



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**



**“Caracterización de los pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* y su  
citotoxicidad sobre hongos y bacterias fitopatógenas “**

**TESIS**

**Que para obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias en Bioprocesos**

**PRESENTA:**

**M. en C. Rocío Cruz Muñoz**

**Dirigida por:**

**Dr. Ramón Villanueva Arce y Dra. Ana Belem Piña Guzmán**

**México, D. F. a 24 de julio de 2015**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 17 del mes de julio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Caracterización de los pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* y su citotoxicidad sobre hongos y bacterias fitopatógenas

Presentada por el alumno:

Cruz	Muñoz	Rocío						
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)						
		A	1	2	0	4	1	2

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Ramón Villanueva Arce

Dra. Ana Belem Piña Guzmán

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Dr. Fabián Robles Martínez

Dra. Silvia Bautista Baños



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Ramón Villanueva Arce

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita



Rocío Cruz Muñoz  
Vo. Bo.



Dr. Ramón Villanueva Arce



Dra. Ana Belem Piña Guzmán

## Autorización de uso de obra

**Instituto Politécnico Nacional**

**Presente**

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Rocío Cruz Muñoz (se anexa copia simple de identificación oficial), manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "Caracterización de los pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* y su citotoxicidad sobre hongos y bacterias fitopatógenas", en adelante "La Tesis" y de cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo al Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (publicación en línea de la Tesis en el repositorio Institucional) "La Tesis" por un período de seis meses contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovara automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México D.F., 17 de julio de 2015

Atentamente



Rocío Cruz Muñoz

## Resumen

*Pycnoporus* es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos que tiene un potencial lignocelulítico: Los metabolitos secundarios de este hongo son importantes en la búsqueda de sustancias antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas. El objetivo de este trabajo fue la producción, separación, purificación e identificación de los pigmentos producidos por *Pycnoporus sanguineus* y su actividad contra hongos y bacterias fitopatógenas. El trabajo se dividió en 2 etapas, la primera de ellas fue la producción de los pigmentos de *P. sanguineus* obtenido de material vegetal en descomposición de árboles de casuarina (H1) y mango (H2), posteriormente cultivados en medio sólido (agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar harina integral de trigo, agar extracto de casuarina y agar extracto de mango) y pH (7.0, 8.0 y 9.0) en un diseño completamente al azar en arreglo factorial. La mayor cantidad de pigmento extraído se obtuvo en agar papa dextrosa y agar de mango pH = 7.0 de 55.6 y 57.1 mg, para H1 y H2, respectivamente. Se evaluó el extracto crudo de los pigmentos en el control de hongos y bacterias fitopatógenas. Se demostró que los pigmentos tienen una actividad fungistática contra *C. fragarie*, pero no se encontró actividad antimicrobiana por lo que decidió realizar la segunda etapa de la investigación en la cual se cultivó sólo el aislamiento H1 de *P. sanguineus* en medio líquido caldo papa y extracto de casuarina a pH (8.0 y 9.0). El mayor rendimiento del pigmento (8.8%) se obtuvo en caldo papa, donde se produjo 1.1631 g de pigmento. Por cromatografía de columna, se logró separar 11 fracciones, de las cuales se identificó la fracción D por medio de resonancia magnética nuclear y se determinó que es una 1-2 diaminoantraquinona. Con los extractos crudos así obtenidos, se determinó la CMI en 1.5 mg mL<sup>-1</sup> para *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*, CMB de 3 mg mL<sup>-1</sup> y 5 mg mL<sup>-1</sup> para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente. La inhibición de la actividad citotóxica a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> fue de 24.40% y 22.23% para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente. Demostrando que el pigmento producido por H1 en caldo papa a pH 9.0 tiene una actividad bactericida contra dichas bacterias fitopatógenas.

## Abstract

*Pycnoporus* is a representative species of saprophyt homobasidiomycetes having a lignocellulitic potential; secondary metabolites of this fungus are important because of the presence of antiviral substances, antioxidants, antifungal and antibacterial. Therefore, the aim of this work was the production, separation, purification and identification of pigments produced by *Pycnoporus sanguineus* and tests their activity against phytopathogenic fungi and bacteria. This procedure was divided into two stages, the first was the production of *P. sanguineus* pigments obtained from decomposing plant material casuarina trees (H1) and mango trees (H2) grown on solid medium (potato dextrose agar, extract malt agar, whole wheat flour agar, casuarin extract agar and mango extract agar) and pH (7.0, 8.0 and 9.0). Major pigment extracted was obtained with potato dextrose agar and mango agar 55.6 mg pH = 7.0 and 57.1 mg, for H1 and H2, respectively ( $p \leq 0.05$ ), proving that these pigments have a fungistatic activity against *C. fragariae*. The second stage of the research was to conduct the cultivation of *P. sanguineus* (H1) in potato extract broth and casuarina liquid media) and pH (8.0 and 9.0) the highest yield of 8.8% in potato broth, where there was H1 pigment of 1.1631g and it was possible to separate 11 fractions, in which the fraction D was identified by MRI determining that was 1-2 diaminoanthraquinone obtained. Pigment H1 showed fungistatic activity against *C. fragariae* to respect to bactericidal activity was determined as MIC at  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$  for *E. amylovora* and *P. carotovorum*, MBC  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  and  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  for *E. amylovora* and *P. carotovorum* respectively inhibiting and cytotoxic activity at a concentration of  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  was 24.40% and 22.23% for *E. amylovora* and *P. carotovorum* respectively. This works probes that the orange/red pigments produced by H1 in potato dextrose broth at pH 9.0 had a bactericidal activity against phytopathogen bacterias.

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Posgrado de Biotecnología Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional.

Cruz-Muñoz agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de sus estudios en el programa de posgrado de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de laUPIBI-IPN que está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado con el número de referencia 000653.

Además, se agradece a la Subdirección de Investigación y Posgrado (proyectos 20113692, 20120572, 20131830), y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN-COFAA) por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

Se agradece al Centro de nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional por la utilización del servicio de Resonancia Magnética Nuclear de 400 Mhz (RMN).

A los directores de proyecto: Dr. Ramón Villanueva Arce y Dra. Ana Belem Piña Guzmán quienes me brindaron su confianza y apoyo para lograr este proyecto.

A los doctores: Silvia Bautista Baños, Fabián Robles Martínez, Gustavo Valencia del Toro y Jorge Yáñez quienes me brindaron su apoyo y colaboración.

A la Dra. Olivia Franco por su apoyo brindado y su gran calidad humana, quién me proporcionó asesoría técnica en la utilización del equipo IR.

## Dedicatorias:

Al Creador de todo esto.

A la vida por permitirme cumplir este reto.

A mi hermosa Esperanza a quien le tengo una profunda admiración y amor la llevaré siempre conmigo.

A toda mi familia por su infinito apoyo y amor en especial a: Josefina, Marcos y Guillermo.

A mi especial compañero de vida (Toño).

A mis amigos y amigas que hemos compartido esta vida.

A mis compañeros de trabajo.

Al amor tan inmenso que redescubrí por los perros.

No tengas prisa, paciencia... todo llega justo en el momento en que estás preparado para seguir con tu evolución "Buda".

La mente es igual que un paracaídas sólo funciona si se abre "Albert Einstein".

La inteligencia es la habilidad de adaptarse a los cambios "Stephen Hawking".





## Productos derivados de la Tesis

### Congresos:

Asistencia y presentación del trabajo: Evaluación de pigmentos fúngicos de aislamientos de *Pycnoporus sanguineus* contra bacterias de interés clínico: *Bacillus cereus* y *Klebsiella pneumoniae*. VI Coloquio de Ingeniería Farmacéutica. Mayo 2012.

Participación con el trabajo: Control de *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum* con Pigmentos de *Pycnoporus sanguineus*. XIV Congreso Internacional y XXXIX Congreso Nacional de Fitopatología. Julio 2012.

Asistencia y presentación del trabajo: *Pycnoporus sanguineus* pigment extracts against phytopathogenic fungi (*Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporoides* and *Botrytis cinerea*). 5th International Congress. Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries (AMECA). Octubre 2012.

Asistencia y presentación del trabajo: *Pycnoporus sanguineus* GROWTH IN DIFFERENT SOLID MEDIA. XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering. GIM 2013 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Junio 2013.

Asistencia y presentación del trabajo: Evaluation of fungal pigments extracted from *Pycnoporus sanguineus* against the phytopathogenic bacteria (*Erwinia amylovora* and *Pectobacterium carotovorum*). "6<sup>th</sup> International Congress on Food Science Biotechnology and Safety" and "Food Safety 2014". (AMECA). Octubre 2014.

Participación con el trabajo: Evaluación del pigmento de *Pycnoporus sanguineus* contra *Erwinia amylovora*. XVII Congreso Internacional y XLII Congreso Nacional de Fitopatología. Congreso. Julio 2015.

### Publicaciones:

Cruz-Muñoz, R., Y.M. Gómez-Gómez, G. Valencia-del-Toro, F. Robles-Martínez, J. Yáñez-Fernández, R. Villanueva-Arce. 2015. *Pycnoporus sanguineus* pigment extracts against phytopathogenic fungi (*Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporoides* and *Botrytis cinerea*) In. García, S., H.S. García-Galindo, G.V. Nevárez-Moorillón (eds). *Advances in Science, biotechnology and safety of foods*. México. Asociación Mexicana de Ciencias de los Alimentos, A.C. ISBN: 978-607-95455-4-3. pp: 293-296.

Cruz-Muñoz, R., A.B. Piña-Guzmán, J. Yáñez-Fernández, G. Valencia-Del Toro, S. Bautista-Baños, R. Villanueva-Arce. 2015. Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia* (Aceptado).

## Contenido

	Página
Índice de Figuras	xii
Índice de Cuadros	xiv
Resumen	iv
Abstract	v
CAPITULO 1. MARCO DE REFERENCIA	17
1.1. Ubicación taxonómica de <i>Pycnopus sanguineus</i>	17
1.2. Distribución ecológica de <i>ycnopus. sanguineus</i>	18
1.3. Cultivo de <i>Pycnopus sanguineus</i>	19
1.4. Ciclo biológico de <i>Pycnopus sanguineus</i>	19
1.5. <i>Pycnopus sanguineus</i> y sus principales aplicaciones en biotecnología	20
1.5.1. Producción de enzimas a partir de <i>Pycnopus sanguineus</i>	21
1.6. Otras aplicaciones biotecnológicas	24
1.6.1. Extracto de <i>Pycnopus sanguineus</i> utilizado como biosensor	24
1.6.2. Efecto de temperatura y NaCl en <i>Pycnopus sanguineus</i>	24
1.7. Aplicación de compuestos químicos producidos e identificados en <i>Pycnopus sanguineus</i>	24
1.7.1. Poliporin	25
1.7.2. Cinnabarina	25
1.7.3. Ácido cinabarínico y tramesanguina	25
1.8. Enfermedades postcosecha causadas por bacterias y hongos	25
1.8.1. El fuego bacteriano	26
1.8.2. Marmoleado	27
1.8.3. Antracnosis	28
1.9. Alternativas y mecanismos de control de enfermedades postcosecha	29
1.9.1. Control químico	29
1.9.2. Biocontrol	29
1.9.2.1 <i>Pycnopus sanguineus</i> como agente de biocontrol de bacterias fitopatógenas	30
1.9.2.2. Producción de extractos de <i>P. sanguineus</i> con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas	30
LITERATURA CITADA	31
CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS DE <i>Pycnopus sanguineus</i>	40

	EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO	
	RESUMEN	40
2.1	INTRODUCCIÓN	40
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.2.1.	Estrategia Experimental	42
2.2.2.	Material biológico	43
2.2.3.	Aislamiento, purificación e identificación de <i>P. sanguineus</i>	43
2.2.4	Producción del pigmento de <i>P. sanguineus</i> en medio de cultivo sólido	43
2.2.5.	Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)	45
2.2.5.2.	Cromatografía en capa fina	45
2.2.5.2	Cromatografía en columna abierta	45
2.2.5.3.	Fracciones secundarias obtenidas en la separación de columna abierta lote 1 y 2	45
2.2.6.	Identificación del pigmento	45
2.2.7.	Determinación de la actividad contra hongos y bacterias	46
2.2.7.1.	Determinación del efecto antifúngico	46
2.2.7.2	Determinación del efecto fungistático	47
2.2.7.3.	Determinación del efecto antibacteriano	47
2.2.7.3.	Prueba de sensibilidad contra bacterias fitopatógenas	47
1.		
2.2.7.3.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	47
2		
2.2.7.4.	Evaluación de los mecanismos de acción antimicrobiana (bacterias y hongos)	48
2.2.7.4.	Ensayo de reducción poner el significaao de MTT	48
1.		48
2.2.8.	Manejo estadístico de los datos	48
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
2.3.1.	Aislamiento, purificación e identificación de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	48
2.3.2.	Producción del pigmento de <i>P. sanguineus</i> en medio de cultivo sólido	50
2.3.3.	Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)	53
2.3.3.1.	Cromatografía en capa fina	53
2.3.3.2.	Cromatografía en columna abierta	55
2.3.3.3.	Fracciones secundarias obtenidas en la separación de columna abierta	56

lote 1	
2.3.3.4.	Fracciones secundarias obtenidas en la separación de columna abierta 57
lote 2	
2.3.4.	Identificación del pigmento 58
2.3.4.1.	Identificación de los compuestos separados del extracto <i>de P. sanguineus</i> por IR 58
2.3.5.	Determinación de la actividad contra hongos y bacterias 64
2.3.5.1.	Determinación del efecto antifúngico 64
2.3.5.1.	Determinación del efecto fungistático 64
1	
2.3.5.2.	Determinación del efecto antibacteriano 65
2.3.5..	CONCLUSIONES 67
2.3.5.1	LITERATURA CITADA 67
	CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS DE <i>Pycnoporus sanguineus</i> EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO 71
	RESUMEN 71
3.1	INTRODUCCIÓN 72
3.1.1.	<i>Pycnoporus sanguineus</i> 72
3.2.	Materiales y Métodos 73
3.2.1.	Estrategia Experimental 73
3.3.	Material biológico 73
3.4.	Producción del pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> en medio de cultivo líquido 74
3.5.	Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna) 75
3.5.1.	Cromatografía en capa fina 75
3.5.2.	Cromatografía en columna abierta 75
3.6.	Identificación del pigmento (HRMN) 75
3.7.	Determinación de la actividad contra hongos y bacterias 76
3.7.1	Determinación del efecto antifúngico 76
3.7.2.	Determinación del efecto fungistático 76
3.8.	Determinación del efecto antibacteriano 77
3.8.1.	Prueba de sensibilidad contra bacterias fitopatógenas 77
3.8.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y 77

	concentración mínima bactericida (CMB)	77
3.8.3.	Evaluación de los mecanismos de acción antimicrobiana (bacterias y hongos)	78
3.8.3.1.	Ensayo de reducción MTT	78
3.9	Manejo estadístico de datos	79
3.10.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
3.11.	Producción de pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> en medio de cultivo líquido	79
3.12.	Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)	81
3.12.1.	Cromatografía en capa fina	81
3.12.2.	Cromatografía en columna abierta	83
3.12.3.	Comparación de compuestos producidos por <i>P. sanguineus</i> en diferentes medios de cultivo: sólido y líquido	90
3.13.	Determinación de la actividad contra hongos y bacterias	91
3.13.1.	Determinación del efecto antifúngico	91
3.13.2.	Determinación del efecto fungistático	92
3.13.3.	Determinación del efecto antibacteriano	92
3.13.4.	Prueba de sensibilidad contra bacterias fitopatógenas	92
3.13.4.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)	95
3.14.	Evaluación de los mecanismos de acción antimicrobiana (bacterias y hongos)	96
3.14.1.	Ensayo de reducción MTT	96
	CONCLUSIONES	97
	LITERATURA CITADA	97

## Índice de Figuras

Figura 1. Basidiocarpo de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. sanguineus</i> y sus principales aplicaciones en biotecnología	19
Figura 3. Fuego bacteriano causado por <i>Erwinia amylovora</i> en pera (Tomado de Palacio <i>et al.</i> , 2008)	26
Figura 4. Marmoleado en lechuga, zanahoria y papa (Sommer <i>et al.</i> , 2002)	27
Figura 5. Antracnosis en frutos fresa, aguacate y papaya (Sommer <i>et al.</i> , 2002)	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 6. Etapas del proceso de investigación para la producción, purificación y evaluación de la actividad antimicrobiana del pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	42
Figura 7. Arreglo de tratamientos para la producción del pigmento naranja de los aislamientos (H1 y H2) en medios de cultivo sólido	44
Figura 8. Tratamientos realizados para el control <i>in vitro</i> <i>Colletotrichum fragariae</i>	46
Figura 9. Colonias de <i>Pycnoporus sanguineus</i> de 30 días en agar extracto de casuarina (H1) y en agar extracto de mango (H2) aislados en Villa Guerrero, Estado de México y Parácuaro, Michoacán respectivamente	49
Figura 10. Producción de pigmento naranja de <i>Pycnoporus sanguineus</i> aislados en Villa Guerrero, Estado de México (H1) y Parácuaro, Michoacán (H2) en PDA a los 3 (A1 y B1), 13 (A2 y B2) y 30 d (A3 y B3) de edad.	52
Figura 11. Espectrogramas de los pigmentos extraídos con acetato de etilo de los aislamientos de casuarina (H1) y de mango (H2) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	54
Figura 12. Frentes de retención (Rf) de los extractos de los pigmentos obtenidos de los aislamientos H1 y H2 de <i>Pycnoporus sanguineus</i> y del colorante químico rojo de metilo (rm) obtenidos por cromatografía en capa fina (1) así como de los compuestos coloridos que existen en ellos (2).	55
Figura 13.. Cromatografía de columna abierta de los extractos de los pigmentos de los aislamientos H1 y H2 de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .	55
Figura 14. Agrupamiento de fracciones separadas en columna por cromatografía de capa fina de los pigmentos de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .	56
Figura 15. Fracciones separadas por columna abierta del extracto de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	57
Figura 16. Espectro infrarrojo (IR) del ácido cinabarinico (a) y del compuesto 5 obtenido por cromatografía en capa fina del pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (b).	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 17. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido cinabarinico en DMSO-d <sub>6</sub> .	60

Figura 18. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido cinabarínico en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .	61
Figura 19. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la muestra 5: A) disuelta en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> y B) en hexano- <i>d</i> <sub>14</sub> .	63
Figura 20. Efecto fungistático del extracto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> obtenido de medio sólido	65
Figura 21. Basidiocarpo de <i>Pycnoporus sanguineus</i> colectado en el estado de Michoacán	72
Figura 22. Etapas de la estrategia experimental	73
Figura 23. Arreglo de tratamientos para la producción del pigmento de <i>P. sanguineus</i> en medio líquido	74
Figura 24. Tratamientos realizados para el control <i>in vitro</i> de <i>C. fragarie</i>	76
Figura 25. Cromatografía de capa fina de extracto crudo H1 de <i>P. sanguineus</i> bajo luz UV onda corta y larga	82
Figura 26. Espectrograma del pigmento extraído con acetato de etilo, caldo papa a pH 9.0 (H1) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	82
Figura 27. Fraccionamiento por columna abierta del extracto crudo obtenido de H1 en medio líquido	83
Figura 28. Fracciones que oscilan en el rango de las fenoxaciona	84
Figura 29. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la muestra D en solución de DMF- <i>d</i> <sub>7</sub>	87
Figura 30. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la muestra D en solución de DMF- <i>d</i> <sub>7</sub> .	88
Figura 31. Espectro Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido cinabarínico en solución de DMF- <i>d</i> <sub>7</sub>	89
Figura 32. Efecto fungicida propiciado por Captan <sup>®</sup> y fungistático efectuado por extracto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> cultivado en caldo papa a pH 9.0	92

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Secuencia de pares de bases de la región ITS1 del ADNr de <i>Pycnoporus sanguineus</i> aislados en Villa Guerrero, Estado de México (H1) y PARácuaro, Michoacán (H2)	49
Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo y pH en el crecimiento y producción de pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> aislado en Villa Guerrero, Estado de México (H1)	50
Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo y pH en el crecimiento y producción de pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> aislado en Villa Guerrero, Estado de México (H2)	51
Cuadro 4. Fracciones secundarias obtenidas de la separación del pigmento de <i>P. sanguineus</i> lote 1	56
Cuadro 5. Fracciones secundarias obtenidas de la separación del pigmento de <i>P. sanguineus</i> lote 2	57
Cuadro 6. Comparación de medias del diámetro de crecimiento (mm) de <i>C. fragarie</i> en PDA con extractos fúngicos de <i>P. sanguineus</i> (H1 y H2) y fungicida comercial (Captan®)	64
<b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Cuadro 7. Efecto de la de inhibición del compuesto 7 (8 mg $\mu\text{L}^{-1}$ ) separado del extracto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> en el control de bacterias fitopatógenas lote 1	65
Cuadro 8. Ensayos de inhibición con diferentes fracciones del pigmento separado del lote 1 de <i>Pycnoporus sanguineus</i> contra bacterias fitopatógenas	66
Cuadro 9. Ensayos de inhibición con diferentes fracciones del pigmento separado del lote 2 de <i>Pycnoporus sanguineus</i> contra bacterias fitopatógenas.	66
Cuadro 10. Comparación de factores del pH y medio de cultivo sobre: concentración del pigmento, peso seco (biomasa) y rendimiento del pigmento producido por <i>Pycnoporus sanguineus</i> (H1)	80
Cuadro 11. Fracciones obtenidas de la separación del pigmento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> H1 cultivado en caldo papa a pH 9.0	84
Cuadro 12. Comparación de absorbancias de extractos crudos producidos en diferentes medios por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	91
Cuadro 13. Comparación de medias del diámetro de crecimiento (mm) de <i>Colletotrichum fragarie</i> en PDA con extracto fúngico de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (H1) y un fungicida comercial (Captan®)	91
Cuadro 14. Efecto del extracto crudo de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (H1) obtenido de caldo papa a pH 9.0 en el desarrollo de <i>Erwinia amylovora</i>	93



Cuadro 15. Efecto del extracto crudo de *Pycnoporus sanguineus* (H1) obtenido de caldo papa a pH 9.0 en el desarrollo de *Pectobacterium carotovorum* 93

Cuadro 16. Efecto de las fracciones separadas del extracto de *Pycnoporus sanguineus* (H1) a una concentración de 8 mg sensidisco<sup>-1</sup> en *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum* 94

## CAPÍTULO 1. MARCO DE REFERENCIA

El mundo de los hongos ofrece una fascinante y aparente riqueza sin fin de la diversidad biológica y forma un recurso invaluable. Actualmente se conocen casi 75 000 especies de hongos filamentosos, pero puede haber más de cinco millones (Blackwell, 2011). Los hongos filamentosos que producen pudriciones blancas forman un grupo ecológico importante; causan la eliminación selectiva de la lignina de la madera y así tienen un alto potencial para procesos biotecnológicos, en especial ocupando materia prima lignocelulósica para aplicaciones de refinería. Entre estos hongos, está el grupo de los Polyporales, incluyendo el género *Pycnoporus*, el más representativo de los saprotróficos por su reconocido gran potencial lignocelulolítico, ya que causan el deterioro de la madera (Alexopoulos *et al.*, 1996).

### 1.1. Ubicación taxonómica de *Pycnoporus sanguineus*

*Pycnoporus* está estrechamente relacionado con el género *Trametes*, al que morfológicamente es similar en todas sus características, excepto por el color naranja-rojizo brillante de su basidiocarpo (Ryvarden y Johansen 1991). Este color surge de la síntesis de varios pigmentos del tipo de la 3-fenoxazina, incluyendo la cinnabarina, tramesanguina y el ácido cinnabarínico (Sullivan y Henry, 1971). Para discernir sobre las especies de *Pycnoporus*, los análisis se han basado en sus características morfológicas (tamaño de poro, forma de basidiosporas y basidiocarpo) y su distribución geográfica (Ryvarden y Johansen 1991). *Pycnoporus cinnabarinus* es una especie muy común distribuida sobre todo en el hemisferio norte (Nobles y Frew, 1962; Ryvarden y Johansen, 1980). *Pycnoporus puniceus*, es una rara especie distribuida en África, India, Malasia y Nueva Caledonia y se caracteriza por tener un basidiocarpo con grandes poros irregulares de 1-3/mm. *Pycnoporus sanguineus*, la especie más común, distribuida en regiones tropicales y subtropicales, se distribuye en los países limitantes con los océanos Índico y Pacífico (Nobles y Frew 1962). De acuerdo con el Diccionario de los Hongos de Kirk *et al.* (2001) la clasificación taxonómica de *P. sanguineus* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Orden: Polyporales

Familia: Polyporaceae

Género: *Pycnoporus*

Especie: *P. sanguineus*

Los cuerpos fructíferos (basidiocarpos) de *P. sanguineus* son correosas, de 2-6 cm de ancho, en forma de abanico o repisa, de color rojo-anaranjado en su totalidad, incluyendo el interior. La superficie exterior de estas estructuras es lisa o algo marcada de zonas concéntricas y la superficie inferior cuenta con poros finos (Figura 1). Su olor es característico y tiene un sabor amargo ligero (BDMTM-APMTM, 2009).



Figura 1. Basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus*.

(Tomada de [http://www.stri.si.edu/english/site\\_tools/photo\\_of\\_the\\_week/index.php?id=64](http://www.stri.si.edu/english/site_tools/photo_of_the_week/index.php?id=64))

## 1.2. Distribución ecológica de *Pycnoporus sanguineus* en México

En México, a *P. sanguineus* se le conoce también con los nombres de oreja de palo, oreja de palo colorada (tierras calientes); chichilnanácatl, tzutzokomazlat (Veracruz) y se encuentra ampliamente distribuido (Pérez *et al.*, 1988; BDMTM-APMTM, 2009), creciendo de manera silvestre en ambientes tropicales y subtropicales, en sustratos tan diversos como troncos de encino (Chanona *et al.*, 2007), caucho (Vikisneswary *et al.*, 2006), palma de aceite (Rifat *et al.*, 2003) e incluso en troncos quemados (Guzmán, 1979). Además, también se reporta que a este hongo se le encuentra en cercas, troncos tirados o tocones en lugares soleados, en tierras calientes o templadas con influencia tropical; siempre fuera del bosque. Su amplia distribución en el país por lo general, es en vegetación alterada por el hombre. Prospera desde el nivel del mar hasta los 1800 m de altitud.

### 1.3. Cultivo de *Pycnoporus sanguineus*

Fisiológica y biotecnológicamente, los hongos del género *Pycnoporus* son fáciles de cultivar a nivel de laboratorio y planta piloto. Se pueden obtener altos rendimientos cuando se utilizan algunos de los siguientes materiales, como principal fuentes de carbono: almidón, extracto de malta, maltosa, metil-celulosa, sacarosa, dextrosa y caldo extracto de malta suplementado con extracto de levadura y/o fosfolípidos (Holler y Brooks, 1980; Oddou *et al.*, 1999).

### 1.4. Ciclo biológico de *Pycnoporus sanguineus*

Los hongos del género *Pycnoporus* son homobasidiomicetos heteroálicos con un sistema de reproducción tetrapolar (Nobles y Frew, 1962). El ciclo de vida del hongo muestra un desarrollo sexual de basidiosporas haploides que producen la germinación a hifa con un núcleo por célula (monocarión), dos cepas monocarióticas con alelos de apareamiento diferentes pueden unirse y producir micelio dicariótico, caracterizado por conexiones "clamp", en las cuales los dos núcleos parentales no se unen durante el crecimiento vegetativo. El crecimiento vegetativo se mantiene hasta que las condiciones ambientales inducen la formación del cuerpo fructífero, después de la cariogamia y la meiosis dentro de los basidios, se producen cuatro esporas uninucleadas y dan lugar a líneas celulares monocarióticas (Figura 2) (Herpoël *et al.*, 2000.; Lomascolo *et al.*, 2002).

