



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE  
LIQUENES *PROTOUSNEA POEPPIGII* Y *USNEA SP* SOBRE BACTERIAS DE  
INTERÉS CLÍNICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA  
MÉDICA**

**AUTORA: JAVIERA FRANCISCA RETAMAL ZÚÑIGA  
PROFESORA GUÍA: Dra. IRIS ANITA PEREIRA RIQUELME  
PROFESORA CO-GUÍA: Dra. MARGARITA ISABEL GUTIÉRREZ CABRERA**

**TALCA-CHILE  
2019**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

## ***DEDICATORIA***

*A mi familia y amigos que fueron el apoyo y motivación para el desarrollo y culminación de toda mi formación profesional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer al Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca por permitirme realizar este estudio en sus dependencias, en especial a la Dra. Iris Pereira por aceptarme como su alumna, guiarme en el proceso y facilitarme su laboratorio a cargo. También agradezco a los auxiliares del establecimiento, encargados de las salas de lavado y autoclave cuyo trabajo fue esencial para el desarrollo de esta tesis.

Se da un reconocimiento especial a la profesora Andrea Barrera por su apoyo en la realización de este trabajo, en especial a su buena disposición, generosidad y vocación para entregar sus conocimientos. Se agradece también a los profesores que trabajan en su conjunto por permitirme la entrada a su laboratorio a usar sus indumentarias.

Dar gracias a la directora del Departamento de Microbiología Olga Lobos por facilitar las cepas bacterianas que se utilizaron para el desarrollo de este estudio, pues este material fue imprescindible para ejecutar el proyecto.

Se reconoce también a la Dra. Margarita Gutiérrez, docente del Instituto de Química de la Universidad de Talca, por permitirme realizar la extracción de los compuestos en su laboratorio a cargo, facilitándome sus instrumentos para el desarrollo de la experimentación además de apoyarme con sus conocimientos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Marco teórico	6
3.1. Líquenes	6
3.1.1. Morfología de los líquenes	6
3.1.2. Metabolitos de los líquenes	9
3.1.3. Efecto antimicrobiano de los líquenes	12
3.2. Bacterias	17
3.2.1. Resistencia bacteriana	18
3.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.2.3. <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.2.5. <i>Bacillus cereus</i>	23
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	26
6. Materiales y métodos	27
6.1. Colecta de los líquenes	27
6.2. Determinación taxonómica	27
6.3. Preparación de los extractos	28
6.4. Preparación del stock de concentraciones	28
6.5. Preparación de los discos	29
6.6. Obtención y conservación de las cepas	29
6.7. Pruebas de susceptibilidad	30
6.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	31
6.9. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	32
6.10. Análisis estadístico	32

7. Resultados	33
7.1. Rendimientos	33
7.2. Screening	33
7.3. Actividad antibacteriana	35
7.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	39
7.5. Concentración Mínima Bactericida (CMB)	40
8. Discusión	42
9. Conclusión	46
10. Referencias	47

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura N°1:</b> Estructura de los líquenes fruticosos <i>Protousnea poeppigii</i> y <i>Usnea</i> sp	8
<b>Tabla N°1:</b> Principales compuestos encontrados en los líquenes y su actividad	10
<b>Figura N°2:</b> Estructuras químicas de los metabolitos encontrados en <i>P. poeppigii</i>	15
<b>Tabla N°2:</b> Principales compuestos de <i>Usnea</i> sp	16
<b>Tabla N°3:</b> Principales características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea	21
<b>Tabla N°4:</b> Rendimiento de la extracción para cada solvente en las especies líquénicas	33
<b>Figura N°3:</b> Screening de concentraciones	34
<b>Figura N°4:</b> Halos inhibitorios producidos por el extracto obtenido en éter de petróleo	35
<b>Figura N°5:</b> Halos de inhibición para <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> de los líquenes <i>Protousnea poeppigii</i> y <i>Usnea</i> sp, clasificado en los diferentes solventes.	37
<b>Figura N°6:</b> Comparación de halos entre las cepas de <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> .	38
<b>Tabla N°5:</b> CMI de los extractos de éter de petróleo en <i>S. aureus</i> .	39
<b>Tabla N°6:</b> CMI de los extractos de éter de petróleo en <i>B. cereus</i> .	40
<b>Figura N°7:</b> CMB de los extractos de éter de petróleo en <i>S. aureus</i>	41
<b>Figura N°8:</b> CMB de los extractos de éter de petróleo en <i>B. cereus</i> .	41

