

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL:

“Obtención de extractos acuosos y metanólicos del entomopatógeno
Beauveria bassiana”.

Correspondiente al proyecto genérico:

Evaluación de conidios y metabolitos de hongos filamentosos
producidos en cultivo sólido para su uso potencial en el control biológico
y en la industria farmacéutica.

PRESENTA:

ELIZABETH CAZARES MUÑOZ

MATRICULA: 2163063672

ASESORES:

JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO No. Económico: 24927

AÍDA HAMDAN PARTIDA No. Económico: 26343

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorio De Biotecnología, Edificio N.
Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Xochimilco, con Dirección: Calzada Del Hueso
1100. Col. Villa Quietud, Alcaldía de Coyoacán, C.P 04960, Ciudad de
México, México.

Periodo: 01 noviembre 2022 al 01 mayo 2023

Ciudad de México, Julio 2023

Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Hongos filamentosos.....	5
2.2 Hongos entomopatógenos.....	5
2.3 <i>Beauveria bassiana</i>	6
2.4 Características morfológicas de <i>B. bassiana</i>	6
2.5 Metabolitos producidos por <i>B. bassiana</i>	7
3. Objetivos e hipótesis	9
4. Desarrollo experimental	10
4.1 Medio de cultivo de conservación.....	10
4.2 Obtención del inóculo.....	10
4.3 Identificación morfológica de <i>B. bassiana</i>	10
4.4 Medio de cultivo sólido de <i>B. bassiana</i>	11
4.5 Obtención de los metabolitos de <i>B. bassiana</i>	11
4.6 Separación por columnas C19 Sep-Pak.....	12
4.7 Determinación de proteína.....	12
4.8 Selección de concentrados y fracciones para medir la actividad antimicrobiana.....	12
4.9 Preparación de cepas para prueba antimicrobiana.....	13
4.10 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	13
5. Resultados y discusión	14
5.1 Identificación morfológica de <i>B. bassiana</i>	14
5.2 Prueba de cuantificación de proteína.....	15
5.3 Metabolitos liofilizados.....	17
5.4 Actividad antimicrobiana.....	20
6. Objetivos y metas alcanzadas	28
7. Conclusiones	29
8. Referencias bibliográficas	30
9. Resumen	32
10. Anexos	34

1. Introducción

La habilidad de los hongos filamentosos de crecer en medios simples y económicos, así como su capacidad de producir un amplio rango de metabolitos ha generado el interés para su producción e investigación. Tanto es así, que los hongos producen importantes metabolitos secundarios que han impactado a la sociedad, como son los antibióticos (penicilina y pleorumutilina), medicamentos para bajar el colesterol (lovastatina y compactina) e inmunosupresores (ácido micofenólico y ciclosporina), así como también moléculas con efectos carcinógenos, toxinas letales, fungicidas industriales, hormonas y psicotrópicos, además tienen otras aplicaciones biotecnológicas; por ejemplo, se utilizan como factorías celulares para la producción de compuestos bioactivos, pigmentos, proteínas y enzimas. Además, son empleados como biocatalizadores en procesos de biorremediación, en la obtención de nuevas fuentes de bioenergía y en el desarrollo de neo-biomateriales como en las áreas de la micotextura y de biotextiles sustentables (Villegas, et al, 2019; Pacheco, et al, 2019; Astudillo, et al, 2020; Suarez, et al, 2022).

Por otra parte, los hongos entomopatógenos son microorganismos que tienen la capacidad de infectar a insectos, otros artrópodos e incluso nemátodos. Lo que los ha convertido en un importante agente de control biológico que está reemplazando gradualmente a los productos químicos sintéticos en el control de plagas. Además, su capacidad natural para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios y enzimas se está explotando en la industria, esto debido a que tienen atractivas características, que incluyen una alta especificidad de acción, un origen natural, estabilidad y naturaleza generalmente segura lo que ha generado gran interés en la industria farmacéutica. Como resultado, muchos estudios se han dedicado al potencial de varios hongos entomopatógenos para la producción de enzimas y otros metabolitos importantes; estos incluyen: *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, etc (Keyhani, 2018; Pacheco, et al, 2019; Litwin, et al, 2020).

Entre los hongos entomopatógenos más estudiados está *B. bassiana*, es ampliamente percibido como un hongo entomopatógeno, también se ha encontrado en la naturaleza como endófito. Como entomopatógeno, el ciclo de vida de diferentes cepas de *B. bassiana* se organizan y adaptan como patógenos en sus huéspedes invertebrados, mientras que como endófitos mantienen una relación simbiótica con sus huéspedes vegetales. Lo que ha hecho que muchos estudios sobre el hongo filamentosos hagan más énfasis en su entomopatogenicidad, su endofitismo y su muy aclamada aplicación en el control biológico de plagas. Para cumplir con estas funciones ecológicas antes mencionadas, este hongo secreta una variedad de enzimas y metabolitos secundarios, todos los cuales tienen funciones biológicas importantes. Entre ellas las quitinasas, lipasas y proteasas se consideran las más importantes de todas las enzimas producidas por *B. bassiana*. Sin embargo, muchos estudios también han demostrado su capacidad para producir otras enzimas vitales que incluyen amilasa, asparaginasa, celulasa, galactosidasa, etc. Las cuales tienen

aplicaciones que incluyen su uso en química analítica, como insecticidas, antibacterianos, antifúngicos, etc (Villegas, et al, 2019; Amobonye, et al, 2020).

A pesar de la amplia gama de estudios dedicados a *B. bassiana*, aún hay mucho que estudiar de este hongo ya que muchos metabolitos secundarios no han sido ampliamente estudiados e incluso es probable que aún no se conozcan todos por lo que es necesario poner mucho énfasis en la exploración del potencial de biotransformación de *B. bassiana* con la finalidad de conseguir nuevas enzimas y metabolitos para distintas aplicaciones en la industria. En este estudio se pretende extraer metabolitos con actividad biológica con solventes de diferente polaridad para su aplicación como agente antimicrobiano.

2. Marco teórico

2.1 Hongos filamentosos

Los hongos son microorganismos unicelulares (levaduras) o multicelulares (especies filamentosas), que constan de células alargadas provistas de una pared celular definida, la mayoría, constituida por quitina, dispuestas en microfibrillas y proteínas, los lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos como material cementante. Después de la infección exitosa de un hospedante, se producen asexualmente estructuras reproductivas conocidas como conidios que ayudan a la diseminación del patógeno. Los hongos poseen una gran variabilidad genética y un amplio rango de hospedantes (Pacheco, et al, 2019; Astudillo, et al, 2020; Suarez, et al, 2022).

Actualmente, los hongos filamentosos se utilizan ampliamente como fuentes de compuestos bioactivos, pigmentos, proteínas y enzimas en diversos sectores industriales alimentarios y no-alimentarios, para la obtención de nuevas fuentes de bioenergía (bioetanol), desarrollo de nuevos biomateriales a partir de su micelio (Mycelium Technology), como medios de control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura sostenible, así como también en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos recalcitrantes, entre otros compuestos orgánicos tóxicos y contaminantes (Pacheco, et al, 2019; Astudillo, et al, 2020; Suarez, et al, 2022).

2.2 Hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos son microorganismos que tienen la capacidad de infectar a insectos, otros artrópodos e incluso nemátodos. Constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista sistemático y presentan diferencias en cuanto a su biología; frente a los insectos o artrópodos actúan por la vía tegumentaria y son virulentos, convirtiéndolos en un importante factor de regulación natural de sus poblaciones al coexistir con los insectos fitófagos en el mismo nicho ecológico con un proceso patológico caracterizado por la secreción de distintos metabolitos insecticidas. Gracias a esta capacidad son considerados excelentes agentes de control biológico que están reemplazando gradualmente a los productos químicos sintéticos en el control de plagas (Keyhani, 2018; Pacheco, et al, 2019; Litwin, et al, 2020; Sánchez, 2022).