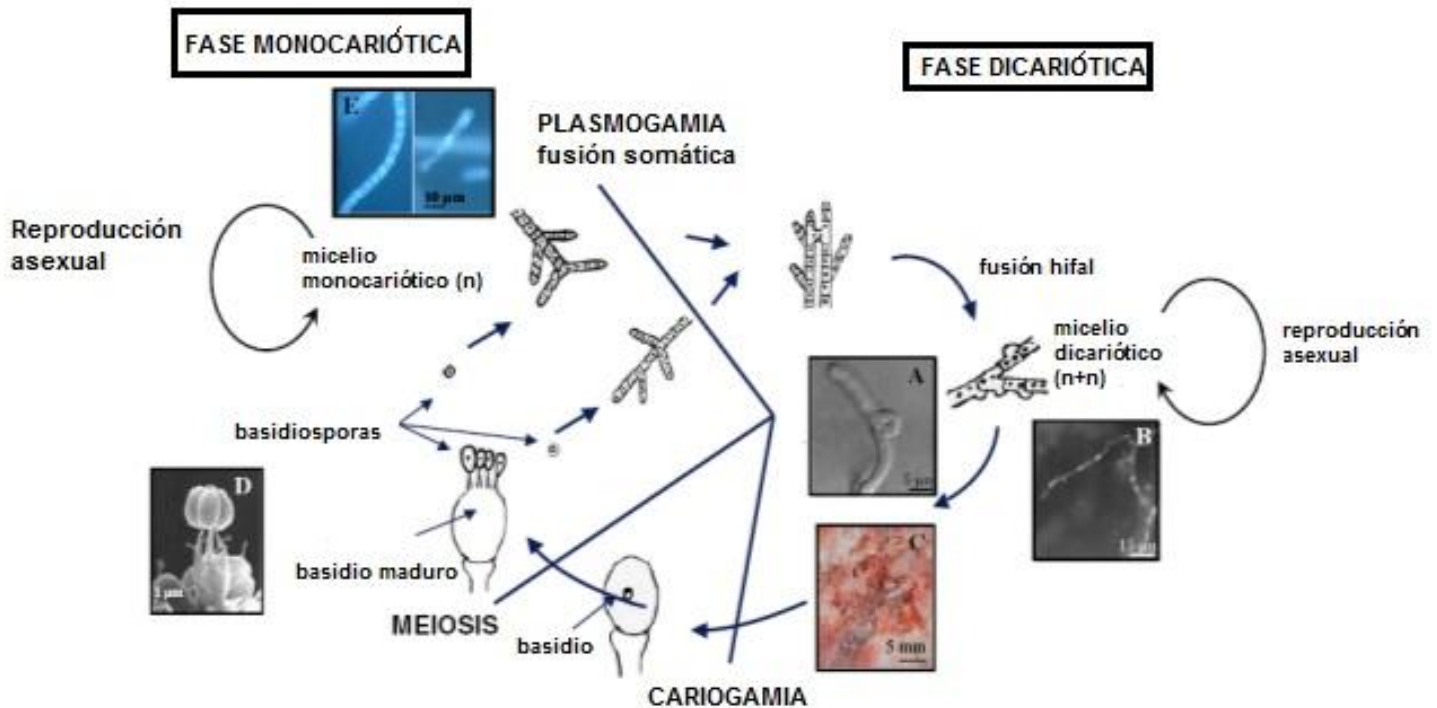


Figura 2. Ciclo de vida de *P. sanguineus* (Tomado de Lomascolo *et al.*, 2011).

### 1.5. *Pycnoporus sanguineus* y sus principales aplicaciones en biotecnología

En 1980 la especie *Phanerochate chrysisporium* fue históricamente el primer modelo de hongo relacionado con la pudrición blanca de la madera y posteriormente, las investigaciones se extendieron poco a poco a *Pycnoporus*, teniendo tres características principales de acuerdo con Lomascolo *et al.* (2011):

- 1) Producir metaloenzimas de cobre y hierro implicadas en los compuestos de las paredes de las células vegetales (Moukha *et al.*, 1999; Halaouli *et al.*, 2005).
- 2) Poseer una ruta metabólica que involucra la funcionalidad de los compuestos aromáticos de la pared celular para dar alto valor añadido a compuestos como aromas y antioxidantes (Lesage-Meessen *et al.*, 1997; Estrada-Alvarado *et al.*, 2003), enzimas y polisacáridos.
- 3) Capacidad para producir cuerpos fructíferos y líneas celulares monocarióticas en condiciones de cultivo de laboratorio (Alves *et al.*, 2004).

En el primer caso, se sabe que los hongos de pudrición blanca requieren cantidades traza de metales esenciales como Cd, Mn o Zn para su crecimiento, los cuales en exceso, llegan a ser tóxicos, por lo que los hongos cuentan con metaloproteínas ricas en cisteína que son responsables de regular el suministro intracelular de los metales esenciales y de proteger a la célula de los efectos nocivos de concentraciones elevadas de estos iones y de otros metales pesados. Se ha encontrado que además de la capacidad de adsorber y acumular metales, los hongos de pudrición blanca poseen excelentes propiedades mecánicas de formar gránulos de micelio, lo cual brinda una oportunidad para la aplicación de micelios de hongos en la absorción selectiva de los distintos iones de metales pesados en aguas contaminadas (Baldrian, 2002). En el caso de *P. sanguineus*, estas características aumentan la posibilidad de su aplicación biotecnológica en la eliminación de metales pesados (Zulfadhly *et al.*, 2000), pues puede actuar como un bioadsorbente reutilizable para la eliminación de iones de metales como  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ .

En el segundo caso, relativo a la ruta metabólica involucrada en la funcionalidad de los compuestos aromáticos, es conocido que los basidiomicetos de podredumbre blanca, y especialmente del género *Pycnoporus*, representan los principales agentes de la biotecnología para generar, *de novo* o por bioconversión, aromas naturales para la industria cuando se cultivan en medios estándar o en presencia de precursores (Asther *et al.*, 1998; Lomascolo *et al.*, 2002). La gran demanda de aroma natural hace que la producción de vainillina mediante biotransformación

sea una alternativa viable en comparación con la obtenida a partir de otras fuentes como la natural y química. El ácido ferúlico (4-hidroxi 3-metoxicinámicoácido), un componente de las paredes celulares de las plantas con un producto químico estructura similar a la de vainillina, es eficaz como un precursor para la producción de vainillina. La cepa I-937 de *P. cinnabarinus* fue seleccionado por su capacidad para producir 64 mg L<sup>-1</sup> de vainillina después de 6 días de cultivo de 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico, con un rendimiento molar del 27.5% (Grosss *et al.*, 1991).

En el tercer caso, relacionado con el cultivo de *Pycnoporus* en laboratorio, Alves *et al.* (2004) desarrollaron un sistema de transformación y expresión eficaz para *P. cinnabarinus*. Este sistema se utilizó para transformar una cepa deficiente de lacasa monocariótica, con el gen de lacasa LAC1 homóloga colocado bajo la regulación de su propio promotor o la del gen de hidrofobina SC3 o el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) de *Schizophyllum commune*. La expresión SC3 impulsada resultó en una actividad lacasa máxima de 107 nkat ml<sup>-1</sup> en cultivos líquidos agitados. Este valor fue de alrededor de 1,4 y 1,6 veces más alta en los casos de los promotores GPD y LAC1, respectivamente, aumentó LAC1 impulsada por la expresión cuando se añadió 25 g de etanol L<sup>-1</sup> al medio. En consecuencia, la actividad de lacasa aumentó a 1.223 nkat mL<sup>-1</sup>. La producción de lacasa se incrementó aún más en los transformantes que expresan LAC1 detrás de su propio promotor o la de GPD por el crecimiento en la presencia de 40 g de etanol L<sup>-1</sup>. En este caso, las actividades máximas fueron 3900 y 4660 nkat mL<sup>-1</sup>, respectivamente, correspondientes a 1 y 1.2 g de lacasa por litro y por lo que representa las actividades de lacasa más altas reportadas para cepas de hongos recombinantes. Estos resultados sugieren que *P. cinnabarinus* pueden ser un huésped de elección para la producción de otras proteínas también.

#### **1.5.1. Producción de enzimas a partir de *Pycnoporus sanguineus***

Son diversas las enzimas producidas por este hongo a continuación se algunas de las aplicaciones que tienen.

Enzimas hidrolíticas. Las enzimas producidas por *P. sanguineus* tales como  $\alpha$ -y  $\beta$ -galactosidasas, la  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -glucosidasa son de interés industrial en el procesamiento azúcar de remolacha, almidón y leche de soya, en la industria láctea y productos industriales de fruta y en estudios estructurales de glicoproteínas. La  $\alpha$ -galactosidasa producida por *P. cinnabarinus* ha sido estudiada por varios autores (Ohtakara *et al.*, 1988; Mitsutomi *et al.*, 1985; Ohtakara y Mitsutomi, 1987; Mitsutomi y Ohtakara, 1988; y Mitsutomi *et al.*, 1991), hidroliza enlaces  $\alpha$ -galactosilo en oligo y polisacáridos, además también muestra una actividad galactosiltransferasa (Mitsutomi y

Ohtakara, 1988). Esta  $\alpha$ -galactosidasa altamente termoestable se purificó y se inmovilizó en quitina coloidal con glutaraldehído (Mitsutomi *et al.*, 1985) o en esferas de quitosano (Ohtakara y Mitsutomi 1987), manteniendo las propiedades bioquímicas similares a la enzima nativa. La enzima inmovilizada se utilizó con éxito para la hidrólisis de rafinosa en melazas de remolacha azucarera en un proceso continuo de 30 días.

Otra enzima hidrolítica es la xilanaso termoestable ( $300\text{-}3.700\text{ U l}^{-1}$ ) que se obtuvo a partir de *P. cinnabarinus* que se cultivó sobre sustratos naturales (polvo de celulosa, el maíz y el salvado de trigo y pulpa de remolacha azucarera) como fuentes de carbono y aumentó en presencia de Tween 80 como agente tensioactivo (Sigoillot *et al.*, 2002).

Producción de xilanasas y celulasas a partir de *P. sanguineus* y *Bjerkandera adusta*. *P. sanguineus* se ha cultivado en diversos residuos agrícolas como: aserrín de roble y cedro, cáscara de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo y semillas de *Jatropha*. La producción de xilanasas y celulasas por dos basidiomicetos: *B. adusta* y *P. sanguineus*, para este último creció mejor en cáscara de arroz mientras que para *B. adusta* el mejor sustrato fue el rastrojo de maíz con una mayor tasa de crecimiento (Quiroz *et al.*, 2010).

La producción de enzimas oxido-reductasas como son las lacasas, específicamente multi-cobre oxidasas que contienen un tipo de cobre-1. Las lacasas catalizan la reducción de oxígeno al agua acompañada por la oxidación de un sustrato, típicamente un fenol u otro p-dihidroxi compuesto fenólico, estas catalizan la oxidación de un electrón de una amplia gama de compuestos que incluyen di-sustituido y los polifenoles y la di-y aromáticos aminos para formar radicales libres, que a su vez puede producir dímeros, oligómeros y polímeros (Baldrian, 2006).

El género *Pycnoporus* es importante por su producción de lacasas, que son glicoproteínas monoméricas extracelulares. La producción se da tanto en cultivo sumergido (Eggert *et al.*, 1996; Lomascolo *et al.*, 2003) como a partir de la fermentación en estado sólido utilizando agro-residuos (Meza *et al.*, 2006. Vikineswary *et al.*, 2006). La producción de lacasas depende de las condiciones de cultivo: concentraciones y fuentes de carbono y nitrógeno (Eugenio *et al.*, 2009), la adición de tensoactivos tal como Tween 80 (Gómez-Alarcón *et al.*, 1989) y la presencia de inductores y de iones de metales tales como cobre (Hoshida *et al.*, 2005).

Se ha reportado que algunas cepas de *Pycnoporus* originarias de diversas áreas geográficas, especialmente de los hábitats tropicales, producen hasta 17.000 U L<sup>-1</sup> lacasa, es decir, 65 mg L<sup>-1</sup> (Lomascolo *et al.*, 2002; Uzan *et al.*, 2010).

La producción de lacasas por *P. sanguineus* se optimizó de la fermentación en estado sólido con el tejido del parénquima de palma de aceite. La concentración de lacasa que se recuperó fue hasta cuatro veces mayor mediante la extracción con agua pH 8,0 y 25 ± 2°C. El rendimiento de lacasa fue aproximadamente ocho veces mayor con 30% (w/w) de 4 semanas de edad, con 0,92% de inóculo (v/w) de la suplementación de nitrógeno del sustrato (Vikineswary *et al.*, 2006). Del grupo de las hidrolasas existen las tirosinasas, estas enzimas catalizan tanto el orto-hidroxilación de monofenoles y la posterior oxidación de los derivados orto-difenoles en la reacción de o-quinonas. En los hongos, las tirosinasas están generalmente asociadas con la formación y estabilidad de las esporas, involucrados en mecanismos de defensa y de virulencia, así como en el oscurecimiento y la pigmentación. La cepa de *P. sanguineus* CBS 614.73 se identificó como la mejor productora de la tirosinasa, con una producción de 45,4 y 163,6 U g<sup>-1</sup> de proteína por día para monofenolasa y difenolasa, respectivamente. Se trata de una tirosinasa monomérica e intracelular, que se purificó y caracterizó. Esta tirosinasa ha demostrado su eficacia en la síntesis de los recursos naturales antioxidantes y en proteínas de reticulación (Halaoui *et al.*, 2005).

Con respecto a las oxidorreductasas, la celobiosa deshidrogenasa (CDH) es una enzima extracelular que contiene tanto un protoporfirina-IX-basado hemo y un grupo de flavina. Es una enzima bifuncional que contiene un dominio de unión a la celulosa. Este sugirió que podría degradar CDH celulosa, hemicelulosa, lignina y podría participar en la degradación de la madera por hongos de putrefacción blanca a través de la generación de radicales altamente reactivos, como son el grupo hidroxilo implicados en la desmetilación de la lignina. El gen que produce CDH fue clonado a partir de *P. cinnabarinus*, mRNA-codificado la CDH, ha demostrado que se induce por celulosa y relativamente se reprimió por la celobiosa o glucosa en el medio de cultivo. La proteína correspondiente (92 kDa) se purificó y caracterizado por Sigoillot *et al.* (2002)

Se estimó la descomposición de los álamos en la región de "Delta del Río Paraná" Argentina (*Populus deltoides*) por medio de *P. sanguineus* y *Ganoderma lucidum* (Aphyllophorales) los cuales causan la podredumbre blanca. Esto se analizó a través de microscopía electrónica de barrido y se demostró que las muestras inoculadas con *P. sanguineus* mostraron una deslignificación selectiva,



mientras que la inoculada con *G. lucidum* tuvieron una combinación simultánea de descomposición y deslignificación selectiva (Luna *et al.*, 2004).

## **1.6. Otras aplicaciones biotecnológicas**

### **1.6.1. Extracto de *Pycnoporus sanguineus* utilizado como biosensor**

El extracto crudo obtenido de *P. sanguineus* se utilizó en un biosensor para determinar diferentes compuestos fenólicos, presentando una mejor respuesta de catecol, hidroquinona y resorcina ya que se demostró que tuvo actividad enzimática en solución y se inmovilizó en transductores electroquímicos de pasta de carbono (Gil *et al.*, 2008).

### **1.6.2. Efecto de temperatura y NaCl en *Pycnoporus sanguineus***

Se realizó un trabajo con tres basidiomicetos (*Microporus xanthopus*, *P. sanguineus* y *Comuna schizophyllum*) aislados de madera del bosque tropical de Papua, Nueva Guinea. En el estudio se caracterizó la relación de temperatura y salinidad por NaCl, y un hallazgo notable fue que *P. sanguineus* sufrió una disminución en el crecimiento en función de la salinidad que fue similar a la de *Microporus xanthopus*. *Pycnoporus sanguineus* sólo puede ser considerado más tolerante a la sal que *Microporus xanthopus* (Castillo y Demoulin, 1997).

### **1.7. Aplicación de compuestos químicos producidos e identificados en *Pycnoporus sanguineus***

*Pycnoporus sanguineus* se utilizó en medicina popular desde tiempos antiguos y ha sido objeto en la búsqueda de sustancias antivirales, antibacterianas y antifúngicas a partir de sus metabolitos secundarios (Hwang *et al.*, 2004). La habilidad más destacada de este género es la sobreproducción de dos enzimas ligninolíticas: la enzima lacasa con alto potencial redox y la multicobre fenol oxidasa. La importancia radica en la variedad de lacasas, las cuales realizan una biotransformación de productos agrícolas y materia prima vegetal en productos de valor agregado como: biopulpeo y bioblanqueamiento de la pulpa del papel. Así como la contribución de estas enzimas en la biodegradación de organocontaminantes, xenobióticos y contaminantes industriales (Lomascolo *et al.*, 2011). Se han encontrado cuatro tipos de ergostanol en micelios cultivados de *P. sanguineus*, incluyendo ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (1), 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -dihydroxyergosta-7,22-dien-6-ona (2), 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -trihidroxi-ergosta-7,22-dien-6-ona (3), y 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -trihidroxi ergosta-7,22-dieno (4),

lya que tienen un efecto antiinflamatorio al inhibir la liberación de óxido nítrico (Kuang *et al.*, 2010).

Los principales compuestos producidos por *P. sanguineus* que tienen actividad antimicrobiana son:

#### **1.7.1. Poliporin**

La actividad antimicrobiana de *P. sanguineus* se conoce desde 1946, cuando se aisló un compuesto activo (poliporin) contra bacterias Gram (+) y Gram (-), y el cual no tuvo toxicidad contra animales de experimentación (Rosa *et al.*, 2003).

#### **1.7.2. Cinnabarina**

Es una sustancia antibiótica producida por *P. sanguineus* (Smânia *et al.*, 1998). Es un pigmento naranja que tiene una estructura básica 3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C-2 y un grupo hidroxilo en C-9 (Achenbach y Blümm, 1991 y Gripenberg, 1951). Smânia *et al.* (1995, 1997) demostraron que la cinnabarina tuvo una actividad antimicrobiana en los casos de *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* y diversas especies de *Streptococcus* y su actividad fue mayor en bacterias Gram (+) que Gram (-).

Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) sometieron a cromatografía de capa fina de los extractos obtenidos de basidiocarpos de *P. sanguineus* y observaron cinco bandas visibles entre naranja y amarillo, de las cuáles la primera presentó un Rf de 0.28, cercana al ácido cinabarínico (Rf 0.39) (Pérez-Silva *et al.*, 1988), dos bandas bien definidas que corresponden a cinnabarina con Rfs de 0.41 y 0.45 y otras dos bandas amarillas con Rfs de 0.57 y 0.75 (Pérez *et al.*, 1988).

#### **1.7.3. Ácido cinabarínico y tramesanguina**

Estos compuestos se encuentran en el extracto de *P. sanguineus* ya que son derivados de la cinnabarina, las cuales imparten el color rojo o anaranjado en los cuerpos fructíferos del género *Pycnoporus* (Eggert *et al.*, 1995).

### **1.8. Enfermedades postcosecha causadas por bacterias y hongos**

Algunas bacterias y hongos fitopatógenos causan enfermedades postcosecha provocando serios problemas económicos por las pérdidas en la producción de frutas y hortalizas. Algunas de estas enfermedades son las siguientes:

### 1.8.1. El fuego bacteriano

Esta enfermedad se presenta básicamente en precosecha, ataca a casi toda la planta (flores, brotes, hojas, frutos, ramas y tronco), siendo los frutos uno de sus preferidos. La enfermedad, causada por *Erwinia amylovora*, se considera como la más devastadora de frutales de pepita en algunos países de Europa y Norteamérica. Es extremadamente peligrosa para el cultivo de peral y manzano. Los frutos pueden ser atacados desde el inicio de su formación hasta la madurez. La bacteria penetra a través de las lenticelas o heridas, especialmente en lesiones producidas por granizo. Un síntoma característico y peculiar de esta enfermedad es la producción de exudados bacterianos en los órganos afectados (Figura 3) (Palacio *et al.*, 2008). Es importante conocer la naturaleza del patógeno, la fisiología del hospedante y la manera de cómo afecta a ambos. Tras una explosión de fuego bacteriano en Egipto, en el período 1982-1984, en peral de la variedad Le Conte, en 1985 se registraron pérdidas en la cosecha cercanas al 95% (Van der Zwet y Beer, 1995). Otro producto susceptible al tizón bacteriano es la manzana cultivada Chihuahua, en México, principal zona productora, al igual que en otros países del mundo donde se cultivan especies como el manzano (*Malus sylvestris* var. domestica). Para estos cultivos, *E. amylovora*, es un grave problema. Los efectos de la enfermedad son devastadores y los árboles infectados pueden llegar a morir. En la flor, los estigmas son el sitio principal para el desarrollo de altas poblaciones epifíticas; aún en climas secos, donde la infección puede desarrollarse durante períodos ocasionales de alta humedad causados por lluvia o irrigación excesiva (Romo-Chacón *et al.*, 2011).



Figura 3. Fuego bacteriano causado por *Erwinia amylovora* en pera  
(Tomado de Palacio *et al.*, 2008).

### 1.8.2. Marmoleado

El marmoleado es una enfermedad causada por *Pectobacterium carotovorum* y afecta principalmente a cultivos de regiones subtropicales y templadas (Alippi *et al.*, 1997). Es una pudrición blanda que ataca al tejido rápidamente a temperatura ambiente. Los más afectados son zanahoria, lechuga, apio, cebolla y papa (Figura 3). Esta pudrición, en la papa, provoca pérdidas significativas de hasta 100% durante el almacenamiento de los tubérculos (Franco *et al.* 2007).

De acuerdo con Franco y Stefanova (2008), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (= *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Jones 1901) y *Dickeya chrysanthemi* (= *Erwinia chrysanthemi* Burkholder, McFadden & Dimock 1953) tienen una distribución mundial y se consideran las bacterias patógenas de mayor importancia en el cultivo de la papa desde el punto de vista comercial, causando grandes pérdidas que han sido estimadas entre 50 y 100 millones de dólares anuales a nivel mundial (Benelli *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2004, Burr *et al.*, 2006). Estas especies causan pudriciones blandas en los tubérculos y pie negro en los tallos de papa. El desarrollo de la enfermedad se debe a la acción de enzimas extracelulares producidas por estas bacterias. Para la especie *Dickeya chrysanthemi*, la mayor virulencia de las cepas en estudio fue vinculada con una elevada actividad pectato liasa y celulasa mientras que para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Franco y Stefanova, 2008), con una alta actividad poligalacturonasa estas enzimas degradan la pared celular de las plantas, lo cual conlleva a la maceración de los tejidos y la liberación de nutrientes para el crecimiento bacteriano (Toth *et al.*, 2003).



Figura 4. Marmoleado en lechuga, zanahoria y papa causado por *Pectobacterium carotovorum* (Tomado de Sommer *et al.*, 2002)

### 1.8.3. Antracnosis

La antracnosis es causada por especies de *Colletotrichum*, tales como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, y *C. demantium*. Estas especies atacan el fruto, primordialmente en el campo, pero la enfermedad puede desarrollarse después de la cosecha. Las lesiones de antracnosis se desarrollan como lesiones hundidas, circulares, de color canela o café claro, en fruta madura o casi madura (Figura 5). *Colletotrichum gloeosporioides* causa antracnosis en muchos frutos, como manzana, aguacate, mango y papaya (Sommer *et al.*, 2002). Las lesiones se pueden formar en cualquier parte del fruto; inicialmente son superficiales y sólo penetran hasta la pulpa cuando las lesiones se encuentran cubriendo gran parte de la superficie del fruto. Los frutos tiernos infectados mantienen la enfermedad en un estado de latencia. Los daños de antracnosis son más visibles cuando los frutos inician su madurez fisiológica. La enfermedad afecta la calidad y reduce sus posibilidades de comercialización (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005). Aun cuando no existen datos estadísticos precisos, se estima que las pérdidas poscosecha por antracnosis en mango fluctúan entre 30 y 60% del total de la producción (Allende *et al.*, 2000).

La antracnosis en fresa es causada por *C. acutatum*, *C. fragariae*, y *C. gloeosporioides*. Las tres especies incitan a la enfermedad, presentando lesiones de pecíolo y estolones en las plantas cultivadas en todo el mundo, pero puede pasar desapercibidas en lugares frescos y secos en los que causan poco daño a las plantas. *Colletotrichum fragariae* se asocia más con antracnosis, pudrición de la corona, pecíolo, estolones e infecciones de raíz de fresas cultivadas en zonas calientes y zonas húmedas, como el sudeste de Estados Unidos, su gama de huéspedes se limita a las fresas y un poco de maleza (Curry *et al.*, 2002). En otros casos, *C. fragariae* ataca frutos inmaduros de chirimoya: En este caso, el hongo, presenta fases de preinfección, infección y colonización bien definidas. El ciclo de la enfermedad se completa en 72 h (Villanueva-Arce *et al.*, 2006).

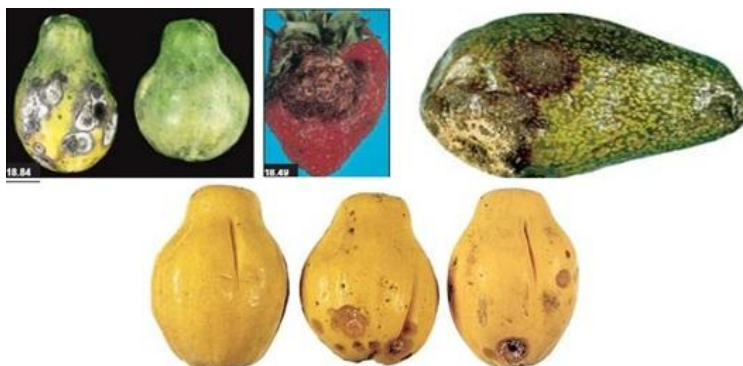


Figura 5. Antracnosis en frutos de fresa, aguacate y papaya (Sommer *et al.*, 2002)

## 1.9. Alternativas y mecanismos de control de enfermedades postcosecha

### 1.9.1. Control químico

La aplicación de químicos a las plantas para prevenir o inhibir el desarrollo de enfermedades es fundamental en el manejo de las enfermedades causadas por hongos. El modo de acción biológica de un fungicida puede ser expresada por uno o dos rutas de los efectos físicamente visibles: inhibición de la germinación de esporas e Inhibición del crecimiento del hongo. El modo fisiológico de acción de los fungicidas puede ser clasificado en cuatro grupos (Matheron, 2001):

- 1) Inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Actúan a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Entre ellos existen las carboxamidas y las estrobilurinas tienen la particularidad de actuar sobre hongos externos (oidios) e internos (mildius) (CASAFE, 2012).
- 2) Inhibidores de enzimas. Son muy importantes en hortifruticultura y pueden sustituir tratamientos de azufre y cobre (CASAFE, 2012).

Algunos fungicidas como maneb, manzate, dithane conocidos como ditiocarbamatos, actúan bloqueando grupos SH en aminoácidos, proteínas y enzimas, provocando su inactivación (Matheron, 2001).

- 3) Inhibidores del metabolismo de ácidos nucleicos y síntesis de proteínas. Los Imidazoles alteran la biosíntesis de tubulina impidiendo la división celular.

Los fenilcarbamatos actúan de igual manera, aunque se utilizan más los bencimidazoles, en mayor dosis para evitar resistencia y debido a que tienen una mayor selectividad (CASAFE, 2012).

- 4) Inhibidores de biosíntesis de esteroides (ergosterol). Inhibidores de enzimas o procesos enzimáticos en la biosíntesis del esteroide. Los esteroides están localizados en las membranas celulares y le confieren estabilidad y control de la permeabilidad. Algunos ejemplos son: triazoles, imidazoles, piperazinas, pirimidinas entre otros (Orozco- Santos, 2008)

### 1.9.2. Biocontrol

Las pérdidas postcosecha implican una inversión de dinero, tiempo de producción y distribución para la venta al consumidor final por lo que existen regiones productoras de frutas y hortalizas afectadas (Cruz-Muñoz, 2012). El uso de productos químicos en el control de enfermedades de las plantas (v. g. benzimidazoles, hidrocarburos aromáticos, inhibidores de la biosíntesis de los esteroides, etc.) es muy común; sin embargo, hay una serie de problemas en contra del uso eficaz de estos productos en áreas donde los hongos han desarrollado resistencia. Mayores

concentraciones de estos químicos aumentan el riesgo de residuos tóxicos de alto nivel en los productos (Tripathi y Dubey, 2004) por lo que surgió el biocontrol como alternativa a la toxicidad de los fungicidas y antimicrobianos. De acuerdo con Baker y Cook (1974) el término biocontrol se define como el uso de una fuente natural de microorganismos, los cuales suelen ser antagonistas a los patógenos en postcosecha que deseamos eliminar. Más recientemente, de acuerdo con Serrano y Galindo (2007) el biocontrol o control biológico se define como el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. Ejemplo de un caso de biocontrol se tiene el trabajo realizado por Poveda (2006), en el que utilizó extractos fúngicos extracelulares (EFE) de especies de *Penicillium*, *Beauveria*, *Aspergillus* y *Phyalophora* en la germinación esporas de *Botrytis cinerea* y se encontró una inhibición entre el 85% y 90%.

