²²

Los dos cultivos de actinomicetos seleccionados para su fermentación se realizaron inoculando en caldo marino y mantenido en constante agitación a 200 rpm a una temperatura de 28° C (en un shaker o agitador) durante 10 días.

Transcurrido los 10 días se procedió a centrifugar el cultivo a 4800 rpm por 25- 30 minutos, luego el sobrenadante se filtró y agregó los solventes seleccionados a cada una de las cepas (v/v), agitando por 30 minutos vigorosamente o en el shaker por 18- a 24 horas.

Transcurrido este tiempo y con la ayuda de una peras de decantación, se separó la fase orgánica y luego evaporada con un rotavapor, recolectando 1 ml de la muestra en un vial previamente pesado y envuelto con papel aluminio, se procedió a incubar en la estufa a 40 °C por 24 horas, obteniendo así un residuo seco, antes de empezar con la prueba de actividad inhibitoria del extracto se pesó el residuo.

Prueba de la actividad inhibitoria

Este procedimiento se realizó siguiendo la metodología de Huamaní Ruiz (2005)²³ modificado. Con el objetivo de evaluar la actividad antifúngica de los extractos orgánicos de hexano y diclorometano de las cepas de actinomicetos marinos seleccionados frente a cepas patógenas de *Candida* como son: *Candida parapsilopsis* 7307, *Candida tropicalis* 7206, *Candida albicans* 7516, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* ATCC 10231, se aplicó un diseño experimental, en el cual se evaluó la capacidad de los extractos orgánicos capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos seleccionados a través de esta prueba.

- Preparación del inóculo

24 horas antes de realizar la prueba de difusión en placa se reactivaron las cepas en caldo Sabouraud a 30°. Con el inóculo ya reactivado se procedió a ajustarlos a 0.5 de Mac Farland en SSF 0.85%.

- Preparación de la concentración del extracto

Se preparó dimetilsulfóxido al 5% y se agregó 1 mL a cada vial con el extracto seco y se homogenizó con la ayuda de los tips.

- Preparación de las placas

Para evaluar la actividad inhibitoria de los actinomicetos se utilizó el método de difusión en placa con pocillos para lo cual se prepararon placas Petri con agar Mueller Hinton.

Luego con la ayuda de un hisopo se sembró cada inóculo ajustada a 0,5 de la escala de Mac Farland por toda la superficie de la placa.

Seguidamente con la ayuda de un sacabocado estéril se realizó pocillos en el agar. Después se llenó con el extracto cada pocillo, también inoculamos el control positivo que viene a ser el fluconazol a una concentración de 0,025% según la CLSI. Y por último se incubó a 30° C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura correspondiente con la observación de los halos de inhibición, se midieron los diámetros en mm de cada halo de inhibición, empleando un vernier se realizó la lectura midiendo los halos con la ayuda de un vernier.



Figura 1. Medición de diámetros de halos de inhibición de la actividad antifúngica de los extractos.

Los valores obtenidos fueron utilizados como índice de actividad antifúngica, la presencia o ausencia de una zona de inhibición fue usada como criterio para seleccionar el mejor extracto que inhibió a las mayoría de microorganismos

patógenos, para luego realizar la prueba de microdilución en una microplaca de 96 pocillos y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se comparó el diámetro de la zona inhibida por el extracto con el diámetro del antifúngico comercial usado como control positivo de la inhibición según la CLSI (2013) Y CLSI (2004).

3.3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La prueba de CMI se realizó siguiendo la metodología según León (2010) modificado²⁴. Se determinó mediante un ensayo de microdilución en caldo TSB utilizando el extracto etanólico y extracto diclorometánico.

Las cepas patógenas empleadas para la prueba fueron: *Candida parapsilopsis* 7307, *Candida tropicalis* 7206, *Candida albicans* 7516, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* ATCC 10231.

- Preparación de las concentraciones:

Se realizaron pruebas de microdilución, los extractos de diclorometano y hexano de las cepas BI-IM2 feb15 y AN8-ESP feb15 fueron resuspendidos en DMSO al 5% para preparar diluciones de 1:2.

- Inoculación e incubación de las muestras

En una microplaca de 96 pocillos, se agregó en cada pocillo 80 μ L de Caldo Tripticasa Soya.

Luego se agregó 10 μ L de la solución de los extractos usando las diferentes concentraciones diferentes. Posteriormente se añadió 10 μ L del inóculo de cada uno de los patógenos a cada pocillo, las microplacas se incubaron durante 18- 24 horas a 30°C.

En todos los ensayos se colocaron controles de esterilidad de medio, control del solvente, control de crecimiento y controles positivos.

El control negativo fue el medio solo con DMSO al 5% sin añadidura del extracto, como control positivo de la actividad antifúngica, se utilizó el fluconazol (0,2 mg/mL).

Una vez cumplido el tiempo de incubación se adicionó 40 μ L de 2,3,5- Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC; 5 mg/mL) en cada uno de los pocillos, y se colocó nuevamente en incubación por 20 minutos.

La lectura se realizó de manera visual colorimétrica, verificando en primer lugar que los resultados obtenidos con los controles fueran los esperados; esto es, que el control negativo estuviera completamente transparente y en el control positivo hubiera suficiente crecimiento. El viraje del color del medio a rojo intenso fue considerado como indicativo de crecimiento microbiano y sin crecimiento si el medio permaneció claro.

3.3.5. Análisis e interpretación de los resultados

Con el fin de evaluar el efecto individual y conjunto de los factores (variables independientes categóricas) que presentó el estudio sobre la variable dependiente cuantitativa (diámetro del halo de inhibición en mm) se utilizó el modelo factorial de Análisis de Varianza (ANOVA).

Posteriormente para identificar diferencias estadísticas significativas entre los valores establecidos se utilizó la prueba de Tukey al 95% de confianza, la cual es un tipo particular de prueba que pertenece a las comparaciones múltiples.

Estos datos se analizaron mediante el programa Minitab Statistical Software (MSS).

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Actividad inhibitoria de los Actinomicetos marinos frente a diferentes cepas de *Candida spp.* por el método de doble capa. (Prueba cualitativa)

<i>Actinomicetos</i> (códigos)	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> 7516	<i>Candida tropicalis</i> 7206	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida parapsilosis</i> 7307
ER14 feb15	-	-	-	-	-
M10-85 mar15	-	-	-	-	-
BI-665(2) abril15	-	-	-	-	-
ARG13-II feb 15	-	-	-	-	-
BismP2(2) Abril15	-	+	-	-	-
BI-665 abril15	-	+	-	-	-
BI-IM2 feb15	+++	++++	+++	+	+++
2PAT-ARG1	+++	+++	++++	+++	++
BI-SMP2 ab15	++	-	-	-	-
E2B10-3C abril15	+	-	-	-	-
I334C abril15	+	-	-	-	-
MII-116 feb15	-	-	-	-	-
9PAT-ARG abril15	-	-	+	-	-
AN8-ESP feb15	-	-	++++	+++	-
5T3 abril15	-	-	-	-	-
BI-CD1 feb15	-	-	-	-	-
BI-665 abril15	+	-	++	-	-
2PAT(2)-ARG1	+	-	-	-	++
ARG12-II feb15	++	-	-	++	-
AN ESP1 feb15	+	-	-	-	-
MII-131 feb15	+	++	-	-	-
I434B feb15	+	-	-	-	-
ER13(B)	-	-	-	-	-
MER-II	-	-	+	-	-
BI-662(1) abril15	-	-	++	-	-
MII-116 ©	-	-	-	-	-
II334C	++	-	-	-	++
BISmP2(3) Abril15	+	+++	-	-	++++
I434B(2) feb15	+	-	-	-	-
ER-II feb15	-	-	-	-	-

- : sin halo; +: 1- 3 mm; ++: 4- 8 mm; +++: 9- 12 mm; ++++: 13- 18 mm

Los actinomicetos seleccionados fueron los siguientes: BI-IM2 feb15, 2PAT-ARG1.

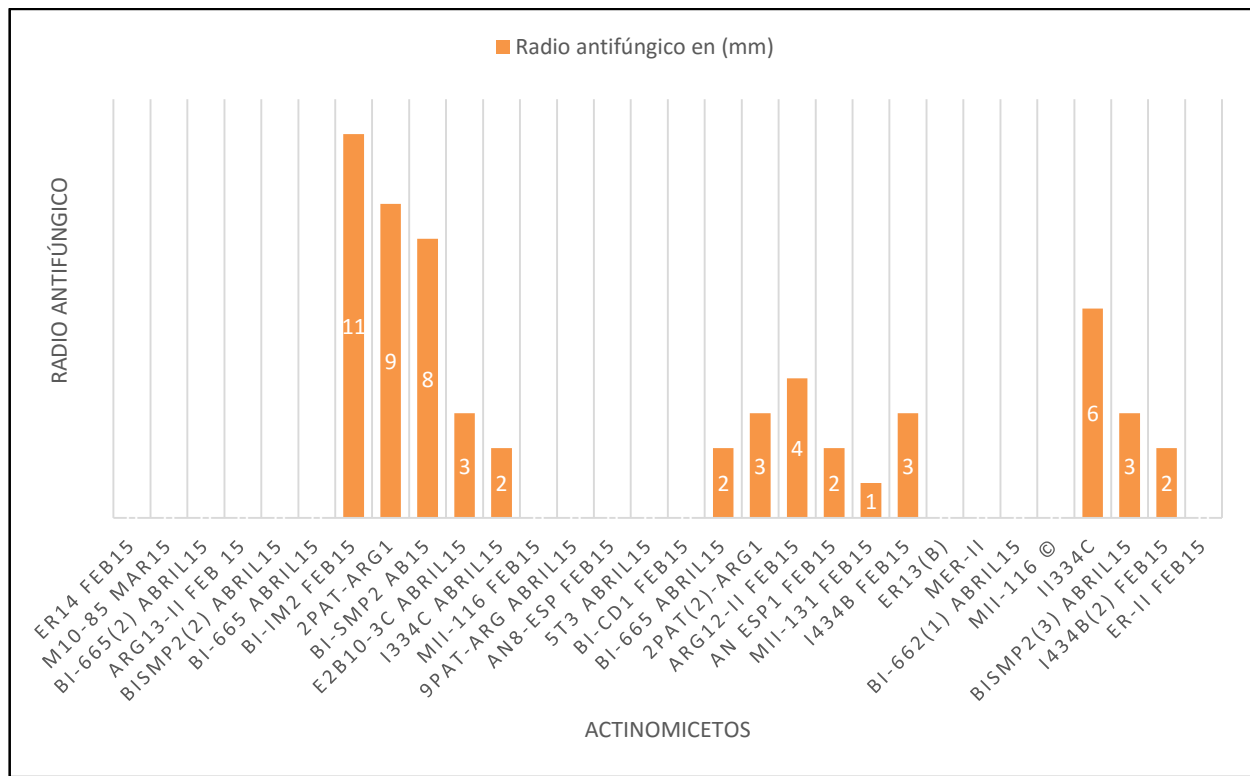


Figura 2: Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos frente a *Candida albicans* ATCC 10231

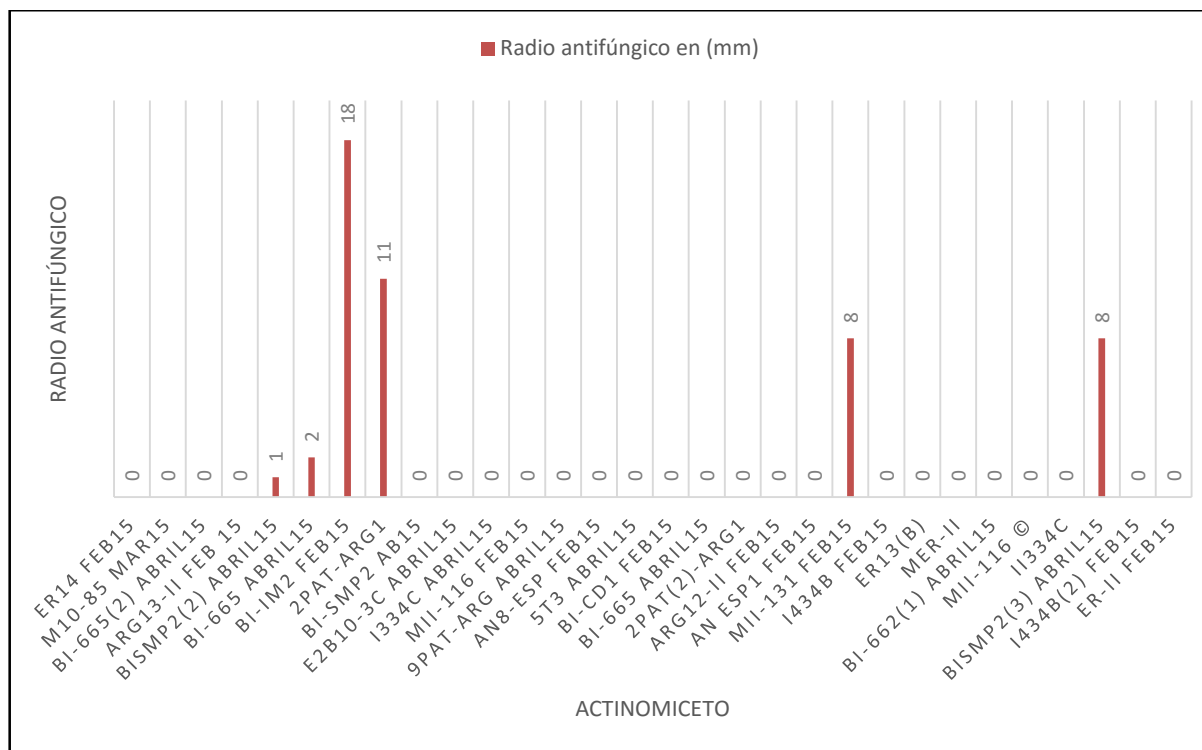


Figura 3: Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a *Candida albicans* 7516