La penetración del hongo en la cutícula del hospedero se inicia normalmente con el desarrollo del apresorio en la superficie cuticular del hospedador y finalmente termina con el desarrollo de blastoporas en el hemocele del hospedador. Esta evolución fisiológica durante la patogenicidad indica que los brotes de hongos están en constante evolución con su entorno y también se están adaptando continuamente para colonizar el tejido de sus anfitriones, así como para contrarrestar los sistemas de defensa de los hospederos (Keyhani, 2018; Pacheco, et al, 2019; Litwin, et al, 2020; Sánchez, 2022).

En este sentido, la patogenicidad de este grupo de hongos depende en gran medida de la capacidad de su maquinaria enzimática para degradar el tegumento de los insectos y también de la secreción de compuestos orgánicos volátiles bioactivos y antibióticos. La capacidad natural de los hongos entomopatógenos para producir una amplia variedad de enzimas ahora se está explotando en la industria para satisfacer la demanda cada vez mayor de nuevos biocatalizadores. Las enzimas tienen una alta especificidad de acción, un origen natural, estabilidad y naturaleza que generalmente es segura. Como resultado, muchos estudios se han dedicado al potencial de varios hongos entomopatógenos para la producción de enzimas y otros metabolitos importantes; estos incluyen: *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, etc (Keyhani, 2018; Pacheco, et al, 2019; Litwin, et al, 2020; Sánchez, 2022).

2.3 *Beauveria bassiana*

B. bassiana es un hongo filamentoso que puede ser considerado tanto entomopatógeno como endófito. Se encuentra distribuido abundantemente en la naturaleza, tiene un amplio espectro de hospedantes, por lo cual es utilizado a nivel mundial como biocontrolador de los insectos plaga debido a su estabilidad fuera del hospedante y en los aislados fúngicos. *B. bassiana*, ataca a más de 700 especies de insectos de los diferentes órdenes, incluyendo las plagas de gran importancia agrícola, entre ellos la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (Merino Peñafiel, C. O.,2017, Amobonye, et al, 2020).

En el cumplimiento de su función biológica dual, *B. bassiana* secreta una amplia variedad de enzimas extracelulares, que incluyen: quitinasas, proteasas, lipasas, amilasas, lacasas, etc. Su capacidad inherente para secretar enzimas en grandes cantidades, su relativa seguridad para la salud humana, junto con su genoma bien caracterizado, han convertido a este hongo en un sitio potencial de extracción de enzimas industriales y otras biomoléculas importantes (Merino Peñafiel, C. O.,2017; Villegas, et al, 2019, Allegrucci, et al, 2020; Amobonye, et al, 2020).

2.4 Características morfológicas de *B. bassiana*

La colonia en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), a los 14 días, presenta un aspecto algodonoso brillante o polvoriento, el matiz es blanco y a medida que transcurre el tiempo se torna amarillenta o cremosa; los bordes son bien definidos, la superficie es plana o elevada. El hongo visto al microscopio muestra las hifas septadas de 2,5 a 25 μm de diámetro. Se caracteriza por la presencia de conidióforos sencillos, cerca de 1-2 μm de diámetro que están irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies se muestran hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene el conidio (en forma de zigzag), después de que varios conidios se producen, éstos son hialinas, esféricas (en medios aerobios) a ovoides y unicelulares (en medios anaerobios), llamadas blastosporas, miden alrededor de 2 a 3 x 2 a 2.5 μm (Merino Peñafiel, C. O.,2017; Villegas, et al,

2019). Los conidios germinan a una temperatura de 25°C-30°C, el pH óptimo de crecimiento es 5.7-5.9 y para la generación de los conidios en el rango de 7-9 días (Merino Peñafiel, C. O., 2017; Villegas, et al, 2019; Amobonye, et al, 2020)

2.5 Metabolitos producidos por *B. bassiana*.

Muchas de las enzimas y metabolitos de *B. bassiana* tienen un mayor uso industrial como bioplaguicidas, debido a su acción contra una amplia gama de huéspedes (más de 700 especies de insectos diferentes), *B. bassiana* ha asumido un papel importante en el manejo de diversas plagas agrícolas y forestales, así como de muchas plagas de importancia veterinaria. También muchos estudios han demostrado que tiene potencial como nematocida ya que fue activo frente a una variedad de nematodos de plantas que incluyen *Meloidogyne hapla* y *Heterodera glicinas*. Además, se ha informado que la beauvericina (BEA), un metabolito producido por *B. bassiana*, posee actividad nematocida. Curiosamente, los nuevos derivados de BEA también exhibieron actividad citotóxica e insecticida. Aparte de la beauvericina, también se han aislado de *B. bassiana* varios otros metabolitos secundarios, importantes con diferentes significados industriales. Estas incluyen bassianolida, beauvetetraonas A-C, ácido dipicolínico, anhídrido de isoleucilisoleucil, etc. Se ha demostrado que estos metabolitos tienen potencial en diversas aplicaciones agrícolas, industriales y farmacéuticas (Manyes, et, al, 2018; Villegas, et al, 2019; Allegrucci, et al, 2020; Amobonye, et al, 2020).

Otros estudios han reportado la producción de diferentes moléculas con actividad tóxicas como la bassiacridina que ha demostrado actividad insecticida contra *Locusta migratoria* y *Schistocerca gregaria*, y efecto citotóxico en células de cáncer de mama. También la oosporeína con actividad antifúngica, antibiótica y antiviral. Además, la beauverolida causa alteraciones en el citoesqueleto en larvas de *Galleria mellonella*, muestra actividad contra la calmodulina (proteína ácida intracelular) y proteínas inmunomoduladoras. Otra molécula de interés es el tenellin que ha sido reportado como inhibidor en la actividad ATPasa de la membrana de los eritrocitos de mamíferos. Otro ejemplo es la ciclosporina que es una molécula con actividad inmunosupresora, antiinflamatoria, antifúngica, antiparasitaria. Y por último la bassianolida con actividad insecticida, antimicrobial, antiplasmodial y citotóxica (Manyes, et, al, 2018; Villegas, et al, 2019).

En concreto, estas aplicaciones incluyen su uso en química analítica, como insecticidas, antibacterianos, antifúngicos, etc. La piridovericina es otro metabolito destacable aislado del extracto de micelio *B. bassiana* que demostró una citotoxicidad significativa contra cuatro líneas celulares de cáncer diferentes. Durante mucho tiempo se ha observado que *B. bassiana* es útil en las medicinas tradicionales chinas y coreanas como el hongo de la polilla de seda (gusanos de seda *Bombix mori*), ya que los registros han demostrado su uso terapéutico en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares, urticaria y diabetes. Aunque, a diferencia de otros hongos entomopatógenos como *Cordyceps chinensis* y *C. militaris*. *B. bassiana* se ha utilizado industrialmente para catalizar la reacción de hidroxilación del anillo del ácido

(R)-2-fenoxipropiónico, un paso necesario en la síntesis de varios productos agroquímicos. La cepa *B. bassiana* ATCC 7159 mediante la biotransformación de la curcumina, da como resultado la formación de curcumina-80-O-40'-Ometil-b-D-glucopiranosido, que exhibió una solubilidad en agua 39,000 veces mayor que su precursor, aumentando así su uso potencial en medicina. De manera similar, se demostró que la biotransformación mediada por *B. bassiana* ATCC 7159 del compuesto anticancerígeno piperlongumina a 5-hidroxilpiperlongumina mejora su solubilidad en agua y su actividad biológica. Teniendo en cuenta estos factores, se debe poner mucho énfasis en la exploración del potencial de biotransformación de *B. bassiana* en el futuro.

3. Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivo general.

Obtener extractos acuosos y metanólicos de metabolitos de hongos filamentosos con su posterior purificación para su aplicación biológica.

3.2 Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones de crecimiento de los hongos filamentosos.
- Extracción de metabolitos con agua y metanol.
- Purificación y liofilización de los diferentes extractos.
- Evaluación biológica de los metabolitos obtenidos para la extracción y purificación.

3.3 Hipótesis

Los metabolitos acuosos y metanólicos producidos por *Beauveria bassiana* en cultivo sólido tendrán la misma actividad antimicrobiana.

