

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE *Pleurotus ostreatus* COMO INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ESKAPE

Juliana Danisa López Bran<sup>1</sup>, Kelly Sorany Berrío Benitez <sup>2</sup>, Santiago Arbeáez Guzmán<sup>3</sup>, Erika Juliana Obando Montoya <sup>4</sup> Rafael Mariano Álvarez <sup>5</sup>

Estudiantes Química Farmacéutica Universidad CES [lopez.juliana@UCES.edu.co](mailto:lopez.juliana@UCES.edu.co)<sup>1</sup>,  
[berrio.kelly@UCES.edu.co](mailto:berrio.kelly@UCES.edu.co)<sup>2</sup>, [arbelaez.santiago@UCES.edu.co](mailto:arbelaez.santiago@UCES.edu.co)<sup>3</sup>

Docentes Facultad de Ciencias y Biotecnología Universidad CES [eobando@CES.edu.co](mailto:eobando@CES.edu.co)<sup>4</sup>,  
[ralvarez@CES.edu.co](mailto:ralvarez@CES.edu.co)<sup>5</sup>

### RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* (pertenecientes al grupo de las bacterias ESKAPE) según la OMS son las que principalmente causan enfermedades graves en las personas y por su resistencia son muy difíciles de controlar; se proponen 4 estrategias importantes para su control, una de ellas es invertir en investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatirlas. En la presente investigación se aborda esta problemática analizando la actividad biológica de *Pleurotus ostreatus* (obtenido del grupo de micología de la Universidad de Antioquia), como inhibidor del crecimiento de las bacterias mencionadas, pues en anteriores investigaciones le han probado su actividad. En este caso se implementan pruebas in vitro de CMI, IC50 e IC90 con ayuda la espectrofotometría de absorción, este método se presenta como el factor diferenciador que brinda datos cualitativos y cuantitativos de la capacidad de inhibición de crecimiento de los extractos (Hexano, Acetato de Etilo, Cloroformo, Acetona y Metanol) de la seta sobre los agentes infecciosos mencionados, estos extractos se someten a análisis por la técnica cromatografía de gases acoplada a masas (CG/MS) con el fin de determinar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana. En los resultados obtenidos se evidencia que las fracciones evaluadas muestran especial grado de inhibición en *E. coli*, pues su crecimiento con las fracciones de hexano, cloroformo y acetona se ve disminuido y las posibles sustancias responsables de la actividad antibacteriana son ácidos grasos en su mayoría saturados, algunos de los cuales tienen esta actividad biológica reportada como se cita en la tabla 4, su acción bactericida podría ser explicada por el estrés oxidativo generado en los microorganismos.

**Palabras clave:** AMR (Resistencia Antimicrobiana), Inhibición bacteriana, fracciones *Pleurotus ostreatus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, Cromatografía líquida al Vacío

### EVALUATION TO THE ACTIVITY OF EXTRACTS OF *Pleurotus ostreatus* AS INHIBITORS OF THE GROWTH OF ESKAPE BACTERIA

#### ABSTRACT

Resistance to antibiotics is today one of the greatest threats to global health, the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* (some of the ESKAPE pathogens) according to the WHO are those that mainly cause serious diseases in people and because of their resistance they are very difficult to control; four important strategies are proposed for its control, one of which is to invest in research and development of new antibiotics to combat them. In the present

investigation this problem is addressed by analyzing the biological activity of *Pleurotus ostreatus* (obtained from the mycology group of the University of Antioquia), as an inhibitor of the growth of the bacteria, since previous research has proven its activity. In this case in vitro tests of CMI are implemented using absorption spectrophotometry, this method is presented as the differentiating factor that provides qualitative and quantitative data of the growth inhibition capacity of the extracts (Hexane, Acetate Ethyl, Chloroform, Acetone and Methanol) of the mushroom on the mentioned infectious agents. these extracts are subjected to analysis by the gas chromatography coupled to masses technique (GC / MS) in order to determine the compounds responsible for the antibacterial activity. The obtained results show that the fractions evaluated show a special degree of inhibition in *E. coli*, since its growth with the fractions of hexane, chloroform and acetone is diminished and the possible substances responsible for the antibacterial activity are fatty acids. saturated, some of which have this biological activity reported as mentioned in table 4, its bactericidal action could be explained by the oxidative stress generated in microorganisms.

**Keywords:** AMR (Antimicrobial resistance), Bacterial inhibition, *Pleurotus ostreatus* fractions, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, Vacuum Liquid Chromatography.

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos ocurre cuando los microorganismos (como bacterias, hongos, virus y parásitos) cambian cuando están expuestos a este tipo de medicamentos; como resultado se obtienen antimicrobianos ineficaces y las infecciones persisten en el cuerpo, lo que aumenta el riesgo de propagación a otras personas. (OMS, 2016) El incremento de la resistencia antimicrobiana (AMR por sus siglas en inglés), ha limitado el empleo de antibacterianos betalactámicos en pacientes que los requieren para su tratamiento, el propósito de varios estudios ha sido el de describir los mecanismos de resistencia a los betalactámicos en bacterias gramnegativas de interés clínico, como las ESKAPE, denominadas “superbacterias” entre ellas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceas*, en esta última se incluye: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp* y *Serratia sp*. (Moreno, G. C. ,2013). Los patógenos de

ESKAPE son la principal causa de infecciones nosocomiales en todo el mundo, la mayoría de ellos son aislamientos resistentes a múltiples fármacos, que es uno de los mayores retos en la práctica clínica. La resistencia a múltiples fármacos se encuentra entre las tres principales amenazas para la salud pública mundial y suele ser causada por el uso excesivo, la automedicación y la mala prescripción de medicamentos antimicrobianos, el uso inapropiado de antimicrobianos y productos farmacéuticos deficientes. (García Castellanos, et al, 2014) Una encuesta de las infecciones adquiridas en los hospitales (HAI) en los Estados Unidos en 2011 informó un total de alrededor de 722.000 casos notificados, con 75.000 muertes asociadas con infecciones nosocomiales (Magill, S. S., 2014). Un segundo estudio realizado en 2002 estimó que, al tener en cuenta todos los tipos de infecciones bacterianas, aproximadamente 1,7 millones de pacientes sufrían de HAI, lo que contribuyó a la muerte de 99.000 pacientes al año (Klevens R. M.,et al, 2007)

En un estudio hecho en Medellín por Londoño J., et al; 2016, encontraron que en las salas de hospitalización la bacteria que más aisló fue *E. coli*, seguida por *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomona aeruginosa*.