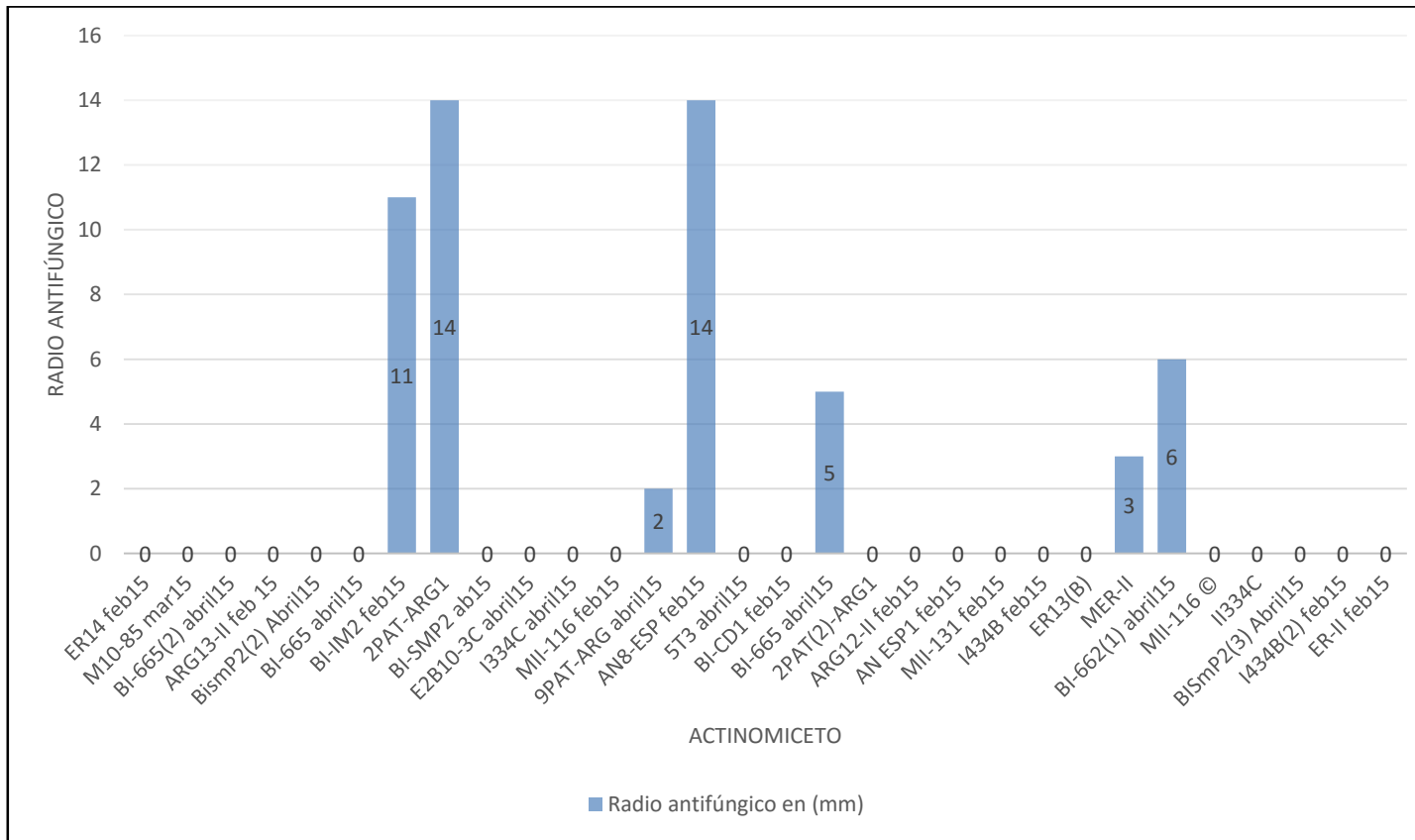


Figura 4: Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomisetos marinos enfrentados a *Candida tropicalis* 7206

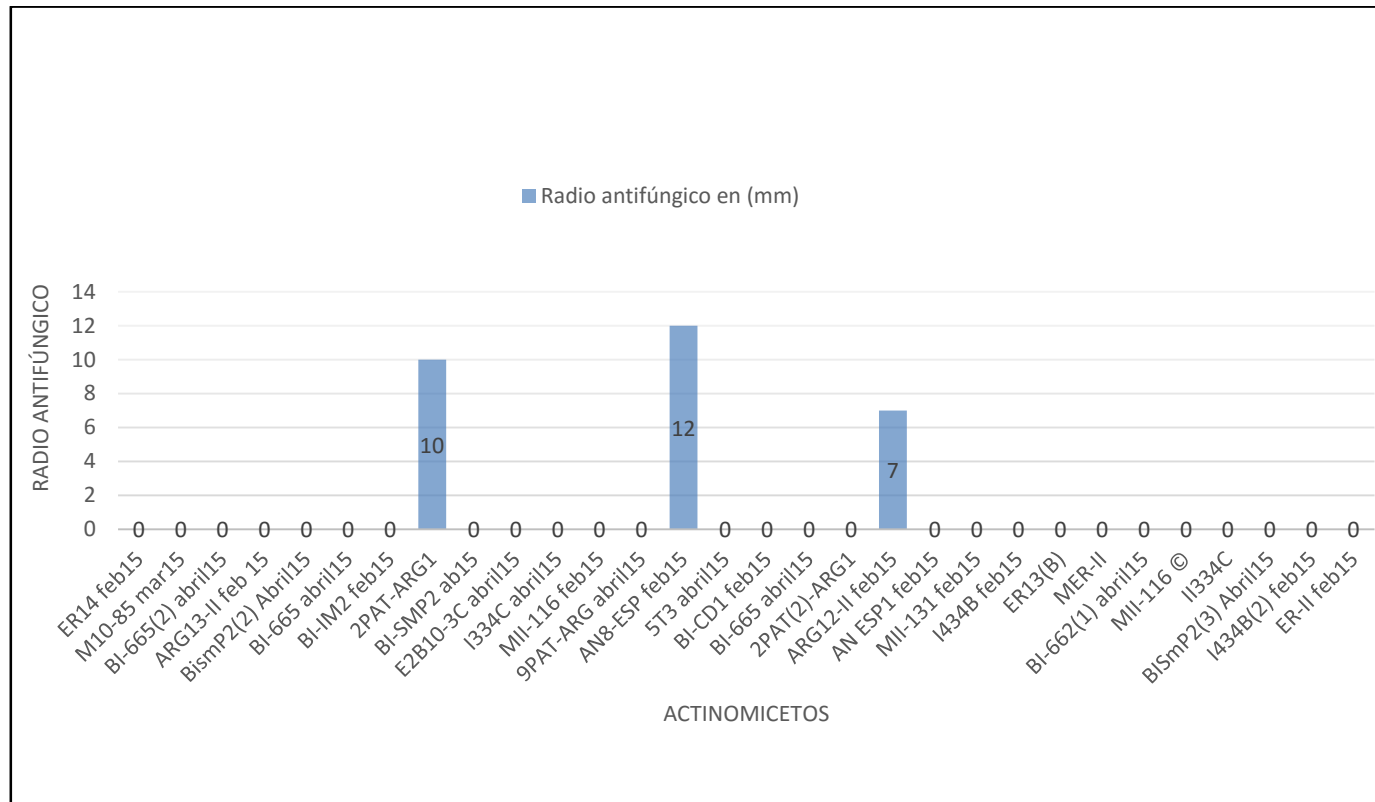


Figura 5: Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a *Candida albicans* ATCC 90028

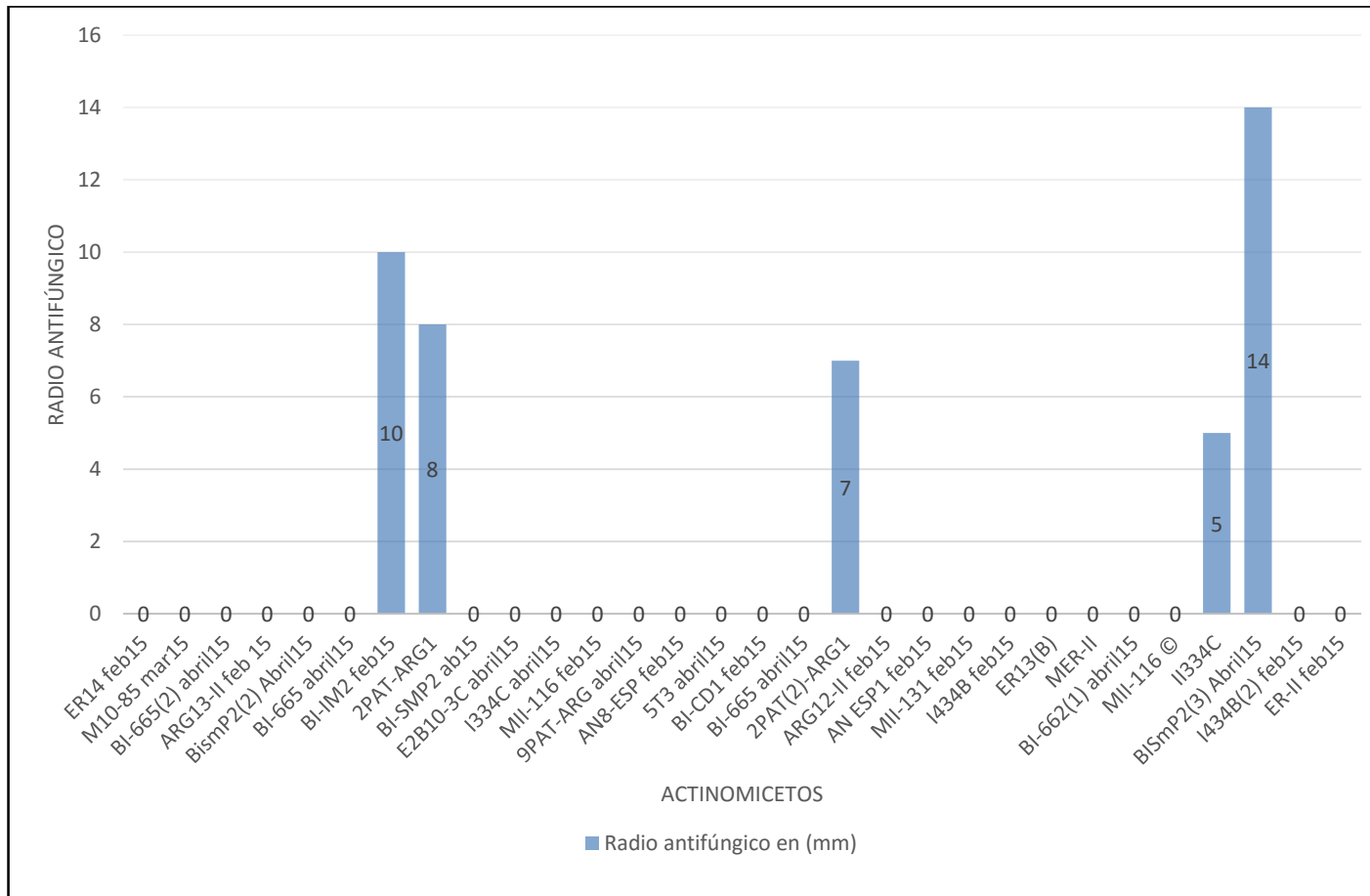


Figura 6: Actividad antifúngica de 30 cepas de actinomicetos marinos enfrentados a *Candida parapsilosis* 7307