4. Desarrollo experimental

4.1 Medio de cultivo de conservación

Se utilizaron dos cepas de *B. bassiana* 106 y 546 procedentes del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, las cuales crecieron en un medio de cultivo papa-dextrosa-agar durante 15 días a 25 °C en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente se agregaron 50 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% y se recolectaron los conidios con un agitador magnético por 5 minutos dentro de una campana de flujo marca Clean Air Center®, evitando arrastrar el micelio. Este procedimiento se repetirá para cada matraz y el contenido de todos los matraces se conservará en envases estériles de 250 mL a 4 °C para su posterior utilización (Barranco et al. 2009).

4.2 Obtención del inóculo

Para realizar un cultivo sólido se requiere un inóculo de 1×10^7 esporas (g peso húmedo⁻¹) (Barranco et al. 2009). Para ello se tomó 1 mL de conidios previamente homogeneizados, se tomó 1 gota con una pipeta Pasteur y se colocó en el centro de una cámara de Neubauer o hemocitómetro, enseguida se colocó un cubreobjetos cuidando que no queden burbujas y que la gota no se derrame ni se salga de los campos de conteo ya que esto daría un dato erróneo, ya que el excedente arrastraría los conidios. Posteriormente se realizó el conteo en un microscopio con el objetivo x40. Una vez finalizado el conteo se utilizó la siguiente fórmula para obtener el número de conidios por mL.

$$\text{No. de conidios} = \frac{n * 10^5 * F * 100}{2.5}$$

Donde:

- n= promedio del conteo de células
- F= factor de dilución

En caso de obtener un resultado menor al valor esperado se recolectan más conidios para elevar el número de conidios.

4.3 Identificación morfológica de *B. bassiana*

Para la identificación morfológica del hongo *B. bassiana* se utilizó el aislado 106, procedentes del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, creció en una caja petri en un medio de cultivo papa-dextrosa-agar durante 15 días a 28 °C. Posteriormente se realizó un microcultivo como lo indica Estrada et al., 2019, para ello se preparó una caja de Petri estéril con medio de cultivo papa-dextrosa-agar con un espesor de 9 mm aproximadamente, del cual se cortaron 2 bloques de aproximadamente 2 cm de área del agar, los cuales se colocaron en otra caja de Petri estéril utilizando como soporte un portaobjetos y una v de vidrio, posteriormente se inocularon con *B. bassiana* en el centro de cada uno de los cuatro lados de la porción de agar, se le colocó un cubreobjetos y un algodón estéril impregnado con tres gotas

de agua glicerizada al 10%, se sellan las cajas y se someten a incubación por 9 días a 28 °C. Pasado el tiempo de incubación se procedió a retirar con cuidado el cubreobjetos para realizar una tinción simple con lugol, para reconocer la estructura del hongo, se llevó al microscopio con el objetivo de x40.

4.4 Medio de cultivo sólido de *B. bassiana*

En un matraz Erlenmeyer de 1,000 mL se colocaron 28.12 g de bagazo de caña, 3.375 g de cutícula de insecto (agregar marca), 0.675 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.135 g de MgSO_4 , 0.1125 g de NaCl , 1.6875 g de KH_2PO_4 , 0.01125 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00315 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0036 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.125 g de sacarosa y 102 ml de agua destilada.

Para la preparación del medio de cultivo sólido se tomaron en cuenta los siguientes cálculos (150 g de MH):

$$MH = MS + \text{Agua} \quad MH = 32.371 \text{ g} + 102 \text{ ml} = 134.371$$

$$MS = \text{Bagazo} + \text{Cutícula} + \text{Sales} \quad MS = 28.12\text{g} + 3.375\text{g} + 0.876\text{g} = 32.371$$

Las condiciones del cultivo serán humedad inicial 75%, pH 5 y temperatura 25 °C. El inóculo de *B. bassiana* fue de 1×10^7 esporas (g peso húmedo⁻¹). En condiciones estériles, en un matraz de 1,000 ml se mezclan todos los componentes uniformemente (bagazo de caña, cutícula de insecto y sales minerales) y se inoculó con *B. bassiana* a una concentración de 1×10^7 esporas por cada ml de medio de cultivo. Los componentes se mezclaron uniformemente dentro de un matraz. Las condiciones de incubación fueron de 75% de humedad inicial, pH 5 y temperatura de 25°C durante un periodo de 9 días (Barranco et al., 2009). Se escaló el cultivo sólido a cantidades de 75g, 150g y 300g para los aislados 106 y 546 de *B. bassiana*.

4.5 Obtención de los metabolitos de *B. bassiana*

Transcurridos los nueve días, al cultivo sólido se le agregó agua destilada o alcohol metílico al 80 % en una relación de 1:1 (v/v) y se dejó reposar 24 horas en una incubadora con agitación a 25 °C. Pasadas las 24 horas el contenido de la fermentación se comprimió a través de manta de cielo y se obtuvo el extracto crudo. Después el extracto crudo se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga Du Pont Instruments® a 4°C durante 10 minutos, este procedimiento se repitió una vez más para eliminar las partículas grandes. Posteriormente se filtró al vacío el sobrenadante con una membrana Millipore de 0.45 µm. En seguida se filtró y centrifugó en tubos Centricon® con tamaño de corte de 10 kDa, un volumen de 3 ml del extracto crudo por tubo en una centrífuga marca Beckman® a 3,000 rpm a 8°C durante 3 minutos. En la parte superior quedaron las proteínas mayores a 10 kDa y en la parte inferior los metabolitos.

En el caso de los metabolitos acuosos estos se pasan directamente a congelar a -70°C durante 24 horas. Mientras que en el caso de los metabolitos metanólicos se debe eliminar el disolvente, para ello se utilizó un rotavapor Büchi® y una vez eliminado el disolvente se congelaron a -70°C durante 24 horas. Finalmente, los extractos de metabolitos acuosos y metanólicos se liofilizaron para su conservación en una liofilizadora LABCONCOA® bajo condiciones de presión y de temperatura a 0.090 mBar y 4°C .

4.6 Separación por filtros C-18

El proceso anterior de obtención de metabolitos se repite hasta la filtración en tubos Centricon®, posteriormente se filtró al vacío el sobrenadante con papel filtro Whatman®, este proceso se repitió una vez más. Una vez filtrado el extracto se mezcló con una dilución 1:10 de buffer PBS (phosphate buffered saline) (ver anexo 1) y se dejó reposar por 15 min. En seguida se realizó una pre purificación utilizando un cartucho C18 (Sep-Pak Cartridge®), para ello el cartucho fue activado haciéndole pasar 4 ml de metanol o agua destilada (dependiendo del tipo de los metabolitos que se deseen extraer) y posteriormente 4 ml de buffer PBS (phosphate buffered saline). Una vez activado se le hizo pasar toda la cantidad obtenida del extracto mezclado con metanol y disolución 1:10 de buffer PBS, después se realizó un lavado con agua destilada, finalmente se extrajeron las fracciones haciendo pasar 1 ml de metanol, recolectando en tubos Eppendorf, cada fracción presenta una coloración distinta (de café oscuro a amarillo) que puede indicar que se trata de una fracción distinta, se estimó recolectar un total de 7 a 8 fracciones (adaptado de Barranco et al., 2009 y Bonilla et al., 2023).

4.7 Determinación de proteína

Se realizaron dos métodos para la cuantificación de proteínas: ensayo de Bradford y cuantificación de proteínas determinada un Nanodrop® (Thermo scientific). Sin embargo, se optó por utilizar el método de cuantificación determinada por Nanodrop®, esto debido a que no se contaba con cantidades grandes de muestras y el equipo trabaja con volúmenes pequeños ($0.5\ \mu\text{L}$), lo que permitió ahorrar muestra. También se prefiere este método debido a que no necesita diluciones aun con muestras altamente concentradas, tiene sensibilidad, menor variabilidad y mejor precisión de los resultados. Además, cuenta con métodos preconfigurados para absorbancia de A280, que es la absorbancia para muchos metabolitos cíclicos que se espera que estén presentes.

