

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA – León

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Farmacia



Monografía para optar por el Título de Licenciado Químico-Farmacéutico

“Determinación de la actividad antimicrobiana de seis muestras de hongos recolectados en la ciudad de León, Nicaragua usando cepas de Salmonella spp”.

Autores:

Br. Celeste de los Ángeles Larios Juárez

Br. Celeste Coralia Martínez Corrales

Br. Dalia Estefanía Mayorga Calderón

Tutor:

MSc. Fernando Baca.

León, Diciembre 2013.

“A la libertad por la Universidad”



INDICE

I.	Introducción	2
II.	Planteamiento del Problema	5
III.	Objetivos	6
IV.	Marco Teórico	7
V.	Hipótesis	24
VI.	Material y Método	25
VII.	Resultados	28
VIII.	Análisis de Resultados	40
IX.	Conclusión	41
X.	Recomendaciones	42
XI.	Bibliografía	43
XII.	Anexos	47



AGRADECIMIENTOS:

Primeramente a **Dios** por sobre todas las cosas, por brindarnos la dicha, la salud y bienestar físico y espiritual para llegar a la culminación de nuestra carrera.

A **nuestros padres**, por su esfuerzo, amor y apoyo incondicional, durante nuestra formación tanto personal como profesional.

A **nuestros profesores**, por habernos brindado su sabiduría, no solo en el desarrollo de este trabajo monográfico sino también en la mejora del desempeño como futuros profesionales.



DEDICATORIA:

A **Dios**, por haberme permitido vivir hasta este momento y poder culminar una de mis metas, además de brindarme sabiduría y paciencia de continuar.

A **Mis Padres**, por haberme apoyado siempre, para poder culminar mi carrera y ejercerme como profesional.

A **Mi Hermana** que siempre me ha estado apoyando en las buenas y en las malas, dándome ánimos de seguir adelante.

A **Mi Tutor Fernando Baca**, por habernos ayudado durante toda la tesis, y en especial a **MSc. Gloria Herrera, Doña Gladys, Don David y Don Piura**, por haberme dado su apoyo, darme fuerzas de seguir adelante y consejos que me ayudaron en este trabajo.

Dalia Mayorga



DEDICATORIA:

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres Ileana y Osbaldo por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Les agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a nuestra profesora Gloria Herrera a Doña Gladys y Don David. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Gracias Licenciado Fernando Emilio Baca Escoto por creer en Dalia y en mí, y habernos brindado la oportunidad de desarrollar nuestra tesis profesional y por todo el apoyo y facilidades que nos fueron otorgadas en la facultad. Por darnos la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender cosas nuevas.

A Dalia por haber sido una excelente compañera de tesis y amiga, por haberme tenido la paciencia necesaria y por motivarme a salir adelante en los momentos de desesperación y sobre todo por su valiosa amistad.

A mi niña preciosa Yazmín Lorena por haber sido mi motor principal de superación y a mi esposo por siempre estar conmigo en todo momento y darme su apoyo incondicional.

Celeste Martínez



INTRODUCCIÓN:

Desde el punto de vista farmacéutico los hongos son importantes como fuente de medicamentos, estudios efectuados en otros países han mostrado la actividad antimicrobiana, antitumoral, inmunomoduladora y farmacológica de ciertos hongos. En base a dicha información se les ha dado uso como antibióticos, alcaloides, vitaminas y pueden emplearse también como sustratos para conversiones químicas que no se consiguen fácilmente en el laboratorio. Algunos contribuyen al deterioro de las drogas vegetales y representan un peligro para el hombre debido a los efectos tóxicos o alucinógenos de algunas especies. (Medinilla Beatriz, Julio del 2008).

Nicaragua, es un país privilegiado debido a su ubicación geográfica, variedad climática y diversidad en su vegetación ha facilitado el desarrollo de una gran variedad de hongos. La zona del pacifico y en especial la zona central y del caribe favorece el desarrollo de dichos hongos debido a factores como la humedad, la tasa fluvial y presencia de bosques. Hasta ahora se han publicado muchos estudios sobre plantas medicinales, sin embargo no se reportan investigaciones realizadas en Nicaragua en cuanto al uso de hongos con propiedades medicinales o alucinógenas como herramienta de tratamiento basada en sus propiedades antimicrobianas. Esto conlleva a implementar una estrategia que permita evidenciar la presencia de metabolitos con potencial actividad biológica frente a diferentes cepas de microorganismos. (Prada Salcedo, LD y Vega Vásquez, P. Abril de 2008).

En 2002 se realizó un estudio de determinación de la actividad antimicrobiana con cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de 2 plantas medicinales de uso folklórico utilizadas para el tratamiento de enfermedades como infección renal de la ciudad de León. En esta investigación se mostró inhibición microbiana en 2 maceraciones simples, utilizando las cepas *Staphylococcus aureus* por lo tanto estas 2 especies tiene poder antimicrobiana contra esta especie. Estas maceraciones pueden ser utilizadas contra las infecciones renales producidas por el microorganismo anterior. (Mendoza María, Morales Doris y Uriarte Marlon, 2002).

En Abril de 2004 se realizó otro estudio de determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos del *Bixa Orellana L.* en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*, del cual se obtuvieron que en un intervalo de



24 y 48 horas presentó actividad antimicrobiana contra estas cepas el extracto correspondiente a la muestra sin Bixina y en el extracto con Bixina se observó su actividad solamente 24 horas después. Los resultados obtenidos en el estudio tienen un gran significado, pudiéndose constatar que la semilla del *Bixa orellana* L. posee actividad antimicrobiana sin Bixina a diferentes concentraciones, siendo que se puede utilizar como una alternativa para el tratamiento de ciertas enfermedades. (Paredes Adriana, Pérez Zorayda y Palacios Virginia, 2004).

En 2007, se investigó la capacidad hepatoprotectora y antioxidante de extracto etanólico de *Phellinus merrillii* (PM) en la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono. En la cromatografía líquida de alto rendimiento de análisis (HPLC), el cromatograma de la huella digital de PM fue establecido. Tanto hispolon y PM mostraron un pico similar al tiempo de retención de 6 min. Esto implicó que PM contiene el ingrediente activo de hispolon. El tratamiento con PM (0,5, 1 y 2 g/kg) antes de la administración de tetracloruro de carbono (1,5 ml/kg en aceite de oliva, 20 %) previno de manera significativa el aumento de la alanina aminotransferasa sérica (s-GOT) y el suero de la aspartato aminotransferasa (s-GPT) de una manera dependiente de la dosis. También se encontró que la incidencia de la degeneración global, necrosis y triaditis portal se redujeron en el grupo pretratado con PM. El tetracloruro de carbono induce sobre la regulación de las enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD) (86,6 %), catalasa (58,8 %) y la glutatión peroxidasa (GPx) (64,7 %) en el hígado. El pretratamiento con PM redujo significativamente en todos estos antioxidantes actividades enzimáticas. Por lo tanto, se verificó que el extracto de etanol de PM tiene la capacidad hepatoprotectora y antioxidante en ratas. (Dr. Yuan-Shiun Chang, 2007).

En 2012 se llevó a cabo un estudio de la Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*, en este estudio se hizo una fracción del extracto metanólico (polar y no polar), demostrando que el extracto sin fraccionar presentó el mayor contenido de fenoles (913.91 mg de equivalentes de ácido gálico/g mgEAG/g), flavonoides totales (563.83 mg de equivalentes de quercetina/g mgEQ/g), la concentración eficiente más baja para inhibir el 50% del radical libre DPPH (0.1767 g/L) y el mayor porcentaje de inhibición contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica Choleraesuis* y *Listeria monocytogenes*. Seguido de la fracción no



polar con valores de 254.50 mgEAG/g, 179.44 mgEQ/g y 0.7238 g/L y la fracción polar 254.50 mgEAG/g, 163.98 mgEQ/g y 1.1767 g/L. Adicionalmente, la inhibición bacteriana correlacionó positivamente con el contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante para todos los extractos. Por ello, el hongo *P. merrillii* podría ser una fuente de extractos con propiedad antibacteriana y antioxidante. (Leiva et al, 2013).

Estudios recientes se han centrado en hongos de la división *Basidiomycota*, debido a la amplia gama de compuestos biológicamente activos que han sido aislados a partir de éstos. En especial los hongos del género *Phellinus*, son conocidos por su uso en la medicina tradicional de la cultura China. Los cuerpos fructíferos de estos hongos representan una fuente importante de fenoles, flavonoides, vitaminas y alcaloides con capacidad antioxidante y antibacteriana. Adicionalmente se ha considerado el cultivo sumergido de estos hongos para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos. (Leiva et al, 2013).

En Nicaragua se encuentran especies de hongos cuyas propiedades medicinales no han sido estudiadas por completo y con el fin de generar conocimiento en cuanto a las posibles propiedades farmacológicas se han seleccionado las especies de hongos que posiblemente pueden tener propiedades antimicrobianas. Este trabajo de investigación se basa en evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de las especies fúngicas para demostrar la capacidad antimicrobiana que ejercen estas sustancias obtenidas a partir de las 6 especies de hongos (muestras) contra el microorganismo patógeno *Salmonella spp*, ya que resulta imprescindible descubrir nuevas sustancias con actividad antibiótica frente a microorganismos resistentes y con alta capacidad infectiva y así poder determinar si se pueden producir fitofármacos para contrarrestar las enfermedades producidas por esas bacterias, aumentando la calidad de vida del hombre.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Poseen actividad antimicrobiana los extractos etanólicos obtenidos a partir de las 6 especies fúngicas frente a microorganismos patógenos como *Salmonella spp*?



OBJETIVOS:

GENERAL:

- Determinar la actividad antimicrobiana de seis muestras de hongos recolectados en la ciudad de León, Nicaragua usando cepas de *Salmonella spp.*

ESPECIFICOS:

- Preparar extractos etanólicos de 6 especies de hongos para la realización del estudio.
- Aplicar el ensayo de actividad antibacteriana por el método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio bromuro) en los extractos obtenidos, para la determinación de actividad antimicrobiana.
- Determinar la Concentración mínima inhibitoria de las muestras que presentan actividad antimicrobiana.



MARCO TEÓRICO:

GENERALIDADES SOBRE HONGOS:

Los hongos son un grupo diferente de seres vivos de las plantas y de los animales, razón por la cual se clasifican en un reino aparte llamado Fungi. Poseen gran capacidad de adaptación y pueden desarrollarse sobre cualquier medio o superficie, tanto en los bosques como en las ciudades. Juegan un papel principalmente descomponedor, ya que transforman la materia orgánica en sustancias más simples y asimilables por otros seres vivos. También son importantes para la medicina, la industria y la alimentación. (Mata Milagro, 2003).