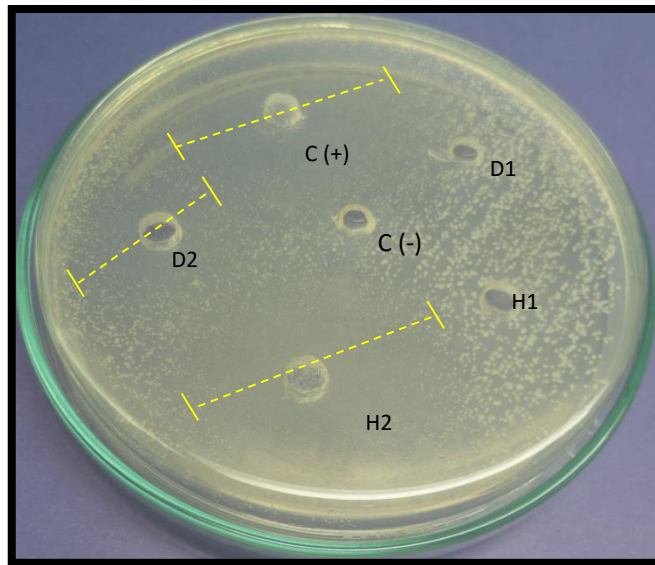
Tabla 2. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida spp.* (CLSI, 2004)

Antifúngico	Carga de disco	Diámetro (mm)			CMI ($\mu\text{g}/\text{MI}$)		
		R	S-DD	S	R	S-DD	S
Fluconazol	25 μg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 64	16-32	≤ 8

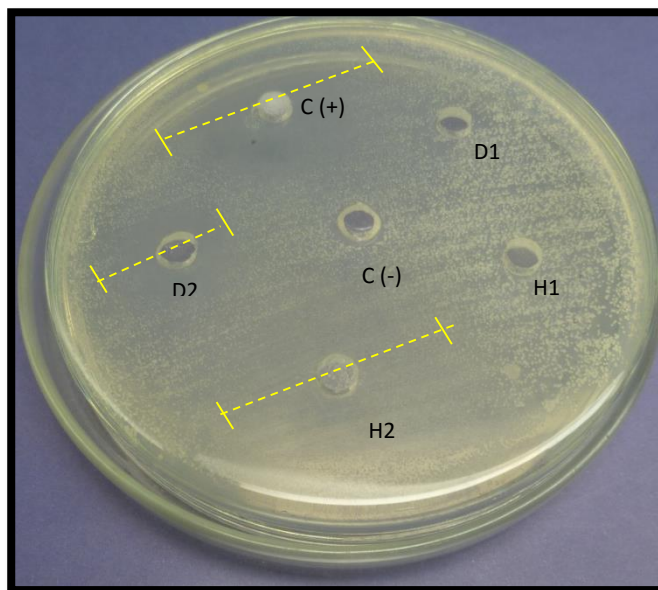
S, sensible. S-DD, sensible dependiente de la dosis. R, resistente, *no sensible

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos frente a levaduras.

Cepas de <i>Candida spp</i>	Diámetro de la zona de inhibición (mm) (promedio)			
	BI-IM2 feb15		2PAT-ARG1	
	Extracto hexánico	Extracto diclorometánico	Extracto hexánico	Extracto diclorometánico
<i>Candida parapsilosis</i> 7307	27	44	-	-
<i>Candida tropicalis</i> 7206	54	71	-	-
<i>Candida albicans</i> 7516	34	51	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	36	48	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	26	52	-	-



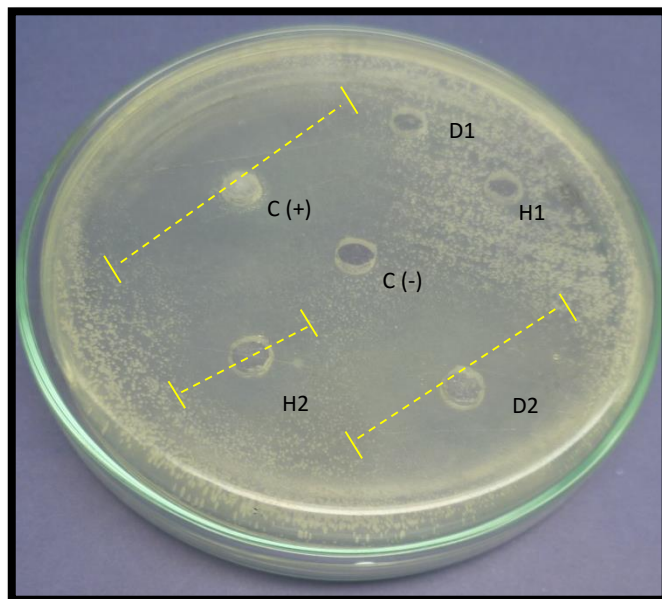
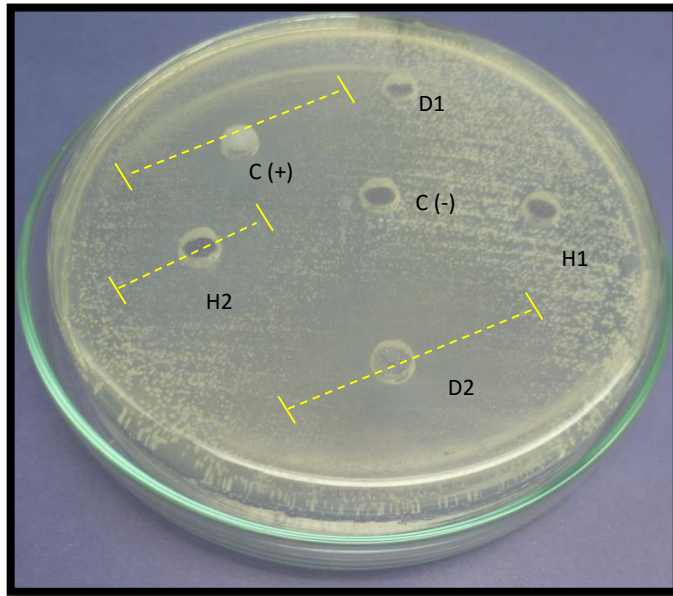
(1)



(2)

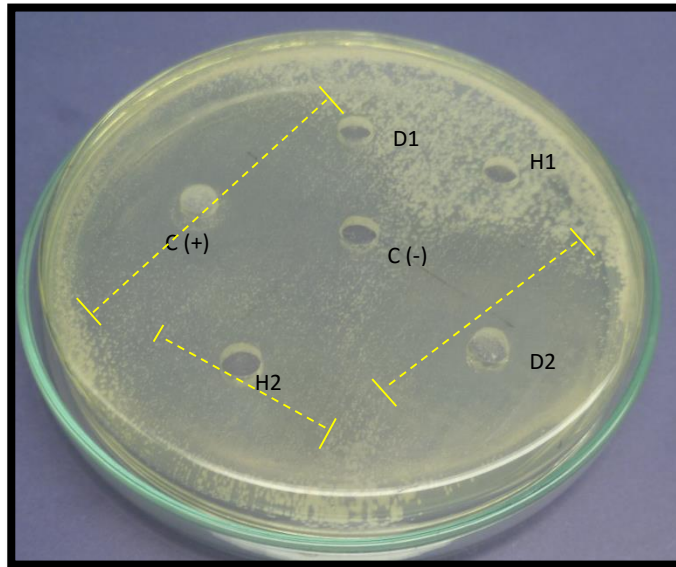
H1: Actino1(2PAT-ARG1) con hexano; D1: Actino1 con diclorometano; H2: Actino2 (BI-IM2 feb15) con hexano; D2: Actino2 con diclorometano; C (+): Fluconazol 0,25mg/mL; C(-): DMSO al 5%

Figura 7. Actividad antimicrobiana de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos frente a (1) *Candida albicans* 7516 y (2) *Candida albicans* ATCC 90028



H1: Actino1(2PAT-ARG1) con hexano; D1: Actino1 con diclorometano; H2: Actino2 (BI-IM2 feb15) con hexano; D2: Actino2 con diclorometano; C (+): Fluconazol 0,25mg/mL; C (-): DMSO al 5%

Figura 8. Actividad antimicrobiana de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos frente a (1) *Candida parapsilosis* 7307 y (2) *Candida albicans* ATCC 10231



H1:Actino1(2PAT-ARG1) con hexano; D1: Actino1 con diclorometano; H2:Actino2 (BI-IM2 feb15) con hexano; D2: Actino2 con diclorometano; C(+): Fluconazol 0,25mg/mL; C(-): DMSO al 5%

Figura 9. Actividad antimicrobiana de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos frente a *Candida tropicalis* 7206

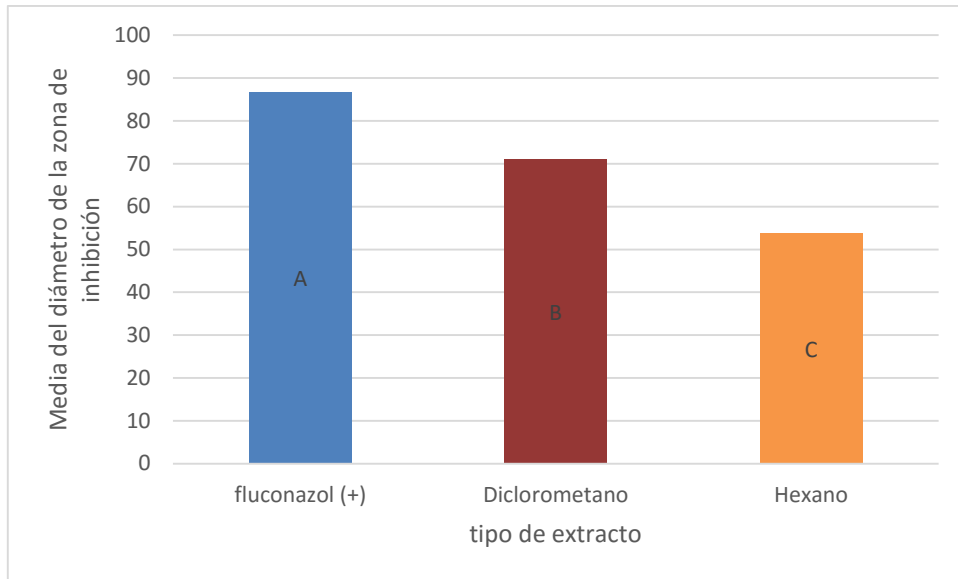


Figura 10. Media del halo de inhibición de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos y el control positivo frente a *Candida tropicalis* 7206.