4.8 Selección de concentrados y fracciones para medir la actividad antimicrobiana

Para la selección tanto de los concentrados como de fracciones para la prueba de actividad antimicrobiana se tomó como único criterio que estas contaran con una

concentración alta de proteínas. Para los metabolitos liofilizados se procedió a resuspender 10 mg en ml de agua destilada en el caso de los metabolitos acuosos y metanol en el caso de los metabolitos metanólicos se suspendieron en 1 ml de metanol. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de ambos metabolitos (1:10, 1:100 y 1:1000) tomando 100 μ L de la muestra concentrada y diluyendo en 900 μ L del disolvente correspondiente, también se realizaron diluciones seriadas de las fracciones acuosas y metabólicas tomando 100 μ L de la fracción para mezclarlo con 900 μ L de agua o metanol según el disolvente que sea necesario. Cabe mencionar que además de las diluciones también se realizó la cuantificación a la muestra concentrada.

4.9 Preparación de cepas para prueba antimicrobiana

Se utilizaron cepas de *S.aureus* ATCC 43300 sin resistencia a antibióticos, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. coli*, *E. fecalis*, *S. flexneri*, *S. epidermis*, *Campylobacter* y *C. albicans* ATCC 10231, todas las cepas fueron donadas por la doctora Aida Hamdan Partida del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Las cepas fueron cultivadas en caldo de soya tripticaseína (TSB) (BD Bioxon®) a 37°C con agitación de 150 rpm durante 24 horas, posteriormente para la conservación de las cepas, 100 μ L de este cultivo se añadieron a 900 μ L de medio de medio TSB con 10% de glicerol y fueron conservadas en congelación a -70°C.

Un cultivo de 24 horas de cada cepa bacteriana se tomó para realizar diluciones seriadas 1:1, 1:10, 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000; después 100 μ L de estas diluciones se cultivaron en cajas Petri con agar Mueller Hinton con la finalidad de obtener unidades formadoras de colonia (UFC). A continuación, se tomó una UFC con un asa bacteriológica y se cultivó en 3 mL de caldo Mueller Hinton (BD Bioxon®) a 37°C, con agitación de 150 rpm durante 24 horas, finalmente la suspensión bacteriana se ajustó a 1 en la escala de McFarland utilizando agua estéril, esta nueva suspensión equivale a 3×10^8 UFC por cada mL, y se utilizó para los ensayos in-vitro. Este procedimiento se hizo cada vez que se realizaron ensayos para garantizar que las cepas bacterianas no estuvieran contaminadas, y que se encontraran en fase exponencial antes de cada prueba.

4.10 Determinación de la actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de antibiograma disco-placa o Kirby-Bauer para determinar si los concentrados y las fracciones presentaban actividad antimicrobiana contra las cepas utilizadas. Para ello se utilizaron cajas Petri con agar Mueller Hinton a las que previo a la inoculación se le horadaron pozos y posteriormente se inocularon con el microorganismo correspondiente, para enseguida agregar 40 μ L del concentrado o fracción al pozo y a un círculo de papel filtro; esto con la finalidad de observar en cuál de los dos medios tiene mejor difusión. Finalmente se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Para considerar que el concentrado o la fracción presenta actividad antimicrobiana se tomó en cuenta que este formará un halo de inhibición sin importar el tamaño del halo se consideró que presenta actividad antimicrobiana.

Además, se midió el halo de inhibición de los concentrados y fracciones que presentaron actividad antimicrobiana para así comparar aquellas que presentaron una mejor actividad.

5. Resultados y discusión

5.1 Identificación morfológica de *B. bassiana*

El aislado 546 de *B. bassiana* se sembró en un medio de cultivo papa-dextrosa-agar como se puede observar en la Figura 1 y en la misma se evidencia que presenta un micelio algodonoso con una superficie plana, textura blanda y color blanco, lo que concuerda con lo descrito por Merino (2017) y Villegas (2019). Mientras que para la identificación morfológica del hongo *B. bassiana* se utilizó el aislado 106, para identificar la morfología se comparó la imagen obtenida con una imagen de referencia que pueden observarse en las figuras 2 y 3.

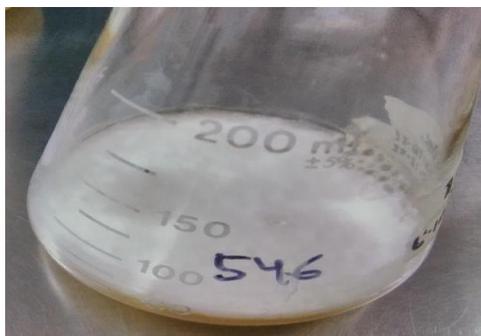


Figura 1. Aislado 546 de *B. bassiana* en un medio de cultivo papa-dextrosa-agar a los 15 días.

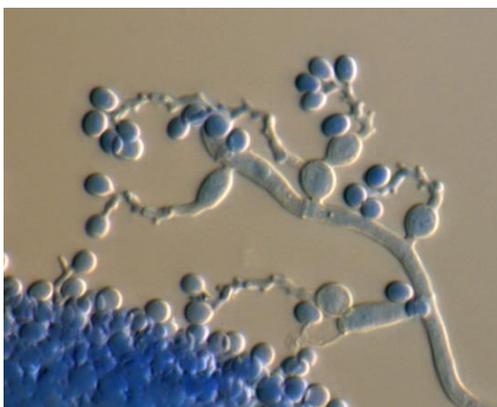


Figura 2. Estructura de *B. bassiana* teñida con azul de lactofenol obtenida de <https://panama.inaturalist.org/taxa/862160-Beauveria-bassiana>. Consultada el 15 de junio del 2023



Figura 3. Tinción con lugol del aislado 106 de *B. bassiana* teñida con lugol.

Para identificar la morfología del hongo se utilizó una imagen de referencia (Figura 2) en la que se observa que el hongo fue teñido con una tinción simple con azul de algodón lactofenol, mientras que el hongo del aislado 106 fue teñido con lugol (Figura 3), en ambas imágenes se pueden visualizar conidios redondeados y conidióforos sencillos que se encuentran agrupados con conidios septados. También se observa que las células conidiógenas tienen una base globosa y un raquis en forma de zig-zag, por lo que podemos concluir que las características observadas en la imagen de referencia (Figura 2) pueden observarse también en la imagen del aislado 106 (Figura 3) y ambas concuerdan con las características morfológicas del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, de acuerdo con lo descrito por Merino (2017) y Villegas (2019).

5.2 Prueba de cuantificación de proteína

El criterio de evaluación para esta prueba fue que estas contaran con una concentración alta de proteínas, ya que con base a esto se tomaría en cuenta el descartar o utilizar el concentrado o fracción para la prueba de actividad antimicrobiana. A continuación, se presenta una serie de tablas con los concentrados y las fracciones seleccionadas.

Tabla 1. Concentraciones de las fracciones obtenidas de los extractos acuosos y metanólicos del aislado 106

Extracto acuoso	
Fracción	Concentración en ppm/ μ L
1	0.00351
Extracto metanólico	
Fracción	Concentración en ppm/ μ L
1	3.23696
2	4.47458
3	0.90112
4	0.2212
5	0.2234
Combinación 1-2	0.5854
Combinación 4-5	0.3654

Tabla 2. Concentraciones de las fracciones obtenidas de los extractos acuosos y metanólicos del aislado 546

Extracto acuoso	
Fracción	Concentración en ppm/μL
1	0.2312
Extracto metanólico	
Fracción	Concentración en ppm/μL
1	0.2476
2	0.3214
4	0.3062
Combinación 1-2	0.7654

Con base a los resultados obtenidos se descartaron los concentrados ya que mostraron bajos niveles de proteínas, por otro lado, las fracciones metabólicas obtenidas de ambos aislados (546 y 106) mostraron mejores niveles de proteínas en ppm/ μ L. Además, se consideró probar una serie de mezcla de fracciones obtenidas de los extractos metanólicos las cuales mostraran niveles altos de proteínas para comparar su actividad de forma individual y conjunta.