Aunque no se conoce con exactitud el número de especies de hongos, hasta ahora se han descrito aproximadamente 100.000 en todo el mundo. Sin embargo, cuando se hayan estudiado bien los bosques tropicales esta cifra podría aumentar hasta 1.5 millones. (Mata Milagro, 2003).

¿Qué son los hongos?

Los hongos poseen características muy particulares que los hacen diferentes de las plantas, ya que no elaboran su propio alimento mediante la fotosíntesis como ellas sino que viven a expensas de otros organismos, vivos o muertos. También se diferencian de los animales porque no poseen la capacidad de desplazarse o moverse sobre el medio o superficie en que crecen. (Mata Milagro, 2003).

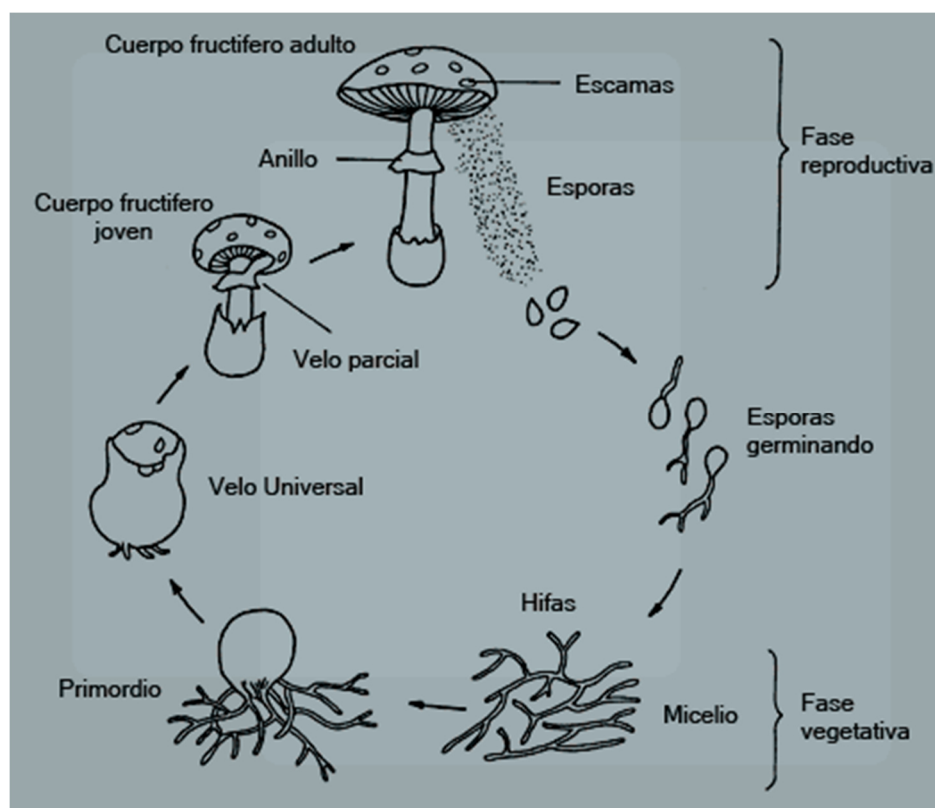
Hay hongos microscópicos (microhongos), que no se pueden observar a simple vista, y macroscópicos (macrohongos), que se pueden ver fácilmente. La ciencia que los estudia es la Micología (del griego Mykes=Hongo y Logos=Estudio). (Mata Milagro, 2003).

La clasificación de los hongos macroscópicos y microscópicos se basa en el tamaño de las fructificaciones de los mismos, si ven éstas a simple vista o si se necesita una lupa o microscópico para observarlas. Aunque esto es a veces subjetivo, porque hay casos de hongos macroscópicos que apenas se les detecta con una lupa, o lo contrario, hongos microscópicos que tienen fructificaciones muy visibles. Sin embargo, a grandes rasgos y tomando en cuenta la gran población que forman los hongos, es bastante práctico dividir a éstos en macro y microscópicos. La identificación de los hongos macroscópicos se basa en

un análisis morfológico y del color del cuerpo fructífero que produce las esporas, es la parte más especializada y que cambia de especie en especie. (EMC=COSMOS, 2009).

Los hongos pueden estar formados por una célula (unicelulares) o por muchas (pluricelulares). Como carecen de sustancias para realizar la fotosíntesis, tales como la clorofila, se alimentan principalmente por absorción y se han adaptado a vivir como saprófitos (sobre materia en descomposición), parásitos (sobre seres vivos, causándoles enfermedad o muerte) o en simbiosis (asociados con otros seres vivos para beneficio mutuo). Se reproducen por medio de esporas, las cuales son diseminadas principalmente por el viento y por el agua. (Mata Milagro, 2003).

PROCEDIMIENTO DE REPRODUCCIÓN DE LOS HONGOS:



A las fructificaciones de los hongos macroscópicos, erróneamente se les ha llamado “hongos”. Cuando se recolectan hongos en el campo o en el jardín, o cuando se consumen los hongos comestibles, incorrectamente se dice “yo colecto hongos” o “yo como hongos”, lo que en realidad se colecta o se consume son las fructificaciones. El verdadero hongo es la masa blanca y algodonosa en el suelo, hojarasca, madera o estiércol, que se llama



micelio y de la que se desarrollan las fructificaciones. Este micelio está formado por cordones blancos, que a su vez forman células muy largas a las que se denominan hifas. Las hifas en todos los hongos son en general tabicadas, a excepción de algunos mohos, como el moho blanco del pan, *Rhizopus*, en donde se presentan las hifas sin tabiques. Por otra parte, en muchos hongos microscópicos las hifas tienen la peculiaridad de transformarse en levaduras al volverse parásitos, excepto en la ficomicosis. Sin embargo, también hay hongos que durante toda su vida son levaduras, como sucede con la levadura de la cerveza, que es la que fermenta los líquidos azucarados y produce alcohol. (EMC=COSMOS, 2009).

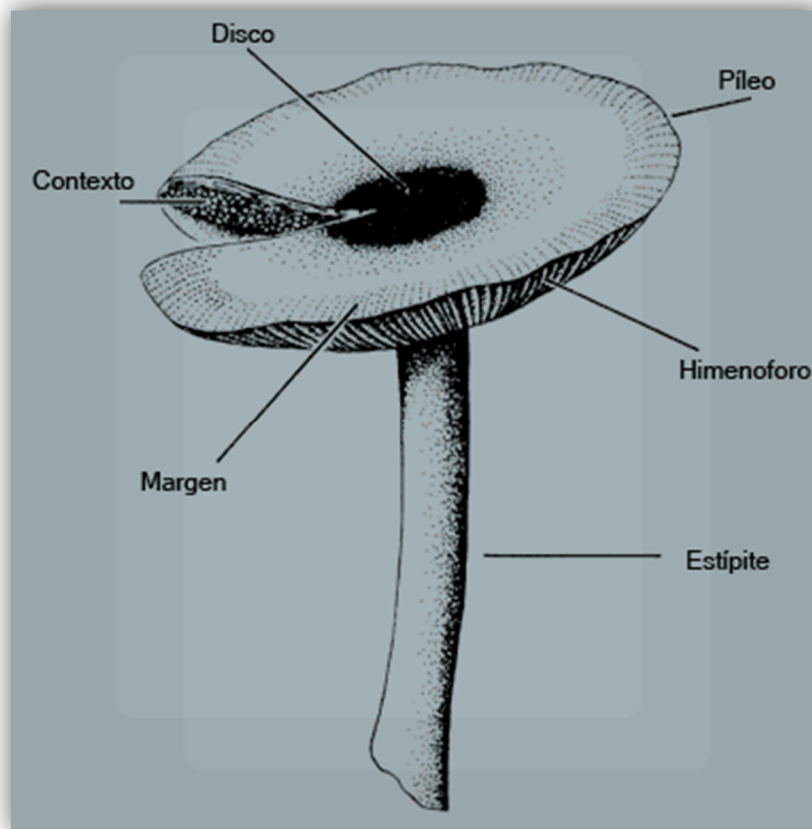
El micelio de un hongo macroscópico al crecer en el sustrato en donde se desarrolla es el encargado de nutrir al hongo a través de la absorción de las sustancias orgánicas que toma del sustrato. Dicho micelio en determinada época del año, la más favorable en cuanto a humedad y temperatura, desarrolla el cuerpo fructífero, que es la parte más llamativa e importante del hongo. La gran mayoría de los hongos macroscópicos fructifican en el verano, pero hay algunos de invierno y otros de primavera, según las especies. Por ejemplo, el hongo comestible cuaresmeño, *Lyophyllum decastes*, solamente se desarrolla en la primavera, en la época de la cuaresma; las morillas, *Morchella*, también crecen en primavera; el totocótzcatl, *Entoloma giganteum*, tan famoso en Teziutlán, pues crece únicamente en invierno y los sensores, *Armillaria ostoyae*, de Veracruz y Puebla también en invierno. Todos estos hongos son comestibles y objeto de venta en los mercados populares. Por otra parte, es interesante observar que el micelio en muchos hongos tiene la peculiaridad de crecer en forma de un disco, por lo que la parte más activa del mismo será la periferia. Es por esto, que al formar el micelio sus fructificaciones, éstas quedarán acomodadas precisamente en la periferia del disco, por lo que las veremos crecer formando un círculo. Son los conocidos anillos de brujas o anillos de hadas, de los que se han desprendido muchas leyendas y mitos. Cualquier hongo, comestible o venenoso, puede formar estos círculos y no únicamente los venenosos como erróneamente se cree. (EMC=COSMOS, 2009).

Las fructificaciones de los hongos cuando jóvenes son globosas y a medida que maduran van tomando la forma definitiva. En todos los casos la función de las fructificaciones es la de formar las esporas y esparcirlas, generalmente al aire, y con ellas se reproducirá el



hongo. La forma, color, consistencia y tamaño de las fructificaciones, así como la de sus estructuras microscópicas, incluyendo las esporas, darán la pauta para la correcta identificación de la especie. Y bien se dice, “el único camino para conocer los hongos comestibles y diferenciarlos de los venenosos, es estudiar las características que los diferencian como especies, tales como la forma y el color de todas sus partes. Descártense las costumbres empíricas de conocer los hongos comestibles observando solamente si ennegrecen una moneda de plata o un ajo, cuando son hervidos en agua”. (EMC=COSMOS, 2009).