**1.9.2.1. *Pycnoporus sanguineus* como agente de biocontrol de bacterias fitopatógenas.** El extracto de *P. sanguineus* mostró un efecto en la esporulación y la germinación de esporas de *Pseudocercospora griseola* y es una alternativa de control del tizón bacteriano de frijol por medio de la inducción de enzimas de la defensa como la peroxidasa y polifenoloxidasas (Viecelli *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista de control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, se han utilizado los extractos acuosos y metanólicos de *P. sanguineus* como agentes de biocontrol contra hongos de los géneros *Trametes*, *Lentinus*, *Microporus*, *Gloeophyllum* y *Eariella*, los cuales atacan a los árboles de caucho y provocan pérdidas económicas en la elaboración de artículos de esta madera (Teoh *et al.*, 2011).

**1.9.2.2. Producción de extractos de *P. sanguineus* con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas.** Se observó un efecto fungicida contra hongos fitopatógenos, obteniéndose una reducción del 70 y 60% del crecimiento de *Botrytis cinerea* con la adición de 10, y 20 mg mL<sup>-1</sup> del extracto crudo del pigmento de *P. sanguineus*, respectivamente. Para *C. fragarie*, la inhibición fue mayor al 50% y sólo del 40% para *C. gloeosporioides*. En el caso de las bacterias fitopatógenas, se determinó la concentración mínima inhibitoria para *Erwinia amylovora* (H1>12 mg mL<sup>-1</sup>; H2, 7 mg mL<sup>-1</sup>) y *Pectobacterium carotovorum* (H1, 10 mg mL<sup>-1</sup>; H2, >12 mg mL<sup>-1</sup>); así como para las bacterias de interés clínico *Salmonella typhi* (8 mg mL<sup>-1</sup>), *Bacillus cereus* (H1, 8 mg mL<sup>-1</sup>; H2, 10 mg mL<sup>-1</sup>), *Klebsiella pneumoniae* (>12 mg mL<sup>-1</sup>) y *Shigella dysenteriae* (8 mg mL<sup>-1</sup>) (Cruz-Muñoz, 2012).

## LITERATURA CITADA

- Achenbach, H., E. Blümm. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch. Pharm. 324: 3-6.
- Acosta-Urdapilleta, L., G. A. Alonso-Paz, A. Rodríguez, M. Adame, D. Salgado, M. Montiel-Peña, F. Medrano-Vega, y E. C. Villegas-Villarreal. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico In: Martínez-Carrera, D., N. Cuvetto, M. Sobal, P. Morales, y V. M. Mora (eds). Hacia un Desarrollo sustentable de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Puebla. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. pp: 531-562.
- Alexopoulos, C.J., C. W. Mims, M. Blackwell. 1996. Phylum Basidiomycota order Aphyllophorales, Polyporales, Chantharellales, tooth fungi, coral fungi and corticioids. In: Harris D (ed) Introductory Mycology. 4th Ed. New York, USA, Wiley and Sons Inc. pp: 563–597.
- Alippi, A. M., E. Dal Bó, L. B. Ronco, P. E. Casanova. 1997. Tomato as a new host of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Argentina. Plant Disease 81: 230.
- Allende, M.R., R. C. Juárez, E. R. S. García, F. A. Carrillo. 2000. Control biológico de antracnosis en frutos de mango Keitt en Culiacán, Sinaloa. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Control biológico. Guanajuato, Gto. México. pp. 219-222.
- Alves, A., E. Record, A. Lomascolo, K. Scholtmeijer, M. Asther, J.G.H. Wessels, H.A.B. Wosten . 2004. Highly efficient production of laccase in the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl. Env. Microbiol. 70: 6379–6384.
- Asther, M., A. Lomascolo, A. Mi, S. Moukha, L. Lesage-Meessen. 1998. Metabolic pathways of biotransformation and biosynthesis of aromatic compounds for the flavour industry by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Mycologia Neotropical Aplicada 11: 69–76.
- Baker, K. F. and R. J. Cook. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. San Francisco: W. H. Freeman 433 p.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev. 30: 215–242.



- BDMTM-APMTM. 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Biblioteca Digital de La Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Disponible en: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Oreja\\_de\\_palo&id=8038](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Oreja_de_palo&id=8038) (fecha de consulta: 13/03/2015).
- Benelli, A., N. Denardin, C. Forcelini, V. Duarte. 2004. Reacão de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. Fitopatol. Bras. 29: 155-159.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ...5.1 million species? Am J Bot 98:426–438.
- Burr, T., M. Barnard, M. Corbett, C. Pemberton, N. Simpson, G. Salmond. 2006. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora* the VirR repressor. Molecular Microbiology 59: 113–125.
- Carrillo-Fasio, J.A., R.S. García-Estrada, M.D. Muy-Rangel, A. Sañudo-Barajas, I. Márquez-Zequera, R. Allende-Molar, Z. De la Graza-Ruiz, M. Patiño-Vera, E. Galindo-Fentanes. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 23: 24-32.
- CASAFE. 2012. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina. Fungicidas. Disponible en: <http://www.casafe.org.ar/pdf/Fungicidas.pdf> (fecha de consulta:15/11/12)
- Castillo, G., V. Demoulin. 1997. NaCl salinity and temperatures effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. Mycol. Res. 101: 341-344.
- Chanona, G.F., G. R.H., Andrade, A.J., Castellanos y J.E., Sánchez. 2007. Macromicetos del parque educativo Laguna Bélgica, Municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 78: 369-381.
- Cruz-Muñoz, R. 2012. Producción de extractos de *Pycnoporus sanguineus* con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas. Tesis de Maestría. UPIBI-IPN, México, DF. pp. 64.
- Curry, K. J., M. Abril, J. B. Avant, B. J. Smith. 2002. Strawberry anthracnose: histopathology of *C. acutatum* and *C. fragariae*. Phytopathology 92: 1055-1063.

- Duarte, V., S. DE Boer, L. Ward, A. De Oliveira. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 535–545.
- Eggert, A., U., Temp, J.F.D., Dean, and K.E., Eriksson. 1995. Laccase mediated formation of phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Letters* 376:202-206.
- Eggert, C., U., Temp, K.E.L., and Eriksson. 1996. The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1151–1158.
- Estrada-Alvarado, I., D., Navarro, E., Record, Mi A, M., Asther. 2003. Fungal biotransformation of p-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:157–160.
- Eugenio, M.E., J.M., Carbajo, J.A., Martin, A.E., Gonzalez, and J.C., Villar. 2009. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *J. Basic Microbiol.* 49:433–440
- Franco, C.Y., N.M. Stefanova, I.M.F. Coronado. 2007. Patofenicidad y virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya Chrysanthemi* en papa (*solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad* 11:15-18.
- Franco, C.Y., y Stefanova N.M. 2008. Determinación de actividades enzimáticas implicadas en la virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* aisladas de papa. *Agro Sur* 36: 130-136.
- Gil, E.S., L., Muller, M.F., Santiago, and T.A., Garcia. 2008. Biosensor based on brut extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for environmental analysis of phenolic compounds. *Portugaliae Electrochimica* 27: 215-225.
- Gomez-Alarcon G, C., Saiz-Jimenez, R., Lahoz. 1989. Influence of tween 80 on the secretion of some enzymes in stationary cultures of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbios* 60:183–192.
- Gripenberg, J. 1951. Fungus pigment. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. *Acta Chem. Scand.* 12: 590-59.

- Gross B., M., Asther, G., Corrieu, P., Brunerie. 1991. Production de vanilline par bioconversion de précurseurs benzéniques. European Patent no. 0453368a.
- Guzmán, G. 1979. Identificación de los Hongos Comestibles, Venenosos y Alucinantes y destructores de la Madera. Ed. Limusa. México, D.F. 452 p.
- Halaoui S., A., Mi, K., Kruus, L., M., Guo Hamdi, J.C., Sigoillot M., Asther, A., Lomascolo. 2005. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. J. Appl. Microbiol. 98:332–343.
- Herpoël, I., H., Jeller, G., Fang, M., Petit-Conil, R., Bourbonnais, J-L., Robert, M., Asther, J-C., Sigoillot. 2002. Efficient enzymatic delignification of wheat straw pulp by a sequential xylanase-laccase treatment. J. Pulp Paper Sci. 28:67–71.
- Holler, JR., J. C., Brooks. 1980. Nutritional studies of *Pycnoporus cinnabarinus*. Mycologia 72:329–337.
- Hoshida, H., T., Fujita, K., Murata, K., Kubo, R., Akada. 2005. Copperdependent production of *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69:1090–1097.
- Hwang, H. J., S. W., Kim, C. P., Xu, J. W., Choi, J. W., Yun. 2004. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96: 1296-1305.
- Kirk, P.M., J.C., Cannon, J.A., Stalpers. 2001. Dictionary of the fungi. CAB International, U.K. pp. 438-450.
- Kuang, L.M., H.O., Lin, F.L., Hsu, Y.L., Lin. 2010. Anti-inflammatory principles of cultivated *Pycnoporus sanguineus*. J. Chin. Med. 21 (3):75-83.
- Lesage-Meessen, L., M., Haon, M., Delattre, J-F., Thibault, B., Colonna-Ceccaldi, M., Asther. 1997. An attempt to channel the transformation of vanillic acid into vanillin by controlling methoxyhydroquinone formation in *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:393–397.

- Lomascolo, A., E., Record, I., Herpoël-Gimbert, M., Delattre, J.L., Robert, J., Georis, T., Dauvrin, J.C., Sigoillot, M., Asther. 2003. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J. Appl. Microbiol.* 94:618–624.
- Lomascolo, A., J.L., Cayol, M., Roche L., Guo, J.L. Robert, E., Record, L., Lesage-Meessen, B., Ollivier, J-C., Sigoillot, M., Asther. 2002. Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycol. Res.* 106:1193–1203.
- Lomascolo, A., E. Uzan-Boukhris, I. Herpoël-Gimbert, J. C. Sigoillot, L. Lesage-Meessen. 2011. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92:1129–1149.
- Luna, M. J., M. A. Murace, J. D. KEIL, M. E. OTAÑO. 2004. Patterns of decay caused by *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma lucidum* (Aphyllophorales) in poplar wood. *IAWA J.* 25: 425-433.
- Matheron, M. 2001. Modes of Action for Plant Disease Management Chemistries. Conference Annual Desert Vegetable Crop Workshop. The University of Arizona. <http://ag.arizona.edu/crop/diseases/papers/dischemistry.html> (fecha de consulta: 15/03/15)
- Meza, J.C., J.C., Sigoillot, A., Lomascolo, D., Navarro, R., Auria. 2006. New process for fungal delignification of sugar-cane bagasse and simultaneous production of laccase in a vapor phase bioreactor. *Agric. Food Chem.* 54:3852–3858.
- Mitsutomi, M., A., Ohtakara. 1988. Isolation and identification of oligosaccharides produced from raffinose by transgalactosylation reaction of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.* 52:2305–2311.
- Mitsutomi, M., J., Honda, A., Ohtakara. 1991. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides by the condensation action of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38:722–728.

- Mitsutomi, M., Y., Uchida, A., Ohtakara. 1985. Immobilization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme. J. Ferment. Technol. 63:325–329.
- Moukha, S.M., T.J., Dumonceaux, E., Record, F.S., Archibald. 1999. Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase. Gene 234:23–33.
- Nobles, M.K., B.P., Frew. 1962. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes.V. The genus *Pycnoporus* Karst. Can. J. Bot. 40:987–1016.
- Oddou, J., C., L., Stentelaire, M., Lesage-Meessen, B., Asther, Colonna -Ceccaldi. 1999. Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:1–6.
- Ohtakara, A. 1988. Chitinase and  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. Methods Enzymol. 161:462–470.
- Ohtakara, A., M., Mitsutomi. 1987. Immobilization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitosan beads and its application to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses. J. Ferment. Technol. 65:493–498.
- Orozco-Santos, M. 2008. Nuevos mecanismos de Acción de Fungicidas en la Agricultura. Reunión de Agricultura Protegida. Disponible en:  
[http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/extranet/\\$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/extranet/$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf) (fecha de consulta: 13/03/15).
- Palacio, A., Cambra M., López M., Ordax M., Peñalver J., Gorris M., Cambra M., Marco-Noales E., Llop P., Biosca E., Roselló M., Montesinos E., Llorente I., Badosa E., Cabrefiga J., Bonaterra A., Ruz L., Moragrega C., Francés J. y Díaz C. 2008. El fuego bacteriano: la enfermedad. En: El fuego Bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Palacio, A. Y Cambra M. (Ed). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino., Zaragoza-España. pp. 13-48.
- Pérez, S. E., A.E., Aguirre, A., Pérez. 1988. Aspectos sobre uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporace) en México. Revista Mexicana de Micología 4:137-144.

- Poveda, P.D.C. 2006. Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C. pp. 48-59
- Quiroz, C. R.E., M.N., Pérez, A. C., Martínez, U.L., Acosta, M. J., Folch. 2010. Evaluation of different lignocellulosic substrates for production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation* 22:565-572.
- Rifat, A., S., Paramaswari, A., Noorlidah, M. Sekaran, S., Vikineswary. 2003. Optimization of laccase productivity during soil substrate fermentation of sago hampas by *Pycnoporus sanguineus*. *Malaysian Journal of Science* 22:35-42.
- Romo-Chacón, A., D.I. Berlanga-Reyes, V. M. Guerrero-Prieto, R. Martínez-Campos, S. Romero-Gómez, M.R. Ramírez-Legarreta. 2011. Manejo de *Erwinia amylovora* con aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) y estudio de resistencia a estreptomycin en arboles de manzano cv. 'Golden Delicious'. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29: 119-132.
- Rosa, L.E., M. K.M., Gomes, J.C., Cristina, M., Capelari, R.C., Augusto, Z.C., Leomar. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 967-974.
- Ryvarden, L., I., Johansen. 1980. A preliminary polypore flora of East Africa. *Synopsis Fungorum* 5. Fungiflora, Oslo.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5. Fungiflora, Oslo.
- Serrano, C.L., F. E., Galindo. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia enero-marzo*:77-88.
- Sigoillot, J.C. 2002. Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* 31:876–883.
- Smânia, A. Jr., F., Delle Monache, E. F. A., Smânia, M. L., Gil, L.C., Benchetrit, 1995. Cruz, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol.* 45:177-181.

- Smânia, E. F. A., A. Jr., Smânia, C., Loguercio-Leite, M. L., Gil. 1997. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. J. Chem. Biotechnol. 70:57-59.
- Smânia, E.F.A., A. Jr., Smânia, L.C., Loguercio. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. Rev. Microbiol. 29: 129-136.
- Sommer, N.F., J. Fortalage, D. C. Edwards. 2002. Postharvest Diseases of selected commodities. En Kader, A. A. (Ed.), Postharvest Tecnology of Horticultural Crops. University of California. pp. 223-227
- Sullivan, G., E.D., Henry. 1971. Occurrence and distribution of phenoxazinone pigments in the genus *Pycnoporus*. J. Pharmaceutical Sci. 60:1097–1098.
- Teoh, Y.P., M.M., Don, S., Ujang. 2011. Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and Gc-MS study by *Pycnoporus sanguineus*. BioResources 6: 2719-2731.
- Toth, I., K. Bell, M. Holeva, P. Birch. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology. 4: 17-30.
- Tripathi, P., and N. K. Dubey. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruits and vegetables. Postharvest Biology and Technology 32:325-245.
- Uzan, E., P., Nousiainen, V., Balland, J., Sipila, F., Piumi, D., Navarro, M., Asther, E., Record, A., Lomascolo. 2010. High redox potential laccases from the lignolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *P. sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. J. Appl. Microbiol. 108:2199–2213.
- Van Der Zwet, T., Beer, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A practical guide to integrated disease management. United States Department of Agriculture (USDA). Agriculture Information Bulletin. pp. 631, 83.
- Viecelli, C.A., J.R., Stangarlin, O.J., Kuhn, K.R.F., Schwan-Estrada. 2010. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. Summa Phytopathologica 36: 73-80.

- Vikineswary, S., N., Abdullah, M., Renuvathani, M., Sekaran A., Pandey, E.B.G., Jones. 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour. Technol.* 97:171–177.
- Vikisneswary, S., N., Abdullah, M., Renuvathai, M., Sekaran, A., Pandey, E.B.G., Jones. 2007. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of antraquinonic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 41:368-376.
- Villanueva-Arce, R., E. Cárdenas-Soriano, A.M. Hernández-Anguiano, A. Mora-Aguilera, D. Téliz-Ortiz. 2006. Patógenesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. 2006. *Agrociencia.* 40: 773-782.
- Zulfadhly, Z. M.D., Mashitah, S., Bhatia. 2000. Heavy metals removal in fixed-bed column by macro fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Environment Pollution.* 112: 463-470.



## **CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS DE *Pycnoporus sanguineus* EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO**

### **RESUMEN**

*Pycnoporus* es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos que tiene un potencial lignocelulítico; los metabolitos secundarios de este hongo son importantes en la búsqueda de sustancias antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento y la producción del pigmento de *P. sanguineus* en diferentes medios de cultivo sólido, para lo cual se utilizaron basidiocarpos de *P. sanguineus* que se obtuvieron de material vegetal en descomposición de árboles de casuarina (H1) y mango (H2). Se determinaron las condiciones de crecimiento y producción del pigmento naranja del hongo bajo un diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial. Los factores y niveles fueron: medio de cultivo (agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar harina integral de trigo, agar extracto de casuarina y agar extracto de mango) y pH (7.0, 8.0 y 9.0) durante 30 d. Las variables respuesta fueron diámetro de la colonia (mm), velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ), concentración del pigmento naranja ( $mg mL^{-1}$ ) y cantidad de pigmento extraído (mg). Con los datos se realizó una ANDEVA y las medias se compararon con contrastes ortogonales ( $p \leq 0.05$ , 0.01, 0.001). Las condiciones óptimas de crecimiento para el aislamiento H1 fueron: agar extracto de casuarina a pH 7.0 y 9.0; mientras que para H2 fueron agar extracto de mango a pH 7.0. La mayor velocidad de crecimiento en ambos casos se presentó en el medio de cultivo con el extracto de donde fueron aislados. Las mayores concentraciones del pigmento se obtuvieron en agar papa dextrosa y agar extracto de malta con 0.0175 y 0.0168  $mg mL^{-1}$  para H1 y H2 ( $p \leq 0.05$ ), respectivamente. La mayor cantidad de pigmento extraído se obtuvo en agar papa dextrosa y agar extracto de mango pH = 7.0 de 55.6 y 57.1 mg, para H1 y H2, respectivamente ( $p \leq 0.05$ ).

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Los hongos producen una amplia gama de productos derivados del metabolismo secundario (Calvo *et al.*, 2002) tales como antibióticos, enzimas, colorantes, y otros productos. Actualmente, se conocen casi 75 000 especies de hongos filamentosos, pero es probable que existan más de cinco millones (Blackwell, 2011). Las especies de hongos pertenecientes al género *Monascus* se han estudiado desde hace muchos años y son potenciales productores de pigmentos naturales

(Carvalho *et al.*, 2007; Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002). Los hongos basidiomicetos producen pudriciones blancas en la naturaleza y forman un grupo ecológico importante (Lomascolo *et al.*, 2011); de éstos, las especies del género *Trametes* son las más eficientes degradadoras de lignina por su producción de enzimas lignolíticas (Cilerdzic *et al.*, 2011) como lacasa, peroxidasa manganasa, peroxidasa lignina, celobiosa deshidrogenasa y 2-oxidasa piranosa (Nyanhongo *et al.*, 2007). Algunas especies de hongos de la familia Polyporaceae, aparte de ser degradadores de madera, producen pigmentos, generalmente derivados de ácidos polipóricos y terpenilquinones (Velíšek y Cejpek, 2011). Dentro de esta familia, *Pycnoporus* es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos que también tiene un potencial lignocelulítico (Alexopoulos *et al.*, 1996) el cual se ha vinculado con el género *Trametes* por su similitud de caracteres, a excepción del color rojo brillante característico que posee *Pycnoporus* (Ryvarden, 1991). Lomascolo *et al.* (2011) mencionan que existen cuatro especies de este género distribuidas en el mundo; *P. cinnabarinus*, *P. puniceus*, *P. sanguineus* y *P. coccineus*. Los pigmentos de este hongo son compuestos derivados de la cinabarina (ácido cinabarínico y la tramesanguina) los cuales imparten el color rojo o anaranjado característico de los basidiocarpos (Eggert *et al.*, 1996).

Además de la producción de pigmentos, las especies del género *Pycnoporus* tienen el potencial biotecnológico por su poder lignocelulítico y por la producción de enzimas como lacasa, tirosinasa, celobiosadeshidrogenasa, quinasa, invertasa, xilasa (Lomascolo *et al.*, 2011). En el campo de la medicina popular, los basidiocarpos de *P. sanguineus* son utilizados por los pobladores del Brasil como antihemorrágicos (Rosa *et al.*, 2003). Las lacasas reducen el efecto de la dermatitis por lo que ayudan a disminuir lesiones de la piel provocadas por hiedra venenosa (Madhavi y Lele, 2009). Además, ha aumentado la búsqueda de compuestos antivirales, antioxidantes, antifúngicos, y antibacterianos en los metabolitos secundarios de este hongo para aprovechar todo su potencial en varios campos de la industria (Hwang *et al.*, 2004). Así, Smânia *et al.* (2003) analizaron la actividad antiviral de los extractos crudos de *P. sanguineus* contra el virus de la rabia y estudiaron la citotoxicidad, mostrando que no causa lesión sistémica detectable o la muerte en animales de laboratorio. Por su parte, Borderes *et al.* (2011) observaron actividad antioxidante de los metabolitos secundarios de los extractos de *P. sanguineus* y desde el punto de vista de control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, los extractos acuosos y metanólicos de *P. sanguineus* se usan como agentes de biocontrol contra hongos de los géneros *Trametes*, *Lentinus*, *Microporus*, *Gloeophyllum* y *Eariella*, los cuales dañan a los árboles de caucho y provocan pérdidas económicas en la elaboración de artículos (Teoh *et al.*, 2011). Los principales compuestos

producidos por *P. sanguineus* son poliporin, cinnabarina, ácido cinabarínico y tramesanguina (Rosa *et al.*, 2003; Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010). El poliporin tiene efecto en bacterias Gram positivas y Gram negativas, y no presenta efectos tóxicos en animales de experimentación (Rosa *et al.*, 2003). Por su parte, la cinabarina es un pigmento naranja con una estructura básica 3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C-2 y un grupo hidroxilo en C-9 (Achenbach y Blümm, 1991 y Gripenberg, 1951); tiene actividad antibiótica contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.*, así como una mayor actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas que negativas (Smânia *et al.* 1995, 1997). De esta manera y con fines de evaluar la actividad antibacteriana de los pigmentos de este hongo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y la producción del pigmento de *P. sanguineus* en medios de cultivo sólido.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Estrategia Experimental

El proyecto se realizó en cuatro etapas, las cuales se presentan esquematizadas en la Figura 6.

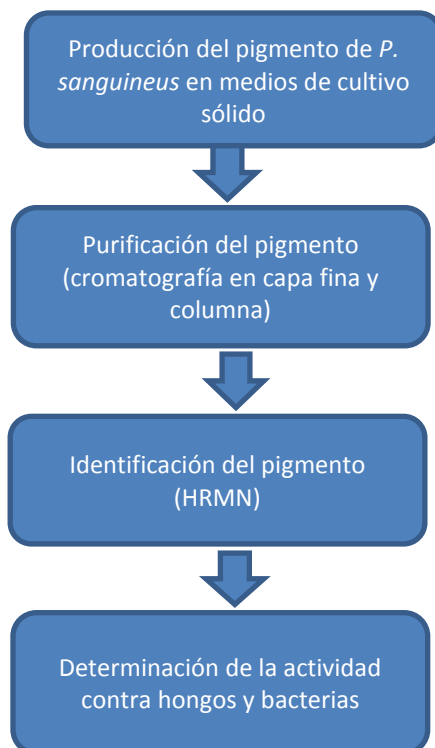


Figura 6. Etapas del proceso de investigación para la producción, purificación y evaluación de la actividad antimicrobiana del pigmento de *Pycnoporus sanguineus*.

### 2.2.2. Material biológico

De enero a septiembre del 2010 se colectaron cuerpos fructíferos (basidiocarpos) de hongos saprófitos de material vegetal en descomposición. El primer aislamiento (H1) se obtuvo de árboles de casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) de la localidad del Ejido de la Finca, Villa Guerrero, Estado de México (18°53'07" LN, 99°37' 36" LO, 1839 msnm). El segundo aislamiento (H2), se obtuvo de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) en Parácuaro, Michoacán (19° 08' 44" N, 102° 13' 09" O, 600 msnm). Los basidiocarpos colectados se trasladaron al Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional.





























































### 2.2.3. Aislamiento, purificación e identificación de *Pycnoporus sanguineus*

Del interior de los basidiocarpos se tomó una pequeña muestra de tejido y se colocó en el centro de cajas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) (BD Bioxon®, México) y se incubó a  $25 \pm 3$  °C por 3-5 d. Una vez que el hongo desarrolló, se tomaron porciones de medio de cultivo con micelio de la periferia de la colonia y se realizaron resiembras hasta la purificación del hongo. La identificación y caracterización se realizó a nivel molecular, por ello, se enviaron dos muestras de colonias puras (punta de hifa) al laboratorio de la Estación Nacional de Epidemiología Cuarentena y Saneamiento Vegetal en Querétaro, México, para la extracción del ADN ribosomal, y su posterior amplificación, secuenciación y alineamiento con las bases de datos del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

### 2.2.4. Producción del pigmento de *P. sanguineus* en medio de cultivo sólido

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción del pigmento de *P. sanguineus* en medio de cultivo sólido, se propuso un diseño experimental completamente al azar (DCA) en arreglo factorial (Figura 7), los factores y niveles evaluados fueron: medio de cultivo [agar papa dextrosa, agar extracto de malta (EMA), agar harina de trigo integral (HTIA), agar extracto de casuarina (ECA), para H1; y agar extracto de mango (EMaA) para H2] y pH (7.0, 8.0 y 9.0). Se tomaron discos de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de cultivo de 30 d de edad de ambos aislamientos y se depositaron en el centro de cajas Petri (100 mm de diámetro) con 25 mL de medio de cultivo. Se realizaron cinco repeticiones de cada tratamiento. Las cajas inoculadas se incubaron a temperatura ambiente ( $23 \pm 3$  °C) durante 30 d con luz blanca continua (850 lm). Las variables de respuesta fueron: diámetro de colonia (mm), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ;

calculada como  $r = r_0 e^{\mu t}$ , donde  $r$  es el radio en mm,  $t$  es el tiempo en horas y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento, según Baumer *et al.*, 2008), concentración del pigmento naranja ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) y cantidad de pigmento extraído (mg). El crecimiento de la colonia se midió diariamente y hasta los 30 d, mientras que la determinación de la concentración y cantidad del pigmento se realizó al finalizar el tratamiento (30 días).

PDA			EMA			AHTI			AC / AM		
pH			pH			pH			pH		
7.0	8.0	9.0	7.0	8.0	9.0	7.0	8.0	9.0	7.0	8.0	9.0
											
											
											
											
											

**Figura 7.** Arreglo de tratamientos para la producción del pigmento naranja de dos aislamientos de *P. sanguineus* (H1 y H2) en medios de cultivo sólido.

Al finalizar el periodo de evaluación, el medio sólido se secó en un horno de convección HCM-A45 (TecnLab Equipment, México) a  $35 \pm 2$  °C por 14 d. Después, se agregó 50 mL de acetato de etilo sobre la superficie de la capa seca de agar y se raspó hasta obtener el pigmento producido por el hongo. El extracto se dejó reposar durante cuatro días en oscuridad. Se tomó una muestra del pigmento extraído y se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Lambda XLS (Perkin Elmer, USA). Para determinar la concentración del pigmento ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), se realizó una curva tipo con concentraciones conocidas del colorante químico rojo de metilo (Sigma-Aldrich, MA, USA) y la concentración de pigmento se calculó por medio de la ecuación de regresión obtenida ( $y = 107.19x + 0.0001$ ). La cantidad de pigmento extraído se determinó por diferencia de masas (mg) de la capa seca de agar antes y después del proceso de extracción. Las muestras secas se colocaron en viales y se almacenaron a temperatura ambiente ( $23 \pm 3$  °C) hasta su uso.