Posteriormente, se obtuvieron más fracciones metanólicas para realizar un segundo ensayo de actividad antimicrobiana, ya que en la primera prueba se observó que tenían actividad y se confirma esto con una segunda prueba. Pero para confirmar que tenían una alta concentración de proteínas se realizó una cuantificación. A continuación, se presenta una serie de tablas (tabla 3 y tabla 4) con las concentraciones de fracciones metanólicas de los aislados 106 y 546.

Como se observa en las tablas 9 y 10, las fracciones metanólicas presentan una buena concentración y las fracciones del aislado 546 tienen valores más altos de proteína y además presentó más fracciones con potencial para la actividad antimicrobiana.

Tabla 3. Concentraciones de las fracciones obtenidas de un extracto metanólico del aislado 546

Extracto metanólico	
Fracción	Concentración en ppm/ μ L
1	0.133046
2	0.110395
3	0.066049
4	0.37147
Combinación 1-2	0.144524
Combinación 3-4	0.051998

Tabla 4. Concentraciones de las fracciones obtenidas de un extracto metanólico del aislado 106

Extracto metanólico	
Fracción	Concentración en ppm/ μ L
1	0.126091
2	0.0525115
Combinación 1-2	0.095923

5.3 Metabolitos liofilizados

A continuación, se presenta una serie de tablas con el rendimiento de enzimas y metabolitos acuosos y metanólicos que pasaron por el proceso de liofilización obtenidos de las diferentes escalas de M.H, así como la producción para ambos aislados de *B. bassiana* relacionando los mg obtenidos de metabolitos y enzimas liofilizados con los gramos de M.H que se utilizaron.

La tabla 5 muestra el rendimiento y la producción de las enzimas y metabolitos obtenidos del aislado 546, en la cual se puede observar una producción en aumento conforme se escalaba la cantidad de materia húmeda (M.H) y manteniendo el rendimiento, podemos decir que se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la producción de enzimas y metabolitos. Por otro lado, en la tabla 6, se muestra el rendimiento y producción de las enzimas y metabolitos obtenidos de extractos metanólicos del aislado 546, en este caso observamos un incremento en los valores

de rendimiento y producción conforme se escalonaba la cantidad de M.H por lo que también podemos asegurar que se obtuvieron buenos resultados. Incluso se puede observar que los valores obtenidos de enzimas y metabolitos en la tabla 5 son muy cercanos entre sí, al igual que los valores de enzimas y metabolitos de la tabla 6 también son cercanos entre sí, por lo que el proceso para la obtención de estos es eficiente para obtener metabolitos acuosos y metanólicos. Además, en ambos casos se obtuvo una mayor cantidad de enzimas comparado con la cantidad de metabolitos que se obtuvieron.

Tabla 5. Rendimiento y producción de enzimas y metabolitos acuosos del aislado 546 de conidios de *B. bassiana*

Materia húmeda (M.H)	75 gMH	150 gMH	300gMH
Rendimiento de enzimas (mg/g MH)	3.2 mg/g MH	5 mg/g MH	3.7 mg/g MH
Producción de enzimas (mg)	240 mg	750 mg	1110 mg
Rendimiento de metabolitos (mg/g MH)	3 mg/g MH	4.4 mg/g MH	3 mg/g MH
Producción de metabolitos (mg)	225 mg	660 mg	900 mg

Tabla 6. Rendimiento y producción de enzimas y metabolitos metanólicos del aislado 546 de conidios de *B. bassiana*

Materia húmeda (M.H) *	75 g	150 g
Rendimiento de enzimas (mg/g MH)	1.6 mg/g MH	5.1 mg/g MH
Producción de enzimas (mg)	120 mg	765 mg
Rendimiento de metabolitos (mg/g MH)	2.6 mg/g MH	4.13 mg/g MH
Producción de metabolitos (mg)	195 mg	619.5 mg

* Solo se escaló con dos cultivos sólidos del aislado 546.

En la tabla 7 se muestra el rendimiento y la producción de enzimas y metabolitos obtenidos de extractos acuosos del aislado 106 en la que se puede observar una producción en aumento conforme se escalaba la cantidad de M.H, al igual que el rendimiento por lo que podemos decir que se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la producción de metabolitos. Mientras que en la tabla 8, se muestra el rendimiento y producción de las enzimas y metabolitos obtenidos de extractos metanólicos del aislado 106, en la que también observamos un crecimiento en los valores de rendimiento y producción conforme se escalonaba la cantidad de M.H por lo que también podemos asegurar que se obtuvieron buenos resultados. Sin embargo, se puede observar en la tabla 7 que a diferencia de los resultados obtenidos del aislado 546 (tabla 5) los valores obtenidos de enzimas y metabolitos no son tan cercanos, notándose además que predomina un mayor rendimiento y una mayor producción de enzimas. Mientras que en la tabla 8 los valores obtenidos de rendimiento y producción presentan una mayor variabilidad. Esto se le puede atribuir a las condiciones en las que el hongo se desarrolló, por ejemplo, el pH podría no haber sido el adecuado o las condiciones de humedad. Comparando ambas tablas (tabla 7 y 8) se nota aún más la variabilidad de los resultados, permitiendo afirmar que el aislado 546 (tabla 5 y 6) mantiene el rendimiento y la producción constante, por lo que muestra una ventaja sobre el aislado 106.

Tabla 7. Rendimiento y producción de enzimas y metabolitos acuosos del aislado 106 de conidios de *B. bassiana*

Materia húmeda (M.H) *	75 g	150 g
Rendimiento de enzimas (mg/g MH)	8.13 mg/g MH	7.33 mg/g MH
Producción de enzimas (mg)	609.75 mg	1099.5 mg
Rendimiento de metabolitos (mg/g MH)	3.46 mg/g MH	1.6 mg/g MH
Producción de metabolitos (mg)	259.5 mg	240 mg

* Solo se escaló con dos cultivos sólidos del aislado 106.

Tabla 8. Rendimiento y producción de enzimas y metabolitos metanólicos del aislado 106 de conidios de *B. bassiana*

Materia húmeda (M.H) *	75 g	150 g
Rendimiento de enzimas (mg/g MH)	13.46 mg/g MH	2.46 mg/g MH
Producción de enzimas (mg)	1009.5 mg	369 mg
Rendimiento de metabolitos (mg/g MH)	3.2 mg/g MH	5.46 mg/g MH
Producción de metabolitos (mg)	240 mg	819 mg

* Solo se escaló con dos cultivos sólidos del aislado 106.

5.4 Actividad antimicrobiana

Se probaron las fracciones cuya concentración de proteínas fuera alta, contra las cepas de *S.aureus* ATCC 43300 sin resistencia a antibióticos, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. coli*, *E. fecalis*, *S. flexneri*, *S. epidermis*, *Campylobacter* y *C. albicans* ATCC 10231, con la finalidad de determinar cuáles fracciones presentan actividad antimicrobiana y contra qué cepas bacterianas presentan inhibición. Los metabolitos acuosos de ambos aislados no se incluyeron en la tabla debido a que solo eran dos y no mostraron tener actividad antimicrobiana. A continuación, se presentan una serie de tablas con los resultados obtenidos de los extractos metanólicos de ambos aislados. En la tabla 9 y tabla 10 se muestran los resultados del primer ensayo que se realizó con la finalidad de observar si existía actividad antimicrobiana y que fracciones metanólicas presentaban actividad, así como identificar las bacterias que eran afectadas por las fracciones.

Tabla 9. Fracciones que presentan actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del aislado 106

Cepa bacteriana		Fracciones						
		1	2	3	4	5	Combinación 1-2	Combinación 4-5
Gram positivo	<i>E. fecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. epidermidis</i>	++	-	-	-	-	-	-
Gram negativo	<i>Campylobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-	-	-	+	-
	<i>S. Flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-
Hongo	<i>C. albicans</i>	-	+	-	-	-	-	-

* Para una mejor interpretación tomar el símbolo + como positivo y como baja actividad antimicrobiana, el símbolo ++ como positivo y como una mayor actividad antimicrobiana y el símbolo - como negativo a actividad antimicrobiana.

Tabla 10. Fracciones que presentan actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del aislado 546.