A continuación, una explicación del panorama de cada una de las bacterias nombradas por la OMS como las más representativas al hablar de AMR, presentes en el actual estudio.

- *Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria naturalmente presente en la flora intestinal. Aunque la mayoría de las cepas de esta bacteria no son peligrosas para la salud, algunas producen infecciones intestinales más o menos graves; (gastroenteritis infantiles, enterotoxigénicas, enteroinvasivas, enteropatógenas, enterohemorrágicas, enteroagregativas, de adhesión difusa, patógenas extraintestinales). Varias investigaciones de la etiología de la diarrea hemorrágica se han asociado a la presencia de *E. coli* enteroagregativa (CEEA), *E. coli* productoras de toxinas Shiga (SLT) o *E. coli* enterotoxigénica (Velázquez-Meza, et al., 2005).

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) el género contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones. Las etapas de las infecciones causadas por *S. aureus* pueden resumirse de la siguiente manera: frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados por *S. aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa. Desde estos sitios, *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones en la piel o a las membranas mucosas; si estas barreras son interrumpidas por un trauma o una cirugía, *S. aureus*, que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta

bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteremia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico (Benítez, O., et al., 1991).

- *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es un anaerobio Gramnegativo, en forma de bacilos, facultativo que forma parte de la flora intestinal normal. Las tasas de transporte son bastante bajas en la población general, pero son más altas en los pacientes hospitalizados, especialmente los huéspedes inmunocomprometidos. Los pacientes se infectan a través de una fuente exógena, como por contacto directo / indirecto con el medio ambiente, pero también son posibles fuentes endógenas. Muchas cepas de *P. aeruginosa* muestran una susceptibilidad intrínseca reducida a varios agentes antibacterianos, así como una propensión a desarrollar resistencia durante la terapia, especialmente en cepas resistentes a carbapenémicos (principalmente imipenem). El mecanismo más común de resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* es una combinación de producción cromosómica de AmpC y cambio de poro.

- *Enterobacter spp.* las especies son bacilos Gram-negativas que a veces se encapsulan. Pueden causar infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, generalmente hospitalizados, y contienen una amplia gama de mecanismos de resistencia a los antibióticos. Muchas cepas de *Enterobacter* contienen carbapenemasas, metalo-βlactamasa-1 y KPC (Castanheira M., et al, 2006-2007).

Es importante también, la represión estable de las β-lactamasas de Amp Cíclico que puede expresarse a niveles elevados por mutación en este grupo bacteriano. Estas cepas MDR son resistentes a casi todos los fármacos

antimicrobianos disponibles, excepto tigeciclina y colistina (Boucher H. W., et al, 2009). Las conclusiones de la OMS en el 2016 con respecto a creciente crisis de AMR engloba varios ejes de acción, comprendiendo esta resistencia como un problema complejo que afecta a toda la sociedad y está impulsado por muchos factores interconectados, es importante notar que las intervenciones aisladas y únicas tienen un impacto limitado por lo que se requiere una acción coordinada para minimizar la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos. “Se requiere una mayor innovación e inversión en la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos, vacunas y herramientas de diagnóstico” (Informe OMS, 2016).

Los nuevos desarrollos tecnológicos incluyen el estudio de nuevas sustancias biológicamente activas a partir de organismos vivos a los que ancestralmente se le atribuyen propiedades “curativas” entre estos organismos se encuentra el hongo *Pleurotus ostreatus* es muy consumido alrededor del mundo gracias a su sabor, altos valores nutricionales y propiedades medicinales.

Debido a que contiene una cantidad considerable de nutrientes y diversos ingredientes bioactivos *P. ostreatus*, se ha informado y reportado con actividades antidiabéticas, antibacterianas, anticolestrolícas, antiartríticas, antioxidantes, anticancerígenas, de salud ocular y antivirales (Deepalakshmi K., et al. 2014). Además, la cantidad de compuestos químicos puede variar de una especie a otra, es decir, el número o porción de un determinado producto puede ser diferente de acuerdo con la especie. Sin embargo, Se han obtenido diferentes compuestos de *P. ostreatus* como azúcares, vitaminas y fenoles (Facchini et al., 2014), en estos últimos se ha reportado actividad antibacteriana tanto en bacterias gram positivas como gram negativas, incluso se han hecho estudios de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) e IC50 (Nhera K., et al; 2012). Centrando sus estudios en las

fracciones de polisacáridos que se encuentran en diferentes especies de setas, incluida *P. ostreatus*, demostraron que tiene actividad antimicrobiana (Facchini et al., 2014), (Llauradó et al., 2015). Se ha reportado que la seta presenta actividad antibacteriana en los modelos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes* (Nhera K., et. al; 2012). La actividad antioxidante se debe a la presencia de grupos hidroxilos adyacentes a anillos aromáticos, permitiendo soportar en sus estructuras radicales libres (resonancia) y se cree que esta propiedad resonante a su vez es la responsable de la propiedad antibiótica. El trabajo de investigación, como se comentó anteriormente es motivado por el control de las enfermedades o infecciones provocadas por microorganismos para proporcionar bienestar a la sociedad tratando dichas enfermedades. Por esto, se emprende la búsqueda de una nueva posibilidad de antibiótico haciendo uso de *Pleurotus ostreatus* al partir del supuesto inicial de su actividad antibacteriana reportada en varios estudios (Iwalokun, B. A., et al, 2007), todo para un posterior potencial uso en el sector químico-farmacéutico o agroindustrial. En diversos estudios se han analizado las actividades biológicas antibacteriana del género *Pleurotus sp.*, la tabla 1 muestra en resumen los microorganismos contra los que se ha mostrado una actividad y el tipo de extracto utilizado.