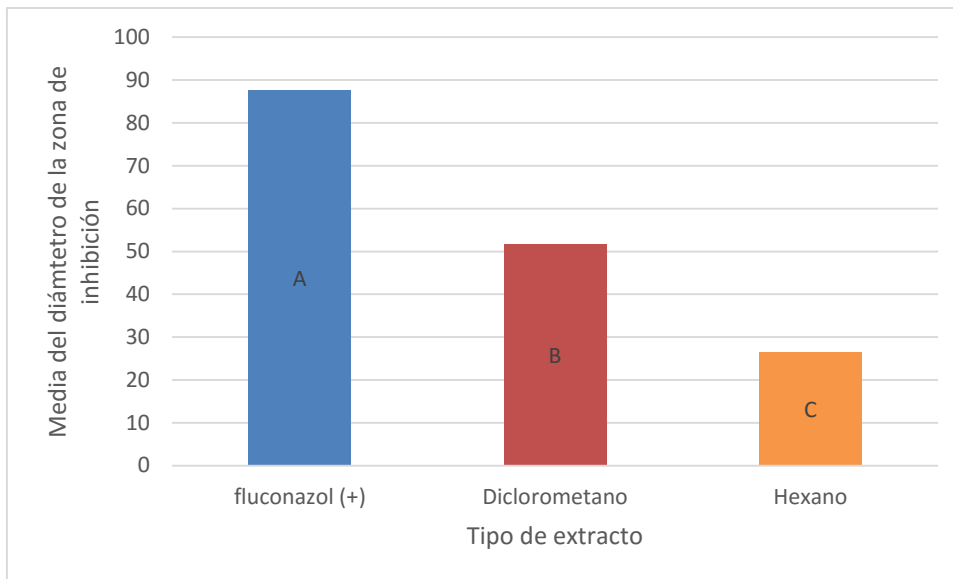


Figura 11. Media del halo de inhibición de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos y el control positivo frente a *Candida albicans* ATCC 10231

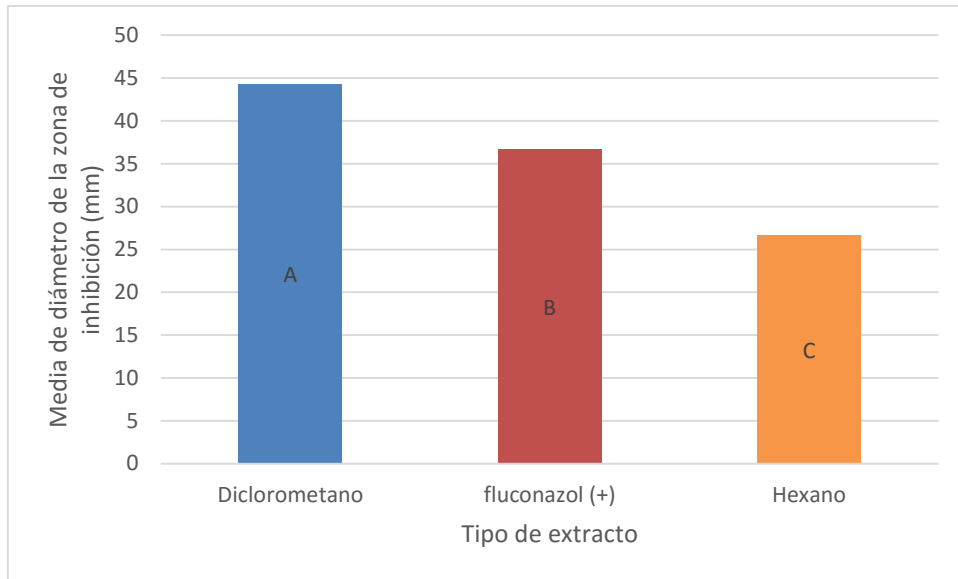


Figura 12. Media del halo de inhibición de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos y el control positivo frente a *Candida parapsilopsis* 7307

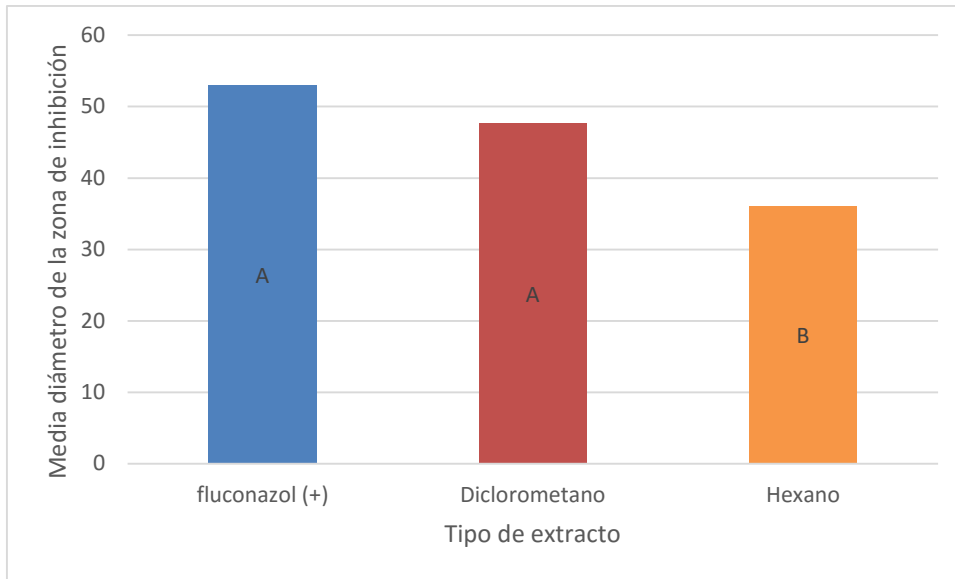


Figura 13. Media del halo de inhibición de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos y el control positivo frente a *Candida albicans* 90028

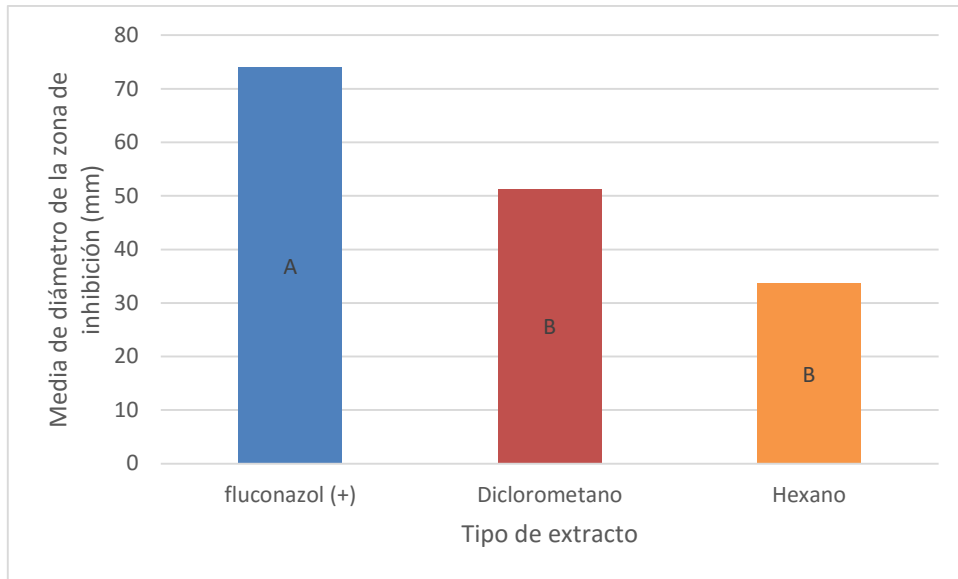


Figura 14. Media del halo de inhibición de los extractos de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos y el control positivo frente a *Candida albicans* 7516

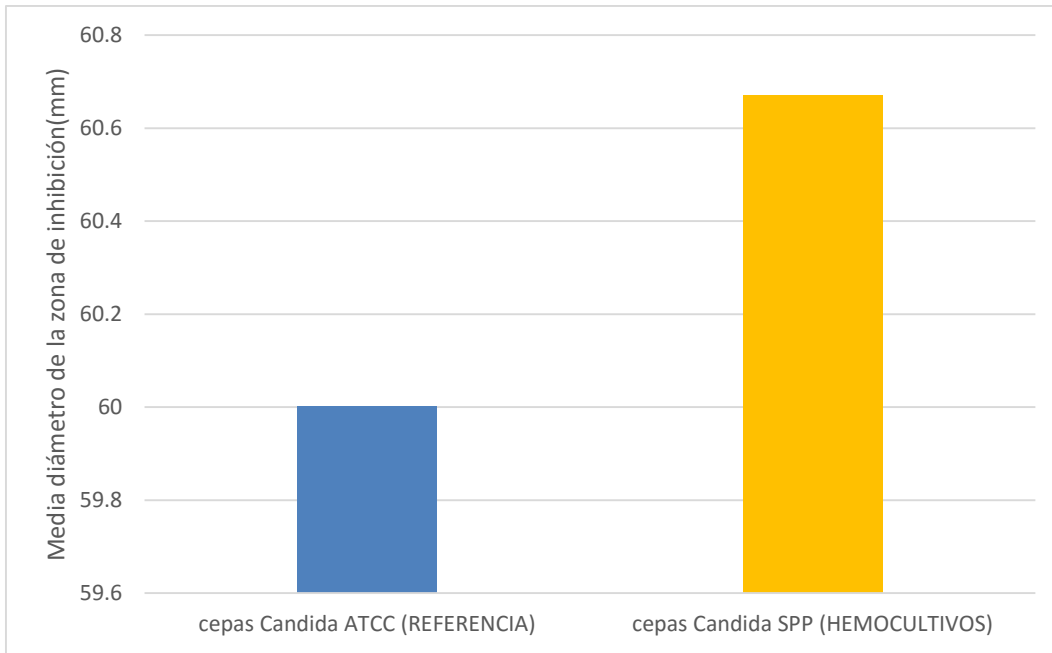


Figura 15. Media del halo de inhibición de las cepas *Candida ATCC* (referencia) comparado con las medias de halo de inhibición de las cepas de *Candida spp* de hemocultivos.

Tabla 4. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico y diclorometánico de los metabolitos secundarios del actinomiceto de código BI-IM2 feb15 frente a cepas de *Candida spp.*

Microorganismos del género <i>Candida spp</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	Extracto hexánico	Extracto diclorometánico
<i>Candida albicans ATCC 90028.</i>	8,90625	17,8125
<i>Candida tropicalis 7206</i>	4,453125	4,453125
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	35,625	8,90625
<i>Candida albicans 7516</i>	8,90625	17,8125
<i>Candida parapsilosis 7307</i>	8,90625	35,625

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

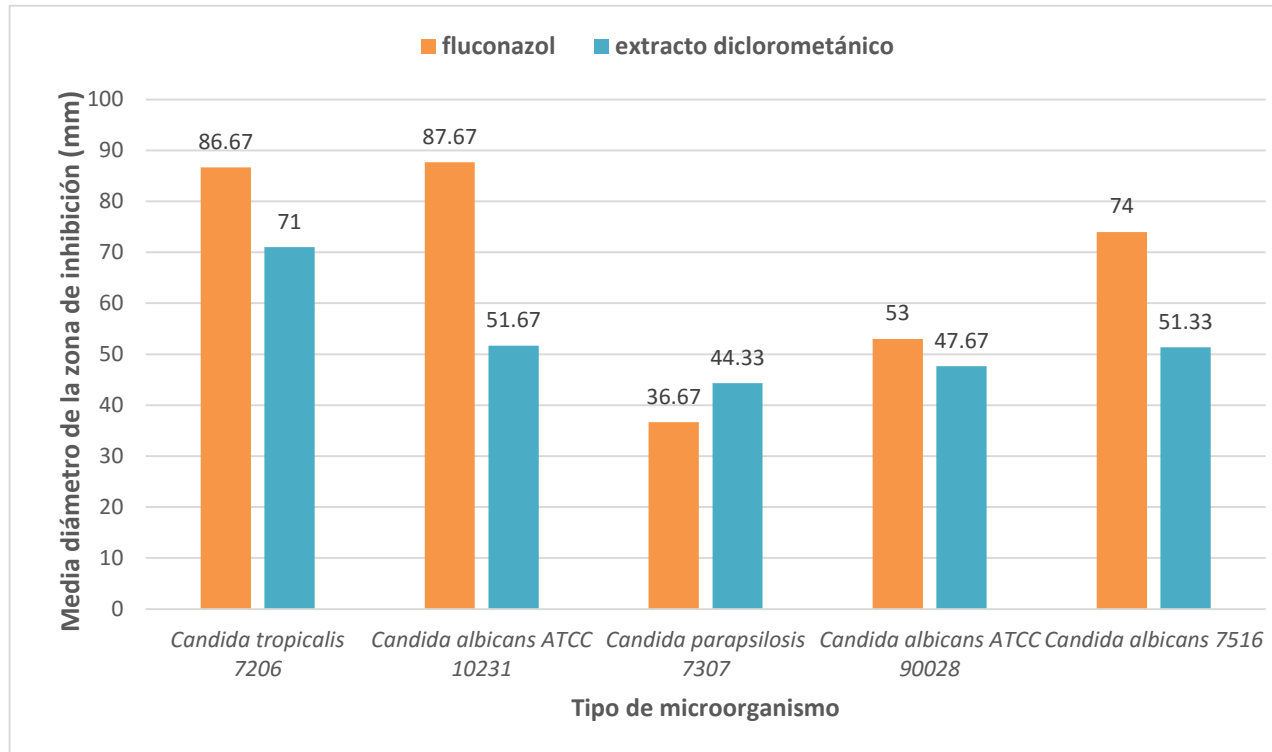


Figura 16. Media del halo de inhibición del extracto diclorometánico comparado con la media del halo de inhibición del control positivo frente a las bacterias patógenas

V. DISCUSIÓN

Las cepas de actinomicetos fueron adaptadas a las condiciones del ambiente marino, esto quiere decir que posee una fisiología acorde para su correcto desarrollo y expresión de metabolitos primarios y secundarios.²⁵