Cepa bacteriana		Fracciones			
		1	2	4	Combinación 1-2
Gram positivo	<i>E. fecalis</i>	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+	++	-	-
	<i>S. epidermis</i>	+	++	-	+
Gram negativo	<i>Campylobacter</i>	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	+	+	-	+
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-	+
	<i>S. Flexneri</i>	+	-	-	+
	<i>S. marcesis</i>	+	+	-	+
Hongo	<i>C. albicans</i>	-	+	-	-

* Para una mejor interpretación tomar el símbolo + como positivo y como baja actividad antimicrobiana, el símbolo ++ como positivo y como una mayor actividad antimicrobiana y el símbolo - como negativo a actividad antimicrobiana.

En las tablas 9 y 10 se observan en las una clara diferencia en la actividad antimicrobiana entre los metabolitos obtenidos de los extractos metanólicos de las dos cepas pues en las fracciones metabólicas de la cepa 546 se obtuvo una mejor actividad antimicrobiana contra seis de las nueve cepas bacterianas entre las que se incluyen: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. marcesis*, *E.coli*, *S. flexneri* y *S. epidermis*. Mientras que las fracciones metabólicas del aislado 106 solo mostraron actividad contra tres cepas de las nueve cepas bacterianas entre las que se incluyen: *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. epidermis*. Además, de que una fracción de cada aislado mostró actividad contra el hongo *C. albicans*.

Esto podría relacionarse directamente con las cepas pues a pesar de tratarse de la misma especie de hongo pueden producir cantidades distintas de metabolitos secundarios y también tener una calidad y actividad distintas.

Con base a los resultados se prosiguió a realizar otro ensayo, no sin antes descartar las fracciones que no mostraron actividad, que como se observó en las tablas 7 y 8

las fracciones del aislado 546 fueron aquellas que mostraron una mejor actividad y solo se realizó una excepción con la fracción 2 del aislado 106 que se decidió solo se probaría contra *C. albicans*. También se seleccionaron los microorganismos en los que se notó actividad y el hongo para realizar otro ensayo con el método del antibiograma disco-placa o Kirby-Bauer con la finalidad de medir el halo de inhibición de las fracciones probadas y calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana, utilizando las cepas bacterianas en las que mostraron actividad. A continuación, se muestra una tabla con los resultados obtenidos.

Tabla 11. Fracciones que presentan actividad antimicrobiana de las fracciones metanólicas del aislado 546 (ensayo 2)

Cepa bacteriana		Fracciones		
		1	2	Combinación 1-2
Gram positivo	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	++	+	++
	<i>S. epidermis</i>	++	++	++
Gram negativo	<i>E. coli</i>	-	+	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	+	-
	<i>S. Flexneri</i>	-	+	-
	<i>S. marcesis</i>	-	+	-
Hongo	<i>C. albicans</i> (aislado 546)	-	+	-
	<i>C. albicans</i> (aislado 106)	-	+	-
* Para una mejor interpretación tomar el símbolo + como positivo y como baja actividad antimicrobiana, el símbolo ++ como positivo y como una mayor actividad antimicrobiana y el símbolo - como negativo a actividad antimicrobiana.				

Como puede observarse en la tabla 11, la mayoría de los resultados positivos los tiene la fracción 2 de ambos aislados aun con una concentración más baja. Esto puede estar relacionado con la virulencia por parte del entomopatógeno *B. bassiana* a los microorganismos en los cuales se probó su actividad antimicrobiana, dicha virulencia se podría relacionar a la presencia de depsipéptidos cíclicos (CDP) los cuales están

relacionados a las actividades biológicas de distintos géneros de hongos filamentosos entre los que se encuentra *Beauveria*. De entre las muchas funciones que presentan estos metabolitos se ha reportado actividad antimicrobiana, por ejemplo, la *beauvericina* ha sido reportada con actividad antimicrobiana de acuerdo con los autores Villegas (2019) y Yin (2021).

Además, las fracciones se probaron por dos métodos de difusión: papel y pozo. En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados de la medición de los halos de inhibición que formaron de las fracciones metanólicas del aislado 546. Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que se tiene una mejor difusión de los metabolitos se da en papel.

Tabla 12. Actividad antimicrobiana de las fracciones metanólicas del aislado 546 en papel

Halos de inhibición (mm) de las fracciones metanólicas del aislado 546			
Microorganismo	F1	F2	Combinación 1-2
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	18	13	13
<i>S. epidermis</i>	9	20	18
<i>E. coli</i>	–	10	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	14	–
<i>S. Flexneri</i>	–	12	
<i>S. marcescens</i>	–	10	–
<i>C. albicans</i> (aislado 546)	–	9	–
<i>C. albicans</i> (aislado 106)	–	10	–

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las fracciones metanólicas del aislado 546 en pozo

Halos de inhibición (mm) de las fracciones metanólicas del aislado 546			
Microorganismo	F1	F2	Combinación 1-2
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	6.3	5.3	7.3
<i>S. epidermis</i>	5.6	4.3	5.6
<i>E. coli</i>	–	2.3	–
<i>P. aeruginosa</i>	–	4.6	–
<i>S. Flexneri</i>	–	3.6	
<i>S. marcesis</i>	–	2.6	–
<i>C. albicans</i> (aislado 546)	–	2.3	–
<i>C. albicans</i> (aislado 106)	–	2	–

Finalmente podemos concluir que se descarta la hipótesis planteada en la que se afirmaba que los metabolitos acuosos y metanólicos tendrían la misma actividad antimicrobiana, pues como se ha observado sólo las fracciones de extractos metanólicos presentaron actividad antimicrobiana, mientras que la actividad de los extractos acuosos fue nula. Además, se observó que las fracciones permiten una mejor concentración de los metabolitos a diferencia de los metabolitos liofilizados que a pesar de pasar a través de las columnas C18 (Sep-Pak Cartridge®), no presentaron altas cantidades de proteínas. A continuación, se presentan una serie de imágenes donde se pueden apreciar los halos de inhibición de las fracciones 1, 2 y la combinación 1 y 2 del aislado 546.



Figura 4. Prueba de actividad antimicrobiana de la fracción metanólica 1 (A) del aislado 546 con el microorganismo *S. epidermis*, por difusión en pozo.



Figura 5. Prueba de actividad antimicrobiana de la fracción metanólica 2 (B) del aislado 546 con el microorganismo *S. epidermis*, por difusión en pozo.



Figura 6. Prueba de actividad antimicrobiana de la combinación de fracciones 1 y 2 (C) del aislado 546 con el microorganismo *S. epidermis*, por difusión en papel.



Figura 7. Prueba de actividad antimicrobiana de la fracción metanólica 1 (A) del aislado 546 con el microorganismo *S. aureus*, por difusión en papel.



Figura 8. Prueba de actividad antimicrobiana de la fracción metanólica 2 (B) del aislado 546 con el microorganismo *S. aureus*, por difusión en papel.

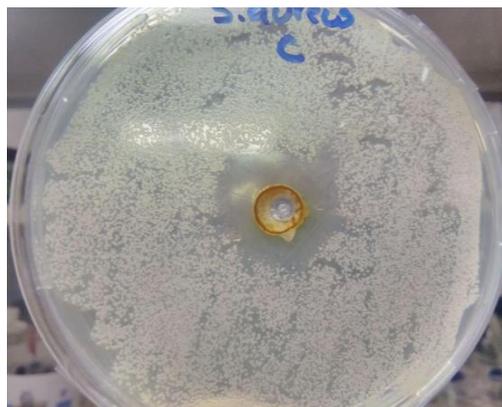


Figura 9. Prueba de actividad antimicrobiana de la combinación de fracciones 1 y 2 (C) del aislado 546 con el microorganismo *S. aureus*, por difusión en pozo.



Figura 10. Prueba de actividad antimicrobiana de las fracciones metanólicas 1, 2 y 3 (A, B y C) del aislado 546 con el microorganismo *C. albicans*, por difusión en pozo y papel.