PARTES DE LOS HONGOS:



Los hongos se encuentran por todo el mundo y en todos los medios. Crecen en ambientes naturales así como en tela, cuero, plástico, hule, metales, vidrio, papel, carbón, alimentos, la piel humana o sobre cualquier otra sustancia o residuos; también pueden resultar muy destructivos, como cuando atacan alimentos almacenados o cultivos de valor económico o causan enfermedades en plantas o animales, incluyendo humanos. (Mata Milagro, 2003).



IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN LA NATURALEZA:

Los hongos juegan un papel muy importante dentro de sus hábitats naturales, ya que al ser organismos principalmente descomponedores y reciclar gran cantidad de desechos orgánicos pueden transformar la materia muerta, devolviendo al medio ambiente elementos y sustancias asimilables por otros seres vivos como plantas y animales, lo cual permite el flujo de energía y nutrientes a través de los ecosistemas naturales. (Mata Milagro, 2003).

Los hongos forman asociaciones de beneficio mutuo (simbiosis) con varias plantas y animales. Por ejemplo, algunos entran en contacto con las raíces de algunas plantas, formando una asociación conocida como micorriza. Como resultado, el hongo absorbe carbohidratos de las plantas y estas a su vez obtienen de éste agua y ciertos elementos químicos como nitrógeno y fósforo necesarios para su crecimiento. Por otro lado, las llamadas hormigas cortadoras cultivan el hongo que utilizan para su alimentación. Las hojas que transportan hasta sus hormigueros no son para alimentarse, sino para que el hongo se desarrolle. Otros hongos regulan el aumento o la disminución de poblaciones tanto vegetales como animales, como los que parasitan plantas hasta provocarles la muerte. (Mata Milagro, 2003).

Hongos medicinales:

Existen muchos hongos de gran beneficio para la salud humana. Uno de ellos es *Penicillium notatum*, el microhongo del cual se obtiene la penicilina. También hay especies que poseen sustancias activas anticancerígenas y antitumorales. En la actualidad se estudian muchos hongos en un esfuerzo por encontrar la cura para el SIDA. (Mata Milagro, 2003).

Hongos en la industria:

Muchos hongos, principalmente microscópicos, tienen gran importancia en distintos procesos industriales en todo el mundo. Las levaduras de los géneros *Torula* y *Sacharomyces* se utilizan en la elaboración de pan y cerveza respectivamente, mientras que algunas especies del género *Penicillium*, como *P. camemberti* y *P. roqueforti*, se usan en la elaboración de quesos. (Mata Milagro, 2003).



Hongos de Estudio:

Ganoderma australe:

Reino: Fungi

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Ganodermatales*

Familia: *Ganodermataceae*

Género: *Ganoderma*



Especie: *Ganoderma australe*

Descripción: 2-10.5 cm de largo y 3-15.5 cm de ancho, semicircular a dimidiado, algunas veces ungulado; superficie rugulosa, algonzonaciones concéntricas, negro pardusco cerca del punto de unión al sustrato, pardo oscuro, pardo anaranjado y pardo amarillento a beige pardusco hacia el margen.

Contexto: 1 -2.5 cm de grosor, pardo anaranjado. Olor y sabor no distintos.

Himenóforo: tubos pardo oscuro de hasta 2 cm de largo, poros 2.4 por mm, blancos a crema grisáceo, que se tornan pardos al manipularse. Adherido lateralmente a la madera.

Habito: solitario a disperso.

Habitat: sobre madera en descomposición.

Estacionalidad: durante todo el año.

Usos: desconocidos.

Distribución: en todos los trópicos, muy común en el este de África.

Observaciones: Se reconoce por su coloración negro pardusco a negra la superficie del píleo, principalmente cerca del punto de unión del sustrato, así como por el color blancuzco de los poros, que se torna pardo oscuro al tocarlos. (Mata Milagro, 2003).



Phellinus merrillii:

Reino: Fungi

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Hymenochaetales*

Familia: *Hymenochaetaceae*

Género: *Phellinus*



Especie: *Phellinus merrillii*

Cuerpo fructífero: Perenne, solitario, píleo adjunto, de peso medio, leñoso y duro cuando se seca. Píleo semicircular, unglado a dimidiado hasta 10 cm de ancho y largo, y 6 cm de espesor cerca de la base, superficie superior pardo oscuro a marrón, concéntricamente surcado en zonas amplias (por lo general) se estrechan (más raro) glabras de la base y luego más negruzco y a veces cubierto de musgos, con la edad también puede ser más agrietado, la corteza suele estar ausente, solo está presente como una capa distinta en muestras mayores y glabras. Poros de superficie oscura canela, pardo a veces con un tono grisáceo, poros redondos y regulares, 5-7 por mm, divisiones enteras y bastante gruesas, tubos distintos a indistintamente estratificado, cada capa tiene hasta 8 mm de espesor.

Contexto: pardo oscuro a marrón rojizo de hasta 6 mm de espesor, con una o varias líneas oscuras cerca de la superficie pilear.

Habitat: Sobre madera muerta, probablemente en las angiospermas. Distribución: Probablemente pantropical.

Observaciones: Las especies que se caracterizan por el píleo espeso, casi unglado con superficie fuertemente surcada pero no hendida, el contexto es relativamente fino, los poros de tamaño medio, las esporas subglobosas coloreadas y la carencia de setas. (Ryvarden y Johansen, 1980).



Phellinus igniarius:

Reino: Fungi

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Agaricomycetes*

Orden: *Poliporales*

Familia: *Hymenochaetaceae*

Género: *Phellinus*

Especie: *Phellinus igniarius*



Cuerpo fructífero: gris, superficie superior joven, volviéndose negra y con frecuencia el desarrollo de grietas verticales cuando son mayores, margen exterior restante color marrón y aterciopelado, incluso en cuerpos fructíferos muy antiguos; hasta 40 cm de ancho y tanto como 20 cm de espesor, concéntricamente puntiagudo en capas anuales. La carne en el interior de estos soportes es de color marrón rojizo.

Tubos y poros: Los tubos son de color marrón, de 3 a 5 mm de profundidad y espaciados entre 4 y 6 mm; terminan en gris-marrón a los poros de color marrón rojizo, a veces con un tinte púrpura.

Olor/sabor: No significativo.

Habitat: Parasitarios y eventualmente saprobio, restringidos a árboles de madera dura y sauces con mayor frecuencia.

Temporada: Perenne, liberando esporas durante todo el verano y el otoño. (Willow Bracket).



Hexagonia hydroides:

Reino: Fungi

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Poriales*

Familia: *Coriolaceae*

Género: *Hexagonia*

Especie: *Hexagonia hydroides*



Descripción: 2.5-100 cm de largo, 3-14.5 cm de ancho, dimidiado a semicircular, algunas flabeliformes, superficie abierta al principio por una capa densa de pelos rígidos y ramificados de hasta 0.5 cm de largo, negros a pardo negruzco, que desaparecen gradualmente, dejando ver líneas concéntricas pardo oscuro a negruzcas y a veces brillantes. Contexto: 0.1-1.5 cm de grosor, pardo canela a pardo oscuro. Olor y sabor suaves. Himenóforo: tubos 0.1-0.2 cm de largo, pardo grisáceo, poros 3-5 por mm del mismo color. Crece adherido lateralmente a la madera.

Hábito: Solitario, disperso a agrupado, a veces se fusionan dos o más cuerpos fructíferos formando uno solo. Habitat: sobre madera en descomposición.

Estacionalidad: Durante todo el año.

Usos: desconocidos.

Distribución: América del Norte, América Central, América del Sur, África.

Observaciones: Especie muy común y fácilmente reconocible, ya que tiene una capa de pelos negros rígidos y ramificados sobre la superficie del píleo, característica que la diferencia de las otras especies del género *Hexagonia*. Además posee una consistencia flexible y coriácea cuando está fresca y los poros son redondos a irregulares. (Mata Milagro, 2003).

Trichaptum perrottetii:

Reino: Fungi

Filo: *Basidiomycota*

Clase: *Basidiomycetes*

Orden: *Poriales*

Familia: *Coriolaceae*

Género: *Trichaptum*

Especie: *Trichaptum perrottetii*



Cuerpo fructífero: aplanado, sésiles, semicircular alargada como plataforma, sobre todo en términos generales de conexión, por lo general no decurrente sobre el substrato, de 5-15 cm de largo y 3-7 cm de ancho y de 8 mm de espesor (tomento no se mide), resistente y flexible. Píleo cubierto por una capa de pelos bifurcados, lisos a suaves, de color marrón oscuro, cada vez más oscuro hacia la base y más grisáceo hacia el margen, azonate o débilmente, hasta 10 mm de espesor en la base. Margen entero y fuerte. Superficie del poro tabaco marrón, poros de angulares a redondos, primero entero y de paredes delgadas, 2-3 por mm, en muestras mayores a menudo incisas, coalescencia y en las partes sinuosas como laberinto, en este último caso de hasta 2 mm de ancho y varios mm de largo. Tubos de color marrón oscuro, de 2-5 mm de profundidad.

Contexto: muy delgado, 0.1-0.4 mm, de color marrón a ocre oscuro.

Distribución: Estados Unidos, Cuba, Centroamérica, Colombia, Brasil, Guyana Francesa y Bolivia. (Ryvarden, 1981).

Panaeolus semiovatus:

Reino: Fungi

División: *Basidiomycota*

Clase: *Agaricomycetes*

Orden: *Agaricales*

Familia: *Coprinaceae*

Género: *Panaeolus*

Especie: *Panaeolus semiovatus*



Descripción: Píleo de 1,5-4,0 cm de diámetro; superficie lisa, de color beige-amarillento a beige-parduzco, brillante. Himenóforo: formado por lamelas gris-parduzco, próximas, con el margen grisáceo. Estípite: de 7,5-12,0 cm de longitud, 0,3-0,8 cm de ancho, uniforme a clavado, posición central; superficie fibrilosa, de color beige-amarillento. Anillo en la parte superior del estípite, membranoso, adherido, de color blanco-grisáceo.

Hábitat: Fructifica sobre excrementos de ganado, muchas veces de forma gregaria. Su época de aparición es la primavera, saliendo también durante el otoño. Es una seta muy frecuente.

Distribución: Sobre estiércol de caballo o bovino.