En la actualidad la multirresistencia antifúngica pone en peligro el tratamiento de un número creciente de enfermedades infecciosas como la candidiasis y la candidemia, gracias a la participación de actinomicetos productores de metabolitos bioactivos tipo antifúngico es posible contrarrestar a algunos de estos patógenos emergentes. Así tenemos que especies del género *Streptomyces* de origen marino son consideradas actinobacterias modelos en la producción de nuevos y promisorias moléculas antimicrobianas.²⁶

De las 60 cepas aproximadamente de actinomicetos de sedimento marino que se encontraban en la colección, se pudieron recuperar 30 cepas o sea el 50% del total, fueron sembradas en caldo marino por 7 días y de allí repicadas a un agar marino observándose el crecimiento característico de los actinomicetos, este resultado difiere de otros trabajos puesto que el agar marino útil generalmente para el aislamiento de heterótrofos no es utilizado necesariamente para el aislamiento de actinomicetos, pero sí utilizan el agar caseína-almidón y agar czapeck y otros medios enriquecidos, los cuales según otros autores tuvieron un óptimo rendimiento para la recuperación de actinomicetos marinos, en nuestro caso el agar marino si tuvo un buen rendimiento.²⁷

En el presente estudio se pudo observar una variedad morfológica de colonias de actinomicetos que se puede observar en la tabla 2 siendo las más frecuentes las circulares con borde liso y las colonias de bordes muy irregulares, así mismo las

colonias blanco grisáceas pulverulentas y sin pigmentación en la superficie predominaron sobre las demás variedades de colonias sin embargo la pigmentación al reverso de cada colonia fue variable entre color marrón, amarillo. Estas mismas características fueron también observadas por otros autores.²⁸

En el Perú, existe escasa literatura científica relacionada con el aislamiento y la actividad antimicrobiana de bacterias marinas. León *et al.* 2007²⁹ reportaron el aislamiento, caracterización fenotípica y propiedades antimicrobianas frente a patógenos humanos de diez cepas marinas que incluyen a géneros como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y dos actinomicetos, todos aislados de invertebrados intermareales de la Bahía de Ancón. Otros reportes señalan la presencia considerable de actinomicetos (aislados de sedimento marino recolectados de diferentes profundidades de la costa central del Perú) con actividad antibacteriana y antifúngica frente a patógenos de origen clínico.²⁹

El método de doble capa constituyó una prueba muy sensible y efectiva para la evaluación cualitativa de antagonismo fúngico. En el trabajo de León (2007)²⁸ se utiliza este método como ensayo de una gran colección de cepas ante dos bacterias testigo, obteniendo buenos resultados. Si bien en el presente trabajo Las evaluaciones se realizaron con cepas estándar y de origen clínico, podemos comparar los resultados obtenidos con aquellos del trabajo previamente mencionado. En los resultados del trabajo mencionado se puede observar una marcada actividad frente a organismos Gram positivos y una mediana o tenue actividad frente a bacterias gram negativas; mientras tanto en el presente trabajo podemos observar que la mayoría de las cepas tienen actividad por lo menos contra una de las especies de *Candida spp*, pero la cepa de código BI-IM2 feb15 y 2PAT-ARG1 tienen actividad contra los cinco patógenos enfrentados motivo por el cual fueron seleccionadas para la extracción de metabolitos secundarios con los dos solventes seleccionados y probar su actividad frente a las levaduras. Esto puede deberse o bien a la selección adaptativa de producción de antibióticos eficaces frente a microorganismos ecológica y filogenéticamente relacionados³⁰. Se usaron dos solventes orgánicos de baja polaridad (hexano) y de mediana polaridad (diclorometano), para la extracción orgánica. Este procedimiento permitió la separación de los compuestos polares extracelulares producidos por las cepas de actinomicetos seleccionados. El diclorometano fue el solvente con mayor eficiencia de recuperación de antifúngicos del sobrenadante. Si bien Zheng (2004) utiliza etil- acetato para la extracción de metabolitos obteniendo muy

buenos resultados²², nosotros elegimos el diclorometano y hexano por sus características químicas así como por su reducido costo y fácil obtención y la disponibilidad en el laboratorio y porque también León (2007) trabajo con este solvente obteniendo buenos resultados contra *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes²⁶.

Para diluir los extractos orgánicos se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, asimismo como control negativo. Es muy importante resaltar que no presentó actividad tóxica en ningún microorganismo evaluado, lo cual ratifica que el responsable de la actividad antimicrobiana son los extractos obtenidos.

Con respecto al proceso fermentativo, los medios de fermentación para los actinomicetos son generalmente más enriquecidos que los de aislamiento y tienen una variedad de nutrientes naturales y semisintéticos. En este caso particular los medios de fermentación poseen grandes cantidades de fuentes carbonadas, cloruro de sodio, sales minerales propias del agua del mar, una fuente proteica y debe estar enriquecida con algún cierto grupo de aminoácidos como Asparagina, Arginina o fenilalanina. Estos medios generan una gran biomasa que conlleva a la producción de los metabolitos secundarios generalmente a partir del tercer o cuarto día. La bibliografía muestra que el tiempo de agitación es esencial para la obtención de buenas cantidades de metabolitos. Por estas razones es que se estandarizó el proceso fermentativo usando caldo marino puesto a temperatura ambiente por 15 días de agitación.

La obtención del extracto diclorometánico y extracto hexánico a partir del proceso fermentativo permitió realizar las evaluaciones cuantitativas del potencial antifúngico de las cepas seleccionadas.

Los resultados muestran una gran potencia del extracto diclorometánico de la cepa BI-IM2 feb15 sobre las levaduras, en especial contra la cepa de *Candida tropicalis* 7206, la cepa de actinomiceto de código 2PAT-ARG1 no mostró formación de halo con ninguno de los extractos por lo tanto consideraremos que no tuvieron actividad antifúngica.

Por lo tanto nos centraremos en los resultados obtenidos de la cepa de código BI-IM2 feb15. En el Anexo 8 se puede observar los resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para los datos obtenidos, se obtuvo un valor $p > 0,05$ por lo tanto se acepta la hipótesis nula que indica que los datos tienen una distribución normal y son homogéneos en cuanto a varianzas, sabiendo que nuestros datos son paramétricos y nuestras varianzas son homogéneas

aplicamos el diseño de Anova, en el anexo 9, 11, 13, 15, 17 nos muestran que los grupos definidos por el tipo de microorganismo, en este caso cepas patógenas de *Candida spp* y el tipo de extracto orgánico, poseen diferencia significativa en la actividad inhibitoria, el estadístico F, lleva asociado un valor $p < 0,05$, lo cual indica que las interacciones entre los factores poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Seguidamente se realizó pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey en donde se puede observar en el anexo 10, comparando las medias de los extractos y el fluconazol, cada uno tiene una letra diferente por lo tanto son significativamente diferentes, numéricamente podemos decir que el control positivo tiene mayor efectividad, seguida del extracto diclorometánico y menos efectividad el extracto hexánico frente a *Candida tropicalis* 7206

En el anexo 12 se observa que el control positivo tiene mayor efectividad, seguida del extracto diclorometánico y menos efectividad el extracto hexánico frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

En el anexo 14 se observa que el extracto diclorometánico tiene mayor efectividad seguida del fluconazol y menos efectividad el extracto hexánico frente a *Candida parapsilosis* 7307.

En el anexo 16 se observa que el control positivo y el extracto diclorometánico tienen mayor efectividad que el extracto hexánico frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

En el anexo 18 se observa que el extracto diclorometánico y hexánico tiene menos efectividad que el control positivo frente a *Candida albicans* 7516.

Por lo tanto podemos concluir que comparando entre ambos extractos, el extracto diclorometánico es mejor que el extracto hexánico.

Lo que resulta interesante de las especies de *Candida* son considerados patógenos oportunistas, debido a que se encuentran en la microflora normal colonizando desde la cavidad bucal hasta el recto; pero cuando se rompe este equilibrio estos microorganismos empiezan a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas candidiasis y candidemias como lo refiere Pfaller⁶.

Considerándose que el extracto diclorometánico de la cepa de actinomiceto marino resultó ser el más efectivo, se podría afirmar que la actividad antimicrobiana presentada por este se debe al tipo de solvente utilizado, ya que el diclorometano tiende a arrastrar gran cantidad de compuestos polares que han

reportado que tienen propiedades antimicrobianas, para el caso del género *Candida* estos compuestos probablemente pueden actuar inhibiendo la biosíntesis de ergosterol o de otros esteroides presentes en la pared celular de la levadura, alterando su permeabilidad; como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares esenciales según Clancy (2005).³¹

Los diámetros obtenidos de los halos de inhibición del extracto diclorometánico en comparación con los diámetros de los halos de inhibición con los antibióticos utilizados que representan el 100%, fueron casi similares, evidenciándose así su efectividad.

En lo que concierne a los valores de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, las concentraciones para esta prueba oscila entre 71,25 µg/mL - 2,2265625 µg/mL, y obteniendo en los resultados de los patógenos evaluados concentraciones que oscila entre 35,625 -4,453125 µg/mL para el extracto hexánico y para el extracto diclorometánico (tabla 14 y figura 16).

La especie más sensible para el extracto diclorometánico tanto como para el extracto hexánico es la *Candida tropicalis* 7206 ya que presentan la CMI más baja.

En otros trabajos donde realizan estudios sobre los actinomicetos marinos y su actividad antibacteriana frente a diferentes bacterias, se obtienen valores muy similares al estudio realizados contra las levaduras. Se reportaron valores de CMI de *Streptomyces* marinos frente a *B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* ATCC 6538 y *M. luteus* en 3,6 µg/mL, 8 µg/mL y 2 µg/mL respectivamente³².

En cambio otro estudio reporta valores entre 16-74 µg/mL para *Streptomyces* sp. PM-32 frente a varios patógenos bacterianos y fúngicos, que incluye a *S. aureus*, *Shigella*, *E. coli*, *Aspergillus*, *Candida*, entre otros³³. Asimismo otro estudio similar reportan valores CMI entre 16 a > 128 µg/mL para *Streptomyces chibaensis* frente a cepas estándar de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*³⁴. Sin embargo, señalan que la CMI no es una constante para un agente determinado ya que está influenciada por varios factores. Estos factores incluyen la naturaleza del organismo en prueba, el tamaño del inóculo, la composición del medio de cultivo, tiempo de incubación y otros³⁵.

Desde el punto de vista de la ecología química, los metabolitos secundarios producidos por actinomicetos cumplen un rol importante en los aspectos de competencia microbiana y adaptabilidad a un determinado microcosmos. Diferentes autores en los últimos 30 años han expuesto diversas teorías que

explican el metabolismo adaptativo de los actinomicetos para la producción de compuestos de acción complementaria.

Así en estudios similares explicaron inicialmente la necesidad de *streptomyces* de producir compuestos antimicrobianos con el objetivo de adaptarse a su propio nicho. Su planteamiento está relacionado con el comportamiento depredatorio de estos microorganismos, los cuales usan los nutrientes provenientes de su propio micelio de sustrato muerto. Ellos explican que estos microorganismos pueden producir compuestos antibacterianos con el fin de proteger de otros microorganismos la reserva de nutrientes generada a partir de su micelio de sustrato, hecho que le permite obtener suficientes nutrientes en su ambiente. Esta afirmación puede apreciarse de cierta forma *in vitro*, debido a que los experimentos de tipo fermentativo muestran que, generalmente, a que el inicio de la producción de compuestos antimicrobianos se da entre el final del desarrollo del micelio de sustrato y el inicio del desarrollo del micelio aéreo.³⁶

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a las evaluaciones realizadas en el trabajo podemos concluir que:

- Se determinó la actividad antifúngica cualitativa de los actinomicetos marinos enfrentándolos con las cepas de *Candida spp*, seleccionando dos cepas que mejor actividad tuvo en función al tamaño de halo.
- Se evaluó la actividad antifúngica cuantitativa de los metabolitos secundarios extraídos de los actinomicetos marinos utilizando el solvente hexano y diclorometano enfrentándolos con las cepas de *Candida spp*. Así mismo se logró determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) siendo la más sensible *Candida tropicalis 7206* con una CMI de 4,453125 µg/mL