**Tabla 1. Actividad de diferentes especies de *Pleurotus*. contra varios microorganismos.**

Microorganismo	Extracto	Ref
<i>Bacillus cereus</i>	Extracto de cuerpo fructífero con benzeno y etanol	Gerasimenya V, et al, 2002. Okamoto, K., et al, 2002. Periasamy, K., et al 2005.
<i>Bacillus subtilis</i>	Extracto acuoso	Gerasimenya V, et al, 2002

		Okamoto, K., et al, 2002
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extractos acuosos	Gerasimenya V, et al, 2002 Wang, H., et al 2004
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Extracto etanolico	Gregori, A., et al, 2007.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Extracto etanolico	Gregori, A., et al, 2007.
<i>Escherichia coli</i>	Extracto de etanol de <i>P. ostreatus</i> hervido	Gerasimenya V, et al, 2002 Wang, H., et al 2004
<i>F. oxysporum</i>	Extractos de hexanodichlorometano que contienen anisaldehído.	Akyuz, M., et al, 2009
<i>B. subtilis</i>	Extractos de hexanodichlorometano que contienen anisaldehído.	Akyuz, M., et al, 2009
<i>P. aeruginosa</i>	Extractos de hexanodichlorometano que contienen anisaldehído. Extracto acuoso de <i>P.ostreatus</i> crudo	Wang, H., et al 2004 Akyuz, M., et al, 2009
<i>A. niger</i>	Extractos de hexanodichlorometano que contienen anisaldehído.	Akyuz, M., et al, 2009
<i>Pseudomonas sp</i>	Extracto acuoso	Gerasimenya V, et al, 2002
<i>K.pneumonia</i>	Extracto de etanol de <i>P. ostreatus</i> hervido, Extracto de cuerpo fructífero con acetona	Periasamy, K., et al 2005. Wang, H., et al 2004
<i>Micrococcus luteus</i>	Extracto de cuerpo fructífero con benzeno, etanol, acetona y cloroformo	Periasamy, K., et al 2005.

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Extracto de cuerpo fructífero con acetona y cloroformo	Periasamy, K., et al 2005.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Extracto de cuerpo fructífero con benzeno, acetona, metanol y etanol	Periasamy, K., et al 2005.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Extracto de cuerpo fructífero con metanol, etanol, acetona y cloroformo	Periasamy, K., et al 2005.
<i>Shigella boydii</i>	Extracto acetato de etilo	Akyuz, M., et al, 2010
<i>Shigellae dysenteriae</i>	Extracto acetato de etilo	Akyuz, M., et al, 2010
<i>Shigellae flexnerii</i>	Extracto acetatode etilo	Akyuz, M., et al, 2010

En los artículos encontrados se puede evidenciar que entre los diferentes extractos utilizados los que tienen menor actividad demostrada son los extractos acuosos, por lo que estos no hacen parte del presente estudio.

La gran diversidad de metabolitos presentes en una matriz biológica es innumerable, por esto es importante darse a la tarea de saber cuáles son los metabolitos que tendrían potencialmente una acción en el proceso antibiótico.

Diversas metodologías se implementan en la actualidad para la detección de metabolitos, este sector de la ciencia conocido como metabolómica le servirá al presente estudio para comprender un poco más acerca de la actividad biológica de *Pleurotus ostreatus*.

El proceso completo del análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) consiste en la esterificación de lípidos y en la inyección, separación, identificación y cuantificación de FAMEs. Para lograr la requerida, cada uno de estos pasos debe optimizarse. (Eder, K.,1995).

## 2. MATERIALES Y METODOS

### -Inhibición bacteriana

Para el análisis del crecimiento y la inhibición bacteriana se hace uso del espectrofotómetro UV/VIS Biotek realizando diluciones de los extractos en microplatos de 96 pozos del laboratorio de ciencias básicas de la Universidad CES.

### -Preparación de los inóculos

Las cepas bacterianas son obtenidas de Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) sede Sabaneta, estas cepas se mantienen en una nevera a  $-4^{\circ}\text{C}$  para su mantenimiento. Para hacer cada una de las curvas de crecimiento (Control positivo, negativo y ensayos en las fracciones) se realiza una inoculación el día antes de su utilización; en aproximadamente 3mL de caldo Muller Hinton se pone una asada de la cepa (Una por tubo) y se dejan en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche a 200rpm.

### -Curva de crecimiento bacteriano

Para saber cuál es la cinética de crecimiento de las bacterias se realiza una dilución inicial para empezar con aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC de cada cepa y se realizan mediciones de absorbancia cada hora por 12 horas para obtener la curva de crecimiento.

### -Curva de inhibición estándar (Ciprofloxacina)

Se realiza inicialmente una solución stock de 64ug/ml con Buffer 7.4 (previamente elaborado), poner el antibiótico con el inóculo a diferentes concentraciones (16-8-4-2-1-0.50.25-0.125 ug/mL) en los micro platos. En otra columna poner el control positivo y en la siguiente el control negativo, leer las absorbancias obtenidas cada hora hasta las 12 horas y con esto construir la curva de inhibición estándar.

Con las dos curvas anteriormente relacionadas se procede a realizar el análisis

de las muestras de *Pleurotus ostreatus* y su actividad contra las cepas bacterianas.

### -Preparación de la muestra

Se obtienen 55.7g de *Pleurotus ostreatus* de la Universidad de Antioquia, la biomasa se obtiene seca y molida.

Inicialmente se realiza el desengrase del hongo con 200mL de hexano, se realiza el cambio de solvente por 3 días y se ponen a secar los sobrenadantes extraídos.