Usos: Se le atribuyen efectos alucinógenos y se consumía mucho en décadas pasadas, pero no existe un fuerte respaldo científico sobre la cantidad de sustancias químicas presentes responsables de causar efectos psicotrópicos.

Observaciones: Consideramos que es una seta inconfundible, en primer lugar por su tamaño, es la especie más grande de su género que se da de forma habitual. Su forma de medio huevo también es definitoria, así como su color uniforme más claro que otras especies del género. Además tiene anillo, con lo cual es muy difícil confundirla con otras especies con las que comparte hábitat, como el *Panaeolus sphinctrinus*. (Mata Milagro, 2003).



Para todas las especies fúngicas en general estas contienen en su composición química: Fenoles, Terpenos, Flavonoides, Lignina, Quitina, que estas a su vez contienen polisacáridos y Alcaloides, pertenecientes a las especies alucinógenas (*Panaeolus semiovatus*).

La **Bacteriología** es una disciplina de la **Microbiología**, que ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad. Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial. Entre algunas enfermedades infecciosas bacterianas, causantes de grandes epidemias que han mermado la población, se encuentran: la difteria, cólera, tuberculosis, sífilis, tétanos, tos ferina, y fiebre tifoidea. Sin embargo, también existen infecciones bacterianas que aunque están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte, son un problema de salud pública en países en vías de desarrollo como el nuestro, entre las que podemos mencionar: diarreas (causadas por *Shigella* o *Escherichia coli*), infecciones de vías urinarias, faringoamigdalitis, gonorrea, tracoma y brucelosis. (Drs. Molina José y Uribarren Teresa, 28 de abril de 2011).

Otro aspecto de primordial importancia en bacteriología es la microbiota del cuerpo humano, en especial del tracto gastrointestinal. La microbiota intestinal difiere de una persona a otra y esa diversidad se ha visto en la composición del lumen (heces) y de la mucosa (epitelial), aunque el genotipo del hospedero es más importante en determinar la microbiota intestinal que la dieta, edad y estilo de vida. (Drs. Molina José y Uribarren Teresa, 28 de abril de 2011).

La microbiota intestinal está implicada en una gran variedad de funciones en el hospedero, involucrando cambios en el epitelio intestinal, modulación inmune, movimiento intestinal y el metabolismo de algunas drogas. La microbiota también está involucrada en la degradación de algunas toxinas y carcinógenos que se ingieren en la dieta, síntesis de micronutrientes, fermentación de sustancias del alimento, ayuda en la absorción de electrolitos y minerales; asimismo afecta el desarrollo y diferenciación de los enterocitos, a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Finalmente, la microbiota previene la colonización del intestino por bacterias patógenas como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Shigella*. (Drs. Molina José y Uribarren Teresa, 28 de abril de 2011).

La bacteria que se tomó para este estudio es: *Salmonella spp.*



Salmonella spp:

Dominio: Bacteria

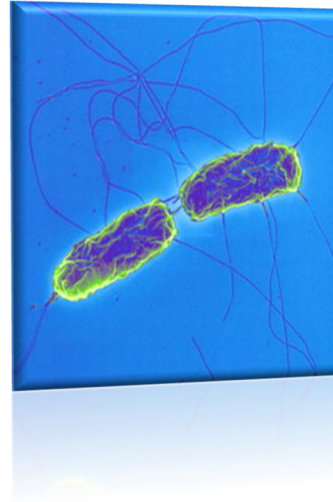
Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gamma Proteobacteria*

Orden: *Enterobacteria*

Género: *Salmonella*

Especie: *Salmonella spp*



GENERALIDADES:

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Siendo fiel a su nombre, esta familia se compone de bacterias que se multiplican en el intestino, siendo varios los géneros de *Enterobacteriaceae* que incluye especies patógenas. (González Patricia).

Al igual que todos los géneros de *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* está formado por bacterias Gram negativa flageladas y forma bacilar. Las *Salmonellas* son microorganismos anaerobios facultativos, presentando las dos rutas metabólicas, la oxidativa y la fermentativa. Una de las características de este género es que la mayor parte de sus integrantes no pueden fermentar la lactosa ni la sacarosa. (González Patricia).

Existen tres tipos de *Salmonella*, la *S. Choleraesuis*, la *S. typhi* y la *S. enteritidis*. Las dos primeras corresponden a un sólo serotipo; la *S. enteritidis* engloba los demás serotipos. Se reúnen estos microorganismos en seis grupos: el grupo A que incluye la *S. paratyphi*; el grupo B que incluye la *S. typhimurium* y la *S. bredeney*; el grupo C1 con la *S. choleraesuis*, la *S. montevideo* y la *S. oranienburg*; el grupo C2 tiene sólo la *S. neuport*; al grupo D pertenecen al *S. typhi*, la *S. enteritidis*, la *S. dublin* y la *S. gallinarum*, finalmente en el grupo E se encuentran la *S. butantan*, la *S. anatum* y la *S. give*. (Saravia Jaime, M.D., 2012).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Salmonella es la causa más común de las enfermedades transmitidas por alimentos. Esta se encuentra en las aves crudas, los huevos, la carne vacuna y, algunas veces, en las frutas y vegetales sin lavar. (González Patricia).

Las manifestaciones clínicas de la bacteria *Salmonella* se presentan básicamente bajo tres modalidades: las denominadas fiebres entéricas entre las cuales la más común es la fiebre tifoidea producida por la *Salmonella typhi*; las gastroenteritis producidas por varios tipos, entre ellas la *S. typhimurium*; y la forma septicémica, caracterizada por la bacteremia asociada a lesiones focales debida frecuentemente a la *S. choleraesuis*. (Saravia Jaime, M.D., 2012).

Dentro de las manifestaciones clínicas comunes está la fiebre acompañada de dolor abdominal, evacuaciones intestinales frecuentes, líquidas, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre. Estos cuadros clínicos son más severos en los niños y en los viejos. En niños desnutridos puede observarse la diseminación hematógena dando lugar a bacteremias con compromiso de otros órganos tales como las meninges, el oído, los pulmones, los riñones y el hueso. (Saravia Jaime, M.D., 2012).

TRATAMIENTO:

Se deben considerar:

- a. El tratamiento antibacteriano específico
- b. Las medidas generales de soporte
- c. El tratamiento de las complicaciones
- d. El tratamiento de los portadores crónicos

Tratamiento específico: en la actualidad se dispone de varios antimicrobianos útiles para el tratamiento de las infecciones por salmonella, dentro de las cuales están el cloranfenicol, la ampicilina, la amoxicilina, el Sulfametoxazol - Trimetoprim, las cefalosporinas de tercera generación, como la Cefotaxima, la Cefoperazona, la Ceftriaxona; y las Fluoroquinolonas como la Ciprofloxacina y la Ofloxacina. (Saravia Jaime, M.D., 2012).



ENSAYO MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio bromuro):

En los últimos años se han desarrollado algunos métodos colimétricos que se pueden utilizar en placas de microtitulación como es el MTT y XTT. En los ensayos con MTT o MTA (MTT Assays) se utiliza la sal del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) porque en eucariotas la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa puede reducir el MTT soluble y amarillo, convirtiéndolo en un producto azul intenso e insoluble (MTT formazán). El MTT fue utilizado por Mosmann por primera vez en la evaluación de la quimiosensibilidad de los cultivos celulares neoplásicos y posteriormente el método ha sido mejorado por otros autores. (Rodríguez Vicente, Vicente Ortega y Cantera Jordana, 1997).

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El producto de la reacción, el formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTTa formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. (Dr. Arencibia Daniel, Lic. Rosario Luis y Curveco Dayisell, 2003).

El fármaco de primera opción contra *Salmonella spp* es el Trimetropín-Sulfametoxazol, pero debido a que la bacteria ha adquirido resistencia a este fármaco, se utilizará una fluorquinolona, en este caso Norfloxacin (Tableta y Patrón). Las fluorquinolonas son los fármacos de segunda opción en el tratamiento contra *Salmonella spp*. (Flórez Jesús, 1997).



HIPÓTESIS:

En nuestra investigación, se planteó que los extractos ensayados de 6 especies de hongos recolectados en el Departamento de León, poseen actividad antimicrobiana con el microorganismo *Salmonella spp.*



MATERIAL Y METODO:

DISEÑO METODOLOGICO:

Tipo de Estudio: Experimental.

Universo: No definido. No hay datos sobre estudios de hongos existentes. Fuente: Herbario UNAN- León.

Muestra: 6 especies de hongos recolectados en la ciudad de León, Nicaragua. (*Ganoderma australe*, *Phellinus merrillii*, *Phellinus igniarius*, *Hexagonia hydroides*, *Trichaptum perrottetii* y *Panaeolus semiovatus*).

Criterios de inclusión:

- Especies de hongos dentro de la ciudad de León
- Cepas de *Salmonella spp*
- Ensayo colorimétrico MTT
- Antibiótico Norfloxacino (Comparación de actividad antimicrobiana)

Criterios de Exclusión:

- Especies de hongos fuera de la ciudad de León
- Otras cepas de bacterias
- Otros ensayos colorimétricos
- Otro tipo de antibiótico

Unidad de Análisis: Píleo y Estípita de los hongos.

Área: Estudios realizados en el Departamento de Análisis de Drogas, Medicamentos y Tóxicos, en el área de Control Microbiológico y Análisis Farmacéutico de la Facultad de Ciencias Químicas, UNAN-León.



Fuente de Información:

Fuente Secundaria:

- ✓ Internet
- ✓ Herbario de Escuela de Biología UNAN-León
- ✓ Monografías (Estudios de plantas)

Forma de analizar la información: Mediante Microsoft Word, Microsoft Excel, libros de Farmacología e Internet.

Variables:

Extractos etanólicos

Actividad antimicrobiana

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Operacionalización de Variables:

Nº	Variable	Concepto	Escala
1	Extractos	Sustancia que, en forma concentrada, se extrae de otra, de la cual conserva sus propiedades	-Mililitros (ml) -Miligramos (mg)
2	Actividad antimicrobiana	Función de una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios	-Positivo -Negativo
3	CMI	La concentración mínima a la que las muestras ejercen su actividad antimicrobiana	µg/ml



METODO:

ENSAYO MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio bromuro):

Reactivos necesarios:

1. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio bromuro) (reactivo).
2. Medios de cultivo: Agar Triptica soya
3. Control positivo: Norfloxacin (Tableta y Patrón)
4. Control Negativo: Caldo Mueller-Hilton
5. Blanco: DMSO (Dimetil Sulfoxido)
6. MeOH (Metanol)

Método:

Tratamiento de las muestras:



Tratamiento de los controles (Control Positivo):



Tratamiento de los microorganismos:

Preparación de suspensión de bacterias:

Preparar microorganismos con solución salina, añadir a las cuñas con cepas y colocar en el vórtex hasta formar remolino.