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación de los actinomicetos no solo marinos también pueden ser de tierra y otros substratos, para la búsqueda específica de compuestos con actividad antimicrobiana, para lo cual se propone ensayar con más patógenos de importancia médica.
- Evaluar extractos de metabolitos secundarios de actinomicetos marinos obtenidos con solventes de diferente polaridad.
- Profundizar estudios sobre los rendimientos y concentraciones de los metabolitos secundarios identificados en la presente investigación, pues de ello dependerá si vale la pena o no su aprovechamiento por parte de la industria o la medicina.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morales T, Betzaide K. Identificación de *Candida spp.* aisladas en hemocultivos de pacientes de Retén, utilizando el medio chomagar, y susceptibilidad a fluconazol y voriconazol. Asesores: Josefa Diaz, Mary Carmen Gómez. Tesis de Grado Título Profesional. Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias. Cumaná, Estado Sucre. 2012.
2. Paz L, De León P, Dario y Ramirez R. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de cuidados críticos intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. Acta medica peruana (en línea). 2008, vol. 25, n°3, p. 140-147. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v25n3/a04v25n3.pdf>.
3. WHO. Informe sobre la salud en el mundo 2002- reducir los riesgos y promover una vida sana. Disponible en : <http://www.who.int/whr/2002/en/whr02.es.pdf>
4. Becerra M, Tantaleán J, Suarez V, Alvarado M, Candela J, Y Urcia F. Epidemiologic Surveillance of Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country. BioMed Central Pediatrics, 2010, vol. 10, n°66. Disponible en: <http://www.biomedical.com/1471-2431/10/66>.
5. Reimer L, Wilson M, weinstein M. Update on detection of bacteriemia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997, vol.10, n° 3, p.444-465. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC172929/>
6. Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. J Hosp Infect 1995; 30: 329-338.
7. Fenical W. New Pharmaceuticals from marine organisms. Trends Biotechnol. 1997;5 (9):339-41
8. Oskay M, Tamer AU, Azeri C. Antibacterial activity of some actinomicetes isolated from farming soils of Turkey. African J. Biotechnol. 2004;3(9):441-6
9. Chang S, Sievert DM, Hageman JC. Infection with vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003; 348:1342-7.
10. Jawetz E. Quimioterapia antimicrobiana. Manual de microbiología médica. 9ed. México, DF: Editorial El Manual Moderno, SA de CU, 1989:110-53.
11. Molina J. Revisión bibliográfica sobre Malassezia (Pytirosporium): taxonomía y su importancia en las infecciones sistémicas, Rev Iberoam Micol 1993.
12. Madrenys N, Torres JM, Urrea A. Estudio epidemiológico de las micosis ungueales en Barcelona. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 14-17.

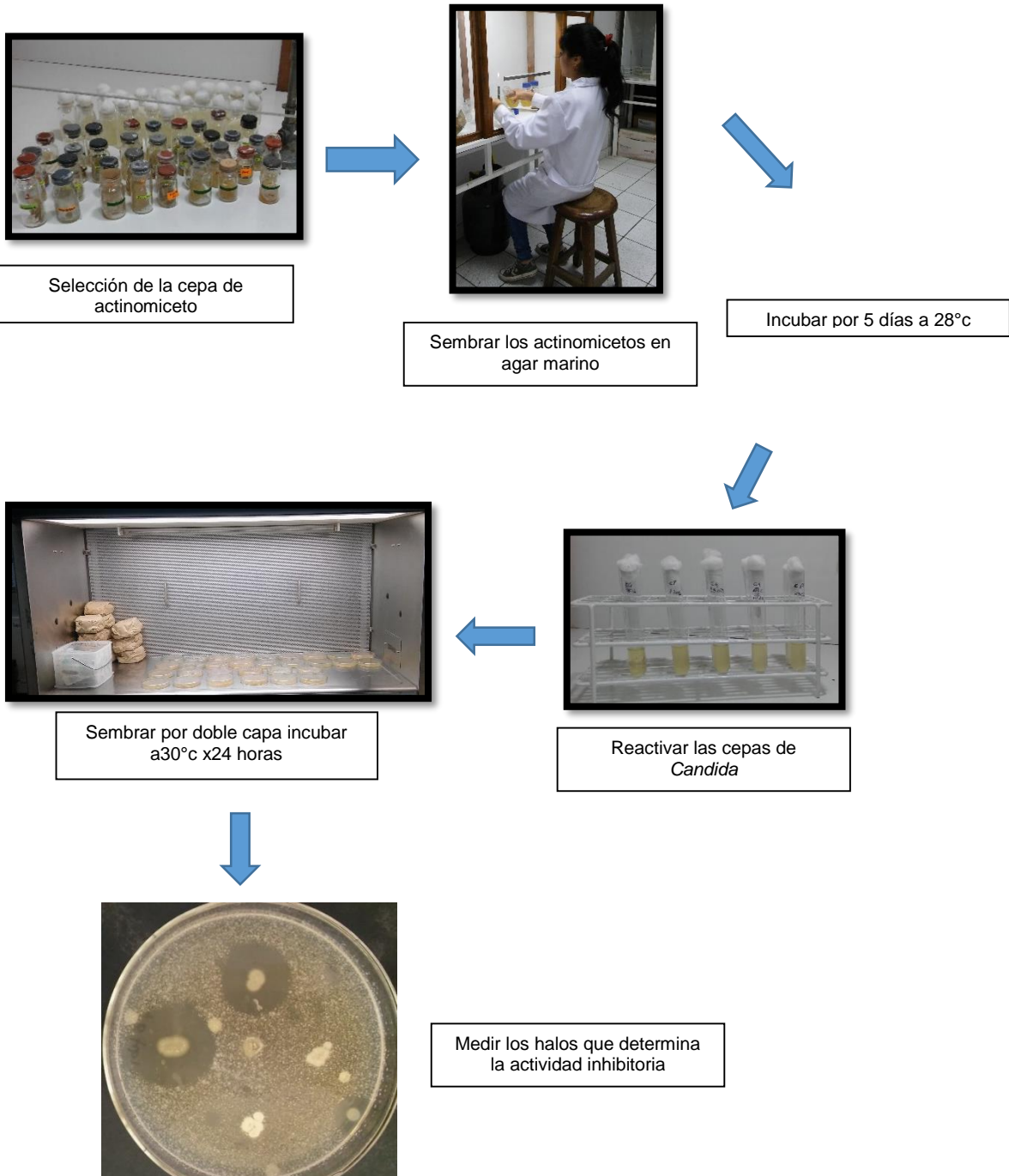
13. Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, & Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 399-405.
14. Tomasz M, Mitomycin C. Small, fast and deadly (but very selective). *Curr. Biol*. 2: 575- 579.
15. Westley JW (1977) Polyether antibiotics: Versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol*. 22: 177-223.
16. Ayala J, Aleman M, Guajardo C, Rivera N. Bacteriemias: incidencia y resistencia antimicrobiana. Tendencia a través de dos décadas de seguimiento. *Avances Ciencias Clínicas*, 2006 vol.8, No. 23, p 4-9.
17. Peman J, Canton E. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (en línea). 2005, vol. 24, n°1, p: 23-30.
18. Reymer L, Wilson M, Weinstein M. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997, vol. 10, n° 3, p.444-465. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172929/>
19. Pfaller, MA, Diekema, D. Epidemiology of invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology reviews*. 2007, vol 20, n°1, p. 133-163. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/20/1/133.abstract>
20. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis* an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; vol 21, n° 4, p 606 – 625.
21. Rogelio J, Treviño R, Gonzales J, Garza E, Gonzales G. *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria* 2012; Vol.; 14, n°2,p.31-32.
22. Zheng L, Lin W, Yan X, Chen H. A primary study on antimicrobial and cytotoxic activity of marine bacteria. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 2004; 15(9):1633-6. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011; 28(2): 237-46. 246
23. Huamaní M, y Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Tesis título profesional UNMSM. Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica, Lima. 2005.
24. León J, Montero S, Albán J, Tomás G, Aponte J. Actividad antimicrobiana de tres especies vegetales de uso en medicina natural peruana. XIX REUNIÓN CIENTÍFICA ICBAR. 2010

25. Aponte J. Estudio del potencial antibacteriano de los metabolitos extracelulares producidos por el actinomiceto marino *Streptomyces* M10-77 [tesis de pregrado]. Lima: UNMSM 2011.
26. León J. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú 2011.
27. León J. Actinomicetos bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú, Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Lima- Perú 2007.
28. Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(12):7520-9.
29. León J, Liza L, Soto I, Cuadra DL, Patiño L, Zerpa R. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Rev Per Biol.* 2007;14(2):259-70.
30. Challis G. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS.* 2003. Vol. 100, supl.2; 1455- 14561.
31. Clancy J. fluconazole MIC and the fluconazole Dose/MIC ratio correlate with therapeutic response among patients with candidemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2005, vol. 49, n°8, p.3171-3177 .
32. Elgendy M, Shaaban M, El-Bondkly AM, Shaaban KA. Bioactive benzopyrone derivatives from new recombinant fusant of marine *Streptomyces*. *Appl Biochem Biotechnol.*2008;150: 85-96.
33. Manivasagan P, Gnaman S, Sivakumar K, Thangaradjou T, Vijayalaksmi S, Balasubramanian T. Antimicrobial and cytotoxic activities of an actinobacteria (*Streptomyces* sp. PM-32) isolated from an offshore sediments of the Bay of Bengal in Tamilnadu. *Adv Biol Research.* 2009;3(5-6):31-6.
34. Gorajana A, Kurada B, Peela S, Jangam P, Vinjamuri S, Poluri E, Zeeck A. 1-Hydroxy-1 norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *J Antibiot.* 2005;58(8):526-9.
35. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of actinomycetes isolated from the Khumbu region of Mt. Everest. *Int Confer Great Himalayas.* Kathmandu University, Canada. January. 2004. p. 12-5.

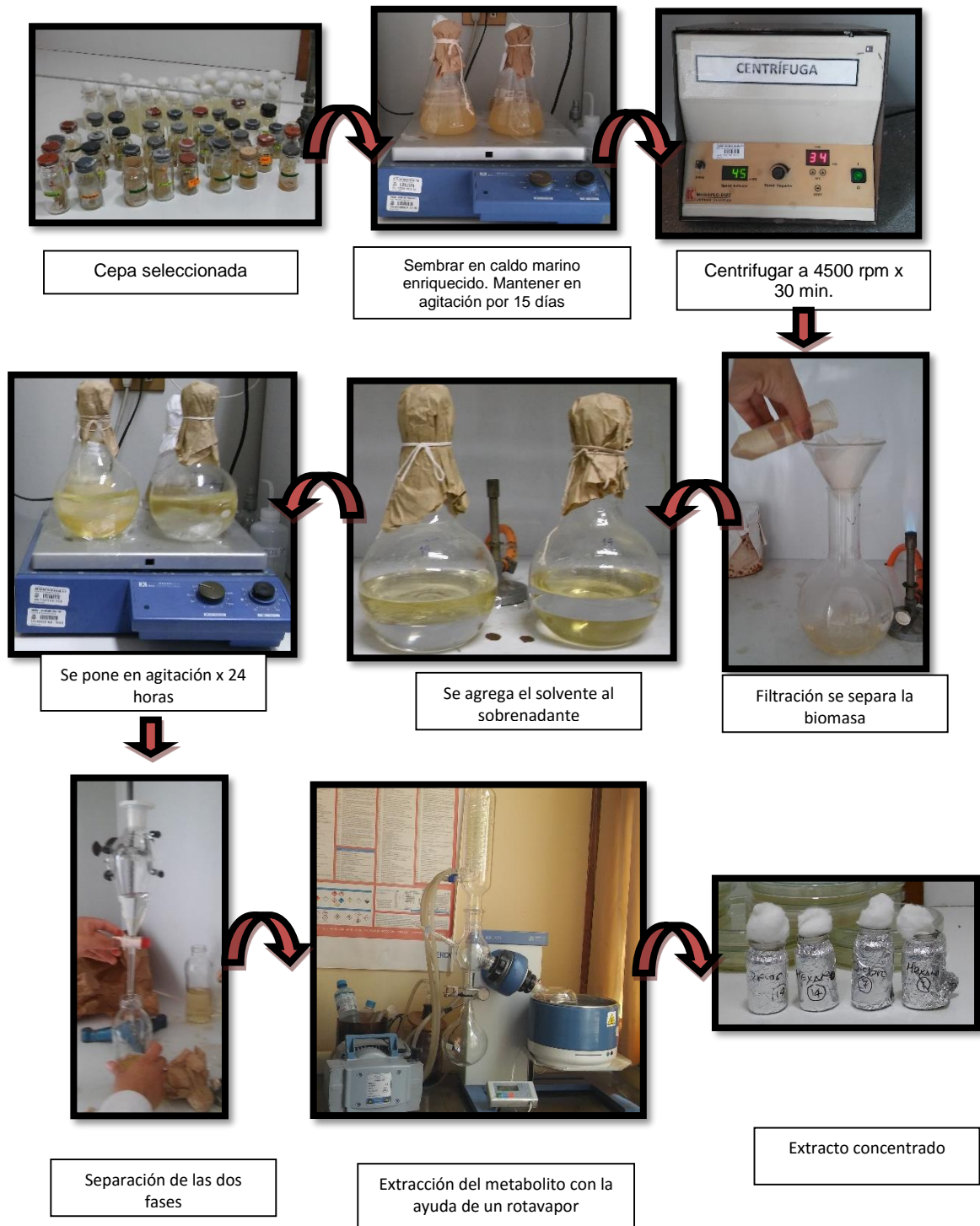
36. Chater, K. Streptomyces inside- out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Phil. Trans. R.Soc. B. 2006.(361); 761- 768.
37. Buchanan R, Gibbons, N. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. (Eight edition), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 747- 842.