Con los extractos secos en acetato de etilo, se realizó una cromatografía de capa fina para comparar los frentes de retención ( $R_f$ ) del pigmento producido por los aislamientos de *P. sanguineus* con el colorante rojo de metilo. Las muestras se colocaron en una placa cromatográfica 60 F<sub>254</sub> (Merck®, Alemania), las cuales fueron tratadas con acetato de etilo-metanol (1:2) como fase móvil. Además, se realizó un barrido espectrofotométrico, en una longitud de

onda de 200 a 700 nm, del pigmento obtenido. Finalmente, se leyó la absorbancia de alícuotas de 400 µL de cada muestra (extractos H1 y H2) diluídas con 400 µL de acetato de etilo en un espectrofotómetro Lambda XLS (Perkin Elmer, USA).

## **2.2.5. Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)**

### **2.2.5.1. Cromatografía en capa fina**

Se probaron varias mezclas de solventes para separar los pigmentos del extracto crudo obtenido, se consideró la polaridad de los solventes y se realizó una combinación de hexano:acetato de etilo (3:1, 2:1, 1:1). Se utilizaron placas cromatográficas con sílica gel 60 F<sub>254</sub>.

### **2.2.5.2. Cromatografía en columna abierta**

Se utilizó sílica gel 60 como fase estacionaria para el empacamiento de la columna (con una altura de 15 cm, aproximadamente). Previo al empacamiento, se le agregó hexano a la sílica y posteriormente se colocó en la columna. Se verificó que no existieran burbujas dentro, ya que estas causarían un grave problema y los compuestos no se separarían adecuadamente. Posteriormente, se agregó 1 g del extracto crudo, previamente se elaboró la “pastilla”, para lo cual se tomó una cantidad de sílica y mezcló con 1 g de extracto crudo de *P. sanguineus* con acetato de etilo. La mezcla se evaporó en el rotovapor para favorecer la adhesión del extracto a la sílica. La columna se eluyó, primeramente se empleó como fase móvil un sistema binario hexano-acetato, posteriormente sólo acetato de etilo y finalmente acetona y metanol. Se colectaron fracciones de 10 mL y se juntaron las que mostraron un patrón de corrimiento similar de acuerdo a sus R<sub>f</sub>s. Las fracciones obtenidas se evaporaron, pesaron y etiquetaron.

### **2.2.5.3. Fracciones secundarias obtenidas en la separación de columna abierta lote 1 y 2**

Se extrajo el pigmento de acuerdo con la metodología 2.2.4 para lograr su fraccionamiento se realizó en dos lotes en el primero se produjo 1.0436 g y en el segundo lote se produjo 2.2027 g de extracto crudo.

### **2.2.6. Identificación del pigmento**

La identificación de compuestos obtenidos por cromatografía a partir del extracto crudo del pigmento de *P. sanguineus*, se realizó mediante la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H RMN). Esta técnica permite identificar compuestos por las vibraciones que

tienen los átomos de hidrógeno a ciertas longitudes de onda. El resultado se presenta como desplazamientos en el eje de las 'x' a diferentes concentraciones en partes por millón (ppm), siendo estos influenciados en su comportamiento por los átomos de hidrógeno o carbono más cercanos.

Por otro lado, a cada fracción se le registró su espectro infrarrojo y se obtuvo de esta manera, mayor información sobre los grupos funcionales de los compuestos presentes en los pigmentos. La espectroscopia de infrarrojo muestra absorbancias a diferentes longitudes de onda, dependiendo de los grupos funcionales que se encuentren en el compuesto evaluado.

## 2.2.7. Determinación de la actividad contra hongos y bacterias

### 2.2.7.1. Determinación del efecto antifúngico

Las pruebas se realizaron con el hongo fitopatógeno *C. fragariae*, previamente cultivado en PDA. Se probaron tres concentraciones de los extractos crudos del pigmento de los aislamientos H1 y H2 (2.0, 5.0 y 10 mg mL<sup>-1</sup> de medio de cultivo) de *P. sanguineus*, los cuales se adicionaron al medio de cultivo (PDA) antes de solidificar. Se utilizó un fungicida comercial (Captan®) como control positivo en una concentración de 200 mg mL<sup>-1</sup>, el cual se agregó al medio PDA antes de solidificar. El control negativo fue el medio PDA con 1 mL de acetato de etilo. Se colocaron discos de PDA (5 mm de diámetro) con micelio del hongo en el centro de cajas Petri con medio de cultivo en todos los tratamientos. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Se utilizó un diseño completamente al azar. El arreglo de los tratamientos se muestra en la Figura 8.

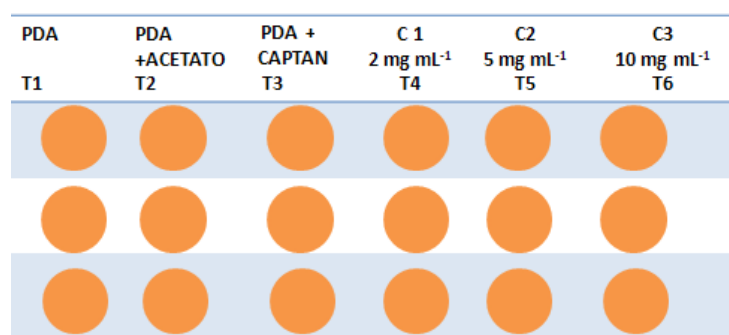


Figura 8. Tratamientos realizados para el control *in vitro* *Colletotrichum fragariae*

**2.2.7.2. Determinación del efecto fungistático** El efecto fungicida o fungistático de los extractos se determinó de la siguiente manera. Se tomaron discos de agar con micelio de *C. fragariae* de las cajas Petri en donde se presentó la inhibición y se colocaron sobre medio de cultivo sin fungicida. Las cajas ‘sembradas’ se incubaron en condiciones ambientales de 28 °C, y se determinó el efecto fungistático sí el hongo fitopatógeno logró reactivar su crecimiento, mientras que el efecto fungicida se determinó cuando no hubo reactivación del crecimiento de la colonia.

### **2.2.7.3. Determinación del efecto antibacteriano**

**2.2.7.3.1. Prueba de sensibilidad contra bacterias fitopatógenas.** Para determinar el efecto antibacteriano de los extractos de *P. sanguineus*, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer (Bailey y Finnegold, 1991; Koneman *et al.*, 1999). Las dos bacterias fitopatógenas utilizadas (*Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*) se reactivaron en medio agar MüllerHinton (AMH) y después en solución salina (0.9%) a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC por comparación óptica con un tubo a 0.5 de la escala nefelométrica de Mc Farland (Bailey *et al.*, 1991 y Koneman *et al.*, 1999). Se tomó una muestra de cada bacteria con un hisopo estéril y se sembró en cajas Petri con AMH de manera uniforme. Se colocaron sensidiscos previamente impregnados con los extractos de los aislamientos de *P. sanguineus* H1 y H2 a una concentración de 8 mg mL<sup>-1</sup>. Como controles positivos se colocaron sensidiscos con un antibiótico de amplio espectro (Cloranfenicol a 30 µg) y como controles negativos, sensidiscos impregnados con agua-alcohol 75% y acetato de etilo 25%. Las cajas inoculadas con las bacterias se incubaron durante 24 h a 28 °C  $\pm$  2 °C. Después del periodo de incubación se midieron los halos de inhibición (mm).

**2.2.7.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).** Se tomó una porción de masa bacteriana de una colonia de 24 h de edad, cultivada en AMH y se depositó en tubos con caldo de cultivo Müller Hinton (CMH) estéril. Los tubos se incubaron a 28 °C  $\pm$  2 °C por 24 h, para las fitopatógenas. Después del periodo de incubación, los cultivos de bacterias, se agregaron a otro tubo con CMH estéril a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC (tubo 0.5 de la escala de McFarland). Por otra parte, se hicieron ocho concentraciones diferentes (0.75, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0 y 12.0 mg/mL) de los pigmentos de H1 y H2 disueltos en agua-alcohol (75%) y acetato de etilo (25%). En placas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) se agregaron 50 µL de cada concentración del pigmento en cada pozo, el cual ya contenía 50 µL del medio de cultivo con bacteria. Las placas se incubaron de 18 a 24 h a 28 °C  $\pm$  2 °C (bacterias fitopatógenas). En cada pozo se adicionaron 50 µL del reactivo violeta de tetrazolio. Las



placas se incubaron por 30 min más en las condiciones antes mencionadas. Finalmente, se verificó el crecimiento bacteriano por la presencia de una coloración morada en el microtubo. La concentración mínima inhibitoria se identificó en los microtubos que no presentaron dicha coloración.

#### **2.2.7.4. Evaluación de los mecanismos de acción antimicrobiana (bacterias y hongos)**

**2.2.7.4.1. Ensayo de reducción del MTT.** La viabilidad celular se determinó por el método del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, por sus siglas en inglés). Este es un método colorimétrico que evalúa la funcionalidad celular dependiente de su integridad mitocondrial. El MTT es captado por las células vivas y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble, el formazan, el cual queda retenido en las células y puede ser liberado al solubilizarse las mismas. De esta forma la cantidad de MTT reducido es evidenciada por un cambio de coloración del amarillo a azul. Por lo tanto 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 celular de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Eisenbrand *et al.*, 2002).

#### **2.2.8. Manejo estadístico de datos**

El análisis de los resultados se realizó mediante ANDEVA para el diseño experimental propuesto y la comparación de los tratamientos (efectos principales) por medio de contrastes ortogonales ( $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ ), para lo cual se usó el paquete estadístico SAS (Versión 9.0 para Windows).

### **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **2.3.1. Aislamiento, purificación e identificación de *Pycnoporus sanguineus***

Los aislamientos H1 y H2 de *P. sanguineus* (Figura 9), presentaron un crecimiento de la colonia variable. En el caso de H1, el hongo cubrió con micelio blanco el total de la superficie del medio de cultivo de la caja Petri a los 10-15 d (5.3-8.0 mm/d), mientras que H2 lo hizo a los 10-12 d (6.7-8.0 mm/d). La descripción morfológica de las colonias y de los basidiocarpos concuerda con lo reportado por Papinutti (2013) para la especie *P. sanguineus*. La identificación morfológica

anterior se corroboró con los resultados de la caracterización molecular (Cuadro 1) de la región intergénica ITS1 del ADN ribosomal y reveló para H1 una identidad y un índice de similaridad de 98% de 787, respectivamente; y para H2 de 97% y 822, respectivamente con el aislamiento 7IV2/2 de *P. sanguineus* (número de acceso GQ982886.1) en el Banco de Genes del NCBI.

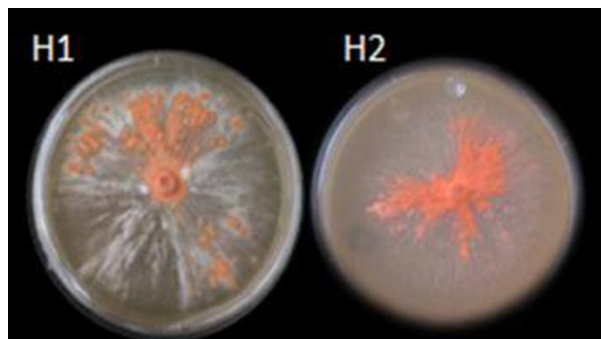


Figura 9. Colonias de *Pycnoporus sanguineus* de 30 días en agar extracto de casuarina (H1) y en agar extracto de mango (H2) aislados en Villa Guerrero, Estado de México y Parácuaro, Michoacán, respectivamente.

Cuadro 1. Secuencia de pares de bases de la región ITS1 del ADNr de *Pycnoporus sanguineus* aislados en Villa Guerrero, Estado de México (H1) y Parácuaro, Michoacán (H2).

---

Secuencia de H1

---

GGTCTTACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTG  
TAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCTCTCCGGGCTTGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAAACACTTAAAGTAAAAGA  
ATGTATTCGCGTCTAACGCATCTAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGNAGCATGCCTGTTTG  
AGTGTATGGAATTCTCAACCCACACATCCTTGTGATGCTGCGGNCTTGGATTGGAGGCTTGCTGNNCCTCTGCGGTGCGCTCCTCT  
TGAATGCATTAGCTTGATTCCGGTGC GGATCGNCTCTCAGTA

---

Secuencia de H2

---

CCTGCGGAAGGATCTTAAACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTG  
TGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCTCTCCGGGCTTGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAAACACTT  
AAAGTAAAAGAATGTATTCGCGTCTAACGCATCTAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG  
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGNAGC  
ATGCCTGTTTGAGTGCATGGAATTCTCAACCCACACATCCTTGTGATGCTGCGGGCTTGGATTGGAGGCTTGCTGGCCCTCTGCGG  
TCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTCCGGTGC GGATCGGCT

---

### 2.3.2. Producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido

Los aislamientos H1 y H2 de *P. sanguineus* cubrieron totalmente la caja Petri a los 13 días después de haberse sembrado, estos datos difieren con lo reportado por Baumer *et al.* (2008) quienes encontraron que las cepas MIP 95001, MIP 95002 y MIP 20001 de *P. sanguineus*, llenaron las cajas Petri al quinto día después de la siembra, aunque el tamaño del disco de inóculo inicial de ellos fue de 14 mm de diámetro en comparación con los 5 mm de los discos utilizados en este trabajo. En relación al diámetro de las colonias, tanto el medio de cultivo y pH evaluados tuvieron un efecto significativo en los dos aislamientos por lo que las mejores condiciones para el crecimiento de las colonias de H1 fueron: agar extracto de casuarina a pH 7.0 y 9.0, mientras que para H2 fueron agar extracto de mango a pH 7.0 (Cuadros 2 y 3), lo cual mostró que existe una afinidad por las fuentes de donde fueron aislados cada uno de ellos.

Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo y pH en el crecimiento y producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* aislado en Villa Guerrero, Estado de México (H1).

Factor	Nivel	Diámetro de colonia (mm)	Velocidad específica de crecimiento $\mu$ ( $h^{-1}$ )			Concentración del pigmento ( $mg\ mL^{-1}$ )	Pigmento extraído (mg)
			Día 3	Día 5	Día 10		
Medio de cultivo	PDA	59.66 <sup>c</sup>	0.0075 <sup>b</sup>	0.0087 <sup>b</sup>	0.0089 <sup>c</sup>	0.0175 <sup>a</sup>	55.60 <sup>aa</sup>
	EMA	33.53 <sup>d</sup>	0.0000 <sup>c</sup>	0.0028 <sup>c</sup>	0.0058 <sup>d</sup>	0.0168 <sup>aa</sup>	46.30 <sup>aa</sup>
	HTIA	69.66 <sup>b</sup>	0.0120 <sup>a</sup>	0.0116 <sup>a</sup>	0.0096 <sup>b</sup>	0.0116 <sup>bbba</sup>	19.30 <sup>bbba</sup>
	ECA	79.60 <sup>a</sup>	0.0106 <sup>a</sup>	0.0125 <sup>a</sup>	0.0105 <sup>a</sup>	0.0071 <sup>ccb</sup>	37.90 <sup>aaa</sup>
pH	7.0	62.55 <sup>a</sup>	0.0089 <sup>a</sup>	0.0092 <sup>a</sup>	0.0090 <sup>a</sup>	0.0140 <sup>a</sup>	37.70 <sup>a</sup>
	8.0	58.20 <sup>b</sup>	0.0064 <sup>b</sup>	0.0085 <sup>b</sup>	0.0085 <sup>b</sup>	0.0123 <sup>a</sup>	40.60 <sup>a</sup>
	9.0	61.10 <sup>a</sup>	0.0072 <sup>b</sup>	0.0092 <sup>a</sup>	0.0086 <sup>b</sup>	0.0136 <sup>a</sup>	41.00 <sup>a</sup>

<sup>†</sup> Letras diferentes significan tratamientos diferentes ( $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ ). <sup>¶</sup> La comparación se realizó entre niveles de cada factor y las diferencias se presentan verticalmente (n=5).

Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo y pH en el crecimiento y producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* aislado en Parácuaro, Michoacán (H2).

Factor	Nivel	Diámetro de colonia (mm)	Velocidad específica de crecimiento $\mu$ ( $h^{-1}$ )			Concentración del pigmento ( $mg\ mL^{-1}$ )	Pigmento extraído (mg)
			Día 3	Día 5	Día 10		
Medio de cultivo	PDA	55.00 <sup>c</sup>	0.0105 <sup>b</sup>	0.0102 <sup>b</sup>	0.0086 <sup>b</sup>	0.0108 <sup>a</sup>	19.30 <sup>a</sup>
	EMA	24.86 <sup>d</sup>	0.0000 <sup>d</sup>	0.0035 <sup>d</sup>	0.0047 <sup>c</sup>	0.0033 <sup>c</sup>	41.70 <sup>ba</sup>
	HTIA	58.00 <sup>b</sup>	0.0089 <sup>c</sup>	0.0092 <sup>c</sup>	0.0087 <sup>b</sup>	0.0071 <sup>b</sup>	23.50 <sup>aab</sup>
	EMaA	79.86 <sup>a</sup>	0.0152 <sup>a</sup>	0.0134 <sup>a</sup>	0.0104 <sup>a</sup>	0.0043 <sup>cb</sup>	57.10 <sup>baa</sup>
pH	7.0	60.25 <sup>a</sup>	0.0092 <sup>a</sup>	0.0101 <sup>a</sup>	0.0085 <sup>a</sup>	0.0076 <sup>a</sup>	37.00 <sup>a</sup>
	8.0	52.10 <sup>b</sup>	0.0084 <sup>b</sup>	0.0085 <sup>b</sup>	0.0078 <sup>b</sup>	0.0050 <sup>b</sup>	39.60 <sup>a</sup>
	9.0	50.95 <sup>b</sup>	0.0083 <sup>b</sup>	0.0089 <sup>b</sup>	0.0081 <sup>b</sup>	0.0065 <sup>b</sup>	29.60 <sup>a</sup>

<sup>†</sup> Letras diferentes significan tratamientos diferentes ( $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ ). <sup>¶</sup> La comparación se realizó entre niveles de cada factor y las diferencias se presentan verticalmente ( $n=5$ ).

Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) probaron los mismos medios de cultivo, excepto los extractos de casuarina y mango, en el crecimiento de cepas de *P. sanguineus* (HEMIM-52, HEMIM-53 y HEMIM-54) y obtuvieron el crecimiento característico del hongo, aunque no encontraron diferencia significativa entre los medios PDA y HTIA para la producción de biomasa. Por su parte, Smânia *et al.* (1998), reportaron las condiciones de cultivo para la cepa MIP 89007 de *P. sanguineus* en caldo papa, pH 9.0 y 25 °C bajo luz por 20 d. En este estudio, el crecimiento de los aislamientos H1 y H2 (Figura 10) en extractos de casuarina y mango agar de 30 d mostraron una pigmentación menor al obtenido en PDA (Figura 10).

De acuerdo con la afinidad mostrada por los aislamientos del hongo sobre los extractos del material vegetal del que fueron aislados, las mayores velocidades específicas del crecimiento a los 3, 5 y 10 d se presentaron en el ECA, para el caso del aislamiento H1, mientras que para H2 fue EMaA (Cuadros 2 y 3). En el caso de H1, durante los primeros días no hubo diferencias entre ECA y HTIA. En todos los casos, las velocidades encontradas para H1 y H2 fueron menores a las reportadas por Baumer *et al.* (2008) para las cepas MIP 95002 ( $\mu= 0.0164\ h^{-1}$ ) y MIP 95001 y 20001 ( $\mu= 0.0147$  y  $0.0145\ h^{-1}$ , respectivamente) en PDA.

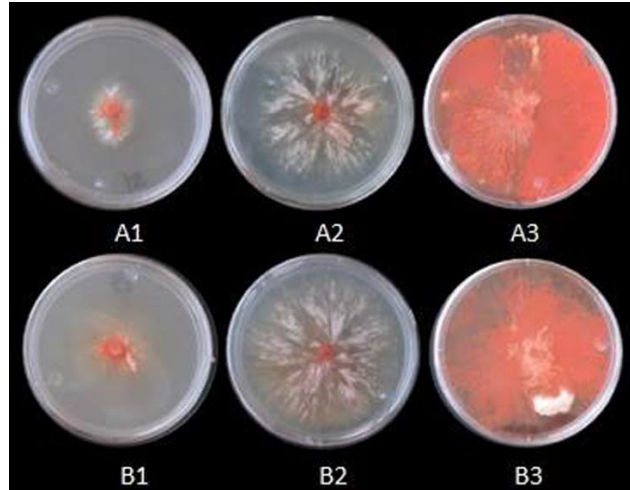


Figura 10. Producción de pigmento naranja de *Pycnoporus sanguineus* aislados en Villa Guerrero, Estado de México (H1) y Parácuaro, Michoacán (H2) en PDA a los 3 (A1 y B1), 13 (A2 y B2) y 30 d (A3 y B3) de edad.

En el caso del aislamiento H1, las mayores concentraciones del pigmento producido, así como la cantidad total extraída, se presentaron en el medio de cultivo PDA y EMA, sin importar el pH en el cual se produjo (Cuadro 2), mientras que en el caso del aislamiento H2 lo fue en PDA y pH indistinto (Cuadro 3). Lo anterior, demuestra que las mayores velocidades de crecimiento del hongo no necesariamente implican que se tenga una mayor producción del pigmento naranja, lo cual coincide con lo reportado por Baumer *et al.* (2008), quienes mencionan que el crecimiento micelial no necesariamente está relacionado con la producción de metabolitos secundarios (cinabarina). Por otra parte, y de acuerdo con los datos de concentración y pigmento extraído, no existe una correlación que pudiera indicarnos que con el colorante químico rojo de metilo se tenga una concentración equivalente del colorante naranja producido por el hongo, ya que las cantidades del pigmento extraído, rebasan por mucho la cantidad estimada (la cual debería de ser 50 veces la concentración estimada).

Según Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) el mejor sustrato para producir cinabarina en primordios fue en residuos de madera de pino, seguido por encino y cedro, sin importar la cepa utilizada. El contenido promedio del pigmento cinabarina en primordios del hongo fue de  $56 \text{ mg g}^{-1}$  y no hubo diferencias entre la cinnabarina producida por los cuerpos fructíferos bien desarrollados (basidiocarpos) que fue de  $68 \text{ mg g}^{-1}$ . La ventaja de utilizar los cuerpos fructíferos es que se pueden obtener hasta dos o más cosechas pero con el inconveniente de que requieren de 242 a 356 d para obtenerlos.

De esta manera, la producción de la cinnabarina puede realizarse *in vitro* en medios sólidos y líquidos, o bien *in vivo* con la producción de basidiocarpos. En este trabajo, los resultados muestran que la producción de pigmentos puede ser menor que las reportadas por otros autores, pero las ventajas principales fueron un menor tiempo de crecimiento y facilidad en el manejo de las cajas Petri en donde se produjo el pigmento. Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) refieren que los metabolitos primarios y secundarios producidos por el género *Pycnoporus* son diferentes y dependen de la especie y las condiciones de cultivo. La producción del pigmento naranja de *P. sanguineus* puede tener aplicaciones importantes dentro de las industrias alimentaria, farmacéutica o biotecnológica ya que se ha reportado que tiene actividad biológica: antiviral, antioxidante, antifúngica, y antibacteriana, además de la importancia que tiene para la industria de los biocolorantes obtenidos de fuentes biológicas. En los últimos años, la disponibilidad y el uso de colorantes naturales se han incrementado en gran medida como consecuencia de la percepción de las preferencias de los consumidores por colorantes de origen natural con respecto a los sintéticos que imparten sabores indeseables al producto y son perjudiciales a la salud, así como la acción legislativa la cual ha excluido a los colorantes artificiales (Rymbai *et al.*, 2011).

### **2.3.3. Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)**

#### **2.3.3.1 Cromatografía en capa fina**

El frente de retención ( $R_f$ ) obtenido por cromatografía de capa fina con los extractos de *P. sanguineus* con respecto al rojo de metilo fue de 0.83 (Figura 12-1). Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) reportaron una curva tipo con cinabarina a 265 nm ( $y = 0.2349x + 0.3978$ ) con concentraciones de 2 a 10 mg mL<sup>-1</sup> del extracto acuoso de *P. sanguineus* y detectaron, además de la cinnabarina, al ácido cinabarínico. En este estudio, se realizó cromatografía de capa fina del pigmento producido por el aislamiento H1 y H2 con los eluyentes hexano: acetato 2:1, y dio como resultado para H1 sólo un  $R_f = 0.77$  y para H2 de 0.33, 0.77 y 0.88 (Figura 12-2), por su parte, Smânia *et al.* (1995) realizaron cuatro fraccionamientos de los extractos de este hongo y obtuvieron valores de  $R_{fA} = 0.78$ ,  $R_{fB} = 0.54$ ,  $R_{fC} = 0.48$  y  $R_{fD} = 0.78$ , de los cuales la fracción FB contenía al compuesto 3-1 fenoxacina como componente principal detectado a 264 nm. En este trabajo, el barrido de los extractos de los aislamientos de *P. sanguineus* con acetato de etilo se realizó en el rango de 200 a 700 nm, debido a que se presume la existencia de más de un compuesto como la cinabarina y el 3-1 fenoxacina que tienen una absorbancia de 265 y 264 nm. De acuerdo con Restrepo (2007) existe una relación entre las longitudes de onda y los colores percibidos como el color amarillo (565-590 nm), naranja (590-625 nm) y rojo (625- 740 nm). Para

el caso que nos ocupa, los extractos de H1 y H2 se perciben a simple vista en este rango de colores, ya que se observaron picos a 214, 266, 431 y 450 nm para H1; y 228, 257, 431 y 451 nm para H2 (Figura 3), lo cual coincide con lo reportado por Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) quienes encontraron una banda característica de cinabarina a 265 nm y el barrido con acetato de etilo mostró otros pigmentos a 290, 400, 440 y 450 nm. Lo anterior implica que los extractos obtenidos en este trabajo se encuentran conformados por varios pigmentos anaranjados o en el rango de colores que van del amarillo al rojo, estopuede significar que, la cantidad total extraída contiene otros pigmentos o componentes que fueron arrastrados por el acetato de etilo, como se puede apreciar en el barrido del pigmento a diferentes longitudes de onda (Figura 11).

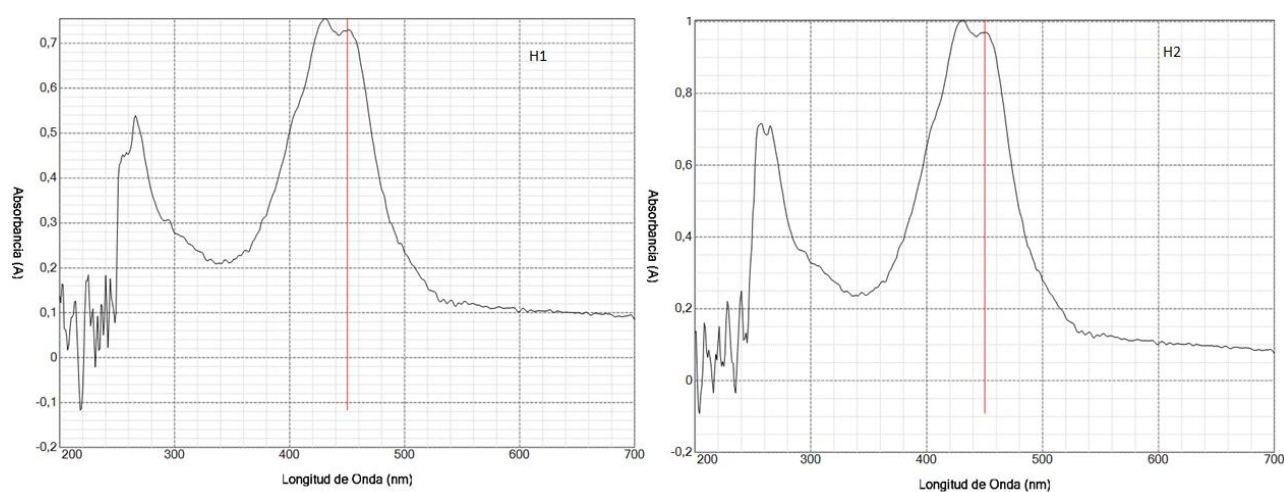


Figura 11. Espectrogramas de los pigmento extraído con acetato de etilo de los aislamientos de casuarina (H1) y mango (H2) de *Pycnoporus sanguineus*.