Para el fraccionamiento a la biomasa desengrasada se le agrega una mezcla de 300mL de Acetato de etilo: Cloroformo [1:1] y se realiza el cambio de solvente 1 vez con la misma mezcla a los 3 días. Al quinto día la mezcla obtenida es la que se utilizará en la **Cromatografía Líquida al Vacío**.

**-Cromatografía Líquida al Vacío:** El extracto obtenido se mezcla con sílica en polvo hasta obtenerse una mezcla homogénea, luego se realiza la extracción de cada una de las fracciones utilizando los solventes Hexano, Acetato de etilo, Cloroformo, Acetona y Metanol en ese orden pasándolo por la mezcla de Extracto: Sílica 1:1 Aproximadamente. Las fracciones obtenidas se dividen en 2, una para análisis por Cromatografía Gaseosa acopada a Masas y otra para evaluación de actividad Antibiótica, a esta última se le disuelve en 600uL de DMSO y se deja por una semana a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### -Evaluación preliminar de las fracciones.

En los microplatos se analizan 100uL de los inóculos con 100uL de cada una de las 5 fracciones por triplicado, (entendiéndose por fracciones, las diluciones del extracto en cada solvente mencionado en el procedimiento de cromatografía líquida al vacío), en el mismo plato se usa una columna para control positivo y una para control negativo. Se leen las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro cada hora hasta las 5 horas siguientes y con estas absorbancias se construye la curva de inhibición estándar.

### -CG/MS

El análisis del contenido de las 5 fracciones se realiza haciendo uso del equipo de Cromatografía de gases Acoplado a Espectro de Masas del laboratorio GIBS (Grupo de Investigación de sustancias Bioactivas) de la SIU (Sede de Investigación Universitaria) de la Universidad de Antioquia

### FAMEs

“Fatty Acid Methyl Esters” son ésteres de ácidos grasos derivados de transesterificación; con esta metodología, se obtienen triglicéridos, ácidos grasos y algunos otros lípidos de los extractos del hongo *P. ostreatus*, lo suficientemente volátiles para el análisis con cromatografía de gases después de haber sido esterificados, permitiendo crear el perfil FAME. (Sekora, NS, et al, 2009)

Su obtención se llevó a cabo disolviendo el desengrase obtenido inicialmente con una solución al 2% de Metanol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se agregan 50µL de una solución saturada de NaCl para evitar la emulsificación de los ácidos grasos y posteriormente se adicionan 400uL de Hexano, se lleva a centrifugación y se obtiene la primera fracción de ácidos grasos esterificados, luego se agregan 300uL más de Hexano, se centrifuga nuevamente y se extrae el sobrenadante, este paso se repite una vez más obteniéndose finalmente aproximadamente 1mL de una solución de ácidos grasos.

### FRACCIONES

Las fracciones se analizan luego de su obtención por el método anterior disueltas en

su respectivo solvente a una concentración de 5mg/mL

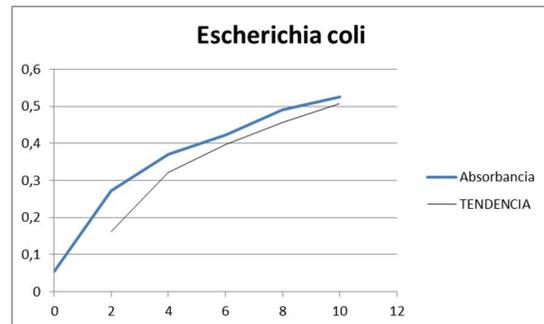
### 3. RESULTADOS

Las fracciones obtenidas se analizan por Cromatografía Gaseosa Acoplada a Masas para saber qué tipo de componentes químicos existen en cada una de las fracciones. Las gráficas 1 - 4 muestran los diferentes procedimientos llevados a cabo en la obtención de las fracciones y el tratamiento previo de estas para su utilización en el análisis de la actividad antibacteriana.

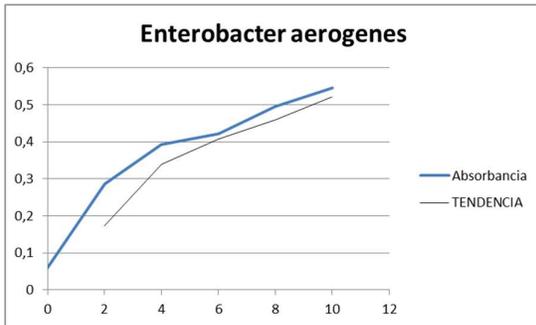
### CRECIMIENTO BACTERIANO

A continuación, se relacionan las curvas obtenidas del crecimiento de las bacterias y se muestra su crecimiento en las 10 horas posteriores de su inicial análisis.

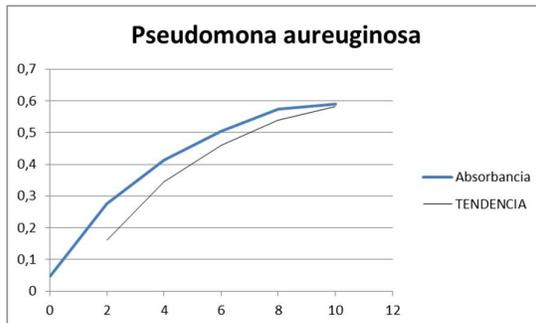
Gráfica 1. Curva de crecimiento *E. coli*