ANEXO

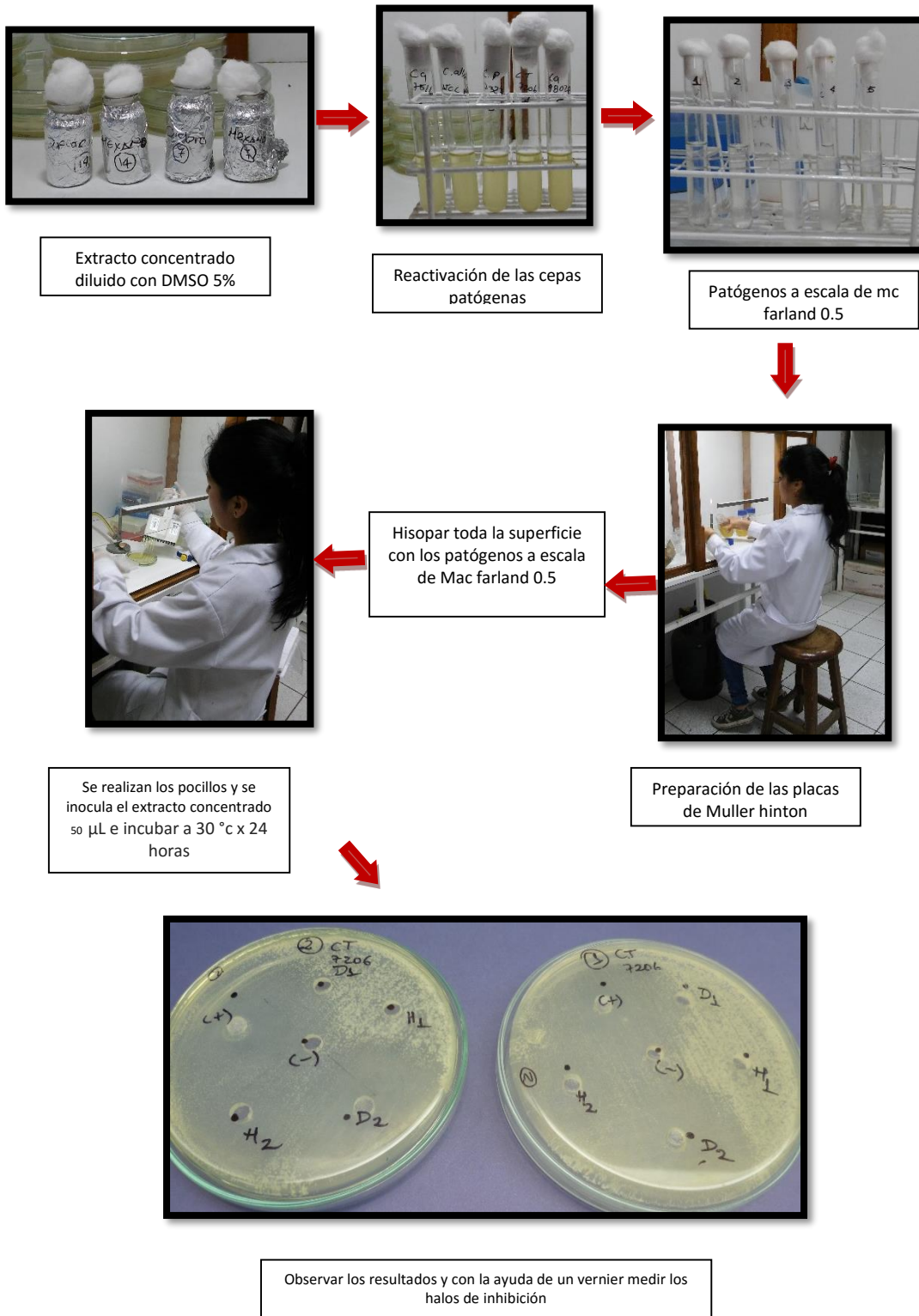
Anexo 1. Flujo de trabajo del método de doble capa, para la selección de los actinomicetos de mejor actividad antifúngica en función al halo



Anexo 2. Flujograma de la extracción del compuesto activo



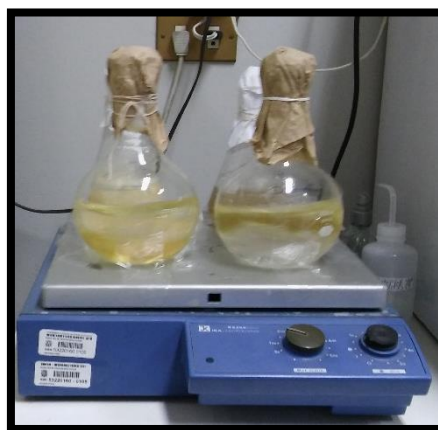
Anexo 3. Flujo de la prueba de su actividad inhibitoria



Anexo 4. Figura de los cultivos de actinomicetos en agitación (1) actinomiceto en crecimiento antes de la filtración (2) actinomiceto filtrado con la adición del solvente (3) obtención de los extractos en viales



(1)

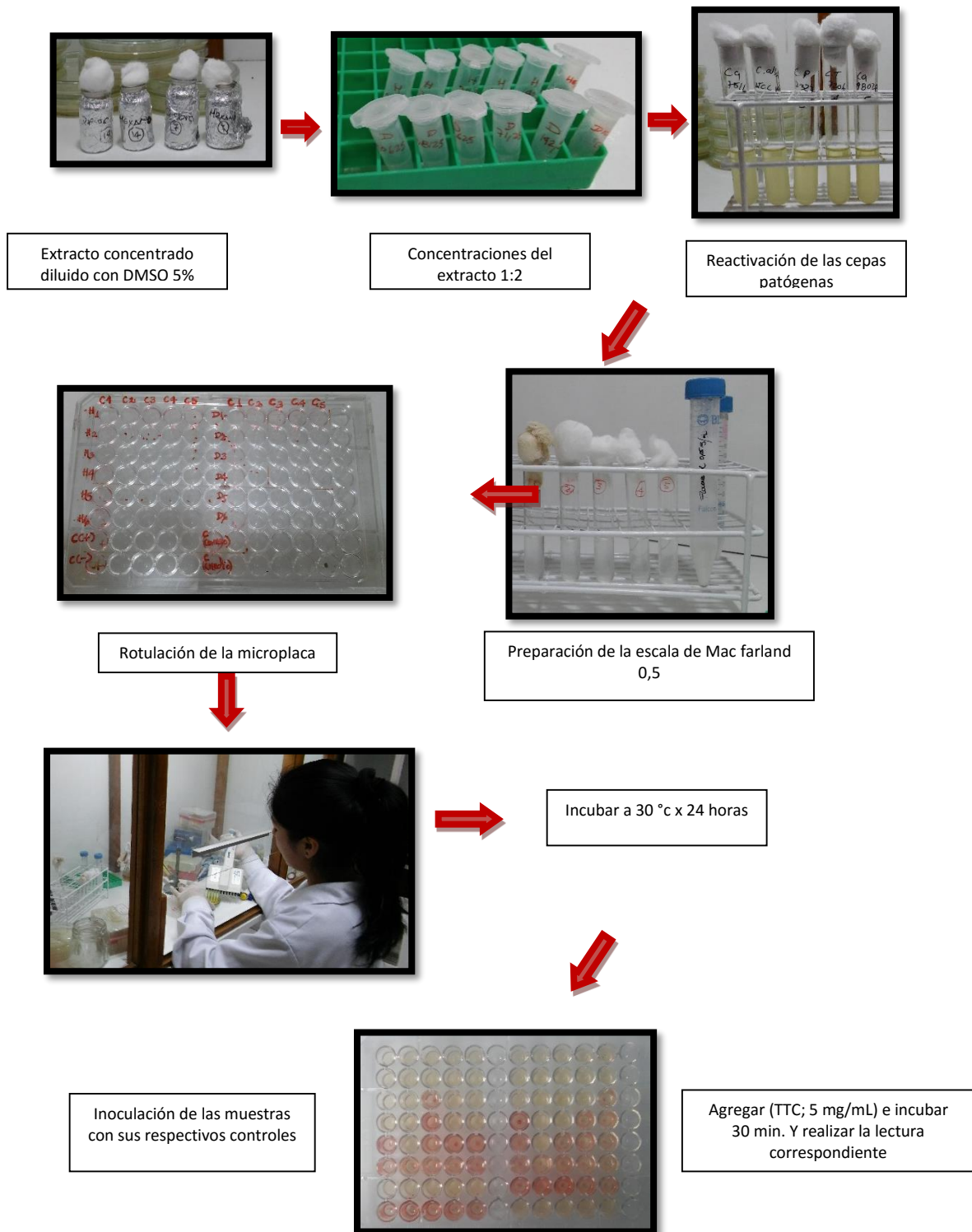


(2)



(3)

Anexo 5. Flujograma de la determinación de la concentración mínima inhibitoria



Anexo 6. Composición de agar y caldo marino

AGAR MARINO PARA PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Componente	g/L
Extracto de levadura	1
Peptona de Soya	4
Agua de mar	750 mL
Agua destilada	250 mL

CALDO MARINO MODIFICADO PARA FERMENTACIÓN

Componente	g/L
Extracto de levadura	1
Peptona de Soya	4
Agua de mar	750 mL
Agua destilada	250 mL
Glucosa	5
Almidón	10
CaCO ₃	1

Anexo 7. Reactivos utilizados en el estudio

REACTIVOS UTILIZADOS

NOMBRE	MARCA
Hexano	Merck
Diclorometano	Merck
Dimetilsulfóxido	Merck
Fluconazol	IqFarma
2,3,5- Trifenil Tetrazolium	Sigma-Aldrich

Anexo 8. Resultados de la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para los datos obtenidos

Patógenos	Normalidad (valor P)	Homogeneidad de varianzas (valor P)
<i>Candida tropicalis</i> 7206	>0.150	0.308
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>0.150	0.440
<i>Candida parapsilosis</i> 7307	>0.150	0.975
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>0.150	0.883
<i>Candida albicans</i> 7516	>0.150	0.544

Anexo 9. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).
Comparación de la efectividad de los extractos frente a *Candida tropicalis* 7206

FUENTE	GL	SC	MC	F	P
Ct 7206	2	1634.9	817.44	41.10	0.000
Error	6	119.3	19.89		
Total	8	1754.2			

GL: Grado de Libertad
SC: Suma de Cuadrados
MC: Cuadrados Medios

Anexo 10. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a *Candida tropicalis* 7206

	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Fluconazol 0.025%	3	86.67	A
Diclorometano	3	71.00	B
Hexano	3	53.67	C

N: Número de repeticiones

Anexo 11. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).
Comparación de la efectividad de los extractos frente a *Candida albicans* 10231

FUENTE	GL	SC	MC	F	P
<i>Ca ATCC 10231</i>	2	5699.6	2849.78	161.31	0.000
Error	6	106.0	17.67		
Total	8	5805.6			

GL: Grado de Libertad
SC: Suma de Cuadrados
MC: Cuadrados Medios

Anexo 12. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a *Candida albicans* ATCC 10231)

	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Fluconazol 0.025%	3	87.67	A
Diclorometano	3	51.67	B
Hexano	3	26.333	C

N: Número de repeticiones

Anexo 13. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).
Comparación de la efectividad de los extractos frente a *Candida parapsilosis* 7307

FUENTE	GL	SC	MC	F	P
Cp 7307	2	470.89	235.444	27.17	0.001
Error	6	52.00	8.667		
Total	8	522.89			

GL: Grado de Libertad
SC: Suma de Cuadrados
MC: Cuadrados Medios

Anexo 14. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a *Candida parapsilosis* 7307)