Preparación de solución madre:

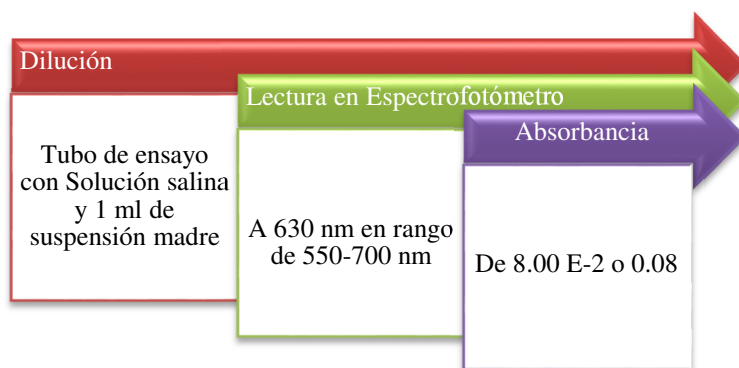
Añadir de suspensión de bacteria a un tubo de ensayo con solución salina previamente esterilizada, agitar en el vórtex hasta formar remolino, luego agregar en celda para leer en Espectrofotómetro a 25 % T y 580 nm (calibrar previamente con blanco, solución salina). Leer la solución preparada. Si el resultado no es el esperado repetir procedimiento anterior, ya sea para disminuir concentración de bacterias (añadir solución salina) o para aumentar la concentración de estas (añadir suspensión de bacteria).

Estandarización de Diluciones de bacterias:

Ensayo de turbidez MTT:

1. De la solución madre preparada anteriormente tomar volúmenes desde 0.1 – 1.4 ml y añadir a tubos de ensayo con solución salina, previamente esterilizados.
2. Leer estas diluciones en Espectrofotómetro a 630 nm (Rango 550-700 nm).
3. Tomar el volumen que presente una absorbancia de 8.00 E-2 o 0.08.
4. El resultado final del ensayo de turbidez fue un volumen de 1 ml de solución madre.

Este ensayo se realizó con solución madre del microorganismo de estudio, del cual luego se procedió a realizar 30 diluciones en 3 días distintos. (*Salmonella spp*).



Ensayo:

1. Agregar 1600 µl de caldo en las celdas 2-9, utilizadas para control positivo (2-9), control negativo (2-9) y las 6 muestras (2-9). En columnas separadas para los controles y cada una de las muestras.
2. Agregar 1600 µl de caldo a la celda 2 y 3 del blanco.
3. Agregar a la celda 1 3200 µl de:

DMSO como blanco

Caldo como Control Negativo

Patrón y Tabletas de Norfloxacinó como Control positivo (en columnas diferentes)

Muestras 1-6 (previamente preparadas)



4. Transferir de celda 1 a 2, 1600 μ l, de celda 2 a 3 1600 μ l y así sucesivamente hasta llegar a la celda 9, el desecho de esta celda tirarlo al beaker. (repetir en todas las columnas)
5. Luego añadir 150 μ l del inóculo (Dilución de *Salmonella spp* a 0.08) a las celdas 2 y 3 del blanco y celdas 2-9 de C. Positivo, C. Negativo y Muestras 1-6.
6. Leer en el espectrofotómetro UV-Vis a 630 nm.
7. Incubar durante 24 horas en Shaker incubator a 37°C.
8. Leer en el espectrofotómetro UV-Vis, luego de las 24 horas, a 630 nm.
9. Agregar 20 μ l de Reactivo MTT, a todas las celdas que contienen el inóculo.
10. Incubar durante una hora más.
11. Observar cambio de coloración.



RESULTADOS:

Control negativo (Caldo Mueller-Hilton):

Control Negativo	C1 0.1829 µg/ml	C2 0.0914 µg/ml	C3 0.0457 µg/ml	C4 0.0229 µg/ml	C5 0.01143 µg/ml	C6 0.00571 µg/ml	C7 0.00286 µg/ml	C8 0.001429 µg/ml
Caldo								

*Púrpura: No hubo inhibición

El ensayo aplicado a las muestras obtuvo el siguiente resultado:

Muestra	C1 0.1829 µg/ml	C2 0.0914 µg/ml	C3 0.0457 µg/ml	C4 0.0229 µg/ml	C5 0.01143 µg/ml	C6 0.00571 µg/ml	C7 0.00286 µg/ml	C8 0.001429 µg/ml
<i>Ganoderma australe</i>								
<i>Phellinus merrillii</i>								
<i>Phellinus igniarius</i>								
<i>Hexagonia hydroides</i>								
<i>Trichaptum perrottetii</i>								
<i>Panaeolus semiovatus</i>								

*Amarillo: Hubo inhibición de las bacterias

**Púrpura: No hubo inhibición

***C1: Concentración 1

Control Positivo: Patrón de Norfloxacin:

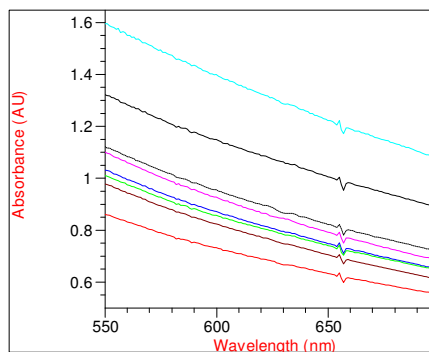
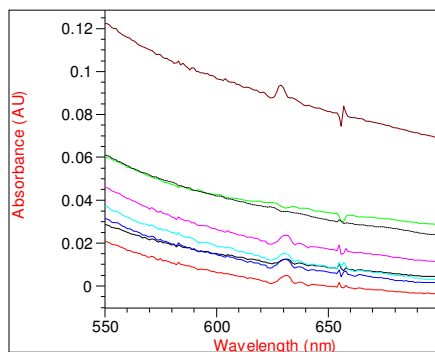
Control Positivo	C1 0.1829 µg/ml	C2 0.0914 µg/ml	C3 0.0457 µg/ml	C4 0.0229 µg/ml	C5 0.01143 µg/ml	C6 0.00571 µg/ml	C7 0.00286 µg/ml	C8 0.001429 µg/ml
Patrón								
Tableta								



Resultados en el espectrofotómetro a 630 nm:

Día 1:

Standard



		Día 1	Día 2	
#	Standard Name	Abs<630nm>	Abs<630nm>	Concentración
1	Norfloxacino	1.2332E-2	1.06230	0.01829 µg/ml
2	Norfloxacino	4.5824E-3	0.66645	0.0914 µg/ml
3	Norfloxacino	1.2296E-2	0.79513	0.0457 µg/ml
4	Norfloxacino	1.5264E-2	1.28730	0.0229 µg/ml
5	Norfloxacino	2.3530E-2	0.84510	0.01143 µg/ml
6	Norfloxacino	3.6800E-2	0.78385	0.00571 µg/ml
7	Norfloxacino	9.2405E-2	0.74778	0.00286 µg/ml
8	Norfloxacino	3.4777E-2	0.86562	0.001429 µg/ml

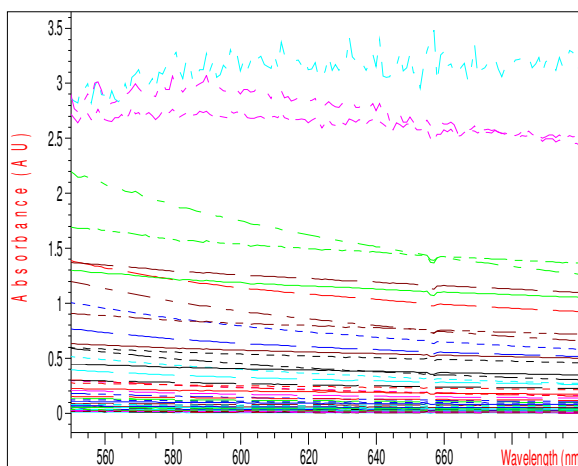


Control Negativo y Muestras:

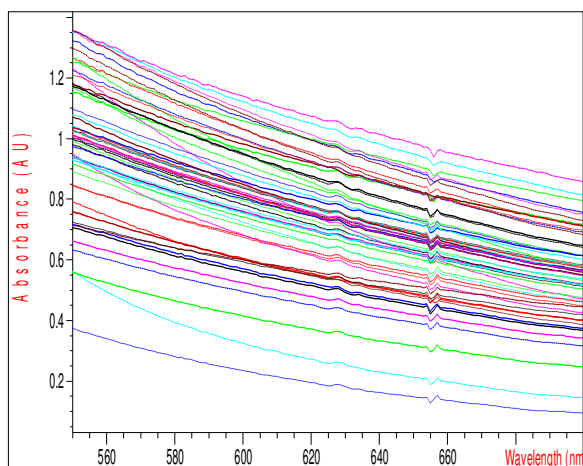
Bacteria utilizada: *Salmonella spp*

Gráficos de Absorbancia del estudio:

Día 1



Día 2



Tablas de absorbancias del estudio:

		Día 1	Día 2
#	Name	Abs<630nm>	Abs<630nm>
1	Negativo	1.8827E-2	0.49365
2	Negativo	2.2981E-2	0.53365
3	Negativo	2.8163E-2	0.50008
4	Negativo	3.2482E-3	0.74678
5	Negativo	9.1443E-3	0.67655
6	Negativo	1.5032E-2	0.87981
7	Negativo	4.9893E-2	0.88282
8	Negativo	6.7577E-3	0.69268



9	Muestra 1	1.05910	0.52836
10	Muestra 1	0.58685	0.95648
11	Muestra 1	0.29768	1.01110
12	Muestra 1	0.15719	1.04140
13	Muestra 1	0.10584	0.96342
14	Muestra 1	7.1434E-2	0.74835
15	Muestra 1	4.2816E-2	0.67507
16	Muestra 1	1.8536E-2	0.59914
17	Muestra 2	0.71631	0.18206
18	Muestra 2	0.34785	0.63245
19	Muestra 2	0.20294	0.97387
20	Muestra 2	8.7563E-2	0.70630
21	Muestra 2	5.6090E-2	0.74779
22	Muestra 2	3.4984E-2	0.73117
23	Muestra 2	4.9901E-3	0.60494
24	Muestra 2	8.3151E-3	0.43459
25	Muestra 3	3.16900	0.25558
26	Muestra 3	2.81580	0.58974
27	Muestra 3	1.56470	0.80852
28	Muestra 3	0.82282	0.95575