Estos resultados fueron similares a los reportados por Méndez-Zavala *et al.* (2007) quienes encontraron dos picos a 505 y 425 nm en el barrido de 400 a 600 nm del pigmento rojo producido por *Penicillium purpurogenum*. Por otra parte, Domínguez-Espinosa *et al.* (2002) explicaron que hay una combinación de dos o más pigmentos que van del amarillo al naranja (405 nm) y de pigmentos rojos (495 nm) en los pigmentos de *Monascus*. Esto concuerda con la investigación de Carvalho *et al.* (2007) quienes mencionaron que conforme avanzó la fermentación de *Monascus*, se producían pigmentos rojos-amarillos; sin embargo, los pigmentos rojos también absorben luz a 400 nm. Tal como se dijo anteriormente, es posible que los extractos que se obtuvieron en este trabajo estén conformados por una mezcla de varios pigmentos, que no sólo estén en la misma

longitud de onda (264 y 265 nm), sino también otros que van de rojo a naranja que son generados por el grupo fenoxacina.

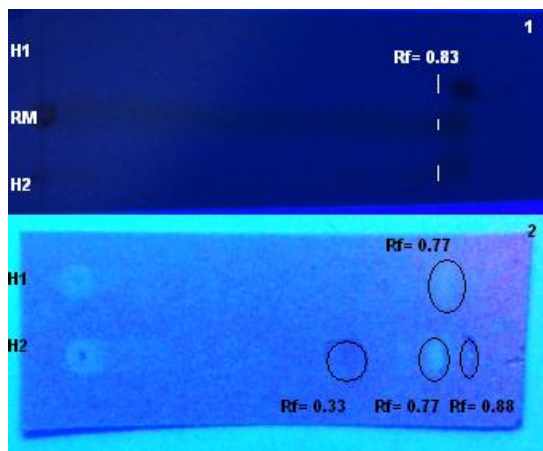


Figura 12. Frentes de retención (Rf) de los extractos de los pigmentos obtenidos de los aislamientos H1 y H2 de *Pycnoporus sanguineus* y del colorante químico rojo de metilo (RM) obtenidos por cromatografía en capa fina (1) así como de los compuestos coloridos que existen en ellos (2).

### 2.3.3.2. Cromatografía en columna abierta

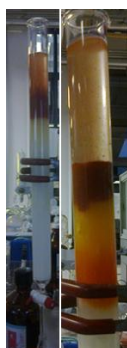


Figura 13. Cromatografía de columna abierta de los extractos de los pigmentos de los aislamientos H1 y H2 de *Pycnoporus sanguineus*.

Para agrupar las fracciones similares, se utilizó la cromatografía de capa fina (utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60 F254) y las fracciones que presentaron Rf similares se colocaron en conjunto, etiquetaron y una vez evaporado el solvente, se obtuvo el rendimiento (poner las unidades). El agrupamiento de las fracciones se realizó de acuerdo con las manchas presentes en las colectas de la cromatografía (Figura 14).



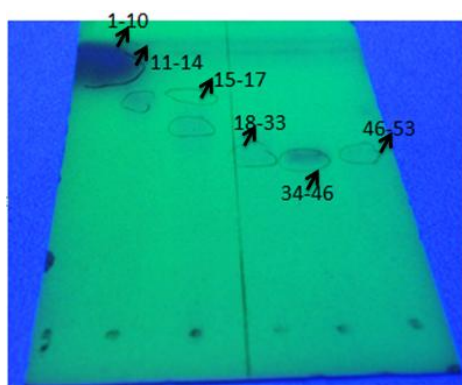


Figura 14. Agrupamiento de fracciones separadas en columna por cromatografía de capa fina de los pigmentos de *Pycnoporus sanguineus*.

### 2.3.3.3. Fracciones secundarias obtenidas en la separación de columna abierta lote 1

Cuadro 4. Fracciones secundarias obtenidas de la separación del pigmento de *Pycnoporus sanguineus* lote 1

Fracciones	Peso (g)
1	0.6682
2	0.0072
3	0.0019
4	0.0211
5	0.0212
6	0.0077
7	0.1961

Un total de siete fracciones secundarias se obtuvieron después de la comparación de los R<sub>f</sub>s (Cuadro 4). El extracto crudo de los aislamientos H1 y H2 (1.0436 g) se purificó y se obtuvo un total de 0.9234 g repartidos en 7 fracciones, los compuestos de interés y pertenecientes a las fenoxacinas (caracterizadas por el color naranja brillante) se muestran en la Figura 15. Se observa que la coloración rojiza comienza a partir del compuesto cinco, por lo que si sólo se buscará este compuesto en la purificación, éste representaría sólo el 2% del rendimiento total de la purificación. En este caso, se tuvo que a colocar en otro vial 0.0024 g que correspondió al tubo 39 para su posterior identificación por medio de resonancia magnética nuclear.

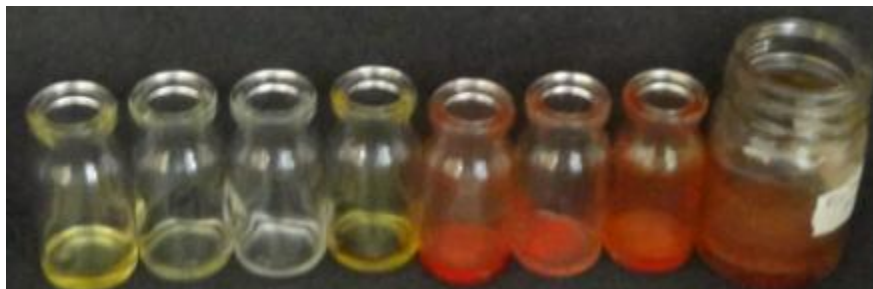


Figura 15. Fracciones separadas por columna abierta del extracto crudo del pigmento de *Pycnoporus sanguineus*

#### 2.3.3.4. Fracciones secundarias obtenidas en la separación de columna abierta lote 2

Como dato adicional, de 200 cajas Petri con medio de cultivo seco (98.36 g) con micelio pigmentado de *P. sanguineus*, se obtuvo 2.2027 g (2.23%) del pigmento concentrado y seco. Se necesitó 10 litros de acetato de etilo para su extracción. Se requirieron aproximadamente 100 días para la obtención del pigmento concentrado y seco: 40 d de cultivo, 15 d de secado, 20 d de extracción-concentración del pigmento, 10 d de evaporación del solvente y 15 d de separación y concentración de los compuestos en columna.

Cuadro 5. Fracciones secundarias obtenidas de la separación del pigmento de *Pycnoporus sanguineus* lote 2

Compuesto	Peso (g)
A	1.2722
B	0.1174
C	0.3346

De acuerdo con De Oliveira *et al.* (2007) para extraer los compuestos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, primero se realizó con hexano, posteriormente con acetato de etilo y finalmente con acetona seguido de metanol. Estos autores, obtuvieron 4 fracciones: P0 del basidiocarpo seco; P1 fracción no polar (extracto con hexano), el cual contiene los esteroides; P2 extracto con acetato de etilo (contiene al menos dos componentes principales como la cinabarina y una mezcla de otra 3-1 fenoxazina); P4 fracción polar, que contiene pura cinabarina.

En el presente trabajo el proceso de separación fue similar ya que se utilizaron los mismos solventes. Como se mencionó anteriormente, las mezclas de solventes empleadas para la elución

fueron de menor a mayor polaridad, quedando para el lote 1, 7 fracciones pero al realizar un segundo lote (Cuadro 5) se consideró que existen compuesto que son menores a los 10 mg por lo que se decidió separar en 3 fracciones para el lote 2, siendo la fracción A la menos polar, la cual se colecto con los solvente hexano: acetato de etilo; la fracción B medianamente polar, la cual se colecto con acetato de etilo; y finalmente la fracción C, la más polar, que se colectó con metanol. A diferencia de lo mencionado por Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), en la obtención de cinabarina mediante la extracción en caja Petri a partir de micelio seco utilizando acetona o acetato de etilo en una proporción de 20 mL g<sup>-1</sup> y se realizó una cromatografía de placa fina en una solución de 2mL de extracto y 1 mL de una mezcla metanol-piridina (3:1). Para lo anterior, muestras de las fracciones se colocaron en cromatoplasmas de sílica gel dentro un recipiente de vidrio con una mezcla compuesta por benceno: acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico (12:6:1:1) y se dejaron correr en 15 cm y se midieron los frentes de retención para identificar los pigmentos.

#### **2.3.4. Identificación del pigmento**

##### **2.3.4.1 Identificación de los compuestos separados del extracto de *P.sanguineus* por IR**

Se realizó un espectro infrarojo (IR) de un estándar de ácido cinabarinico y del compuesto 5 obtenido por cromatografía en capa fina (Figura 16). El espectro muestra la presencia de los grupos oxhidrilo, amina y fenoxacina, por lo que es probable que el compuesto 5 sea un derivado del este grupo. El espectro IR, reportado por De Oliveira *et al.* (2007) de los extractos separados con acetato de etilo y metanol mostraron señales intensas en 1510, 143 y 1247 cm<sup>-1</sup> las cuales pueden ser asignadas al grupo CH<sub>2</sub> y NH<sub>2</sub>. Para el caso de este trabajo, el ácido cinabarinico presentó señales en 1507.61 y 1253.90 cm<sup>-1</sup> y para la muestra 5 mostró señales en 1510.15 y 1240.42 cm<sup>-1</sup>. En el extracto de acetato de etilo se observaron señales en 1647 cm<sup>-1</sup> la cual puede ser asignada para el grupo carbonilo (De Oliveira *et al.*, 2007), en el ácido cinabarinico presentó señal en 1634.31 cm<sup>-1</sup> y en el compuesto 5 la señal se presentó a 1631.41 cm<sup>-1</sup>. Otras señales caracterizadas por la fenoxacina se presentan a 1510 y 1443 cm<sup>-1</sup> y son características de la estructura fenoxacina que contiene el grupo NH<sub>2</sub>, para el caso del ácido cinabarinico, la señal se presentó a en 1478.13 cm<sup>-1</sup> y para la muestra 5 en 1456.78 cm<sup>-1</sup>.

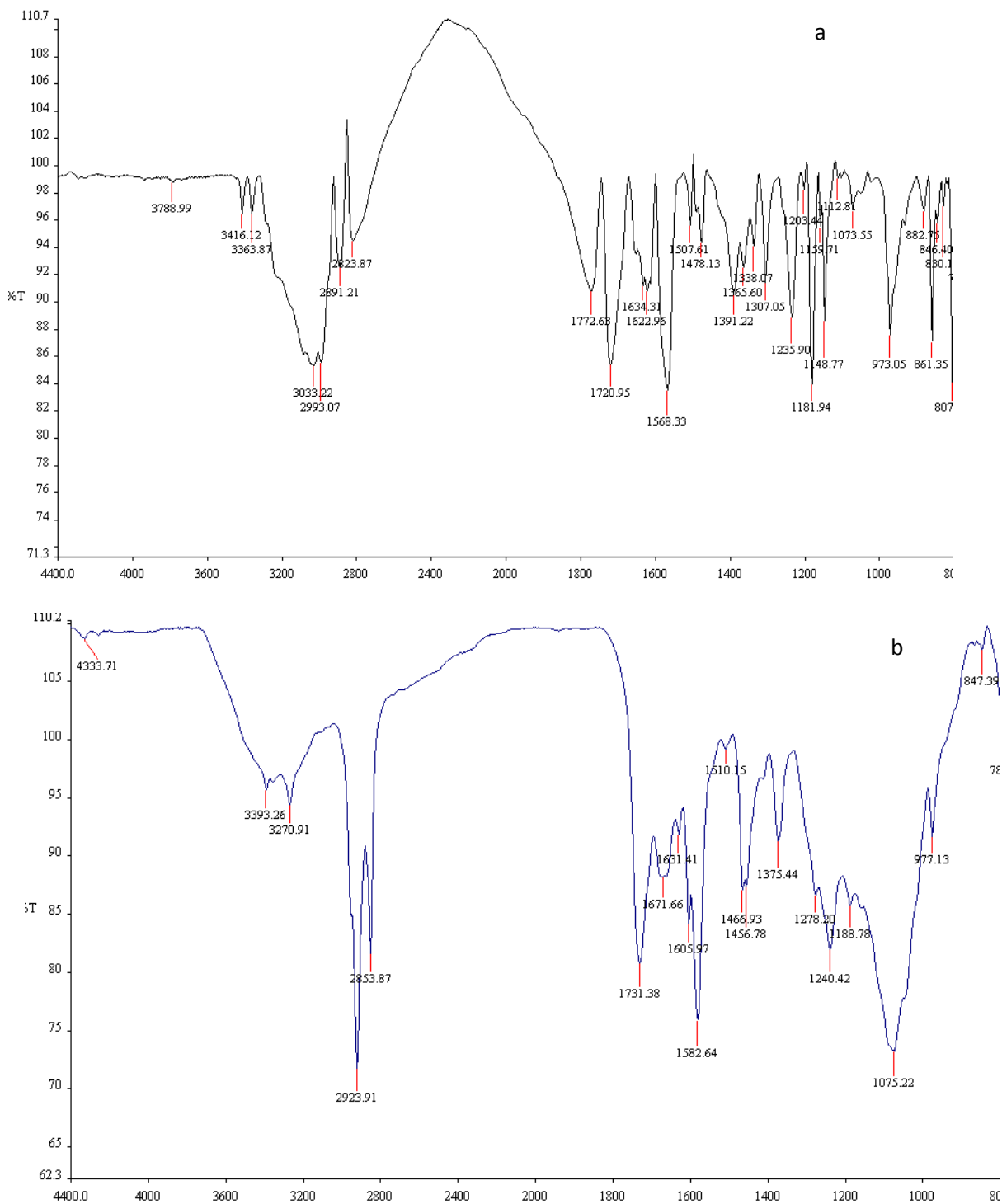


Figura 16. Espectro infrarojo (IR) del ácido cinabarinico (a) y del compuesto 5 obtenido por cromatografía en capa fina del pigmento de *Pycnopus sanguineus* (b).

### 2.3.4.2. Identificación de los compuestos separados del extracto de *P.sanguineus* por (RMN $^1\text{H}$ )

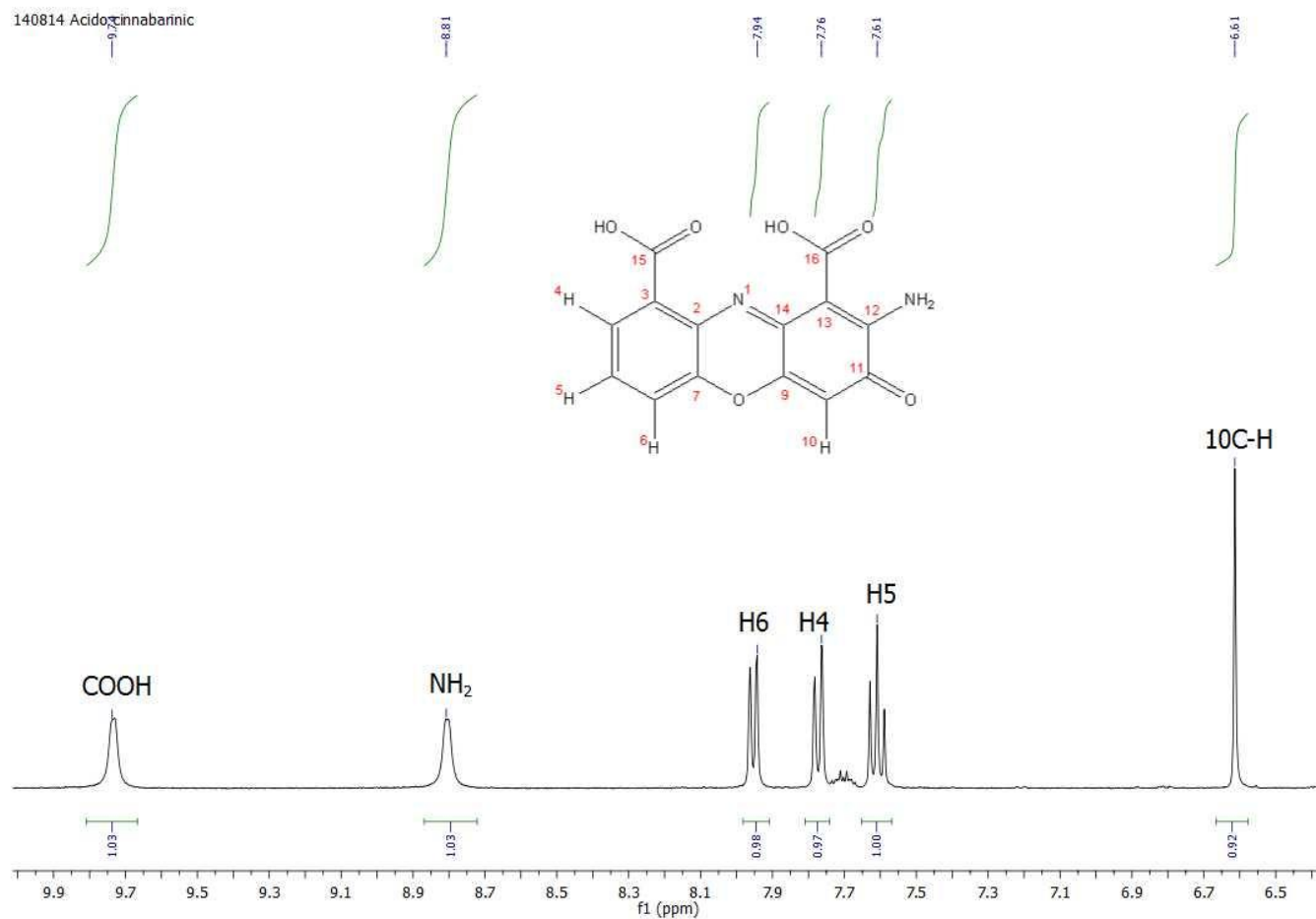


Figura 17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del ácido cinabarinico en DMSO- $d_6$

140814 Acido cinnabarinic

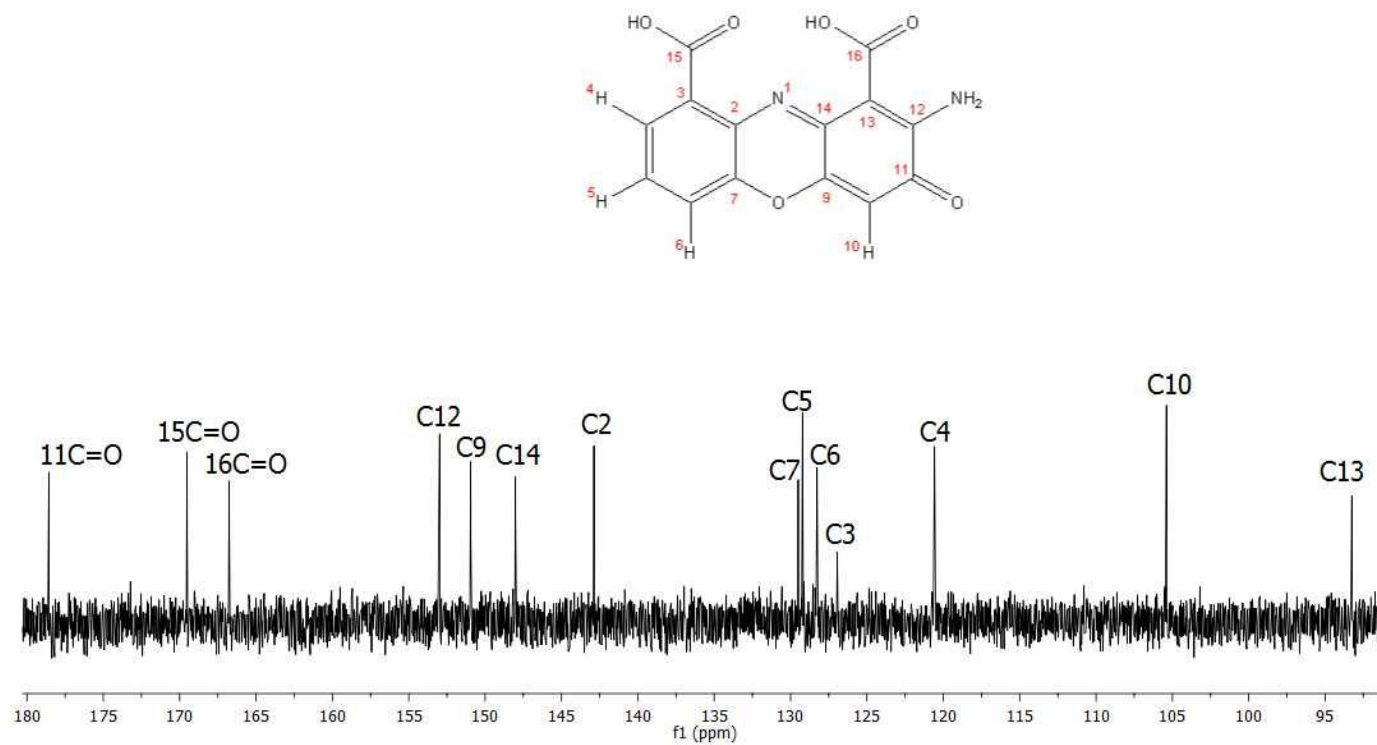


Figura 18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido cinabarínico en  $\text{DMSO-}d_6$

En las Figuras 17 y 18 se observan las señales características del ácido cinabaránico de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Estas señales fueron comparadas con lo reportado por Pasceri *et al.* (2013), donde el ácido cinabaránico ( $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{NaO}_2$ ) tiene una  $\lambda_{\text{max}}$  (metanol)  $\text{nm}^{-1}$  234 ( $\log \epsilon$  5.03), 446 ( $\log \epsilon$  4.30); para las señales de estiramiento de sus grupos funcionales en el espectro de infrarrojo con  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )/ $\text{cm}^{-1}$  3689, 3608, 3413, 3361, 3042, 2976, 1725, 1601 1568, 1241; mientras que para el espectro de RMN de protón se tiene los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) (400 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) 9.73 (1H, br s,  $\text{NH}_2$ ), 8.82 (1 H, br s,  $\text{NH}_2$ ), 7.96 (1 H, d, J 8.3 Hz, H-8), 7.78 (1 H, d, J 8.3 Hz, H-6), 7.61 (1 H, t, J 8.3 Hz, H-7), 6.62 (1 H, s, H-4). Para el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se tienen los siguientes desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) (100 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) 178.5 (C), 169.5 (C), 166.7 (C), 153.0 (C), 150.9 (C), 148.0 (C), 142.9 (C), 129.5 (C), 129.3 (CH), 128.3 (CH), 126.7 (C), 120.6 (CH), 105.3 (CH), 92.2 (C). Dicha información es confirmatoria, dado que es un patrón estándar con una pureza del 98% (Sigma Aldrich®), en su hoja técnica se reportó que el ácido cinabaránico es soluble en dimetil sulfóxido (DMSO) y la muestra 5 se intentó correr en el mismo solvente pero se tuvo varios inconvenientes técnicos primeramente relacionados con el largo tiempo de procesamiento de la muestra, y al acceder al equipo de resonancia magnética se realizó 2 corridas: una de ellas disolviendo con dimetil sulfóxido y posteriormente con hexano deuterados. De las corridas, no se detectaron señales características en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 19), tal como se mostró en la Figura 17. En el estudio realizado por Meléndez-Martínez *et al.* (2004) se menciona que la inestabilidad de los carotenoides se debe a que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente por procesos oxidativos. Otros factores como la temperatura, luz o el pH también pueden producir importantes cambios cualitativos en estos compuestos debido a las reacciones de isomerización. En el caso de betalainas de raíces de remolacha (*Beta vulgaris* L.) que se expusieron a una fuente de luz blanca, sufrieron una degradación aproximadamente de 15.6% después de la exposición en un día de luz a  $15^\circ\text{C}$  (Moreno-Alvarez *et al.*, 2002), de esta manera se confirma que los pigmentos obtenidos de fuentes naturales sufren degradación por diversos procesos. Por lo anterior, se puede deducir que el compuesto 5 sufrió cambios en su estructura y no se obtuvieron señales que permitieran la identificación de su estructura química, a diferencia de los espectrogramas IR, los cuales se realizaron de manera inmediata, y se pudo observar la presencia de grupos funcionales como la fenoxacina y el grupo carbonilo, lo que indica que el tiempo es factor decisivo para corroborar el espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

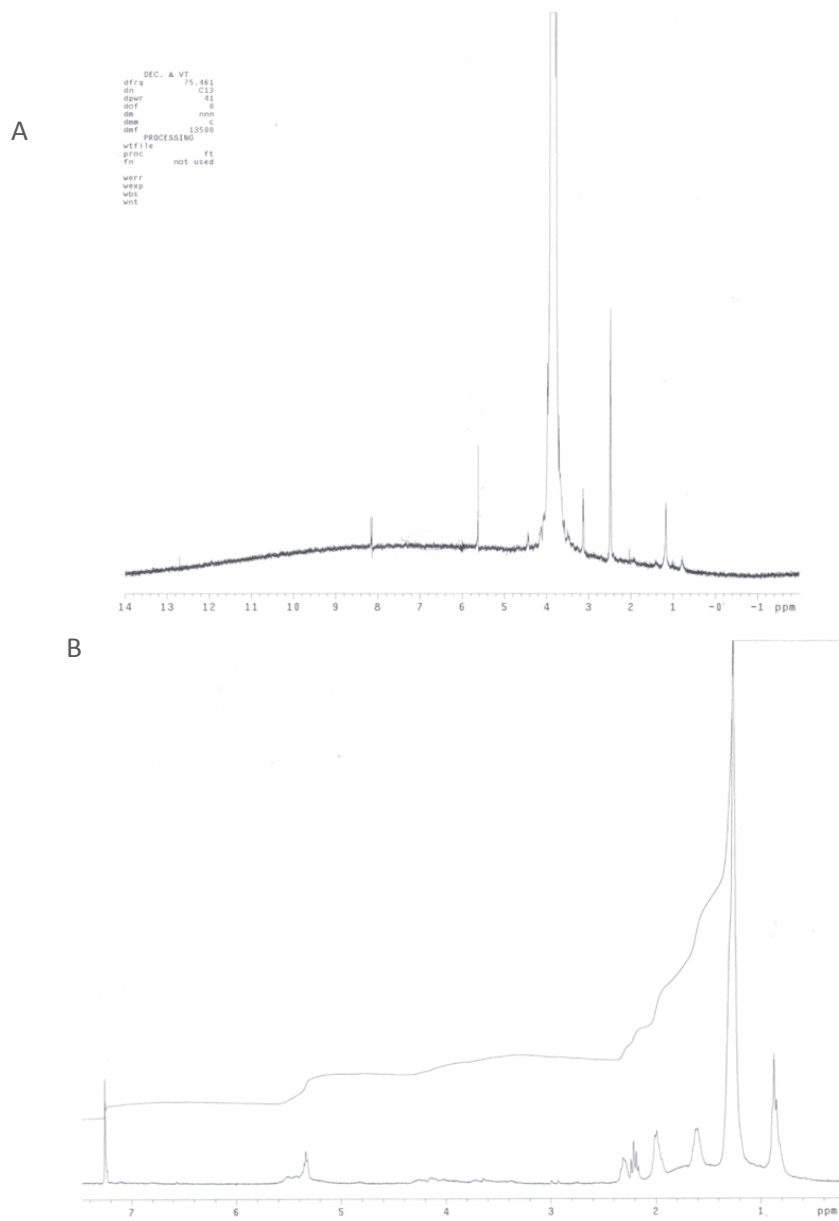


Figura 19. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la muestra 5: A) disuelta en  $\text{DMSO-}d_6$  y B) en  $\text{hexano-}d_{14}$ .



### 2.3.5. Determinación de la actividad contra hongos y bacterias

#### 2.3.5.1 Determinación del efecto antifúngico

Los resultados de las pruebas de control sobre el crecimiento utilizando el hongo fitopatógeno *C. fragariae*, así como la información contenida en el Cuadro 6, muestran la capacidad inhibitoria (parcial o retardada) del pigmento extraído de cajas de H1 y H2 de los aislamientos de *P. sanguineus*, sobre de crecimiento de este hongo. .