	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Diclorometano	3	44.33	A
Fluconazol 0.025%	3	36.67	B
Hexano	3	26.67	C

N: Número de repeticiones

Anexo 15. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).
Comparación de la efectividad de los extractos frente a *Candida albicans* 90028

FUENTE	GL	SC	MC	F	P
Ca ATCC 90028	2	453.56	226.78	14.68	0.005
Error	6	92.67	15.44		
Total	8	546.22			

GL: Grado de Libertad
SC: Suma de Cuadrados
MC: Cuadrados Medios

Anexo 16. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% (extractos y el control frente a *Candida albicans* 90028)

	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Fluconazol 0.025%	3	53.00	A
Diclorometano	3	47.67	A
Hexano	3	36.00	B

N: Número de repeticiones

Anexo 17. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).
Comparación de la efectividad de los extractos frente a *Candida albicans* 7516

FUENTE	GL	SC	MC	F	P
Ca 7516	2	2452.7	1226.33	20.94	0.002
Error	6	351.3	58.56		
Total	8	2804.0			

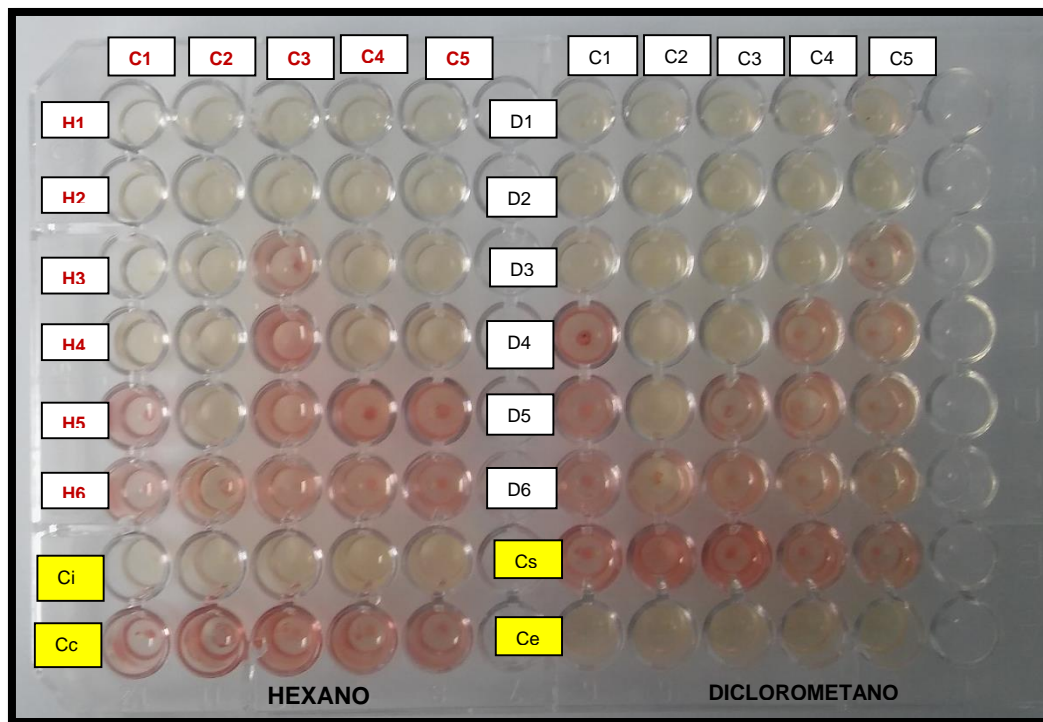
GL: Grado de Libertad
SC: Suma de Cuadrados
MC: Cuadrados Medios

Anexo 18. Subconjuntos homogéneos utilizando el método de tukey nivel de confianza 95% extractos y el control frente a *Candida albicans* 7516

	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
Fluconazol 0.025%	3	86.67	A
Diclorometano	3	71.00	B
Hexano	3	53.67	B

N: Número de repeticiones

Anexo 19. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto hexánico y diclorometánico del actinomiceto BI-IM2 feb15 frente a cepas de *Candida spp.*



Cepas patógenas: (C1) *Candida albicans* ATCC 90028. (C2) *Candida tropicalis* 7206 (C3) *Candida albicans* ATCC 10231 (C4) *Candida albicans* 7516 (C5) *Candida parapsilosis* 7307

Diluciones del hexano (mg/mL): (H1):71,25 (H2):35,625 (H3):17,8125 (H4):8,90625 (H5):4,453125 (H6):2,2265625

Diluciones del diclorometano (mg/mL): (D1):71,25 (D2):35,625 (D3):17,8125 (D4):8,90625 (D5):4,453125 (D6):2,2265625

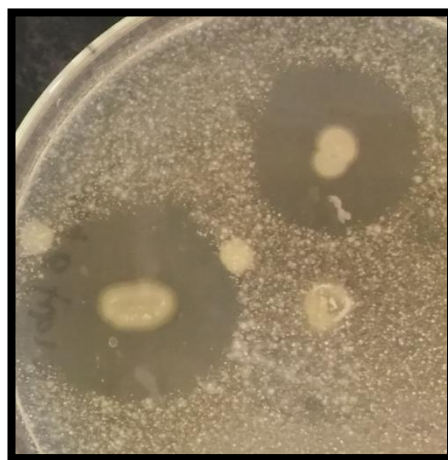
Controles: (Ci): Control de inhibición por fluconazol (0.25mg/mL); (Cc): Control de crecimiento; (Cs): Control de solvente (DMSO al 5%); (Ce): Control de esterilidad del medio de cultivo

Los actinomicetos seleccionados fueron los siguientes: BI-IM2 feb15, 2PAT-ARG1.

Anexo 20. Actividad inhibitoria por el método de doble capa. Actinomiceto marino frente a
(1) *Candida albicans* ATCC 10231 (2) *Candida albicans* 7516 (3) *Candida tropicalis* 7206
(4) *Candida albicans* ATCC 90028 (5) *Candida parapsilopsis* 7307



(1)



(2)



(3)



(4)



(5)

Anexo 21. Características culturales de actinomicetos marinos aislados

Actinomicetos	Medio líquido (caldo marino)	Medio sólido (agar marino)
ER14 feb15	Blanca en toda la superficie, escasez micelial en el cultivo pero abundante en el sedimentado.	Colonia yesosa, 9 mm de diámetro, superficie pulvurulenta, borde irregular, sin elevación.
M10-85 mar15	Abundantes colonias en superficie, sedimento micelial blanquecino.	Blanca grisácea, yesosa circular, poco elevada.
BI-665(2) abril15	Blanca en toda la superficie, escasez micelial en el cultivo pero abundante en el sedimentado.	Colonia yesosa, superficie pulvurulenta, borde irregular sin elevación.
ARG13-II feb 15	Blanca y compacta en toda la superficie, algunas en el fondo, escaso micelio profundo y sedimentado.	Colonia blanca yesosa, borde irregular pulvurulenta, ligeramente elevada, sin pigmento.
BismP2(2) Abril15	Blanquecina con exudado en toda la superficie, pulvurulenta, abundante micelio profundo.	Blanca yesosa, bordes irregulares, centro plumoso, con bordes blanco cremoso, ligeramente elevada.
BI-665 abril15	Plomiza en superficie, abundante micelio sedimentado.	Plomiza superficie rugosa.
BI-IM2 feb15	Blanca yesosa en superficie, micelio profundo largo.	Colonia circular.
2PAT-ARG1	Grande plumiza, con puntos blancos, micelio profundo.	Plomiza circular.
BI-SMP2 ab15	Crema marrón yesosa, micelio profundo uniforme sin conglomerados y abundante micelio.	Beige yesosa, pulvurulenta, ligeramente elevada.
E2B10-3C abril15	Blanca yesosa, pigmentación marrón en la base, micelio profundo.	Blanca yesosa circular, borde poco irregular elevada.
I334C abril15	Blanca yesosa sin micelio profundo, micelio sedimentado.	Colonia circular con borde irregular de color plomo oscuro.
MII-116 feb15	Blanca yesosa sin micelio.	Blanca yesosa, borde irregular, pulvurulenta, poco elevada, presencia de pigmento color marrón.
9PAT-ARG abril15	Blancas, crecen a lo largo del tubo y en superficie.	Blanca circular bordes irregulares y sin pigmento.
AN8-ESP feb15	Blancas amarillentas en superficie, micelio corto sedimentado en el fondo del cultivo.	Superficie algodonosa, ligeramente elevada, borde regular.
5T3 abril15	Blanca y compacta en superficie, algunas en el fondo, escaso micelio profundo y sedimentado.	Colonia blanca yesosa borde irregular, pulvurulenta.
BI-CD1 feb15	Blanca con exudado en superficie, micelio sedimentado.	Blanca yesosa circular pulvurulenta.
BI-665 abril15	Muy delgada, que cubre toda la superficie, agrietada, micelio corto.	Blanca yesosa, circular, elevada

2PAT(2)-ARG1	Blanca yesosa en superficie, micelio profundo largo sedimento miceliar escaso.	Colonia circular, blanca pulvurulenta.
ARG12-II feb15	Ploma seca con algunas zonas blancas, micelio profundo, escaso micelio sedimentado.	Plomizo claro, borde irregular, borde ancho blanquecino, sin micelio.
AN ESP1 feb15	Pequeñas, blancas, planas con bordes lisos, poco micelio profundo.	Plomiza, borde poco irregular puntos blancos sobre la colonia.
MII-131 feb15	Crema yesosa agrietada, poco micelio profundo.	Crema yesosa circular, borde irregular
I434B feb15	Única en superficie, poco abrupta, blanco yesosa.	Blanca yesosa, borde irregular, circular.
ER13(B)	Blanca yesosa sin micelio profundo.	Colonia circular de borde regular.
MER-II	Blanca yesosa agrietada, micelio profundo corto.	Blanca yesosa, pulvurulenta, pigmento marrón bajo.
BI-662(1) abril15	Crema yesosa, corto micelio poco profundo.	Blanca yesosa, circular, borde regular, poco elevada.
MII-116 ©	Blanca y compacta en superficie, algunas en el fondo, escaso micelio profundo y sedimentado.	Colonia blanca yesosa borde irregular, pulvurulenta.
II334C	Grande blanco yesoso, presencia de micelio sedimentado y medio de cultivo transparente.	Blanca yesosa, borde irregular.
BISmP2(3) Abril15	Plomiza y algo húmeda en superficie poca presencia de sedimento.	Plomizas circulares, pulvurulentas.
I434B(2) feb15	Blanca y compacta en superficie, algunas en el fondo, escaso micelio profundo y sedimentado.	Colonia blanca yesosa borde irregular, pulvurulenta.
ER-II feb15	Blanquecina con exudado en toda la superficie, pulvurulenta.	Blanca yesosa con bordes irregulares.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MATRIZ DE CONSISTENCIA**

TÍTULO: “Evaluación de la actividad antifúngica de actinomicetos marinos frente a cepas de *Candida spp*, aisladas de hemocultivos”.
Lima 2015.

Responsable: Bach. Pamela Pilar Bautista Carrasco

Asesor: MCs. Blgo. José Alarcón Guerrero

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Los actinomicetos marinos tendrán actividad antifúngica frente a cepas de <i>Candida</i> , aisladas de hemocultivos?	<p>General</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la actividad antifúngica de actinomicetos marinos frente a cepas de <i>Candida</i> aisladas de hemocultivos. Lima 2015 <p>Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la actividad antifúngica cualitativa de los actinomicetos marinos frente a cepas de <i>Candida spp</i>. • Evaluar la actividad antifúngica cuantitativa de los metabolitos secundarios de los actinomicetos marinos frente a cepas de <i>Candida spp</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actinomicetos • Antecedentes • Taxonomía • Metabolitos secundarios producidos por actinomicetos • Infecciones nosocomiales • Hemocultivo • Fungemia • Candidemia 	<p>Variable independiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Actinomiceto marino <p>Variable dependiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacidad antifúngica de los extractos orgánicos del actinomiceto <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • pH • Formación del halo • Tiempo y T° de incubación • Medio de cultivo 	<p>Tipo de investigación: Básica pre-experimental</p> <p>Análisis de datos</p> <p>Población 60 cepas de actinomicetos aislados de lecho marino.</p> <p>Técnicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • La determinación de la actividad antifúngica se realizará mediante el método de “doble capa”. • Extracción del compuesto activo y pruebas de Su actividad inhibitoria se realizará por el método del pocillo. • La Prueba De La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Se realizará siguiendo la metodología de pocillos en placas de microdilución.