29	Muestra 3	0.39338	0.84159
30	Muestra 3	0.20333	0.91835
31	Muestra 3	0.12510	0.89351
32	Muestra 3	4.9809E-2	0.68786
33	Muestra 4	2.63770	0.71017
34	Muestra 4	1.47940	0.81700
35	Muestra 4	0.78313	0.91072
36	Muestra 4	0.38379	0.84346
37	Muestra 4	0.18950	0.72545
38	Muestra 4	8.7750E-2	0.77305
39	Muestra 4	4.1139E-2	0.66949
40	Muestra 4	1.2081E-2	0.46146
41	Muestra 5	1.14280	0.35658
42	Muestra 5	0.54824	0.74671
43	Muestra 5	0.25205	0.71817
44	Muestra 5	0.12883	0.74907
45	Muestra 5	5.2964E-2	0.71925
46	Muestra 5	2.3737E-2	0.78148
47	Muestra 5	9.6889E-3	0.73361
48	Muestra 5	4.2210E-2	0.65714



49	Muestra 6	1.20450	0.54651
50	Muestra 6	0.50903	0.53554
51	Muestra 6	0.23305	0.89210
52	Muestra 6	0.10045	0.79909
53	Muestra 6	6.3685E-2	0.74947
54	Muestra 6	2.0137E-2	0.72551
55	Muestra 6	2.2844E-2	0.63434
56	Muestra 6	9.2998E-3	0.52560

Cálculo de Concentración de cada celda:

$$C_1 = (1600\mu\text{l} * 0.2 \mu\text{g/ml}) / 1750\mu\text{l} = \mathbf{0.1829 \mu\text{g/ml}}$$

C₁ fue la concentración a la que la mayoría de las muestras presentaron inhibición bacteriana.

C₂ = C₁/2 = 0.0914 μg/ml	C₅ = C₄/2 = 0.01143 μg/ml	C₈ = C₇/2 = 0.001429 μg/ml
C₃ = C₂/2 = 0.0457 μg/ml	C₆ = C₅/2 = 0.00571 μg/ml	
C₄ = C₃/2 = 0.0229 μg/ml	C₇ = C₆/2 = 0.00286 μg/ml	



Cálculo de porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ INHIBICION} = ((\text{ABSMUESTRA}/\text{ABSNEGATIVO}) + 1) / 100$$

DIA 2 (Luego de la incubación durante 24 horas)								
M 1	0.52836	0.02070313%	M 2	0.18206	0.01368804%	M 3	0.25558	0.01517735%
M 1	0.95648	0.02792336%	M 2	0.63245	0.0218514 %	M 3	0.58974	0.02105106 %
M 1	1.0111	0.03021876%	M 2	0.97387	0.02947428%	M 3	0.80852	0.02616781 %
M 1	1.0414	0.0239452 %	M 2	0.7063	0.01945794 %	M 3	0.95575	0.02279828 %
M 1	0.96342	0.02424019%	M 2	0.74779	0.02105299 %	M 3	0.84159	0.02243944 %
M 1	0.74835	0.01850581%	M 2	0.73117	0.01831054 %	M 3	0.91835	0.02043805 %
M 1	0.67507	0.01764675%	M 2	0.60494	0.01685236 %	M 3	0.89351	0.02012109 %
M 1	0.59914	0.01864959%	M 2	0.43459	0.01627404 %	M 3	0.68786	0.01993042 %
M 4	0.71017	0.0243861%	M 5	0.35658	0.01722334%	M 6	0.54651	0.0210708%
M 4	0.817	0.02530966%	M 5	0.74671	0.0239925 %	M 6	0.53554	0.02003542 %
M 4	0.91072	0.02821149%	M 5	0.71817	0.0243611 %	M 6	0.8921	0.02783915 %
M 4	0.84346	0.02129462%	M 5	0.74907	0.02003066 %	M 6	0.79909	0.02070047 %
M 4	0.72545	0.02072278%	M 5	0.71925	0.02063114 %	M 6	0.74947	0.02107782 %
M 4	0.77305	0.01878656%	M 5	0.78148	0.01888237 %	M 6	0.72551	0.01824621 %
M 4	0.66949	0.01758354%	M 5	0.73361	0.01830985 %	M 6	0.63434	0.01718538 %
M 4	0.46146	0.01666195%	M 5	0.65714	0.01948692 %	M 6	0.5256	0.01758792 %



ANALISIS DE RESULTADOS:

Según los datos presentados por el espectrofotómetro UV-Vis a 630 nm, las concentraciones de caldo con el inóculo (*Salmonella spp*) presentaron un crecimiento bacteriano después de las 24 horas de incubación, ya que el caldo es un rico medio de proliferación.

El Standard presentó crecimiento bacteriano, pero al visualizar el ensayo colorimétrico con MTT la concentración 1 (0.1829 µg/ml) hubo coloración amarilla, es decir, que hubo inhibición de bacteria, ya que está es cercana al valor establecido en la farmacopea de su CMI del fármaco Norfloxacino (0.2 µg/ml).

Todas las muestras presentaron un grado de inhibición en la concentración más alta (0.1829 µg/ml), algunas de ellas (*Phellinus igniarius* y *Hexagonia hydroides*) presentaron inhibición en su concentración 2 (0.0914 µg/ml), además la muestra *Phellinus igniarius* presentó inhibición en su concentración 3 (0.0457 µg/ml).

Con respecto al ensayo colorimétrico MTT las muestras únicamente presentaron coloración amarilla en la primer celda, que contenía la mayor concentración.

El porcentaje de inhibición presentado por las bacterias fue 0.020%, este es el porcentaje de la concentración (0.1829 µg/ml) que inhibió bacteria.

Las muestras que presentaron inhibición bacteriana son debido a que estas tienen en su contenido químico polisacáridos, haciendo que estas sean más lipofílicas y puedan atravesar la membrana y así inhibir la bacteria.



CONCLUSION:

La determinación de la actividad antimicrobiana se comprobó mediante el método de coloración MTT. Para esto se tuvieron que preparar extractos etanólicos, los cuales presentaron una mayor concentración de la especie a analizar.

Al aplicar el ensayo MTT, se demostró que las muestras presentan una coloración amarilla, en las celdas donde se realizó la primera dilución, indicando que inhibió la bacteria, las demás celdas presentaron color púrpura que es todo lo contrario.

Al determinar la CMI se pudo comparar que las muestras inhibieron a una concentración cercana a la del antibiótico de referencia utilizado en este estudio (Norfloxaciono, CMI= 0.2 µg/ml).

Al finalizar nuestro estudio de carácter experimental llegamos a la conclusión de que en el campo farmacéutico es necesario que se realicen más estudios investigativos sobre las propiedades terapéuticas que pueden presentar estas especies, demostrando así que pueden descubrirse y desarrollarse nuevas formulaciones al hacer uso de material vegetal, no solo para el tratamiento de enfermedades de carácter común, sino también como alternativas en enfermedades que ponen en peligro la calidad de vida del hombre.



RECOMENDACIONES:

- Realizar estudios fitoquímicos con mayor profundidad para determinar los principios activos inmersos en las diferentes especies de hongos que promuevan la mayor acción inhibitoria en el crecimiento del microorganismo estudiado.
- Probar si los microorganismos expuestos a los extractos, después de la inhibición de su crecimiento son viables.
- En posteriores estudios que se realicen determinar además de la C.M.I (concentración mínima inhibitoria) determinar también la C.M.B (concentración mínima bactericida) de los extractos de hongos, en el microorganismo utilizado.
- Realizar estudios más profundos sobre *phellinus igniarius* y *hexagonia hynoides* ya que según los resultados que obtuvimos estas especies inhiben el crecimiento bacteriano a una menor concentración, lo que podría resultar en un fitofármaco de mayor acción a dosis bajas.
- Si optan por realizar una monografía experimental, solicitar los reactivos necesarios al tener definido el tema.
- Realizar investigaciones sobre este tipo de especie vegetal, para fomentar el desarrollo de fitofármacos.
- Fomentar a los estudiantes la realización de trabajos monográficos para que estos refuercen conocimientos a nivel experimental.



BIBLIOGRAFÍA:

1. Medinilla Beatriz. (2008). Evaluación biológica y fitoquímica de cinco especies de hongos nativos de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.41.pdf>.
2. Prada Salcedo, LD y Vega Vásquez, P. (2008). Caracterización y evaluación de actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hongos de la familia *Tricholomataceae* frente a agentes causales de dermatomicosis en animales. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis135.pdf>
3. Shiva Ramayoni, CM. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Universitat Autònoma de Barcelona. Recuperado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5606/cmsr1de1.pdf;jsessionid=523110DE1C8F6B5ABD7648315D9B0684.tdx2?sequence=1>
4. Mendoza, M., Morales, D. y Uriarte, M. (2002). Determinación antimicrobiana con cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de 2 plantas medicinales de uso folklórico utilizados para el tratamiento de enfermedades como infección renal de la ciudad de León. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León. Tesis Monográfica.
5. García, C. y Jiménez, A. (2002). Determinación de actividad antimicrobiana y antifúngicos, en tres especies vegetales, *Hamelia patens*, *Brusera simaruba* y *Tabebuia rosea*, de uso folklórico, comercializadas en Nicaragua contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Candida albicans*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León. Tesis Monográfica.
6. Paredes, A., Pérez, Z. y Palacios, V. (2004). Determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos de *Bixa orellana* L. en cepas de *Escherichia coli*,



Staphylococcus aureus, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León. Tesis Monográfica.