Cuadro 6. Comparación de medias del diámetro de crecimiento (mm) de *C. fragariae* en PDA con extractos fúngicos de *Pycnoporus sanguineus* (H1 y H2) y fungicida comercial (Captan<sup>®</sup>)

Factor de variación	Nivel	Crecimiento en mm al día 8 de <i>C. fragariae</i>
Tratamiento	T1	50.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
	T2	50.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
	T3	0.0 ± 0.0 <sup>e</sup>
	T4	41.66 ± 1.5 <sup>b</sup>
	T5	36.0 ± 1.0 <sup>c</sup>
	T6	33.0 ± 1.0 <sup>d</sup>

Nota: T1, testigo de crecimiento (PDA); T2, testigo negativo acetato de etilo; T3, Testigo positivo Captan<sup>®</sup>, T4, Extracto de *P. sanguineus* de 2 mg/mL; T5, extracto de 10 mg/mL; T6, extracto de 20 mg/mL. a,b,c, y d y e indican diferencias significativas estadísticamente a lo largo de cada columna (Tukey al 5%, n=3)

En el cuadro anterior se puede observar un comportamiento inhibitorio de los extractos de *P. sanguineus* que resultó ser concentración-dependiente ya que a mayor concentración del extracto se obtuvo una mayor inhibición del crecimiento de de *C. fragariae*, lográndose un 66% de inhibición. En el trabajo reportado por Cruz-Muñoz (2012) en el que se probaron los extractos de H1 y H2 cultivados en medio líquido (caldo papa a pH= 8.0, 8.5 y 9.0) se logró una inhibición de *C. fragariae* del 70%, por lo que el extracto obtenido de medio sólido y líquido tienen una actividad de inhibición parcial lo cual se logra dilucidar en el siguiente apartado.

**2.3.5.1.1. Determinación del efecto fungistático** Se probó el efecto de los pigmentos de *P. sanguineus* contra *C. fragariae*, la relación de proporcionalidad de mayor cantidad de pigmento con respecto al retardo de crecimiento de *C. fragariae*. Se cultivo a este hongo en 3 cajas Petri con PDA y extracto en

una concentración de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  y se colocaron estos bloques en cajas Petri con medio PDA y se dejó en las condiciones óptimas para observar un crecimiento, se definió como actividad fungistática (Figura 20).



Figura 20. Efecto fungistático del extracto de *Pycnoporus sanguineus* obtenido de medio sólido

### 2. 3.5.2. Determinación del efecto antibacteriano

Se realizó una prueba de sensibilidad con el compuesto 7, el cual se encuentra integrado por otros incluyendo el compuesto 5, por lo que se inició esta prueba de sensibilidad con las bacterias *E. amylovora* y *P. carotovorum* con los siguientes resultados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de la inhibición del compuesto 7 ( $8 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ) separado del extracto de *Pycnoporus sanguineus* en el control de bacterias fitopatógenas del lote 1

Bacteria	Tinción Gram	Compuesto 7	
		H1	Cloramfenicol
<i>Erwinia amylovora</i>	Negativo (-)	$12.3 \pm 0.57$	$36 \pm 1.0$
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Negativo (-)	$12.3 \pm 0.57$	$35.6 \pm 1.52$

Como resultado de esta prueba se observó un halo de inhibición para *E. amylovora* y *P. carotovorum* de  $12.3 \text{ mm}$ , para confirmar se realizaron diferentes pruebas, para reproducir el efecto antibacteriano. Por los resultados del Cuadro 8 y 9, se determinó que las fracciones obtenidas del extracto de *P. sanguineus* no tuvieron actividad inhibitoria para las bacterias fitopatógenas mencionadas anteriormente. Se destaca que se probaron las fracciones de ambos lotes y con diversos solventes teniendo resultados negativos.

Cuadro 8. Ensayos de inhibición con diferentes fracciones del pigmento separado del lote 1 de *Pynoporus sanguineus* contra bacterias fitopatógenas.

Fracción	Solvente	Efecto de inhibición	
		<i>E. amylovora</i>	<i>P. carotovorum</i>
1	-----	-	-
6	cloroformo	-	-
6	Ac. de Etilo	-	-
7	Ac. de Etilo	-	-
7	Metanol	+	+

Nota: - significa que no hubo inhibición y + significa que si hubo inhibición

Cuadro 9. Ensayos de inhibición con diferentes fracciones del pigmento separado del lote 2 de *Pynoporus sanguineus* contra bacterias fitopatógenas.

Fracción	Solvente	Efecto de inhibición	
		<i>E. amylovora</i>	<i>P. carotovorum</i>
A	-----	-	-
B	Cloroformo	-	-
B	Ac. Etilo	-	-
C	Metanol	-	-
C	Ac. de Etilo	-	-
C	Cloroformo	-	-
C	Metanol –agua 1:1	-	-
Extracto crudo	Ac. de Etilo	-	-
Extracto crudo	Metanol	-	-
Extracto crudo	Metanol –agua 1:1	-	-

Nota: - significa que no hubo inhibición y + significa que si hubo inhibición

## CONCLUSIONES

La producción *in vitro* de *P. sanguineus* en medios de cultivo sólido fue viable debido a que se observó mayor extracción de los pigmentos. En el caso de los pigmentos producidos por el aislamiento H1 de *P. sanguineus*, la mayor afinidad fue en agar papa dextrosa, mientras que para H2 fue en agar extracto de mango. Durante el crecimiento de *P. sanguineus* y la extracción de los pigmentos anaranjados en medios de cultivo sólido se observaron como ventajas: la reducción de la cantidad de medio utilizada (25 mL), además, de la facilidad de manejo y almacenamiento de las muestras.

De acuerdo con los espectrogramas de IR, la muestra 5 mostró la presencia de grupos pertenecientes al ácido cinabaránico. La corroboración con HRMN no es confirmatoria, ya que los compuestos pudieron degradarse por la demora del estudio. Se demostró la actividad fungistática contra *C. fragarie* de los pigmentos extraídos de medio sólido.

No hubo actividad bactericida en las bacterias *E. amylovora* y *P. carotovorum*.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- Achenbach, H., and E. Blümm. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch. Pharm. 324: 3-6.
- Acosta-Urdapilleta, L., G. A. Alonso-Paz, A. Rodríguez, M. Adame, D. Salgado, M. Montiel-Peña, F. Medrano-Vega, y E. C. Villegas-Villarreal. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico In: Martínez-Carrera, D., N. Cuvetto, M. Sobal, P. Morales, y V. M. Mora (eds). Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamerica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Puebla. 2010. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. pp: 531-562.
- Alexopoulos C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell. 1996. Phylum Basidiomycota order Aphyllophorales, polypores, Chantharells, tooth fungi, coral fungi and corticioids. En: Harris, D. (ed). Introductory Mycology 4<sup>th</sup> Ed. New York, U. S. A. Wiley and Sons Inc. pp: 563–597.
- Alfonso, D. y E.R. Sandoval. 2008. Evaluación "*In vitro*" de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. pp: 113.

- Bailey, S., Finegold, S., Baron, E. 1991. Diagnostico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. 7ª edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 190-209.
- Baumer, J. D., S. M. Mas Diego, S. M. V. Pacheco, A. F. M. Morgado, and A. F. Jr. Furigo. 2008. Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. Biofar Rev. Biol. Farm. 2:1-5.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ...5.1 million species ?. Am. J. Bot. 98: 426–438.
- Borderes, J., A. Costa, A. Guedes, and T. L. B. Ballod. 2011. Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. Braz. Arch. Biol. Technol. Int. J. 54: 1167-1174.
- Calvo, A. M., R. A. Wilson, J. Woo-Bok, and N. P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 447-459.
- Carvalho, J. C., B. O. Oishi, A.L. Woiciechowski, A. Pandey, S. Babitha, and C. R. Soccol. 2007. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. Indian J. Biotechnol. 6: 194-199.
- Cilerdzic, J., M. Stajic, J. Vukojevic, S. Duletic-Lausevic, and A. Knezevic. 2011. Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. BioRes. 6: 2885-2895.
- De Oliveira, L.F.C., M. L. Hyaric, M. M. Berg, M.V. de Almeida, H. G. M. Edwards. 2007. Raman spectroscopic characterization of cinnabarin produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. J. Raman Spectrosc. 38: 1628-1632.
- Domínguez–Espinosa, R. M., R. Wang, y J. D. Pacho–Carrillo. 2002. Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. Tecnol. Ciencia (IMIQ) 17: 77–83.
- Eggert, C., U. Temp, and K. E. L. Eriksson. 1996. The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1151–1158.
- Gripenberg, J. 1951. Fungus pigment. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. Acta Chem. Scand. 12: 590-59.

- Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi, and J. W. Yun. 2004. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96: 1296-1305.
- Komeman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G. y Screckenberger, P. 2004. Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica-PANamericana. 5a. Edición. Argentina. pp. 565-620.
- Lomascolo, A., E. Uzan-Boukhris, I. Herpoël-Gimbert, J. C. Sigoillot, and L. Lesage-Meessen. 2011. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92:1129-1149.
- Madhavi, V., and S. S. Lele. 2009. Laccase properties use. *BioRes.* 4:1694-1717.
- Meléndez-Martínez, A.J., I.M. Vicario, F. J. Heredia. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *ALAN.* 54: 209-215.
- Méndez-Zavala, A., J. C. Contreras-Esquivel, F. Lara-Victoriano, R. Rodríguez-Herrera, y C. N. Aguilar. 2007. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6: 267-273.
- Moreno-Alvarez, M. J., R. Douglas, R.B. Camacho, A. Vilorio-Matos. 2002. Degradación de betalainas en remolacha (*Beta vulgaris* L.) estudio cinético. *Rev. Científica.* 12: 133-136.
- Nyanhongo, G. S., G. Gübitz, P. Sukyai, C. Leitner, D. Haltrich, and R. Ludwig. 2007. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in Biotechnology: a wealth of catalytic activity. *Food Technol. Biotechnol.* 45: 250-268.
- Papinutti, L. 2013. *Pycnoporus sanguineus*. Fichas Micológicas. *Rev. Boletín Biológica* 7: 31-32.
- Pasceri, R., D. Siegel, D. Ross, C. J. Moody. 2013. Aminophenoxazinones as inhibitors of indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO). Synthesis of exfoliazone chandranimycin A. *J. Med. Chem.* 56: 3310-3317.
- Restrejo, G.M. 2007. Sustitución de colorantes en alimentos. *Rev. Lasallista Investig.*4: 35-39.
- Rosa, L. E., M. K. M. Gomes, J. C. Cristina, M. Capelari, R. C. Augusto, and Z .C. Leomar. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 967-974.
- Rymbai, H., R. R. Sharma, and Manish Srivastav. 2011. Biocolorants and its implications in health and Food Industry- A Review. *Int.J. Pharm.Tech. Res.* 3: 2228-2244.

Ryvarden, L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Syn. Fungorum*. 5:1-373.

Smânia, A. Jr., C. J. S. Marques, E. F. A. Smânia, C. R. Zanetti, S. G. Carobrez, R. Tramonte, and C. Loguercio-Leite. 2003. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytother Res*. 17: 1069-1072.

Smânia, A. Jr., F. Delle -Monache, E. F. A. Smânia, M. L. Gil, L.C. Benchetrit, and F.S. Cruz. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol*. 45: 177-181.

Smânia, E. F. A., A. Jr. Smânia, C. Loguercio-Leite, and M. L. Gil. 1997. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *J. Chem. Biotechnol*. 70:57-59.

Smânia, E. F. A., A. Jr. Smânia, L.C. Loguercio. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Rev. Microbiol*. 29: 129-136

Statistical Analysis System, Version 9.0 for Windows. 2002. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.1  
Copyright© 1995-2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Teoh, Y. P., M.M. Don, S. Ujang. 2011. Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and Gc-Ms study by *Pycnoporus sanguineus*. *BioRes*. 6: 2719-2731.

Velíšek, J., K. Cejpek. 2011. Pigments of higher fungi: A Review. *Czech J Food Sci*. 29: 87-102.

### **CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS DE *Pycnoporus sanguineus* EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO**

#### **RESUMEN**

*Pycnoporus* es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos que tiene un potencial lignocelulítico; los metabolitos secundarios de este hongo son importantes en la búsqueda de sustancias antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento en medios de cultivo líquido y la producción del pigmento de *P. sanguineus* y evaluar su potencial antimicrobiano. Se utilizó un aislamiento H1 de *P. sanguineus* obtenido de un árbol de casuarina en descomposición. Se determinaron las condiciones de crecimiento y producción del pigmento naranja del hongo bajo un diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial. Los factores y niveles fueron: medio de cultivo (caldo papa y extracto de casuarina) y pH (8.0 y 9.0) durante 30 días. Las variables respuesta fueron concentración de color, peso seco del micelio y rendimiento del pigmento (%). Además, se realizaron cromatografías en capa fina y columna para la separación y purificación de los pigmentos y se identificó por resonancia magnética nuclear los compuestos presentes en el pigmento. Se evaluó el efecto antimicrobiano del pigmento contra el hongo *C. fragariae* y las bacterias *E. amylovora* y *P. carotovorum*. El mayor rendimiento (8.8%) se obtuvo en caldo papa, donde se produjo 1.1631 g de pigmento. Se lograron separar 11 fracciones, de las cuales se identificó por medio de resonancia magnética nuclear, la fracción D y se determinó que es una 1-2 diaminoantraquinona. Se determinó un efecto fungistático del pigmento contra *C. fragariae*, mientras que para las bacterias, se tuvo un halo de inhibición de 11.33 mm para el caso de *E. amylovora* con el pigmento producido en extracto de casuarina a pH 9.0 y para *P. carotovorum* se tuvo un halo de inhibición de 12.50 mm con el producido en caldo papa a pH 9.0. Se tuvieron mayores halos de inhibición en la fracción A (11-12) de 19.5 y 16.66 mm para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente. Se determinó la CMI en 1.5 mg mL<sup>-1</sup> para ambas bacterias, CMB de 3 mg mL<sup>-1</sup> y 5 mg mL<sup>-1</sup> para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente y la inhibición de la actividad citotóxica a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> de 24.40% y 22.23% para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente.



### 3.1 INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. *Pycnoporus sanguineus*

Los hongos filamentosos que producen pudriciones blancas forman un grupo ecológico importante; causan la eliminación selectiva de la lignina de la madera y así tienen un alto potencial para procesos biotecnológicos (Alexopoulos *et al.*, 1996). *Pycnoporus* es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos que tiene un potencial lignocelulítico (Alexopoulos *et al.*, 1996). Este hongo forma parte de la familia Polyporaceae la cual abarca no solo los hongos más lignolíticos si no los más eficientes degradadores de la madera (Papinutti, 2013). Los basidiomas de este género se dice que son flaveliformes (forma de abanico) y se encuentran fuertemente adheridos al sustrato por la base algunas veces se hace más estrecha. Estos hongos tienen la apariencia de ser subestipitados (Figura 21), sus medidas varían pero en general el rango va desde 1.2 cm a 3.5 cm de largo por 1.5 cm a 5 cm de ancho por 0.1 a 0.45 cm de grosor, son confluentes por sus laterales, es decir, se pegan basidiomas contiguos (Papinutti, 2013).



Figura 21. Basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* colectado en el estado de Michoacán.

La especie *Pycnoporus sanguineus* era utilizado en la medicina popular desde tiempos antiguos, actualmente, sus metabolitos secundarios tienen una gran importancia en la búsqueda de sustancias antivirales, antibacterianas y antifúngicas (Hwang *et al.*, 2004). Los pigmentos de este hongo son compuestos derivados de la cinabarina (ácido cinabarínico y tramesanguina), los cuales imparten el color rojo o anaranjado característico de los basidiocarpos (Eggert *et al.*, 1996). El objetivo de este capítulo fue evaluar el crecimiento en medios de cultivo líquido y la producción del pigmento de *P.*

*sanguineus* y evaluar su potencial antimicrobiano, así como su purificación e identificación del compuesto que haga dicho efecto.

### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1. Estrategia Experimental

El proyecto se realizó en cuatro etapas, las cuales se presentan a continuación (Figura 22).

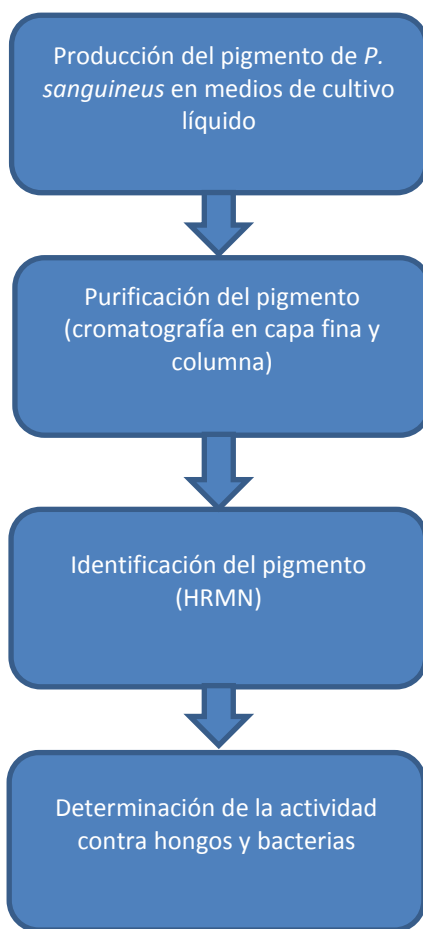


Figura 22. Etapas de la estrategia experimental

### 3.3. Material biológico

De enero a septiembre del 2010 se colectaron muestras de material vegetal en descomposición con presencia de cuerpos fructíferos (basidiocarpos) de hongos saprófitos. Los basidiocarpos del aislamiento (H1) se obtuvieron de árboles de casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) en la localidad del

Ejido de la Finca, Villa Guerrero, Estado de México (18°53'07" LN, 99°37' 36" LO, 1839 msnm). Los basidiocarpos colectados se trasladaron al Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

### 3.4. Producción del pigmento de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo líquido

De acuerdo con Cruz-Muñoz (2012), las mejores condiciones de cultivo del aislamiento H1 de *P. sanguineus* para una mayor producción del pigmento fueron en caldo papa, pH= 8.0 y luz blanca constante. Con base en estos resultados y para evaluar el crecimiento del hongo y producción del pigmento, se propuso un nuevo diseño experimental completamente al azar (DCA) en arreglo factorial, los factores y niveles fueron: medio de cultivo, caldo papa y extracto de casuarina a pH 8.0 y 9.0 (Figura 24). Para esto, se tomaron 5 discos (5 mm de diámetro) de PDA con micelio de cultivos de 30 días del aislamiento H1 y se depositaron en frascos de vidrio (350 mL de capacidad) con 150 mL de los medios de cultivo caldo papa y extracto de casuarina a pH 8 y 9 (Figura. 23). Los frascos inoculados se incubaron a 25°C+ 3°C durante 30 días en luz blanca continua (850 lm). Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento.





















Caldo Papa		Extracto de Casuarina	
pH 8.0	pH 9.0	pH 8.0	pH 9.0
			
			
			
			
			

Figura 23. Arreglo de tratamientos para la producción del pigmento de *P. sanguineus* en medio líquido.

Después del periodo de incubación, se decantó y filtró (papel Whatman No.1 de peso conocido) el medio líquido del micelio de color naranja. Se pesaron las masas de micelio (base húmeda). Se tomó aproximadamente 1 g de cada muestra y se secaron a 105 °C durante 20 h. El micelio restante, se maceró con 10 mL de acetato de etilo para liberar el pigmento. Se ajustó a un volumen de 50 mL con el

mismo solvente. Se dejó reposar el extracto por 4 días. Posteriormente, los extractos se concentraron en un rotavapor (Büchi mod. 461) a 75 °C. Los extractos se pesaron y guardaron en frascos color ámbar.

Las variables de respuesta fueron: concentración del pigmento ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), peso seco del micelio (g) y rendimiento (%). Para determinar la concentración y cantidad del pigmento, se hizo una curva patrón con concentraciones conocidas del colorante rojo de metilo, seleccionado previamente por comparación con otros colorantes comerciales utilizando una cromatografía de placa fina. Se determinó la absorbancia de cada una de las concentraciones. Con los valores de concentración y absorbancia, se realizó una regresión lineal y se determinó la ecuación de la recta ( $y = 107.19x + 0.0001$ ) con la cual se calculó la concentración del pigmento en  $\text{mg mL}^{-1}$ .

### **3.5. Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)**

#### **3.5.1. Cromatografía en capa fina**

Se realizaron mezclas de solventes para separar los pigmentos del extracto crudo obtenido, se consideró la polaridad de cada uno. Se realizaron varias combinaciones de hexano: acetato de etilo (3:1, 2:1, 1:1), con ellas se realizó una cromatografía en capa fina en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> y posteriormente se montó una cromatografía en columna.

#### **3.5.2. Cromatografía en columna abierta**

Para la cromatografía se utilizó sílica gel 60 como fase estacionaria para el empacamiento de la columna de 35 cm aproximadamente. Previo al empacamiento, la sílica se mezcló con hexano y se agregó a la columna, verificando que no existieran burbujas a fin de realizar una separación más eficiente de los compuestos del extracto. Una vez teniendo la sílica libre de burbujas, se procedió a agregar 1 g de extracto sobre la superficie de la columna de sílica. Previamente, el gramo de extracto se mezcló con acetato de etilo y se compactó en una pastilla, el cual se evaporó en un rotavapor. El propósito de esta operación fue la adhesión del extracto a la sílica. La columna se eluyó, para esto se empleó un sistema binario hexano-acetato como fase móvil, posteriormente, sólo acetato de etilo, finalmente acetona y metanol. Se colectaron fracciones de 10 mL y se juntaron las que mostraron un idéntico patrón de corrimiento de acuerdo a sus R<sub>f</sub>s, lo cual se verificó a través de la cromatoplasca con sílica gel. Las fracciones se evaporaron, pesaron y etiquetaron.

### **3.6. Identificación del pigmento (HRMN)**

La identificación de compuestos obtenidos por cromatografía a partir del extracto total del pigmento de *P. sanguineus* se realizó mediante la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H

RMN). Esta técnica permite identificar compuestos por las vibraciones que tienen los átomos de hidrógeno a ciertas longitudes de onda. El resultado se presenta como desplazamientos en el eje de las 'x' a diferentes concentraciones en partes por millón (ppm), siendo estos influenciados en su comportamiento por los átomos de hidrógeno o carbono más cercanos.

Por otro lado, a cada fracción se le registró su espectro infrarrojo y se obtuvo de esta manera, mayor información sobre los grupos funcionales de los compuestos presentes en los pigmentos. La espectroscopia de infrarrojo muestra absorbancias a diferentes longitudes de onda, dependiendo de los grupos funcionales que se encuentren en el compuesto evaluado.

### 3.7. Determinación de la actividad contra hongos y bacterias

#### 3.7.1. Determinación del efecto antifúngico

Las pruebas se realizaron con el extracto crudo del pigmento de *P. sanguineus* que se obtuvo en caldo papa a pH 9.0. Se utilizó al hongo fitopatógeno *C. fragariae*. Se utilizó una concentración de 10.0 mg mL<sup>-1</sup> del pigmento, previamente disuelto en acetato de etilo, el cual se adicionó al medio de cultivo (PDA) antes de solidificar. El control positivo fue un fungicida comercial (Captan®) en una concentración de 200 mg mL<sup>-1</sup>, agregado al medio PDA antes de solidificar. Como control negativo se utilizó el medio PDA con 1 mL de acetato de etilo. Se colocó un disco (5 mm de diámetro) de PDA con micelio del hongo en cajas Petri con cada uno de los medios de tratamiento. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento, como se muestra en la Figura 24. Las cajas inoculadas se incubaron en condiciones ambientales (28 °C) durante 8 días. Se evaluó el crecimiento de la colonia (mm).

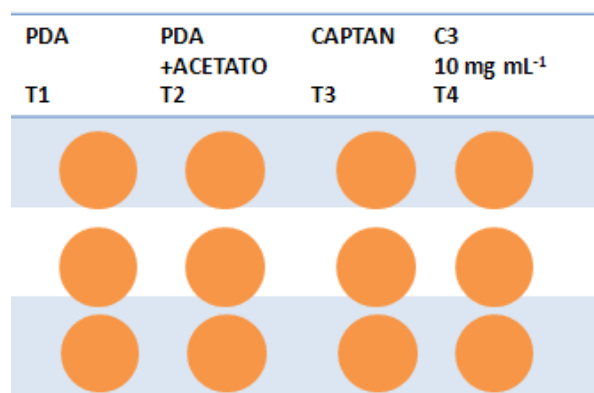


Figura 24. Tratamientos realizados para el control *in vitro* *C. fragariae*

**3.7.1.2. Determinación del efecto fungistático** Para determinar el efecto fungicida o fungistático de las diferentes concentraciones del extracto del pigmento de *P. sanguineus*, se tomaron discos de PDA con

micelio de la periferia de las colonias en donde se presentó la inhibición de *C. fragarie* y se sembraron en PDA. Las cajas inoculadas se incubaron en condiciones ambientales (28 °C). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Se tomó como efecto fungistático si el hongo crecía y sino, como efecto fungicida.

### **3.8. Determinación del efecto antibacteriano**

#### **3.8.1. Prueba de sensibilidad contra bacterias fitopatógenas**

Para determinar el efecto antibacteriano de los extractos de *P. sanguineus*, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer (Bailey y Finnegold, 1991; Koneman *et al.*, 1999). Las dos bacterias fitopatógenas utilizadas (*E. amylovora* y *P. carotovorum*) se reactivaron en medio agar MüllerHinton (AMH) y después en solución salina (0.9%) a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC por comparación óptica con un tubo a 0.5 de la escala nefelométrica de Mc Farland (Bailey *et al.*, 1991 y Koneman *et al.*, 1999). Se tomó una muestra de cada bacteria con un hisopo estéril y se sembró en cajas Petri con AMH de manera uniforme. Se colocaron sensidiscos previamente impregnados con los extractos de los aislamientos de *P. sanguineus* H1 y H2 a una concentración de  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ . Como controles positivos se colocaron sensidiscos con un antibiótico de amplio espectro (Cloranfenicol a  $30 \text{ } \mu\text{g}$ ) y como controles negativos, sensidiscos impregnados con agua-alcohol 75% y acetato de etilo 25%. Las cajas inoculadas con las bacterias se incubaron durante 24 h a  $28 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Después del periodo de incubación se midieron los halos de inhibición (mm).

#### **3.8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)**

Se tomó una porción de masa bacteriana de una colonia de 24 h de edad, cultivada en AMH y se depositó en tubos con caldo de cultivo Müller Hinton (CMH) estéril. Los tubos se incubaron a  $28 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$  por 24 h. Después del periodo de incubación, los cultivos de bacterias, se agregaron a otro tubo con CMH estéril a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC (tubo 0.5 de la escala de McFarland). Por otra parte, se hicieron ocho concentraciones diferentes (0.75, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0 y 12.0 mg/mL) del pigmento de H1 disuelto en agua-alcohol (75%) y acetato de etilo (25%). En placas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración del pigmento en cada pozo, el cual ya contenía 50  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo con bacteria. Las placas se incubaron de 18 a 24 h a  $28 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ . En cada pozo se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo violeta de tetrazolio. Las placas se incubaron por 30 min más en las condiciones antes mencionadas.

Finalmente, se verificó el crecimiento bacteriano por la presencia de una coloración morada en el microtubo. La concentración mínima inhibitoria se identificó en los microtubos que no presentaron dicha coloración. La CMI se identificó en los microtubos que no presentaron dicha coloración, para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), se colocaron 9  $\mu\text{L}$  de cada pozo en cajas de Müller Hinton tomados desde la última concentración donde existe una coloración morada y 3 posteriores concentraciones sin coloración, estas cajas se incubaron por 24 h y se reportó el crecimiento por triplicado.