6. Objetivos y metas alcanzadas

- Se logra establecer las condiciones de crecimiento del hongo filamentoso: *B. bassiana*. Escalando el cultivo sólido con base a la Materia Húmeda.
- Se logra la extracción de metabolitos con los solventes agua y metanol.
- Se logra la pre-purificación y liofilización de los diferentes extractos, consiguiendo en ambos casos un rendimiento y producción buenos. Además, de implementar una concentración de los distintos extractos a través de filtros C18 (Sep-Pak Cartridge®).
- La evaluación biológica de los metabolitos obtenidos mostró que los metabolitos metanólicos tenían un potencial como antimicrobianos aun con bajas concentraciones de proteína. Lo que da la posibilidad de realizar más pruebas, especialmente a bacterias Gram positivas.

7. Conclusiones

El cultivo sólido permite un buen rendimiento y producción de metabolitos acuosos y metanólicos, observando que el aislado 546 mostró tener rendimientos equivalentes mientras se escalaba y también se incrementaba la producción, mientras que el rendimiento mostrado por el aislado 106 no son tan equivalentes, pero si se mejora la producción.

Los metabolitos metanólicos de ambos aislados mostraron una mayor concentración de proteína a diferencia de los metabolitos acuosos que mostraron bajos niveles, por lo que los descartó para la prueba microbiología, sin embargo, muestran mejores niveles de concentración de proteínas después de una pre-purificación y concentración con una Columna C18 Sep-Pak Cartridge®.

En la prueba de actividad antimicrobiana los metabolitos liofilizados que se resuspendieron para la evaluación no mostraron efecto sobre los microorganismos, sin embargo, las fracciones metanólicas mostraron actividad antimicrobiana, la actividad fue más notoria contra bacterias Gram positivo. Además, se observó que las fracciones metanólicas del aislado 546 presentaron actividad antimicrobiana aun con concentraciones bajas a diferencia de las fracciones del aislado 106.

8. Referencias bibliográficas

- Allegrucci, Natalia, Velazquez, Maria-Silvana, Russo, María-Leticia, Vianna, Maria-Florencia, Abarca, Camila, & Scorsetti, Ana-Clara. (2020). Establishment of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as an endophyte in *Capsicum annuum* and its effects on the aphid pest *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1084-1094. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v68i4.41218>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Pandey, A., Singh, S., & Pillai, S. (2020). Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 1019-1034.
- Astudillo-Echeverría, A., Pazmiño-Centeno, D., & Naranjo-Briceño, L. (2020). Uso de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición de genomas en hongos filamentosos: una revisión del estado actual y últimas tendencias. *Genética Médica y Genómica Vol. 5, Núm. 5, 2021*.
- Barranco-Florido, J. E., R. Alatorre-Rosas, M. Gutiérrez-Rojas, G. ViniegraGonzález, and G. Saucedo-Castañeda. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 910-915.
- Barranco-Florido, J. E., P. Bustamante-Camilo, L. Mayorga-Reyes, R. GonzálezCervantes, P. Martínez-Cruz, and A. Azaola-Espinosa. 2009. β -N acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*. 34: 356-360.
- Beys-da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J., Vainstein, M. H., Schrank, A., ... & Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 208, 107812.
- Bonilla, J. N. V. (2023). *Mejoramiento en la producción de beauvericina en cultivo sólido para su uso como agente antimicrobiano*. <https://doi.org/10.24275/uami.5h73pw32f>
- Estrada Salazar, G. I., & Ramírez Galeano, M. C. (2019). *Micología general*.
- Keyhani, N. O. (2018). Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi. *Fungal Biology*, 122(6), 420-429.
- Kiran, K. A. P., & Mohan, C. M. (2018). Antioxidant and cytotoxic activity of *Beauveria bassiana* crude mycelia extracts against A-549 cell line. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(4), 776-780.
- Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19, 23-42.
- Manyes, L., Escrivá, L., Ruiz, M. J., & Juan-García, A. (2018). Beauvericin and enniatin B effects on a human lymphoblastoid Jurkat T-cell model. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 127-135.

- Merino Peñafiel, C. O. (2017). Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin sobre un insecto plaga.
- Pacheco Hernández, M., Reséndiz Martínez, J., & Arriola Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56), 4-32.
- Picazo, J. J. (2003). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos. *España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Sánchez, B. R. (2022). Evaluación de la actividad insecticida del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* contra *Spodoptera frugiperda*.
- SUÁREZ-CONTRERAS, L. Y., & PEÑARANDA-FIGUEREDO, F. A. (2022). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 194-206.
- Vásquez Bonilla, J. N. (2018). Identificación molecular de cepas de *Beauveria bassiana* y evaluación de los niveles de expresión del gen de la *Beauvericina* sintetasa en un cultivo sólido (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco).
- Vásquez-Bonilla, J.N., Barranco-Florido, J.E., Ponce-Alquicira, E. et al. Improvement of *beauvericin* production by *Fusarium oxysporum* AB2 under solid-state fermentation using an optimised liquid medium and co-cultures. *Mycotoxin Research* 38, 175–183 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00458-y>
- Villegas-Mendoza, J. M., Rosas-García, N. M., Mireles-Martínez, M., Santiago-Adame, R., Rodríguez-Castillejos, G. C., Camacho-Corona, M., & Claudio, P. D. C. (2019). Evaluación antimicrobiana de un extracto metanólico de *Beauveria bassiana* contra bacterias patógenas de importancia nosocomial. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 60(3), 169-176.
- Yin, M., Xiao, D., Wang, C., Zhang, L., Dun, B., & Yue, Q. (2021). The regulation of BbLaeA on the production of *beauvericin* and bassiatin in *Beauveria bassiana*. *World of Microbiology & Biotechnology*, 38(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03162-8>

Vo. Bo. de los asesores



Dra. Aida Hamdan Partida



Dr. Juan Esteban Barranco Florido



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL:

“Obtención de extractos acuosos y metanólicos del entomopatógeno
Beauveria bassiana”.

Correspondiente al proyecto genérico:

Evaluación de conidios y metabolitos de hongos filamentosos
producidos en cultivo sólido para su uso potencial en el control biológico
y en la industria farmacéutica.

PRESENTA:

ELIZABETH CAZARES MUÑOZ

MATRICULA: 2163063672

ASESORES:

JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO No. Económico: 24927

AÍDA HAMDAN PARTIDA No. Económico: 26343

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorio De Biotecnología, Edificio N.
Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad Xochimilco, con Dirección: Calzada Del Hueso
1100. Col. Villa Quietud, Alcaldía de Coyoacán, C.P 04960, Ciudad de
México, México.

Periodo: 01 noviembre 2022 al 01 mayo 2023

Ciudad de México, Julio 2023

9. Resumen

Beauveria bassiana es el hongo entomopatógeno más estudiado por su capacidad en el control biológico de plagas. Este hongo secreta enzimas y metabolitos secundarios que participan en el mecanismo de patogenicidad que produce el tiempo de muerte de los insectos. Actualmente los metabolitos producidos por los hongos han sido estudiados por su uso potencial como bioinsecticidas, antibacterianos, antifúngicos, entre otros. Así como su aplicación en la industria farmacéutica. El cultivo sólido es un bioproceso que incrementa la producción de estos metabolitos de los hongos entomopatógenos en un ambiente semejante al natural.

En este trabajo se produjeron metabolitos de *B. bassiana* por cultivo sólido y su evaluación de su actividad antimicrobiana; así como el escalamiento en su producción. Se utilizaron dos cepas de *B. bassiana* (106 y 546), que fueron crecidas en cultivo sólido, los metabolitos fueron extraídos con agua o metanol y semipurificados por filtración en membranas de corte 10 kDa. Finalmente, fueron liofilizados o fraccionados por cartuchos C18 Sep-Pak y su evaluación antimicrobiana se realizó por el método disco-placa o Kirby Bauer en cepas microbianas. Como resultado la producción de los metabolitos se incrementó hasta 900 mg de metabolitos al escalar el cultivo sólido, manteniendo el rendimiento (3,46 mg/gMH), principalmente en el aislado 546. Al emplear dos métodos de semipurificación de los metabolitos, resultó mejor el obtenido con las fracciones de los cartuchos C18 Sep-Pak, respecto a los liofilizados. La actividad antimicrobiana se evaluó con las fracciones metanólicas 1 y 2 que contenía la mayor concentración de proteína, las fracciones metanólicas del aislado 546 mostraron una mayor actividad antimicrobiana contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 y *Staphylococcus epidermis* comparadas con las fracciones metanólicas del aislado 106. Como conclusión, el rendimiento se mantuvo al escalar el cultivo sólido y los metabolitos presentan actividad antimicrobiana contra cepas de interés clínico.