7. Ramírez, V. y Ruiz, M. (2004). Determinación de actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhymuriun*, *Shigella flexineri*, *Klebsiella pneumoniae*, a seis extractos de plantas que fueron colectadas en la biodiversidad vegetal de la estación biológica Bartola-Río San Juan. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León. Tesis Monográfica.
8. Drs. Molina José y Uribarren Teresa. (2011). Generalidades de bacterias. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
9. Borraz Carmen. (2006). Tesis doctoral epidemiologia de la resistencia a metilicina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Barcelona. Recuperado de <http://sintomas-enfermedades.blogspot.com/2011/10/antibioticos-para-staphylococcus-aureus.html>
10. González Patricia. Bacteria *Salmonella*. Monografías.com. Recuperado de <http://www.monografias.com/trabajos89/salmonella/salmonella.shtml>
11. Saravia Jaime, M.D. (2012). Salmonelosis. Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital San Juan de Dios. Recuperado de <http://www.aibarra.org/Guias/7-25.htm>
12. Rodríguez-Angeles Guadalupe. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Laboratorio de Bacteriología Molecular, departamento de Biología Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D.F., México. Recuperado de <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>



13. Ramos Guillermo. (2009). *Escherichia coli*. Médico Interno de Pregrado. Hospital Civil de CD. Madero/Secretaría de Salud. México. Recuperado de <http://es.slideshare.net/gramos089/escherichia-coli-2618679>
14. López Silva Milamarie. (2008). *Escherichia coli*. Slideshare. Recuperado de <http://es.slideshare.net/wao2008/escherichia-coli-presentation>
15. Mata Milagro. (2003). *Macrohongos de Costa Rica*. 2da Edición. Volumen 1. INBio, Instituto Nacional de Biodiversidad. Págs. 13, 15, 19 y 21.
16. Calvo Pérez, Javi. (2010). *Panaeolus semiovatus*. Fungipedia. Recuperado de <http://www.fungipedia.es/clasificacion-orden/basidiomycota/agaricales/330-panaeolus-semiovatus.html>
17. Rodríguez Vicente, Vicente Ortega y Cantera Jordana. (1997). Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio de crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanona. *Revista Patología* 1997. Volumen 30. Recuperado de <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n1/3.pdf>
18. Dr. Arencibia Daniel, Lic. Rosario Luis y Curveco Dayisell. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista Tecnológica en Línea*. La Habana, Cuba. Recuperado de http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
19. Juan Manuel Leyva, Julio Jesumar Pérez-Carlón, Gustavo Adolfo González-Aguilar. Martín Esqueda, Jesús Fernando Ayala-Zavala. (2013). Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. *Revista Mexicana de Micología*. Volumen 37.
20. Dr. Yuan-Shiun Chang. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of ethanol extract from *Phellinus merrillii* on carbon tetrachloride-induced liver damage. Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, China Medical University. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 35, No. 5, 793–804.



21. EMC=COSMOS. La enciclopedia de las ciencias y la tecnología en México. (2009). Biología. Recuperado de <http://www.izt.uam.mx/cosmosecm/HONGOS.html>
22. Ryvarden, L.; Johansen, I. (1980). A preliminary polypore flora of East Africa. *Phellinus merrillii* (Murrill) Ryvarden. Data from CBS Aphyllophorales database. Recuperado de <http://www.cbs.knaw.nl/scripts/Aphyllophorales.dll/ShowName?Nr=68751>
23. Quél. – Willow Bracket. *Phellinus igniarius* (L.). Recuperado de <http://www.first-nature.com/fungi/phellinus-igniarius.php>
24. ZipcodeZoo: *Trichaptum perrottetii*. Recuperado de http://zipcodezoo.com/Fungi/T/Trichaptum_perrottetii/
25. Ryvarden, L. (1981). *Trichaptum perrottetii* (Léveillé) Ryvarden. Data from CBS Aphyllophorales database. Recuperado de <http://www.cbs.knaw.nl/scripts/Aphyllophorales.dll/ShowName?Nr=77253>
26. Flórez Jesús. (1997). *Farmacología Humana*. Capítulo 63. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. 3ª Edición.



ANEXOS

ANEXO 1:

GLOSARIO:

B

Bifurcado: bífido, ramificado, dividido, desviado.

C

Carpóforo: cuerpo fructífero o de reproducción.

Clorofila: Sustancia verde presente en los vegetales y en algunas algas y bacterias, la cual resulta esencial en el proceso de la fotosíntesis y la fijación de carbono.

Coalescencia: Propiedad o capacidad de ciertas sustancias y cosas para unirse o fundirse con otras en una sola.

Coprófilo: Hongo que se desarrolla sobre estiércol o boñiga.

Coriácea: Que tiene el aspecto o el tacto parecido al del cuero.

Cuerpo fructífero: Estructura reproductora que produce el hongo sobre el sustrato, cuya función es dispersar las esporas.

D

Dimidiado: Con forma de concha o de la mitad de un círculo.

Disperso: Separado y diseminado dentro de una misma área.

Distribución: Ámbito geográfico donde se encuentra una especie.

E

Especie: Organismos que comparten las mismas características reproductivas y tienen sólo un ancestro común cercano.

Estípite: Pie que sostiene el píleo y que lo eleva de la superficie.

F

Familia: Grupo sistemático de la clasificación taxonómica que comprende uno o más géneros afines.

Flabeliforme: En forma de abanico.

Fibrilosa: Con fibrillas semejantes a hilos de seda muy finos.



G

Género: Grupo de especies estrechamente emparentadas. El género está incorporado al nombre científico de todas las especies pertenecientes a éste, por ej. *Amanita muscaria*, donde *Amanita* es el nombre del género.

Globoso: Con forma de esfera o casi esférico.

Gregario: Organismos que viven próximos entre sí y poco esparcidos en un área pequeña.

H

Hábitat: Medio o entorno en que vive y se desarrolla una población de hongos, animales o plantas.

Hábito: Apariencia externa típica de la forma en que crece un organismo.

Hifas: Filamento que constituye la unidad estructural y fundamental de la mayoría de los hongos.

Himenio: Superficie sobre la cual se forman las estructuras reproductoras responsables de producir las esporas.

Himenóforo: Parte del hongo donde nacen las esporas; por ejemplo, láminas, tubos, espinas, dientes, pliegues, etc.

Hispolon: compuesto polifenólico que induce apoptosis.

I

Incisas: Cortado.

L

Lamelas: Estructuras con forma de lámina que constituyen la superficie fértil. Se encuentran localizadas debajo del píleo y en ellas se encuentran las esporas.

Lobulado: Que tiene forma de lóbulo.

Lignina: compuesto químico que impregna las paredes de las células vegetales.

M

Micelio: conjunto de hifas que constituyen el cuerpo o talo de los hongos.

O

Orden: Grupo sistemático que comprende una o más familias afines. Ejemplos: *Cantharellales* (hongos trompeta), *Poriales* (orejas de palo), *Tremellales* (hongos gelatinosos).

P

Perenne: Permanente, que no muere.



Píleo: Parte superior de un cuerpo fructífero.

Poros: Orificios de los tubos que forman el Himenóforo.

Q

Quitina: compuesto químico que forma parte de las paredes celulares en los hongos.

R

Reino: En biología, reino es cada una de las grandes subdivisiones en que se consideran distribuidos los seres naturales, por razón de sus caracteres comunes.

Rugulosa: Con arrugas muy profundas dispuestas de forma irregular.

S

Saprobio: organismo que se nutre absorbiendo las sustancias orgánicas que descompone.

Sésil: Sin estípite.

Solitario: Hábito de crecimiento donde el hongo produce un solo cuerpo fructífero.

T

Talo: parte vegetativa, cuerpo asimilador del hongo.

Taxonomía: Ciencia que se encarga de denominar, describir y clasificar a los organismos vivos.

Tomento: Capa de pelos que cubre la superficie de los órganos de algunas plantas.

V

Velutinoso: Con pelos cortos, finos, suaves y dispuestos de manera compacta (parecido a la pana y al terciopelo)



ANEXO 2:

ABREVIATURAS:

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio bromuro)

DMSO: Dimetil sulfóxido

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

PM: *Phelluns merrillii*

XTT: Sal de tetrazol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio bromuro)

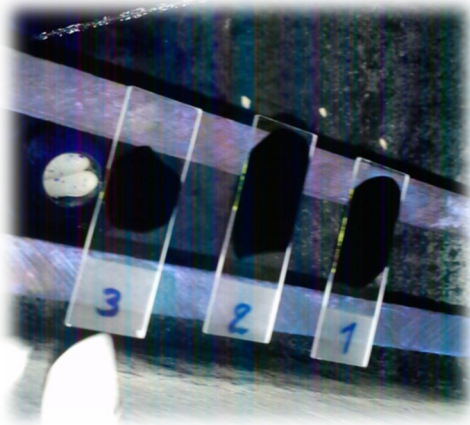
MeOH: Metanol



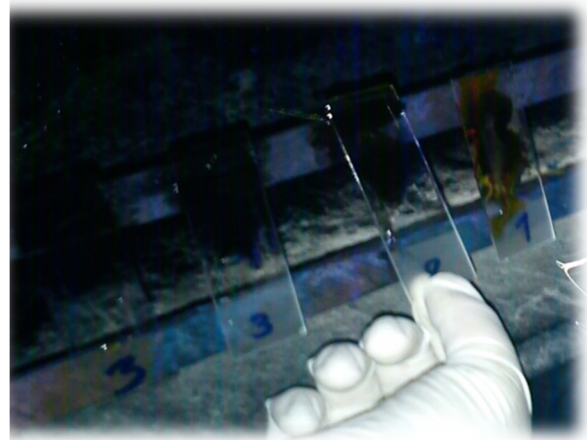
ANEXO 3:

TINCION DE GRAM:

Cristal-Violeta



Alcohol-Acetona



Lugol

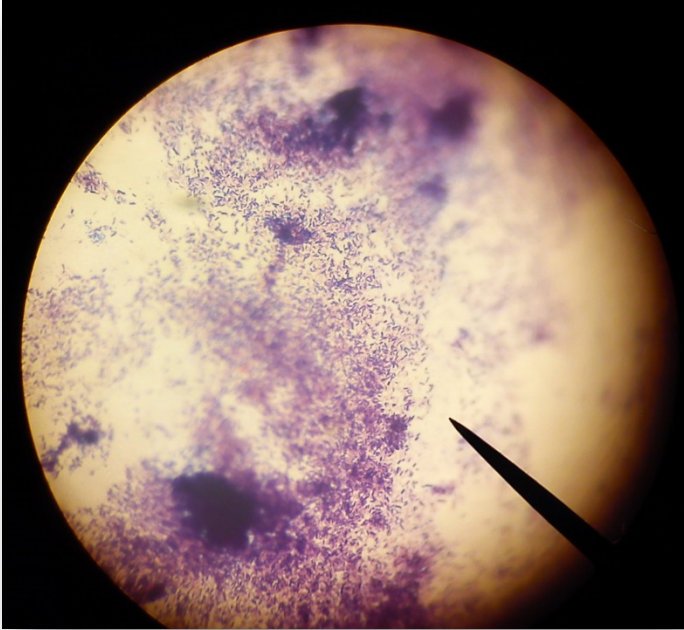


Safranina



Vista a través del microscopio:

Bacteria: *Salmonella spp*



Resultado: positivo, presentó la formación de bacilos flagelados.