### **3.8.3. Evaluación de los mecanismos de acción antimicrobiana (bacterias y hongos)**

#### **3.8.3.1. Ensayo de reducción del MTT**

La viabilidad celular se determinó por el método del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, por sus siglas en inglés). Este es un método colorimétrico que evalúa la funcionalidad celular dependiente de su integridad mitocondrial. El MTT es captado por las células vivas y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble, el formazan, el cual quedó retenido en las células y puede ser liberado al solubilizarse las mismas. De esta forma la cantidad de MTT reducido es evidenciada por un cambio de coloración del amarillo a azul. Por lo tanto 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 celular de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Se tomó una porción de masa bacteriana de una colonia de 24 h de edad, cultivada en AMH y se depositó en tubos con caldo de cultivo Müller Hinton (CMH) estéril. Los tubos se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Después del periodo de incubación, los cultivos de bacterias, se agregaron a otro tubo con CMH estéril a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC (tubo 0.5 de la escala de McFarland). Por otra parte, se hicieron ocho concentraciones diferentes (0.75, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0 y 12.0 mg/mL) del pigmento de H1 disuelto en agua-alcohol (75%) y acetato de etilo (25%), en placas de ensayo ELISA. Las placas se incubaron de 18 a 24 h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al siguiente día se preparó dos soluciones de MTT: 1) Solución de MTT:  $5\text{ mg mL}^{-1}$  de MTT en bufer de fosfatos, esta solución debe ser esterilizada 2) MTT Disolvente: HCl 4 mM, 0.1% (NP-40, nonylphenoxypolyethoxyethanol), todo en isopropanol. Se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de solución de MTT a cada pozo y se incubó por 3.5 horas a  $28^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de MTT Disolvente y finalmente se leyó a 590 nm. El porcentaje de inhibición de

crecimiento se midió de la siguiente manera: % Inhibición de crecimiento=  $(OD_{control} - OD_{muestra}) / OD_{control}$ .

### 3.9. Manejo estadístico de datos

El análisis de los resultados se realizó mediante ANDEVA para el diseño experimental propuesto y la comparación de los tratamientos (efectos principales) ( $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ ), para lo cual se usó el paquete estadístico SAS (Versión 9.0 para Windows).

### 3.10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.11. Producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo líquido

El crecimiento del hongo se notó 5 días después de la inoculación, ya que se formó micelio blanco en la superficie y hasta los 15 d se cubrió por completo la superficie del medio líquido del frasco que lo contenía. La coloración del micelio (pigmentación naranja) inició a partir de los 15 d. El experimento se detuvo a los 30 d. De acuerdo con Smânia *et al.* (1998), las colonias de las cepas de *P. sanguineus* MIP 89007, MIP 95001 y MIP 95002 presentaron la pigmentación naranja completa a los 20 d, la mitad del tiempo que duró el experimento propuesto en este trabajo. Cabe mencionar que se hicieron unas pruebas preliminares de crecimiento del hongo en agitación pero el hongo no creció adecuadamente, tal como lo reportaron Smânia *et al.* (1998). Cruz-Muñoz (2012) reportó que el crecimiento y formación de micelio blanco del hongo en la superficie se notó 7 días después de la inoculación y fue hasta los 20 días que se cubrió por completo la superficie del medio líquido, en relación a la experimentación el autor reportó que inició entre los 25-30 días aunque en esa ocasión el experimento se detuvo a los 40 días. En el presente trabajo, se redujó el número de días de experimentación debido al número de discos con micelio (inoculos) ya que se colocaron cinco en lugar de uno por lo que el proceso de producción se adelantó 10 días.

En este trabajo, la extracción del pigmento naranja se realizó durante cuatro días con acetato de etilo en condiciones de oscuridad y después se determinó su concentración con base en la curva de rojo de metilo, considerando que este pigmento es un metabolito secundario y que la literatura sugiere que su producción se realiza en la idiofase cuando el crecimiento activo ha cesado (Calvo *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2005). De esta manera, los resultados coinciden con los autores antes mencionados ya que la



pigmentación del micelio comenzó a los 15 días, cuando el hongo alcanzó el máximo crecimiento dentro del medio de cultivo, y suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados (Parés y Juárez, 2002).

En diversos estudios, los factores como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, espacio, y agua (Frisvad *et al.*, 1998; Strohl, 2000; Adrio y Demian, 2003) además de la variación de los nutrientes y condiciones de incubación se han utilizado para inducir o estimular una mayor producción de metabolitos secundarios bioactivos (Casas-López *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2005). Tal es el caso de la producción de antibióticos por *Fusidium coccineum*, la cual es mejor a pH básicos (Shipanova *et al.*, 1995).

En este trabajo, se evaluó la producción del pigmento en respuesta a los factores medio de cultivo y pH, obteniéndose la mejor producción de pigmento naranja a un pH de 9 en caldo papa (Cuadro 10). Este resultado concuerda con lo reportado por Smânia *et al.* (1998), quienes evaluaron la producción del pigmento naranja (cinabarina) por la cepa MIP 89007 de *P. sanguineus* y observaron la mejor producción fue en pH de 7 y 9 en caldo papa, a 25°C en luz continua. Además, se observó que bajo condiciones de luz blanca se tuvo una mayor concentración de pigmento. Se ha dicho que la presencia de pigmentos también es frecuente en células vegetativas, y pueden actuar protegiéndolas bien de la radiación o de radicales tóxicos producidos en reacciones aeróbicas, también se menciona que en el caso de los hongos que producen pigmentos, estos protegen el material genético de las reacciones químicas inducidas por la luz, al absorber la energía luminosa de la luz blanca (Parés y Juárez, 2002).

Cuadro 10. Comparación de factores del pH y medio de cultivo sobre: concentración del pigmento, peso seco (biomasa) y rendimiento del pigmento producido por *Pycnoporus sanguineus* (H1)

Factor de variación	Nivel	Concentración del pigmento (mg mL <sup>-1</sup> )	Peso seco (g)	Rendimiento de extracto (%)
Medio (A)	Caldo papa	<u>0.0053 ± 0.0024</u> <sup>a</sup>	0.3796 ± 0.1046 <sup>a</sup>	<u>8.817 ± 3.159</u> <sup>a</sup>
	Extracto casuarina	0.0013 ± 0.0003 <sup>b</sup>	0.3416 ± 0.0308 <sup>a</sup>	2.797 ± 0.835 <sup>b</sup>
pH (B)	8.0	0.0028 ± 0.0014 <sup>a</sup>	0.3627 ± 0.0685 <sup>a</sup>	5.823 ± 3.270 <sup>a</sup>
	9.0	0.0039 ± 0.0035 <sup>a</sup>	0.3586 ± 0.0895 <sup>a</sup>	5.790 ± 4.485 <sup>a</sup>

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey al 5%). La comparación es por columna.

Según Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) el contenido promedio del pigmento cinabarina en primordios (basidiocarpos pequeños) del hongo fue de 56 mg g<sup>-1</sup> y no hubo diferencias entre la cinnabarina producida por los cuerpos fructíferos bien desarrollados (basidiocarpos) que fue de 68 mg g<sup>-1</sup>. De acuerdo con estos autores, el mejor sustrato para producir cinabarina en primordios fue pino, seguido por encino y cedro sin importar la cepa utilizada. La ventaja de utilizar los cuerpos fructíferos es que se pueden obtener hasta dos o más cosechas pero con el inconveniente de que requieren de 242 a 356 días para obtenerlos. Una de las diferencias con el presente trabajo es que los pigmentos del aislamiento H1 de *P. sanguineus* se produce en 30 días en medio líquido.

Con respecto al peso seco de la biomasa producida por el aislamiento H1 de *P. sanguineus*, no hubo diferencias significativas entre tratamientos, mientras que Cruz-Muñoz (2012) obtuvo cantidades más altas de biomasa de H1 (0.8501 g) cuando se le comparó con otro aislamiento (0.5801 g) a pH 8.0, en caldo de papa. Si se relaciona la cantidad de biomasa con la producción del pigmento, no existe una tendencia clara, Smânia *et al.* (1995) mencionaron que a mayor producción de cinnabarina, el crecimiento del hongo es menor y esto coincide con lo reportado por Ramos (2006) ya que las mejores condiciones de crecimiento no se relacionan con la producción de cinabarina, similar a lo reportado por Baumer *et al.* (2008), que mencionan que el crecimiento micelial no necesariamente está relacionado con la producción de metabolitos secundarios.

En cuanto al rendimiento, Cruz-Muñoz (2012) mencionó que para el mismo aislamiento de este trabajo, los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 8.5 y 9.0 en caldo papa o extracto de malta (27.53 y 24.91%, respectivamente), menores a los obtenidos para el aislamiento H2, cuyo rendimiento fue de 34.09 y 30.04 % en extracto de malta a pH 8.0 y 8.5. En el presente trabajo se tuvo un rendimiento mucho menor para H1 (8.17%) en comparación con lo anteriormente reportado.

### **3.12. Purificación del pigmento (cromatografía en capa fina y columna)**

#### **3.12.1. Cromatografía en capa fina**

De acuerdo con los resultados, se decidió cultivar a *P. sanguineus* (H1) en caldo papa a pH 9.0. Al extracto obtenido se le realizó una cromatografía de capa fina para determinar los compuestos presentes en el pigmento con los eluyentes 3:1 hexano: acetato de etilo (Figura 25).

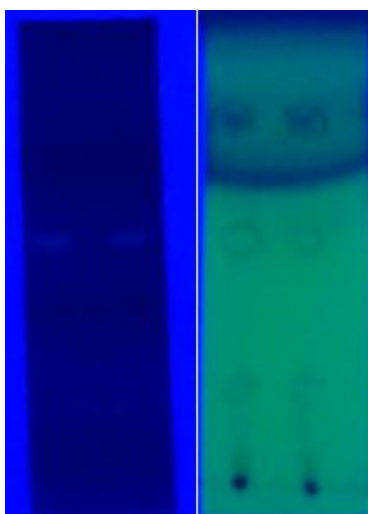


Figura 25. Cromatografía de capa fina de extracto crudo del pigmento de H1 de *P. sanguineus* bajo luz UV onda corta y larga

En el barrido en el espectro UV del extracto del pigmento del aislamiento H1 de *P. sanguineus* obtenido en caldo papa y pH 9.0 de 200 a 700 nm (Figura 26), con acetato de etilo se estableció porque existen compuestos como la cinabarina y el 3-1 fenoxacina que tienen una absorbancia de 265 y 264 nm (Restrepo, 2007). Este autor mostró una relación de las longitudes de onda y los colores percibidos como el color amarillo (565-590nm), naranja (590-625 nm) y rojo (625- 740 nm).

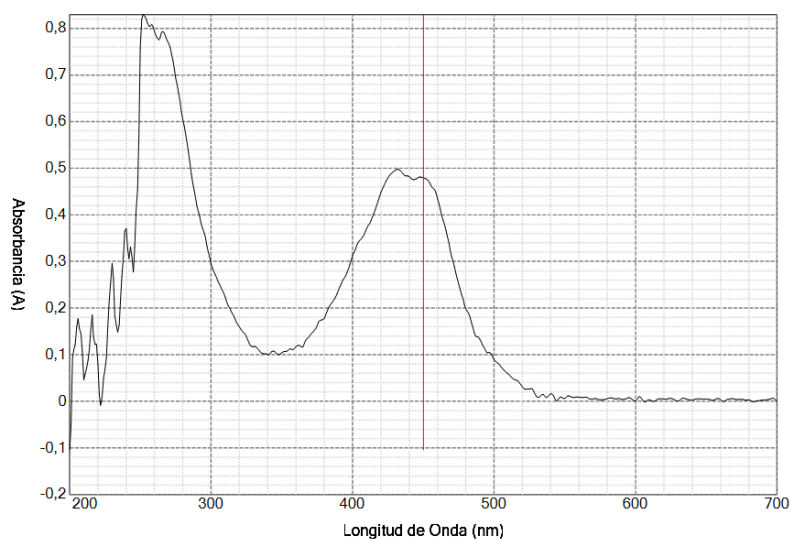


Figura 26. Espectrograma del pigmento extraído con acetato de etilo, caldo papa a pH 9.0 (H1) de *Pycnoporus sanguineus*.

### 3.12.2. Cromatografía en columna abierta

Para este tipo de cromatografía se siguió el siguiente protocolo, la fase estacionaria fue sílica gel no. 60; fase móvil: los primeros 7 tubos se colectaron de la elución con 3:1 hexano: acetato de etilo, del tubo 8-16 con la mezcla 2:1 hexano:acetato de etilo, del tubo 17-24 de la combinación 1:1 hexano:acetato de etilo, del tubo 25-34 sólo con acetato de etilo y finalmente se arrastró la parte más polar con metanol aproximadamente 400 mL (Figura 27).



Figura 27. Fraccionamiento por columna abierta del extracto crudo obtenido de H1 en medio líquido

Las fracciones obtenidas fueron 11 (Cuadro 11). La fracción A se colectó con 3:1 hexano:acetato de etilo, la B con 2:1 hexano:acetato de etilo y la C con 1:1 hexano:acetato de etilo, las fracciones A10, A (11-12), A (13-19), A (20-29) se colectaron sólo con acetato de etilo y finalmente las fracciones M1, M2 y M3 con metanol.

Se decidió agrupar las fracciones, no sólo por los resultados encontrados en la cromatografía en capa fina, sino que a partir del compuesto D se realizaron barridos de UV para clasificar de una forma más estandarizada las fracciones y de esta manera se decidió enviar a HRMN<sup>-1</sup> 3 fracciones (A10, D, M2), pues de acuerdo con la Figura 28 se tuvieron absorbancias que pudieran pertenecer a lo anteriormente señalado en el caso de las fenoxacinas (264, 265 y 268 nm).

Cuadro 11. Fracciones obtenidas de la separación del pigmento de *Pycnoporus sanguineus* H1 cultivado en caldo papa a pH 9.0.

Fracción	Peso g
A	0.1073
B	0.0421
C	0.0679
D	0.0707
A(10)	0.0067
A(11-12)	0.0128
A(13-19)	0.0454
A(20-29)	0.0224

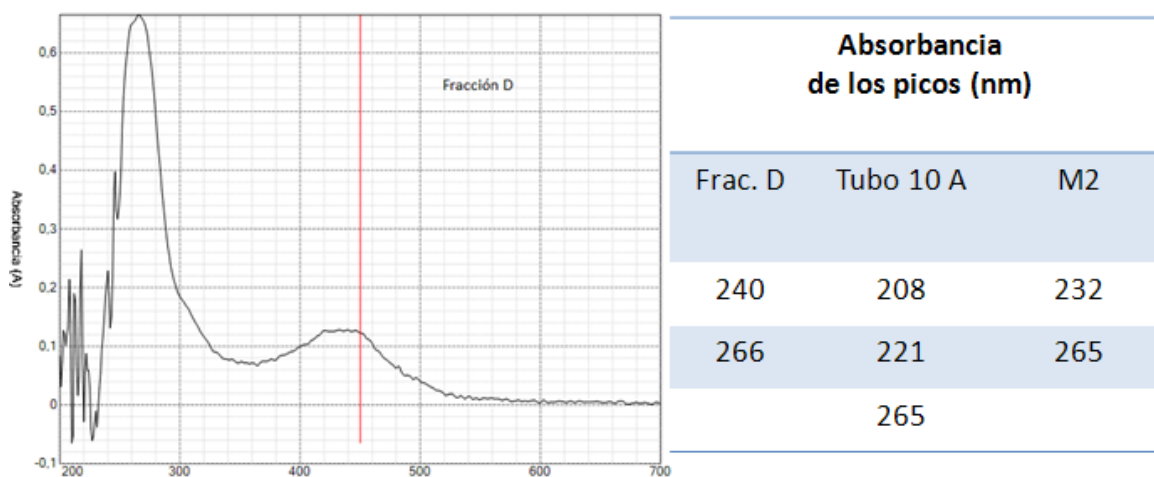


Figura 28. Fracciones que oscilan en el rango de las fenoxaciona

Los hongos como *P. sanguineus* productor de metabolitos como las lacasas, realizan bioconversiones que involucran algunas reacciones enzimáticas. En relación a esto, en el trabajo de Batista (2009) fue evaluada la influencia de los flavonoides narangina, naringenina y quercetina en el crecimiento de *P. sanguineus*, demostrando que se produjeron catorce diferentes metabolitos coloridos, nueve de los cuales se originaron de naringenina y ocho de narangina. Otro ejemplo de bioconversión es en la industria textil fue reportado por Vanhulle *et al.* (2007) donde se utilizó a *P. sanguineus* para degradar el colorante "Acid Blue 62" mediante lacasas, formando compuestos más biodegradables. Los hongos son una interesante fuente ecológica de pigmentos, ya que varias especies de ellos son ricos en colorantes estables, tales como antraquinona, ácidos carboxílicos, pre-antraquinonas. Por lo que

pigmentos naturales presentan una mejor biodegradabilidad y una mayor compatibilidad con el medio ambiente en comparación con los tintes sintéticos (Poorniammal *et al.*, 2013).

El potencial que tiene *P. sanguineus* desde el punto de vista biotecnológico por la gran cantidad de productos que puede generar, dependiendo de la cepa, condiciones de cultivo, temperatura, etc., lo hacen atractivo para la industria. De acuerdo con lo que se visualizó en los espectros de RMN<sup>1</sup>H (Figura 29) y <sup>13</sup>C (Figura 30), el compuesto D presenta dos señales múltiples con un desplazamiento químico ( $\delta$ ) de 7.65 ppm y 7.58 ppm expresadas en la zona de alta frecuencia de protones aromáticos, estas dos señales integran para dos protones cada una por lo tanto dicho efecto por señales múltiples la estructura molecular es un sistema AA'BB', estos sistemas son muy complejos por que las constantes de acoplamiento  $J_{AB}$  (orto acoplado) es usualmente mas grande que el  $J_{AB'}$  (meta acoplado), este modelo es propio de sistemas simétricos como lo son el 1,4-disustituido dienos y los orto disustituidos bencenos; siguiendo analizando el espectro de protón se tienen dos señales con un  $\delta=7.03$ ppm y 6.77 ppm en la misma zona de grupos aromáticos por lo que se deduce que además de que pertenecen a la misma molécula ya que integran proporcionalmente, la molécula posee dos grupos fenilo unidos a un homociclo, es decir, una estructura totalmente hidrocarbonada, por último, se observó una señal ancha en 5.22 ppm expresada en la zona de aminas, integrando para cuatro protones. Para el espectro de <sup>13</sup>C se observarán dos señales en zonas de muy alta frecuencia, 172.72 ppm y 167.22 ppm, correspondiendo a carbonilos (C=O) y con mayor precisión cetonas, estos dos grupos funcionales cetonas no pueden pertenecer a los dos grupos fenilo identificados con anterioridad en el espectro de protón por lo tanto debe pertenecer a una orto-benzoquinona, además existe la presencia de 14 señales, de las cuales 6 señales poseen hibridación  $sp^2$ , es decir, seis carbonos tienen dobles enlaces con carbonos representando a los grupos fenilos identificados en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, al construir la molécula con la información obtenida de ambos espectros de RMN; se propone que la molécula soluble en dimetilformamida (DMF) es una 1-2 diaminoantraquinona, aunque se esperaba encontrar grupos de fenoxacinas por la existencia de referencias sólidas donde mencionan que los compuestos principales de *P. sanguineus* son: cinabarina, ácido cinabarínico y tramensaguina como se muestra en el espectro de RMN <sup>1</sup>H del ácido cinabarínico disuelto en DMF-*d*<sub>7</sub> (Figura 31) tiene desplazamientos químicos diferentes que el compuesto D.

Las antraquinonas son el grupo más grande de pigmentos naturales de naturaleza quinoide, son sintetizadas por plantas, hongos y líquenes. Tienen una gran importancia porque exhiben actividad: antibacteriana antiparasitaria, insecticida, fungicida y antiviral (Gessler *et al.*, 2013).

En la Figura 28 se muestra que los compuestos seleccionados oscilan entre los 208 a los 266 nm por lo que se asumió que podrían ser compuestos pertenecientes a las fenoxacinas pero de acuerdo con Nor Hadiani *et al.* (1997) las longitudes de onda máximas de las antraquinonas que se obtuvieron de *Morinda elliptica* fueron de 262, 288 y 434 nm para el 1,3,8- trihidroxi-6-metil-antraquinona (emodin), mientras que Hosoe *et al.* (1990) señalan longitudes de onda a 284, 309 y 378 para el 1,3,7-trihidroxi-6 metilantraquinona (demetilmacrosporin). En la investigación reportada sobre antraquinonas de origen *Morinda Royoc* L se observaron la presencia de antraquinonas de coloración roja intensa y un comportamiento similar para la médula y la corteza, con tres máximos de absorción, para la corteza de 240, 300 y entre 460-480 nm, la médula sólo difiere de estos valores en el primer máximo que se encuentra a 260 nm. En las hojas se detectó un máximo a 340, pero de muy baja intensidad (Barroto *et al.*, 2005).

Las antraquinonas son el grupo más grande de pigmentos naturales de naturaleza quinoide. En las plantas, hongos y líquenes existen unos 700 compuestos identificados pertenecientes a este grupo. A menudo aplican un color por lo general amarillo, naranja o marrón en el micelio de hongos microscópicos, en los cuerpos fructíferos de los hongos macroscópicos, y líquenes. En la industria textil, antraquinonas fúngicas son ampliamente utilizadas como colorantes para fibras naturales y sintéticas y en la microelectrónica, las antraquinonas tienen aplicación como semiconductores (Gessler *et al.*, 2013). En el caso del hongo *P. sanguineus* se puede apreciar estos colores presentes en el micelio y en el basidiocarpo por lo que también pueden existir antraquinonas, las cuales fueron identificadas por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

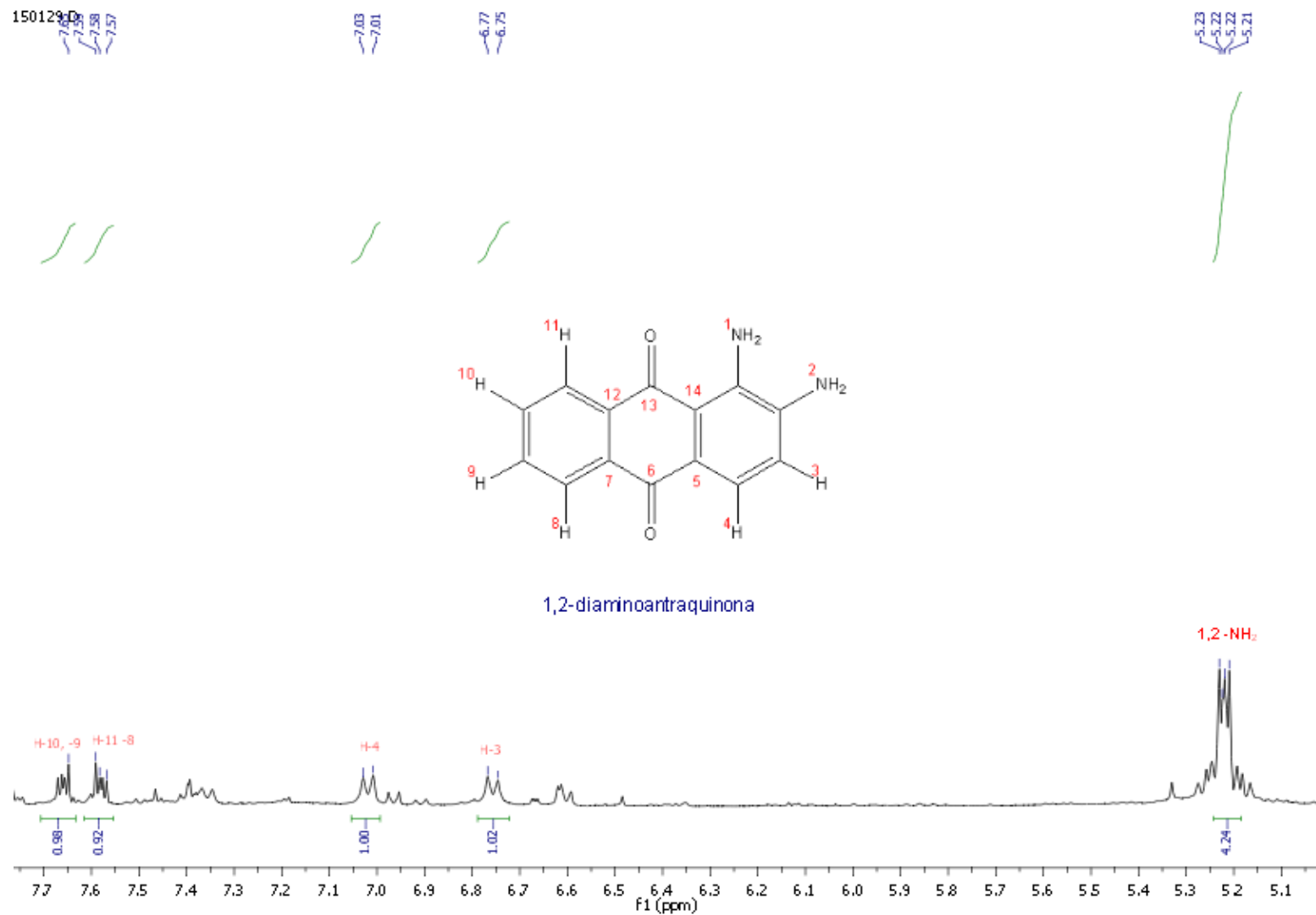
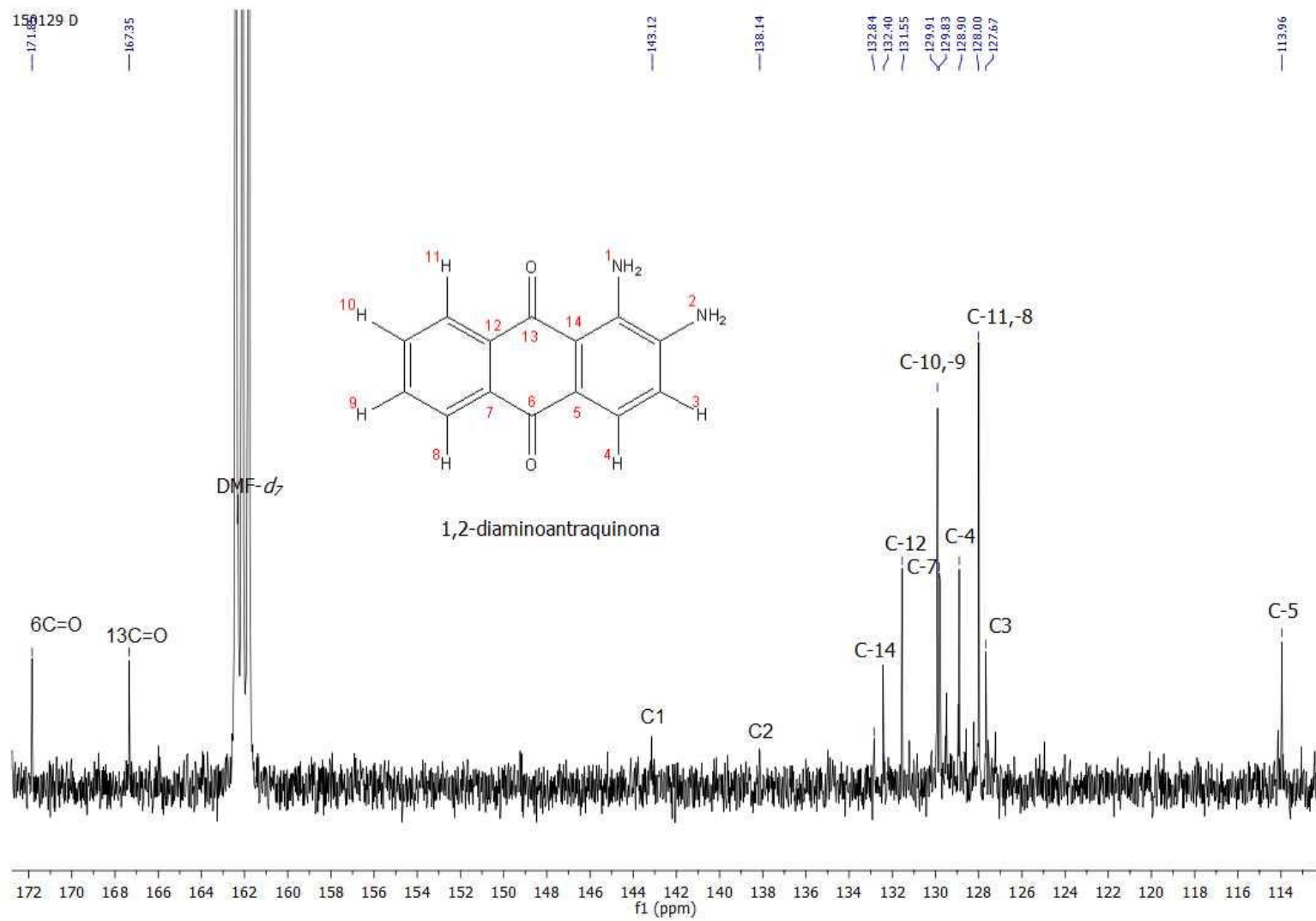


Figura 29. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la muestra D en solución de  $\text{DMF-}d_7$ .