Gráfica 2. Curva de crecimiento *E. aerogenes*

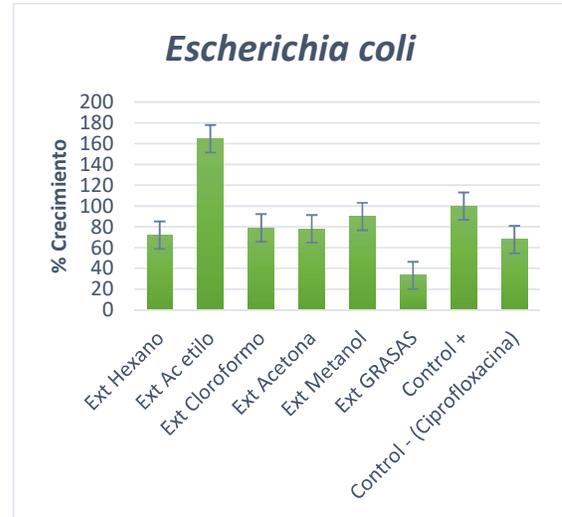


Gráfica 3. Curva de crecimiento *P. aureuginosa*

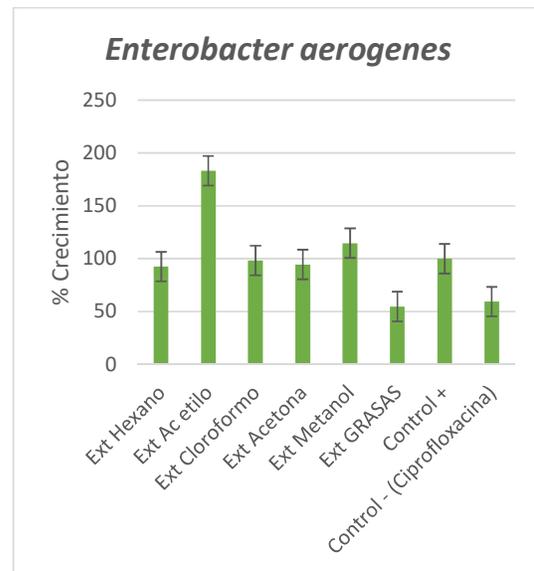


### INHIBICIÓN FRACCIONES

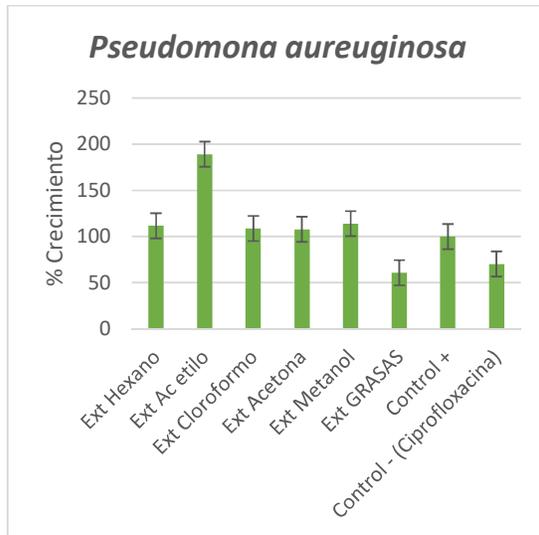
Para analizar la actividad biológica de *Pleurotus ostreatus* contra cada una de las 3 bacterias de elección se realizan gráficas de porcentajes de inhibición en comparación con los porcentajes de inhibición de la ciprofloxacina estándar, los datos obtenidos se muestran a continuación:



Gráfica 4. Porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli* retada a fracciones de *Pleurotus ostreatus*.

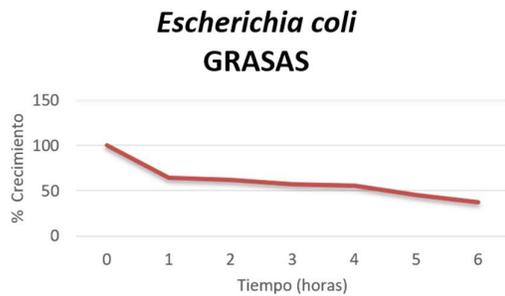


Gráfica 5. Porcentaje de crecimiento de *Enterobacter aerogenes* retada a fracciones de *Pleurotus ostreatus*.

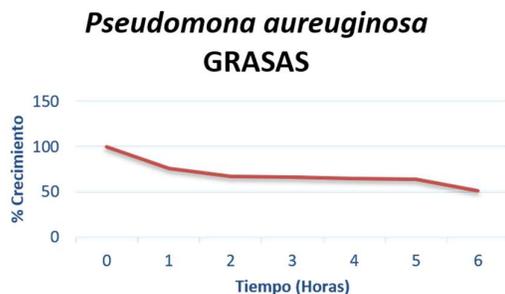


Gráfica 6. Porcentaje de crecimiento de *Pseudomonas aureuginosa* retada a fracciones de *Pleurotus ostreatus*.

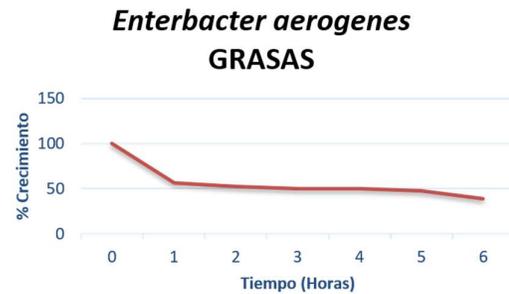
Se realizaron curvas de crecimiento de cada una de las tres bacterias con el extracto de las grasas que según las gráficas anterior, es la fracción que presenta mayor actividad antibacteriana.



Gráfica 7. Porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli* retada a la fracción de grasas de *Pleurotus ostreatus*.



Gráfica 8. Porcentaje de crecimiento de *Pseudomonas aureuginosa* retada a la fracción de grasas de *Pleurotus ostreatus*.



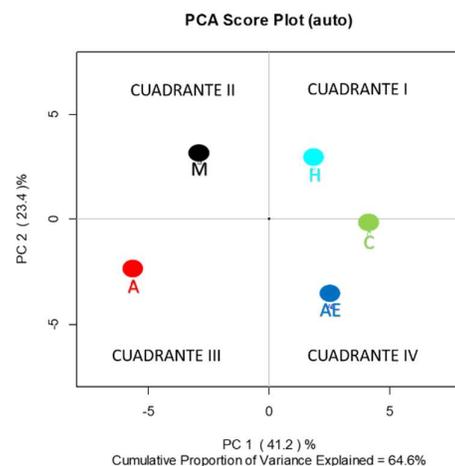
Gráfica 9. Porcentaje de crecimiento de *Enterobacter aerogenes* retada a la fracción de grasas *Pleurotus ostreatus*.