Palabras clave:

Beauveria bassiana, cultivo-sólido, escalamiento, actividad-antimicrobiana, metabolitos

10. Anexos

Anexo 1: Solución madre buffer fosfato salino (PBS10X)

Para un litro de solución:

Pesar:

- ✓ 80,6 g de NaCl
- ✓ 2,2 g de KCl
- ✓ 11,5 g de Na₂HPO₄
- ✓ 2,0 g de KH₂HPO₄

Anexo 2: PNO para rotavapor



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

Contenido

1. Objetivo
2. Alcance
3. Definiciones
4. Responsabilidades
5. Precauciones
6. Desarrollo del proceso
7. Control de cambios
8. Referencias bibliográficas

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 1 / 7			



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

1. Objetivo

Establecer los pasos a seguir para el armado, operación y limpieza de el Rotavapor® Büchi.

2. Alcance

Aplica al armado, operación y limpieza del Rotavapor® Büchi, ubicado en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

3. Definiciones

3.1 Rotavapor: Equipo utilizado para la eliminación eficiente y suave de los solventes de las muestras mediante evaporación, destilación y posterior condensación.

4. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal que ingrese al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco la aplicación de este procedimiento.

5. Precauciones

5.1 Utilice el equipo de seguridad necesario durante la operación del equipo (bata, cubre bocas, guantes y lentes de seguridad).

5.2 Asegúrese de que las uniones estén lubricadas con gel de silicona antes de operar el equipo.

5.3 Cuando intervenga el equipo para la limpieza y/o verificación mecánica del mismo, asegúrese de que el equipo esté apagado, espere a que la temperatura del agua del baño de calentamiento se enfríe antes de desecharla y tomar todas las medidas de seguridad

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 2 / 7			



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

necesarias para evitar accidentes. Recuerde que su seguridad está antes que cualquier otra cosa.

5.4 Asegurarse de que al colocar el matraz en la entrada giratoria tenga una buena separación y procure no apretar de más la pinza para sostener el matraz.

5.5 Asegurarse de que el nivel de anticongelante del chiller de recirculación se encuentre en un nivel óptimo y que se encuentre en buenas condiciones.

5.6 Evite ajustar en exceso las pinzas que sujetan los matraces.

5.7 No opere el equipo sin antes saber la temperatura de ebullición del solvente que desea eliminar.

5.8 Asegurarse de que no salga expulsada la válvula de vacío.

5.9 Nunca opere el equipo sin previamente haber leído y comprendido este procedimiento de operación.

6. Desarrollo del proceso

6.1 Verificación del armado del Rotavapor® Büchi

6.1.1 Asegurarse de que el equipo cuente con las siguientes piezas: baño de calentamiento, un chiller de recirculación, matraz de recolección (matraz bola), matraz pera para la muestra, válvula de vacío y pinzas (Ver figura 1, 2,3 y 4).

6.1.2 Verificar que el equipo y sus partes estén limpios y secos.

6.1.3 Lubricar con una pequeña cantidad de gel de silicona las uniones de la entrada giratoria y la salida del solvente antes de colocar el matraz correspondiente.

6.1.4 Coloque el matraz en su lugar correspondiente y sujete con las pinzas.

6.1.4 Llenar el baño de calentamiento con agua corriente normal a un máximo de tres cuartos de su capacidad.

6.1.5 Verifique que el selector de rotación y de temperatura se encuentren en cero y que la llave de vacío esté cerrada.

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 3 / 7			



**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología**

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

6.1.6 Conecte el rotavapor a la corriente eléctrica y presione el botón de encendido del baño de calentamiento, la bomba de vacío y el chiller de recirculación.

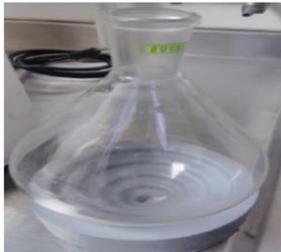
<p>Figura 1. Rotavapor® Büchi.</p>	<p>Figura 2. Chiller de regulación.</p>

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 4 / 7			



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

	
Figura 3. Matraz bola.	Figura 4. Matraz pera.

6.2 Procedimiento de operación

- 6.2.1 Abrir la llave de vacío y ajustar la presión utilizando la válvula de vacío y las salidas de vacío, hasta que no se escuche que se entra aire.
- 6.2.2 Espere a que el chiller de recirculación indique que el anticongelante ha alcanzado la temperatura óptima de enfriamiento.
- 6.2.3 Ajustar la altura del matraz de la entrada giratoria con el brazo de ascenso y descenso de forma que el agua del baño de calentamiento cubra una cuarta parte del matraz.
- 6.2.4 Ajustar la velocidad de rotación y la temperatura que se requiera para eliminar el solvente.
- 6.2.5 Después de eliminar el solvente detener la rotación y disminuir la temperatura con el selector.
- 6.2.6 Separe el matraz de la entrada giratoria del agua del baño de calentamiento alzando el matraz con el brazo de ascenso y descenso.

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 5 / 7			



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

6.2.7 Cerrar la llave de vacío y a continuación liberar la presión del equipo abriendo poco a poco las salidas del vacío y la válvula de vacío.

6.2.8 Apagar con el mismo botón de encendido el baño de calentamiento, la bomba de vacío, el chiller de recirculación y desconectar el equipo de la corriente eléctrica.

6.3 Limpieza del Rotavapor® Büchi

6.3.1 Asegúrese de que el equipo esté desconectado de la corriente eléctrica.

6.3.2 Asegúrese de que la presión se liberara por completo antes de retirar los matraz.

6.3.3 Gire con cuidado la pinza que sostiene el matraz de la entrada giratoria, retirelo y recolecta su contenido.

6.3.2 A continuación retire el matraz recolector del solvente cuando no observe goteo de la salida del solvente y recolectar el solvente.

6.3.3 Lavar los matraz utilizando una solución de jabón Dextrán al 5% en agua y una esponja o cepillos suaves.

6.3.4 Enjuague los matraz con suficiente agua potable, hasta eliminar cualquier traza de jabón y deje secar.

6.3.5 Deje enfriar el agua del baño de calentamiento antes de desechar el agua y secar con un trapo limpio y seco.

6.3.6 Limpie el residuo de gel de silicona de las uniones con papel secante.

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 6 / 7			



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Laboratorio de Biotecnología

Procedimiento Normalizado de Operación (PNO)			OPERACIÓN Y LIMPIEZA DE ROTAVAPOR® BÜCHI	
Número de control: PNO-LB104-UAMX	Versión: 01	Sustituye a: NA	Vigente a partir de: mes/año	Próxima revisión: mes/año

7. Control de cambios

Control de cambios					
Número de revisión	Fecha	Descripción del cambio	Justificación	Realizado por	Aprobado por
0	Día/ Mes/ Año				
1					
2					

Tabla 1. Tabla para control de cambios.

8. Bibliografía

- De Salud, L. G., & UNICO, C. (2005). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. *Texto Vigente Última reforma publicada en el DOF*, 14-10-21.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.

Control de emisión			
	Realizó	Revisó	Autorizó
Nombre	Elizabeth Cazares Muñoz	Juan Esteban Barranco Florido	Juan Esteban Barranco Florido
Firma			
Cargo	Prestadora de servicio social	Investigador	Investigador
Fecha	23/ 05/ 2023	27/ 05/ 2023	03/ 06/ 2023
Página: 7 / 7			

Vo. Bo. de los asesores



Dra. Aida Hamdan Partida



Dr. Juan Esteban Barranco Florido