ANEXO 4:

Preparación de los medios de cultivo:

Agar Tripticasódica:

1. Calentar agua destilada.
2. Pesar 4 g/ 100 ml de Agar Tripticasódica.
3. Colocar en Erlenmeyer.
4. Añadir 100 ml de agua destilada caliente.
5. Mezclar hasta que no queden grumos.
6. Rellenar cuñas con 7-10 ml, dependiendo del tamaño de la cuña.
7. Llevar al autoclave.
8. Dejar enfriar de forma casi horizontal.

Solución Salina:

1. Pesar 8.5 g / 1000 ml de NaCl.
2. Añadir a beaker de 1000 ml.
3. Añadir 1000 ml de agua destilada.
4. Agitar hasta disolver.
5. Rellenar tubos de ensayo con 9.2 ml de solución salina (volumen exacto, al ingresar al autoclave este presenta un margen de error de 0.2 ml).
6. Llevar al autoclave.



Preparación de Caldo Mueller-Hinton:

1. Pesar cantidad a utilizar (4.2 g).
2. Añadir a beaker de 500 ml.
3. Añadir 300 ml de agua destilada.
4. Agitar hasta disolver.
5. Adicionar 10 ml de la preparación a tubos de ensayos.
6. Llevar al autoclave.

Autoclave:

1. Verificar que contenga agua hasta lo indicado.
2. Ingresar los materiales a esterilizar.
3. Encender y esperar a que caliente a 121°C.
4. Al llegar a 121°C mantener temperatura y contar 15 minutos.
5. Luego de pasado los 15 minutos apagar el autoclave y desconectar.
6. Esperar a que llegue a 0°C para sacar materiales, de lo contrario habría peligro por la presión que presenta.

ANEXO 5:

Preparación de reactivo MTT:

1. Pesar 30 mg de MTT.
2. Llevar a un Erlenmeyer de 25 ml.
3. Añadir 6 ml de metanol.
4. Mezclar.

Cálculo de preparación:

Concentración de MTT = 5 mg/ml

Cantidad aproximada de celdas:

Grupo 1: 80

Grupo 2: 92

Grupo 3: 92

Total: 264 celdas

Contenido aproximado de cada celda: 1800 μ l

$(264 \times 1800) / 100 = 4.752 \text{ ml}$ – Cantidad aproximada de MTT a utilizar

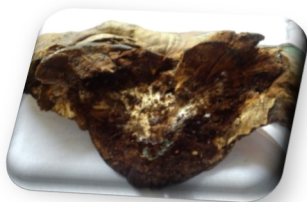
ANEXO 6:

Código	Nombre Común	Nombre Científico	Parte usada	Peso
DCC01	Oreja de palo	<i>Ganoderma australe</i>	Píleo	126.6136 g
DCC02	Se desconoce	<i>Phellinus merrillii</i>	Píleo	85.0941 g
DCC03	Oreja de palo	<i>Phellinus igniarius</i>	Píleo	97.8951 g
DCC04	Se desconoce	<i>Hexagonia hydroides</i>	Píleo	6.4406 g
DCC05	Se desconoce	<i>Trichaptum perrottetii</i>	Píleo	6.3399 g
DCC06	Se desconoce	<i>Panaeolus semiovatus</i>	Píleo y Estípite	21.8464 g

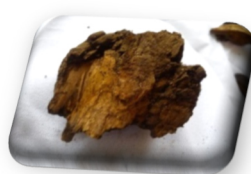
ANEXO 7:

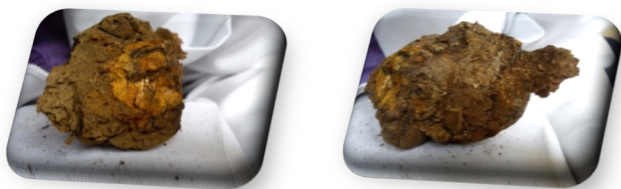
RECOLECTA DE HONGOS

ESPECIE: *Ganoderma australe*



ESPECIE: *Phellinus igniarius*





ESPECIE: *Phellinus merrillii*





ESPECIE: *Hexagonia hydroides*



ESPECIE: *Trichaptum perrottetii*



ESPECIE: *Panaeolus semiovatus*

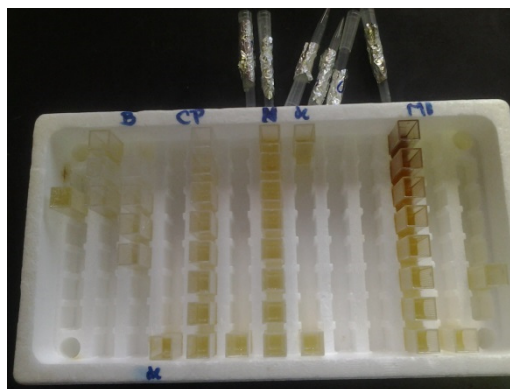
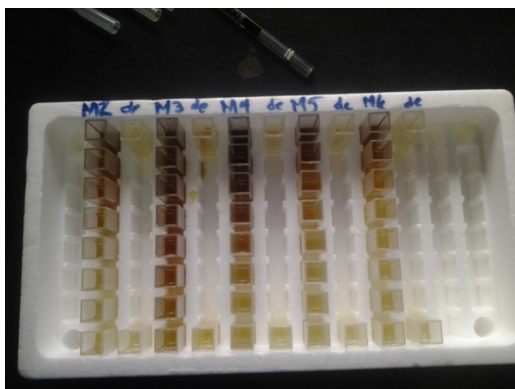




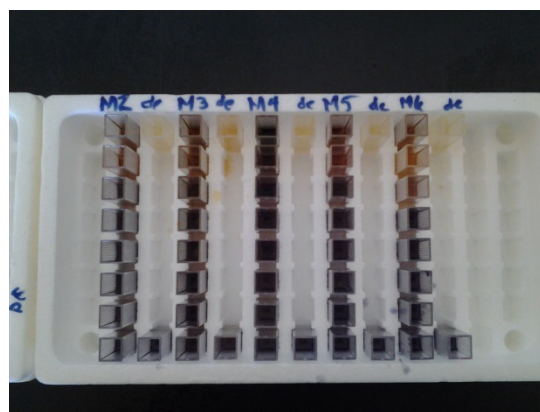
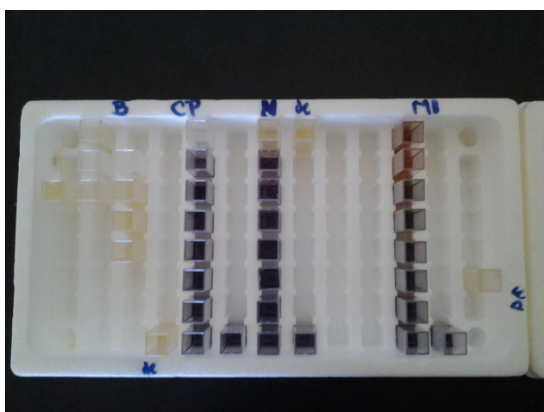
ANEXO 8:

ENSAYO:

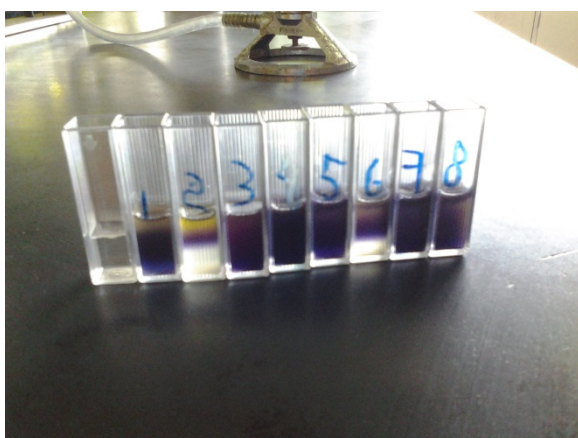
Diluciones del primer día (lectura a 630 nm):



Segundo día con MTT:



Control positivo: Antibiótico Norfloxacino





Control Negativo: Caldo



Blanco: DMSO



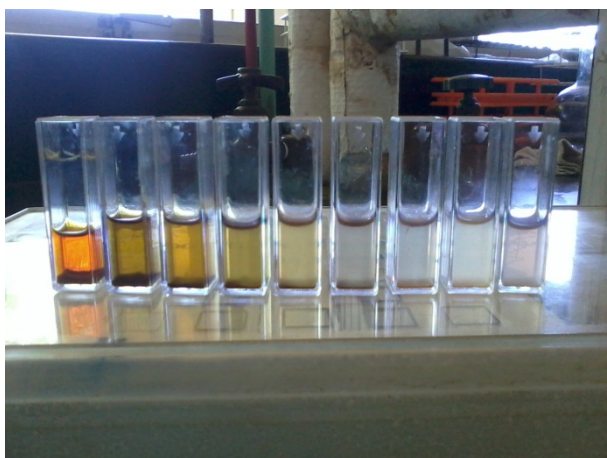
Muestra 1: *Ganoderma australe*



Muestra 2: *Phellinus merrillii*



Muestra 3: *Phellinus igniarius*

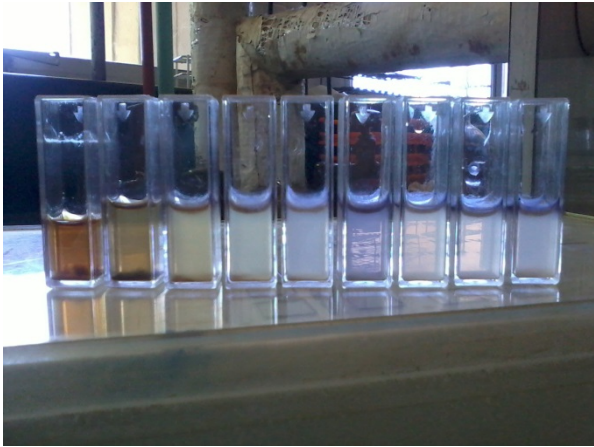


Muestra 4: *Hexagonia hydroides*





Muestra 5: *Trichaptum perrottetii*



Muestra 6: *Panaeolus semiovatus*