### ANÁLISIS POR CG/MS

Mediante los datos obtenidos por los espectros de cromatografía de gases acoplada a masas, se hizo un análisis de datos multivariados usando “principal component análisis” (PCA) por medio del programa R, donde se buscaron los componentes responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Pleurotus ostraetus* tratadas con diferentes solventes (Metanol, Acetona, Acetato de etilo, Cloroformo, Hexano).

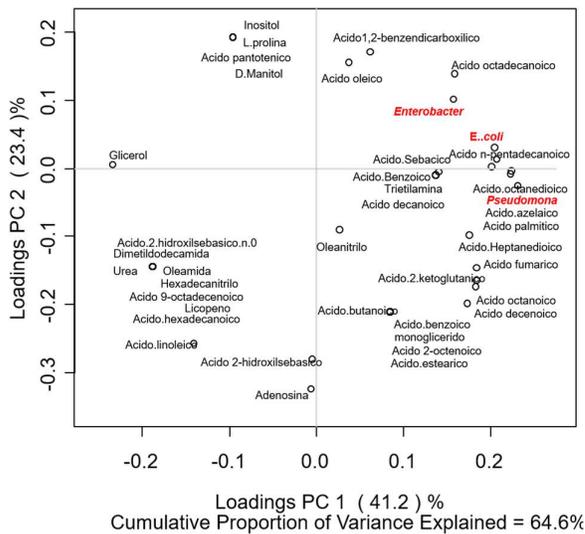
Si se separa el área en cuadrantes, la polaridad de los solventes tiene el siguiente orden:

Gráfico 10.



Mediante el gráfico se logra ver claramente que las muestras se separan de acuerdo a su polaridad siendo la más polar el metanol (negro) que está en el segundo cuadrante, luego acetona (rojo) en el tercer cuadrante, acetato de etilo (azul) en el cuarto cuadrante, cloroformo (verde) en el cuarto cuadrante y hexano (agua marina) en el primer cuadrante.

Gráfico 11.  
PCA Loading Plot (auto)



En esta gráfica se representa la composición química de las muestras de la gráfica 10, donde los nombres de los microorganismos utilizados para hacer las pruebas antimicrobianas están en color rojo. La muestra de cloroformo tubo actividad biológica contra *E. Coli* y *Pseudomona* y el hexano contra *Enterobacter*. Esta actividad contra estos microorganismos se debe a que algunos compuestos son resultados del estrés oxidativo de las grasas como es son el ácido decanoico y el ácido azelaico que es un activo con excelentes propiedades antiradicalarias y anti-glicación, utilizado en la industria cosmética como activo de alta tecnología anti edad.

Tabla 2. Composición de las fracciones

Metanol	Acetona	Acetato de etilo	Cloroformo	Hexano
Glicerol	Urea	Acido benzoico	Glicerol	Ácido octanedioico
L-prolina	Glicerol	Glicerol	Acido 2-ketoglucanico	Ácido azelaico
Trietilamina	Ácido azelaico	Ácido butanoico	Ácido octanoico	Acido n-pentadecanoico
D-manitol	Ácido palmítico	Acido 2-ketoglutanico	Acido fumárico	Acido palmítico
Acido pantoténico	Hexadecanitrilo	Ácido octanoico	Ácido Heptanedioico	Ácido oleico
Ácido plamítico	Ácido octadecadienico	Acido fumárico	Trietilamina	Ácido Octadecanoico
Inositol	Ácido oleico	Ácido succinico	Acido Benzoico	Acido 1,2-Benzenedicarboxylico
Acido linoleico	Oleamida	Amina	Acido octanedioico	
	Dimetil dodecamida	Ácido octanedioico	Ácido azelaico	
	Acido 2-hidroxi sebasico (n=1)	Ácido azelaico	Ácido Sebacoico	
	Acido 2-hidroxi sebasico (n=0)	Ácido pentanoico	Acido n-pentadecanoico	
	Adenosina	Acido palmítico	Acido palmítico	
	Ácido hexadecanoico	Acido linoleico	Ácido Octadecanoico	
	Acido 9-octadecenoico	Acido esteárico	Ácido Decanoico	
	D- Turanosa	Ácido α-linolénico	Ácido decenoico	
	Licopeno	Acido 2-octenoico	Oleanitrilo	
	Oleanitrilo	Acido 2-hidroxi sebasico	Adenosina	
		Monoglicerido		
		Monoleoilglicerol		

**TABLA 3. PERFIL FAME**

Sutancias	% FAMEs
Acido palmitico	59.67
Acido oleico	12.85
Acido estearico	8.43
Acido pentadecanoico	7.39
Acido nonanedoico	2.89
Metil tetradecanoato	1.77
Acido 10- undecenoico	1.69
Acido Oxiraneundecanoico	1.29
Acido tetracosenoico	0.89
Acido nonanoico	0.73
Acido docosanoico	0.48
Acido 8,11,14 - Eicosatrienoico	0.43
Acido Hexadecanoico	0.39
Acido linoleico	0.35
metil 21- methildocosanoato	0.32
Acid 6,9,12- Octadecatrienoico	0.24
Acido 13-docosenoico	0.19
<b>Σsat</b>	<b>80.26</b>
<b>Σmonoinsat</b>	<b>17.43</b>
<b>Σpoliinsat</b>	<b>2.31</b>
<b>Rel Sat/Insat</b>	<b>4.07</b>

#### 4. DISCUSIÓN

Según los resultados de las curvas de inhibición con ciprofloxacina en cada uno de los microorganismos se puede evidenciar que la concentración efectiva mínima inhibitoria de este antibiótico es la de 0.25 ug/mL.