**Figura 30.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la muestra D en solución de DMF- $d_7$ .

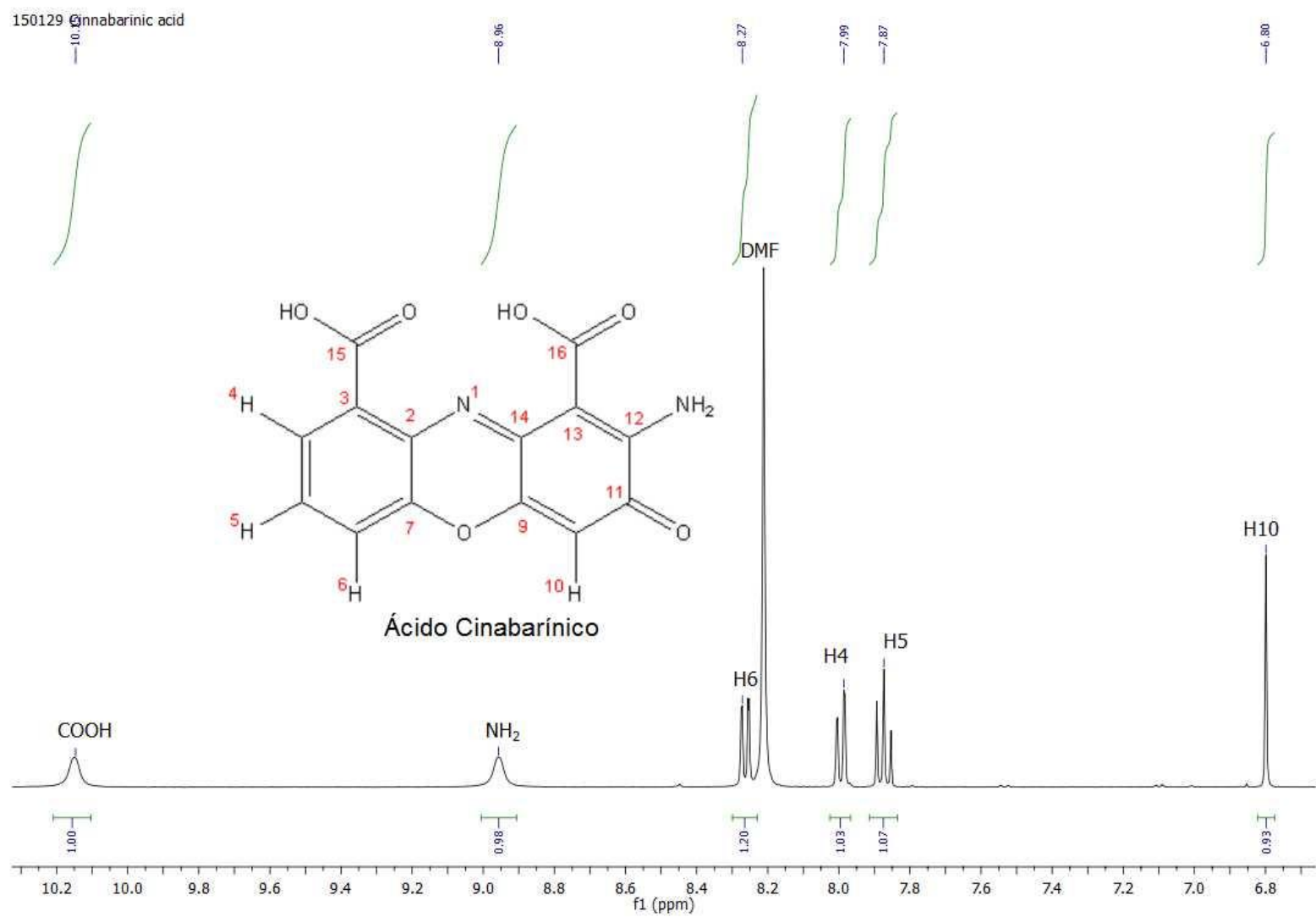


Figura 31. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del ácido cinabarínico en solución de DMF-*d*<sub>7</sub>

### **3.12.3. Comparación de compuestos producidos por *P. sanguineus* en diferentes medios de cultivo: sólido y líquido**

Se mencionó anteriormente que los metabolitos secundarios que produce por *P. sanguineus* se realizan por bioconversiones enzimáticas por lo que es importante comparar los compuestos detectados en el espectrofotómetro, las formas de cultivo influyeron en la producción de compuestos como se aprecia en el Cuadro 12, se mostraron picos a 214, 266, 431 y 450 nm para H1 cultivado en pda a pH 7; 228, 257, 431 y 451 nm para H2 cultivado en pda a pH 7.0; mientras que H1 cultivado en caldo papa pH 9.0 se presentó más compuestos en 206, 230, 252, 266, 432, 540 y 603nm, lo cual coincide parcialmente con lo reportado por Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) quienes encontraron una banda característica de cinabarina a 265 nm muestra que el barrido con acetato de etilo mostró otros pigmentos a 290, 400, 440 y 450 nm. Lo anterior explica que los extractos que se obtuvieron en este trabajo se encuentran conformados por varios pigmentos anaranjados y que dependiendo de cómo sea cultivado, en medio sólido o líquido se producen diferentes compuestos. Estos resultados son similares a los reportados por Méndez-Zavala *et al.* (2007) quienes encontraron dos picos a 505 y 425 nm en el barrido de 400 a 600 nm del pigmento rojo producido por *Penicillium purpurogenum*. Domínguez-Espinosa *et al.* (2002) explicaron que hay una combinación de dos o más pigmentos que van del amarillo al naranja (405 nm) y de pigmentos rojos (495 nm) en los pigmentos de *Monascus*. Esto concuerda con la investigación de Carvalho *et al.* (2007) quienes mencionaron que conforme avanzó la fermentación de *Monascus*, se producían pigmentos rojos-amarillos; sin embargo, los pigmentos rojos también absorben luz a 400 nm. Tal como se dijo anteriormente, es posible que los extractos obtenidos en este trabajo estén conformados por una mezcla de varios pigmentos, que no sólo estén en la misma longitud de onda (264 y 265 nm) sino también otros que van de rojo a naranja que son generados por el grupo fenoxacina. De esta manera, se realizó un barrido en el rango de 200 a 700 nm con un estándar de ácido cinabaránico, (Sigma Aldrich<sup>®</sup>), de acuerdo con su ficha técnica, se disuelve con dimetil sulfóxido (DMSO) y que tiene sólo un pico a 268 nm. En el caso de H1 cultivado en medio sólido y líquido tuvieron la misma absorbancia de 266 nm, lo cual podría indicar que existe la presencia de las fenoxacinas.

Al hacer la comparación de las absorbancias encontradas en los extractos obtenidos en medio sólido y caldo papa a pH 9.0, se encontró que existen más compuestos en el extracto producido en medio líquido que en el sólido (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comparación de absorbancias de extractos crudos producidos en diferentes medios de cultivo de los aislamientos *Pycnoporus sanguineus*.

Aislamiento	Medio de cultivo	pH	Picos nm
H1	Agar papa dextrosa	7.0	214, 266, 431.450
H1	Caldo papa	9.0	206, 230, 252, 266, 432, 540, 603
H2	Agar papa dextrosa	7.0	228, 257, 431, 451

### 3.13. Determinación de la actividad contra hongos y bacterias

#### 3.13.1. Determinación del efecto antifúngico

Los resultados de las pruebas de control sobre el crecimiento que se realizaron con el hongo fitopatógeno *C. fragariae* (Cuadro 13) muestran una inhibición parcial del crecimiento con el extracto del pigmento del aislamiento H1 de *P. sanguineus* producido en caldo papa a pH 9.0. Se decidió sólo manejar una sola concentración en este experimento ya que se observó que a mayor concentración existe mayor retardo en el crecimiento del hongo (Cruz-Muñoz, 2012).

Cuadro 13. Comparación de medias del crecimiento (diámetro de colonia, mm) de *Colletotrichum fragariae* en PDA con extracto del pigmento del aislamiento H1 de *Pycnoporus sanguineus* y un fungicida comercial.

Factor de variación	Nivel	Crecimiento radial en mm al día 8
(A) Tratamiento	T1	47.3 ± 0.57 <sup>b</sup>
	T2	50.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
	T3	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>
	T4	29.3 ± 1.15 <sup>b</sup>

Nota: T1, testigo de crecimiento (PDA); T2, testigo negativo acetato de etilo; T3, Testigo positivo Captan<sup>®</sup>, T4, Extracto de *P. sanguineus* de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey al 5%).

Del cuadro anterior se puede explicar, que se tuvo una inhibición significativa del crecimiento con el extracto *P. sanguineus* a 10 mg mL<sup>-1</sup>, la inhibición de *C. fragariae* fue directamente proporcional, teniendo un 66% de inhibición, sin embargo no fue mayor a la que se observó con el fungicida Captan<sup>®</sup> (T3). En el trabajo reportado por Cruz-Muñoz (2012) donde de igual manera se probaron los extractos de H1 y H2 pero se cultivaron en medio líquido (caldo papa a pH= 8.0, 8.5 y 9.0) tiene una inhibición del 70% con respecto a *C. fragariae*.

### 3.13.2. Determinación del efecto fungistático

Se corroboró con el fungicida Captan<sup>®</sup>, la efectividad fungicida de este compuesto, sin embargo con el extracto de *P. sanguineus* a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>, se observó el desarrollo del hongo a condiciones de 28 °C en agar papa dextrosa por lo que sólo fue una actividad fungistática con respecto *C. fragarie* en la Figura 32 se observa lo antes explicado.

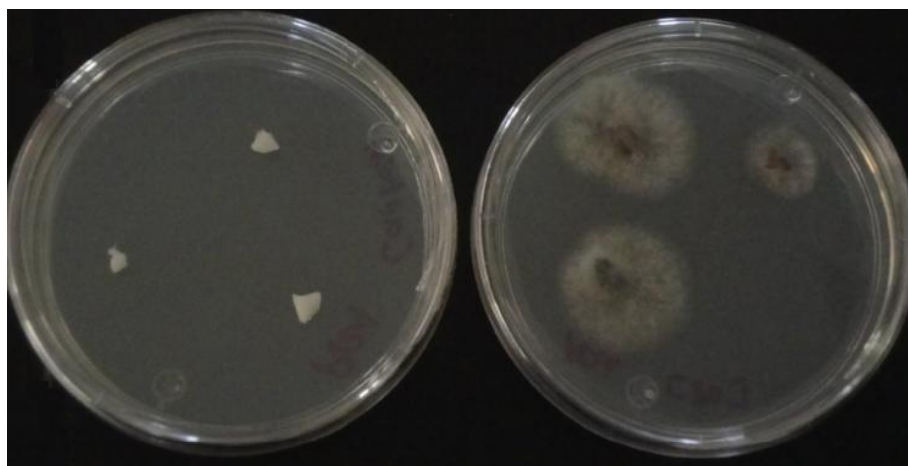


Figura 32. Efecto fungicida propiciado por Captan<sup>®</sup> y fungistático efectuado por extracto de *Pycnoporus sanguineus* cultivado en caldo papa a pH 9.0

### 3.13.3. Determinación del efecto antibacteriano

#### 3.13.4. Prueba de sensibilidad contra bacterias fitopatógenas

Las pruebas de sensibilidad realizadas con sensidiscos impregnados con el extracto del pigmento del aislamiento H1 de *P. sanguineus* a una concentración de 8 mg sensidisco<sup>-1</sup> contra bacterias fitopatógenas, arrojó los siguientes resultados en los Cuadros 14 y 15.

Cuadro 14. Efecto del extracto crudo de *Pycnoporus sanguineus* (H1) obtenido de caldo papa a pH 9.0 en el desarrollo de *Erwinia amylovora*.

Factor de variación	Nivel	Halo de inhibición en mm H1
Medio (A)	CP	10.33 ± 1.032 <sup>b</sup>
	EC	<u>11.33 ± 0.516<sup>a</sup></u>
pH (B)	8.0	10.33 ± 0.816 <sup>b</sup>
	9.0	<u>11.33 ± 0.816<sup>a</sup></u>

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey al 5%)

El extracto producido en casuarina a pH 9.0 tiene un mayor efecto antibacteriano contra *E. amylovora* (11.33 mm), con respecto a *P. carotovorum* no existe diferencia significativa por lo que los halos de inhibición oscilan entre los 11.50 y 12.66 mm.

Cuadro 15. Efecto del extracto crudo de *Pycnoporus sanguineus* (H1) obtenido de caldo papa a pH 9.0 en el desarrollo de *Pectobacterium carotovorum*.

Factor de variación	Nivel	Halo de inhibición en mm H1
Medio (A)	CP	12.66 ± 1.366 <sup>a</sup>
	EC	11.50 ± 0.836 <sup>a</sup>
pH (B)	8.0	11.66 ± 1.032 <sup>a</sup>
	9.0	12.50 ± 1.378 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey al 5%)

Comparando los resultados anteriores son mayores halos de inhibición que los reportados por Cruz-Muñoz (2012) donde mencionó que el pigmento producido por *P. sanguineus* tuvo halos de inhibición en *E. amylovora* (7 a 8 mm) y para *P. carotovorum* (7.3 a 8.6 mm), causado por el extracto cultivado en medio líquido de H1 y H2 a pHs básicos de *P. sanguineus*. La inhibición no la causa el medio de

cultivo si no el extracto naranja, por lo que la importancia radicó en la evaluación del extracto de acuerdo a sus condiciones de donde se produjo es importante mejorar el proceso antibacteriano.

Las pruebas de sensibilidad con las fracciones: A, C, M2 y M3 no hubo efecto inhibitorio a una concentración de 8 mg sensidisco<sup>-1</sup>, por lo que se realizó con las demás fracciones obteniendo resultados de inhibición bacteriana en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Efecto de las fracciones separadas del extracto de *Pycnoporus sanguineus* (H1) a una concentración de 8 mg sensidisco<sup>-1</sup> en *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*.

Bacteria	Tinción Gram	Fracciones		
			Halo de inhibición en mm Cloranfenicol	
<i>Erwinia amylovora</i>	Negativo (-)	D	10.6 ± 0.57	36 ± 1.0
		A(11-12)	19.57 ± 0.57	35 ± 1.0
		A(13-19)	16.66 ± 0.57	34.6 ± 0.57
		A(20-29)	12.00 ± 0.0	35.6 ± 0.57
		A(11-12)	19.33 ± 1.15	35.0 ± 0.0
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Negativo (-)	A(13-19)	16.66 ± 0.57	35 ± 1.0
		A(20-29)	12.00 ± 0.0	35.0 ± 0.0

Nota: los halos de inhibición son el promedio de tres repeticiones ± el error de la media (ESM).

En el cuadro 15 se reportó que los mayores halos de inhibición para ambas bacterias fitopatógenas se presentó en la fracción A(11-12) está fracción fue obtenida mediante la separación en columna abierta y colectada con acetato de etilo, presento absorbancias de: 207,234,257 y 258 nm.

Las fracciones que presentaron mayores halos de inhibición fueron: A(11-12) de 19.57 y 16.66 mm para *E. amylovora* y *P. carotovorum* respectivamente y A(13-19) con 16.66 mm contra ambas bacterias, mostrando que la separación por columna si mejoro la actividad antibiótica pero la desventaja es la cantidad que se puede separar, para la fracción A(11-12) tiene un rendimiento de 1.19% y para A(13-19) de 4.2% de purificación, siendo técnicamente costoso, por lo que probablemente se pueda alcanzar valores parecidos a los que se obtuvieron en el Cuadro 15, variando las condiciones de producción de *P. sanguineus* (H1) en líquido para obtener el extracto sin llegar a la separación de los compuestos.

Los principales compuestos producidos por *P. sanguineus* como ya se mencionaron son: poliporin, cinnabarina, está última es un pigmento naranja con una estructura básica 3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C-2 y un grupo hidroxilo en C-9 (Achenbach y Blümm, 1991 y Gripenberg, 1951), y tiene actividad antibiótica contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp., así como una mayor actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas que negativas (Smânia et al. 1995, 1997). Se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar si el ácido cinabarínico tiene de igual manera un efecto antibiótico pero no se encontró información por lo que se decidió probarlo experimentalmente en las bacterias fitopatógenas, por lo que se colocaron sensibilizadores de ácido cinabarínico (sigma Aldich® al 98% de pureza) a una concentración de 1 mg sensibilizador<sup>-1</sup> se determinó negativa la inhibición para las bacterias fitopatógenas (*E. amylovora* y *P. carotovorum*).

Cómo anteriormente se expuso el compuesto D es 1-2 diaminoantraquinona se tiene reportado que las antraquinonas exhiben actividad antibacteriana, insecticida, fungicida y antiviral.

También se tiene reportes de que antraquinonas producidas por *Aspergillus* spp., *Verticillium* spp., *Pichia* spp., durante la fermentación Fuzhuan té bebida tradicional de algunas provincias de China posee un efecto antidisentérico (Gessler et al., 2013).

Otro ejemplo de antraquinona es Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone) es un compuesto bactericida, fungicida, desacoplador de la respiración mitocondrial, inhibidor la proteína quinasa, antiinflamatorio, anticancerígeno y hepatoprotector es producido por los hongos: *Aspergillus* sp., *Pyrenochaeta terrestris*, *Trichoderma* sp., *Dermocybe sanguinea*, *Phoma* sp. (Anke et al., 1980 y Gessler et al., 2013).

#### **3.13.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)**

Cruz-Muñoz (2012) reportó que las concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos obtenidos de H1 y H2 fue de >12 y 7 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente contra de *E. amylovora* y de los extractos obtenidos de H1 y H2 fue de 10 y >12 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente contra de *P. carotovorum*, en el Cuadro 17 se obtuvo una CMI de 1.5 mg mL<sup>-1</sup> del extracto obtenido por H1 en caldo papa a pH 9, contra ambas bacterias fitopatógenas, esta concentración es menor que en el trabajo reportado anteriormente y una CMB de 3 y 5 mg mL<sup>-1</sup> para *E. amylovora* y *P. carotovorum* respectivamente por lo que es importante verificar cada extracto producido bajo las mismas condiciones si tiene un menor o mayor efecto contra estas bacterias fitopatógenas.



También Cruz-Muñoz (2012) determino la CMI de las bacterias patógenas (*in vitro*) de interés clínico *Salmonella thyphi* (8mg/mL), *Bacillus cereus* (H1, 8mg/mL; H2, 10mg/mL), *Klebsella pneumoniae* (>12mg/mL), *Shigella dysenteriae* (8mg/mL). También Smânia *et al.* (1998) reportaron que entre tres cepas de *Pycnopus sanguineus*, MIP 89007 produjo más cinnabarina que MIP 95001 y MIP 95002 y que fue causante de la actividad antimicrobiana contra 11 especies de bacterias aisladas de los alimentos. *Bacillus cereus* y *Leuconostoc plantarum* fueron las más sensibles a cinnabarina, siendo inhibidas por 0.0625 mgmL<sup>-1</sup>, mientras que *Klebsiella pneumoniae* fue la menos sensible (>4.0 mg mL<sup>-1</sup>).

Cuadro 17. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de H1 de *Pycnopus sanguineus* en el control de bacterias fitopatógenas

Bacterias fitopatógenas	Concentración mínima inhibitoria (mg mL <sup>-1</sup> )	Concentración mínima bactericida (mg mL <sup>-1</sup> )
	H1	
<i>Erwinia amylovora</i>	1.5	3
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1.5	5

### 3.14. Evaluación de los mecanismos de acción antimicrobiana (bacterias y hongos)

#### 3.14.1. Ensayo de reducción del MTT

El ensayo fue modificado, ya que el método convencional reportado se aplica a células. Con las concentraciones probadas (0.75, 1.5, 3, 5, 7, 8, 10 y 12 mg mL<sup>-1</sup>) de pigmento extraído de caldo papa a pH 9.0, en una placa de 96 pozos, el resultado obtenido (expresado en porcentaje de inhibición de actividad citotóxica) a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> de pigmento extraído de caldo papa a pH 9.0 fue de 24.40% ± 3.38 y 22.23% ± 2.45 para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente. En lo reportado por Abate *et al.* (1998) para la detección rápida de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a la rifampicina, se realizó la prueba MTT y los resultados obtenidos mediante este ensayo coinciden perfectamente con el método Bactec. La prueba del MTT es simple y barata puede ser utilizada para identificar resistencia o susceptibilidad de las cepas a diferentes compuestos.

## CONCLUSIONES

La producción *in vitro* de *P. sanguineus* en medio de cultivo líquido fue viable debido a que se observó un mayor rendimiento 8.8% cuando se cultivó en caldo papa. En este estudio, también se se acortó el tiempo de producción del micelio de *P. sanguineus* de 40 días a 30 días, debido al incremento de inóculos (5) se separó el e pigmento producido y la muestra D es 1-2 diaminoantraquinona, se determinó por HRMN<sup>1</sup>, la cual demostró actividad antibacteriana contra *E. amylovora*. Se obtuvo una CMI de 1.5 mg mL<sup>-1</sup> de extracto producido en caldo papa a pH 9.0 contra ambas bacterias y una CMB de 3 y 5 mg mL<sup>-1</sup> para *E. amylovora* y *P. carotovorum*. Se demostró la actividad fungistática de los pigmentos extraídos de medio líquido contra *C. fragarie* y se obtuvo un porcentaje de inhibición de actividad citotóxica a una concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> de pigmento extraído de caldo papa a pH 9.0, de 24.40% y 22.23% para *E. amylovora* y *P. carotovorum*, respectivamente. El pigmento producido por H1 en medio caldo papa tiene un potencial como biobactericida contra las bacterias fitopatógenas que producen pérdidas en postcosecha.

## LITERATURA CITADA

- Abate, G., R. N. Mshana, H. Miörner. 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. INT J TUBERC LUNG DIS. 2(12):1011–1016.
- Achenbach, H., and E. Blümm. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch. Pharm. 324: 3-6.
- Acosta-Urdapilleta, L., G. A. Alonso-Paz, A. Rodríguez, M. Adame, D. Salgado, M. Montiel-Peña, F. Medrano-Vega, y E. C. Villegas-Villarreal. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico In: Martínez-Carrera, D., N. Cuvetto, M. Sobal, P. Morales, y V. M. Mora (eds). Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Puebla. 2010. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. pp: 531-562.
- Adrio, J.L., A.L. Demian. 2003. Fungal biotechnology. International Microbiology 6:191-199.

- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, M. Blackwell. 1996. Phylum Basidiomycota order Aphyllophorales, polypores, Chantharells, tooth fungi, coral fungi and corticioids. *In*: Harris, D. (ed). Introductory Mycology 4<sup>th</sup> Ed. New York, U. S. A. Wiley and Sons Inc. pp: 563–597.
- Alfonso, D., E. R. Sandoval. 2008. Evaluación "*In vitro*" de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
- Anke, H., I., Kolthoum, H. Zaehner, H. Laatsch, 1980. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* Group. *Arch. Microbiol.* 126: 223–230.
- Bailey, S., S. Finegold, E. Baron. 1991. Diagnostico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. 7<sup>a</sup> edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 190-209.
- Barroto, B. J., M. A. J. Blanco, M. P. Rivas, M.T. Hernández, L.O. Concepción, R.S. Trujillo. 2005. Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la Planta de *Morinda Royoc* L. *Revista CENIC.* 36: 65-69.
- Batista, L.F. 2009. Produção de lacase e bioconversão de flavonóides por *Pycnoporus sanguineus*. Tesis de Maestría. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS FACULDADE DE FARMÁCIA, Goiânia, Brasil.
- Baumer, J. D., S. M. Mas Diego, S. M. V. Pacheco, A. F. M. Morgado, and A. F. Jr. Furigo. 2008. Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. *Biofar Rev. Biol. Farm.* 2:1-5.
- Bailey, S., Finegold, S., Baron, E. 1991. Diagnostico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. 7<sup>a</sup> edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 190-209.
- Calvo, M. A., R. A. Wilson, J. W. Bok, N. P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.
- Carvalho, J. C., B. O. Oishi, A.L. Woiciechowski, A. Pandey, S. Babitha, and C. R. Soccol. 2007. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian J. Biotechnol.* 6: 194-199.

- Casas-López, J.L., J.A. Sánchez-Pérez, F.G. Fernández-Sevilla, E. Molina Grima, Y. Chisti, 2004. Fermentation, optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79: 1119-1126.
- Cruz-Muñoz, R. 2012. Producción de extractos de *Pycnoporus sanguineus* con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas. Tesis de Maestría. UPIBI-IPN, México, DF. pp: 64.
- Domínguez-Espinosa, R. M., R. Wang, J. D. Pacho-Carrillo. 2002. Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 17: 77–83.
- Eggert, C., U. Temp, K. E. L. Eriksson. 1996. The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151–1158.
- Eisenbrand, G., B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B.J. Blauboer, A. Boobis. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* 40 (2): 193-236.
- Frisvad, C.J., U. Traen, O. Filtenbor. 1998. Role and use of secondary metabolites in fungal taxonomy. In: Frisvad; J.C., P.D. Bridge, D.K. Arora, (eds), *Chemical Fungal Taxonomy*. Marcel-Decker, Nueva York pp. 289-319.
- García, J. 2008. Efecto del quitosano sobre la membrana celular de *Rhizopus stolonifer*. Tesis de Maestría. CEPROBI-IPN, Yautepec, Morelos.
- Gessler, N.N., A.S. Egorova, T.A. Belozerskaya. 2013. Fungal anthraquinones. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 49: 85-99.
- Gripenberg, J. 1951. Fungus pigment. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. *Acta Chem. Scand.* 12: 590-59.
- Hosoe, T., K. Nozawa, S. Udagawa, S. Nakajima, K. Kawai. 1990. An anthraquinone derivative from *Dichotomophthora lutea*. *Phytochemistry.* 29: 997-999.
- Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi, and J. W. Yun. 2004. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96: 1296-1305.

- Keller, N.P., G. Turner, J.W. Bennett. 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3:937-947.
- Komeman, E., W. Winn, S. Allen, W. Janda, G. Procop, P. Screckenberger. 2004. Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica-PANamericana. 5a. Edición. Argentina. pp. 565-620.
- Méndez-Zavala, A., J. C. Contreras-Esquivel, F. Lara-Victoriano, R. Rodríguez-Herrera, y C. N. Aguilar. 2007. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6: 267-273.
- Nor Hadiani, I.A.M.A, N. Aimi, M. Kitajima, H. Takayama, N.H. 1997. Lajis. Anthraquinones from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry*. 45:1723-1725.
- Papinutti, L. 2013. *Pycnoporus sanguineus*. Fichas Micológicas. *Rev. Boletín Biológica* 7: 31-32.
- Parés, I.F.R., G.A. Juárez. 2002. Metabolitos secundarios. En: *Bioquímica de los Microorganismos*. Editorial Reverté, S.A. de C.V. 2da.Reimpresión. Barcelona España. pp. 324-338.
- Pasceri, R., D. Siegel, D. Ross, C. J. Moody. 2013. Aminophenoxazinones as inhibitors of indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO). *Synthesis of exfoliazone chandranamycin A*. *J. Med. Chem.* 56: 3310-3317.
- Poorniammal, R., M. Parthiban, S. Gunasekaran, R. Murugesan, G. Thilagavathi. 2013. Natural dye production from *Thermomyces* sp fungi for textile application. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*. 38: 276-279.
- Ramos, R. C.; et al. 2006. Cinética de Crescimento de *Pycnoporus sanguineus* em Sistema Submerso Para Produção de Compostos Antibacterianos. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química.
- Restrepo G.M. 2007. Sustitución de colorantes en alimentos. *Rev. Lasallista Investig.*4: 35-39.
- Shipanova, I., Y. Bartoshevich, L., Sibeldina, P. Zaslavskaya, A. Michtchenko. 1995. Relationship between intracellular pH and antibiotic biosynthesis in *Fusidium coccineum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 514-517.
- Smânia, A. Jr., F. Delle -Monache, E. F. A. Smânia, M. L. Gil, L.C. Benchetrit, and F.S. Cruz. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol.* 45: 177-181.

- Smânia, E. F. A., A. Jr. Smânia, C. Loguercio-Leite, and M. L. Gil. 1997. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. J. Chem. Biotechnol. 70:57-59.
- Smânia, E. F. A., A. Jr. Smânia, L.C. Loguercio. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. Rev. Microbiol. 29: 129-136
- Statistical Analysis System, Version 9.0 for Windows. 2002. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.1  
Copyright© 1995-2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Strohl, W.R., 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. Drug Discovery Today 5: 39-41.
- Vanhulle, S. 2007. Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi. Chemosphere. 70: 1097-1107.