Las fracciones evaluadas muestran especial grado de inhibición en *E. coli*, pues su crecimiento con las fracciones de hexano, cloroformo y acetona se ve disminuido. Las grasas mostraron una inhibición del crecimiento en las tres bacterias analizadas (Gráficas 5-6-7), a las cuales se les realizó un análisis en Cromatografía de gases acoplada a masas para determinar los compuestos presentes y cuales pudieran ser responsables de la marcada actividad antibacteriana, este análisis se realizó después del tratamiento

de las grasas con la técnica FAME, el resultado obtenido evidencia la presencia mayoritariamente de ácidos grasos saturados, algunos de los cuales tienen actividad antibacteriana reportada (tabla 4).

Los componentes presentes en las fracciones de *P. ostreatus* disueltos en los solventes metanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo y hexano; se obtuvieron también por medio de la técnica cromatografía de gases acoplada a masas y mediante una correlación de las áreas de cada una de las sustancias de las muestras, los pesos y el porcentaje de inhibición se pudo hacer un análisis multivariado por PCA, mostrando que la actividad antibacteriana se puede explicar ya que algunas grasas generan estrés oxidativo como el ácido azelaico, ácido decanoico, ácido pentadecanoico y el ácido hexadecanoico. (Rodríguez, et al, 2015). (Tabla 2).

**TABLA 4. SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Sustancia con actividad antibacteriana	Referencia
El ácido linoleico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rosa M. Antimicrobial activity of fatty acids isolated from Tubifex tubifex. Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas. 2004: 5-9.</li> <li>Venkatesalu, V.; Sundaramoorthy, P.; Anantharaj, M.; Gopalakrishnan, M.; Chandrasekaran, M. (2004). Studies on the fatty acid composition of marine algae of Rameswaram coast. Seaweed Res. Util., 26, 83-86.</li> <li>Agoramoorthy G., et al. ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF FATTY ACID METHYL ESTERS OF THE VLIND- YOUR- EYE MANFROVE FROM INDIA. Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38: 739-742.</li> </ul>
El ácido esteárico	Rosa M. Antimicrobial activity of fatty acids isolated from Tubifex tubifex. Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas. 2004: 5-9.

El ácido oleico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Venkatesalu, V.; Sundaramoorthy, P.; Anantharaj, M.; Gopalakrishnan, M.; Chandrasekaran, M. (2004). Studies on the fatty acid composition of marine algae of Rameswaram coast. <i>Seaweed Res. Util.</i>, 26, 83-86.</li> <li>Agoramoorthy G., et al. ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF FATTY ACID METHYL ESTERS OF THE VLIND- YOUR- EYE MANFROVE FROM INDIA. <i>Brazilian Journal of Microbiology</i> (2007) 38: 739-742.</li> </ul>
Ácido palmítico	<ul style="list-style-type: none"> <li>McGaw, L.J.; Jäger, A.K.; Van Staden, J. (2002). Isolation of antibacterial fatty acids from <i>Schotia brachypetala</i>. <i>Fitoter.</i>, 73, 431-433.</li> <li>Seidel, V.; Taylor, P.W. (2004). In vitro activity of extracts and constituents of <i>Pelagonium</i> against rapidly growing mycobacteria. <i>Int. J. Antimicrob. Agen.</i>, 23, 613-619.</li> </ul>
Ácido Azelaico	Marcella N. Azelaic acid. <i>Journal of the American Academy of Dermatology</i> . 1987, 17(6): 1033-1041.
ácido octadecanoico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Viegas CA, Rosa MF, Correia IS, Novais JM. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. <i>Appl Environ Microbiol.</i> 1989;55:21-28.</li> <li>Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 2010 Feb; 85(6):1629-42.</li> </ul>
Ácido benzoico	G. Betts, L. Everis and R. Betts. Microbial issues in reducing salt in food products. <i>Reducing Salt in Foods</i> . 2007: 174 -200
Ácido butanoico	Huang CB., et al. Short – and médium- chain fatty exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. <i>Archives of Oral Biology</i> . 2011, 56(7): 650- 654.
Ácido fumárico	Charles N., et al. Fumaric Acid and Slightly Acidic Electrolyzed Water Inactive Gram Positive and Gram Negative Foodborne Pathogens. <i>Microorganisms</i> . 2015, 3(1): 34 - 46.
Ácido valerico	M.A. COAKER, J.A. VAZQUEZ, R.A. AKINS. Antifungal Activities of Short Chain Fatty Acids. <a href="#">Aspergillus &amp; Aspergillosis Website</a>
Ácido octanoico	R. Medimagh, et al. Enhanced functional properties of chitosan films cross-linked by biosourced dicarboxylic acids. <i>Polymer Science Serie A</i> . 2016, 58 ( 3): 409-418
Acido 1,2- Benzenedicarboxyliclo	Shogen M., Garba S. and Labaran S. Antimicrobial activity of 1,2 – benzenedicarboxylic acid, butyldecyl ester isolated from the sedes and pods of <i>Acacia nilótica</i> Linn. <i>Basic research journals</i> . 2016, 3(2): 2354-4082.
Acido n- pentadecanoico	Rodríguez, Fátima, D.Armas, Haydelba, & Salazar, José. (2015). Caracterización estructural de algunos componentes del extracto alcohólico de las hojas de <i>Melochia villosa</i> (STERCULIACEAE) proveniente del Amazonas Venezolano. <i>Saber</i> , 27(1), 67-77. Recuperado en 05 de noviembre de 2018, de <a href="http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1315-01622015000100009&amp;lng=es&amp;tng=es">http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1315-01622015000100009&amp;lng=es&amp;tng=es</a> .

## 5. CONCLUSION

Las grasas, las fracciones obtenidas por hexano, cloroformo y acetona muestran ciertos porcentajes de inhibición a las diferentes bacterias, siendo *E. coli* la más sensible a estos componentes; según los resultados arrojados por el análisis en CG/MS, las posibles sustancias responsables de la actividad antibacteriana son ácidos grasos en su mayoría saturados, algunos de los cuales tienen esta actividad biológica reportada (Tabla 4) y su acción bactericida podría ser explicada por el estrés oxidativo generado en los microorganismos. Estos compuestos hallados deben someterse a más estudios posteriores para determinar su carácter tóxico y poder establecer la seguridad de su aplicación en la generación de nuevos antibióticos que ayuden a resolver la resistencia bacteriana que estamos enfrentando.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akyuz, M., & Kirbag, S. (2009). Antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* grown on various agro-wastes. *EurAsian Journal of BioSciences*, 3(8), 58-63.
- Akyuz, M., Onganer, A. N., ERECEVIT, P., & Kirbag, S. (2010). Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and southeast Anatolia region of Turkey. *Gazi University Journal of Science*, 23(2), 125-130.
- Cepero de García-M.C, 2012. Biología de los hongos. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de ciencias biológicas; Ediciones Uniandes.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22 32(3):75-77.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. M07-A9 32(2):18-20.
- García Castellanos, T., Castillo Marshal, A., & Salazar Rodríguez, D. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(1), 129-135.
- Gregori, A., Švagelj, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45(3), 238-249.
- Gerasimenya, V. P., Efremenkova, O. V., Kamzolkina, O. V., Bogush, T. A., Tolstych, I. V., & Zenkova, V. A. (2002). Antimicrobial and antitoxic action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4(2).
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 113-131.
- Ibarra A., et. al. FRECUENCIA DE INFECCIONES BACTERIANAS DE HERIDAS QUIRÚRGICAS EN DOS HOSPITALES DE CHILPANCINGO, GUERRERO. *Red de Revistacientífica de América Latina*. 2009; 34: 99.
- Londoño J., et. al. Factores de riesgo asociado a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio*. 2016; 20: 77-83
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., & Malm, A. (2015). Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one polish mushrooms. *PloSone*, 10(10), e0140355.
- Velázquez-Meza, Maria Elena. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública de México*, 47(5), 381-387. Recuperado en 23 de agosto de 2016, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342005000500009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500009&lng=es&tlng=es)
- Oromí, J. (2000). Editorial: Importancia y limitaciones de la utilización de los antimicrobianos. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*, 36(9), 321-322.
- Okamoto, K., Narayama, S., Katsuo, A., Shigematsu, I., & Yanase, H. (2002). Biosynthesis of p-anisaldehyde by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(2), 207-210.
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., ... & Ray, S. M. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1198-1208.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMedresearchinternational*, 2016.
- Moreno, G. C. (2013). Programas de uso prudente de antibióticos en los hospitales: una estrategia efectiva para disminuir la resistencia a los antimicrobianos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 26(104), 281-282.

- Iwalokun, B. A., Usen, U. A., Otunba, A. A., & Olukoya, D. K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6(15).
- Periasamy, K. (2005). Novel antibacterial compounds obtained from some edible mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(3).
- Hernández R. and López C.; 2006. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Trabajo de grado. Universidad Pontificia Javeriana.
- Chu, K.K., Ho, S.S. and Chow, A.H. (2002). *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42(9):976-984.
- Kaufer F. (1936) The biology of *Pleurotus corticatus* Fries. *Minnesota Agricultural Experiment Station Bulletin* 114
- Sibel Yildiz, Umit Cafer Yildiz, Engin Derya Gezer, Ali Temiz. (2002) Some lignocellulosic waste used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochem* 301-306
- Facchini, J. M., Alves, E. P., Aguilera, C., Gern, R. M. M., Silveira, M. L. L., Wisbeck, E., & Furlan, S. A. (2014). Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 72-77.
- Nhera K., et. al; 2012. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *International Journal of Microbial Resource Technology*. ISSN 2278 – 3822
- Nieto I., et. al. 2013. THE EFFECT OF DIFFERENT SUBSTRATES ON TRITERPENOID AND FATTY ACIDS IN FUNGI OF THE GENUS *Pleurotus*. [Journal of the Chilean Chemical Society](#). 58(1): 0717-9707.
- Deepalakshmi K., et al. 2014. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J Biochem Tech* (2014) 5(2):718-726
- Benítez, O., Uribe, F., Navarro, A., Hernández, D., Ruíz, J., & CRAVIETO, A. (1991). Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 48(2), 65-70.
- Cepero de García-M.C, 2012. Biología de los hongos. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de ciencias biológicas; Ediciones Uniandes.
- Cho J., et.al. (1998). Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid and trans 4-Hydroxycinnamic Acid Isolated and Identified from Rice Hull. *Biosci, Biotechnol, Biochem*. 62(11): 2276-2276.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22 32(3):75-77.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. M07-A9 32(2):18-20.
- Ibarra A., et. al. FRECUENCIA DE INFECCIONES BACTERIANAS DE HERIDAS QUIRÚRGICAS EN DOS HOSPITALES DE CHILPANCINGO,

GERRERO. Red de Revista científica de América

- Klevens R. M., Edwards J. R., Richards C. L., Jr., et al. Estimating health care associated infections and deaths in U.S. Hospitals, 2002. *PublicHealthReports*. 2007;122(2):160–166
- Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ lactamases and its correlation with molecular
- Wang, H., & Ng, T. B. (2004). Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25(1), 1-5.
- Sekora, NS, Lawrence, KS, Agudelo, P., van Santen, E., y McInroy, JA (2009). Uso del análisis FAME para comparar, diferenciar e identificar múltiples especies de nematodos. *Revista de nematología*, 41 (3), 163-73.
- Rodríguez, Fátima, D.Armas, Haydelba, & Salazar, José. (2015). Caracterización estructural de algunos componentes del extracto alcohólico de las hojas de *Melochia villosa* (STERCULIACEAE) proveniente del Amazonas Venezolano. *Saber*, 27(1), 67-77. Recuperado en 05 de noviembre de 2018, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-01622015000100009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000100009&lng=es&tlng=es).