## 1. RESUMEN

Los líquenes son organismos simbiotes compuestos por un socio fúngico más un alga o cianobacteria y se caracterizan por sintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios que le ayudan a sobrevivir bajo diversas condiciones climáticas. Estos metabolitos presentan diversas actividades que tiene alguna importancia en el área clínica, como antibacterianas, antimicóticas, antivirales, antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, antiproliferativas y citotóxicas. A nivel mundial, hoy en día ha surgido la resistencia bacteriana, dificultando los tratamientos médicos y farmacología. En base a este problema, en este estudio se probó el potencial antibacteriano que tienen los extractos crudos de líquenes, *Protousnea poeppigii* y *Usnea* sp. y sobre las bacterias gram negativo *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, y gram positivo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

A partir de los solventes éter de petróleo, acetato de etilo y metanol se obtuvieron 3 extractos para cada una de las especies liquénicas. Por medio de la técnica de difusión en disco se probaron diferentes concentraciones de estos extractos en las cepas mencionadas. Se realizó una microdilución en caldo para calcular Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB). Se encontró que los extractos de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea* sp. tienen actividad antibacteriana sobre las bacterias gram positivo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, pero no sobre las gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. El extracto de metanol proveniente de *P. poeppigii* no presento efecto antibacteriano, pero no así los de éter de petróleo y acetato de etilo que si generan inhibición, en cambio, los tres extractos obtenidos a partir de *Usnea* sp. tienen efecto antibacteriano sobre las bacterias gram positivas.

**Palabras clave:** liquen, extracto, actividad antibacteriana, CMI, CMB.



## 2. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos simbiotes compuestos por un socio fúngico (micobionte) y uno o más organismos fotosintéticos (fotobionte), estos últimos pueden ser algas verdes, cianobacterias o ambos(1). Hasta la fecha se han identificado aproximadamente 18500 especies de líquenes(2, 3). Se dice que el 98 % de los socios fúngicos pertenecen a la división Ascomycota y el resto a la división Basidiomycota y hongos anamórficos(4, 5). Estos simbiotes se caracterizan por ser muy resistentes a las condiciones ambientales y por la gran variedad de metabolitos secundarios que estos producen(4).

Los productos metabólicos secundarios de los líquenes pueden ocupar hasta un 20% del peso total de su talo, atribuyéndoseles un rol importante como mecanismos de defensa frente a diferentes factores como radiación UV, estrés oxidativo, interacción con el ambiente, entre otros(6). Se han identificado alrededor de 800 metabolitos secundarios producidos por los líquenes, muchos de ellos presentan actividades biológicas como antibacterianas, antimicóticos, antivirales, antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, antiproliferativas y citotóxicas(2, 7, 8).

El mundo está registrando un aumento sustancial de la resistencia bacteriana contra los medicamentos descubiertos, donde esta resistencia casi ha tocado a todos los patógenos humanos. Ante este hecho, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud han alertado de que están muy cerca de la era postantibiótica, donde los tratamientos con antibióticos serán dramáticamente ineficaces contra los patógenos infecciosos. Se ha informado de la necesidad crítica y expedita de desarrollar nuevos agentes antibacterianos para enfrentar esta grave crisis de salud(9).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Líquenes**

Los líquenes son una asociación simbiótica compuesta por un hongo (micobionte) en asociación con uno o más organismos fotosintéticos (fotobionte), este puede ser un alga verde o una cianobacteria o ambos(1). Estudios recientes muestran que existen alrededor de 18500 especies de líquenes a nivel mundial (2, 3). En los líquenes el 98% de los hongos que forman parte de éstos son Ascomycota y el porcentaje restante son Basidiomycota u hongos anamorficos. Se ha estimado que el 21% de todos los hongos pueden actuar como micobionte(5), mientras que cerca de 40 géneros, 25 algas y 15 cianobacterias pueden actuar como socios fotosintéticos(10).

##### **3.1.1 Morfología de los líquenes**

Los líquenes se componen de un talo que contiene el componente fúngico y algal. El elemento fúngico básico es la hifa, la pared consiste en al menos dos capas, una multilaminada y una granular. El liquen está rodeado por un polisacárido fibrilar extracelular bastante más grueso que los hongos no liquenizados. En él, se pueden encontrar bacterias y cristales incrustados de sustancias de líquenes que eventualmente migran a la superficie. Los tejidos en el talo del liquen están compuestos de hifas que se orientan en direcciones y compresiones diferentes para dando la apariencia de una organización celular(11).

Los líquenes muestran básicamente tres tipos de formas de crecimiento: crustosas, foliosas y fructíferas. Los líquenes crustosos son formas incrustantes que se extienden

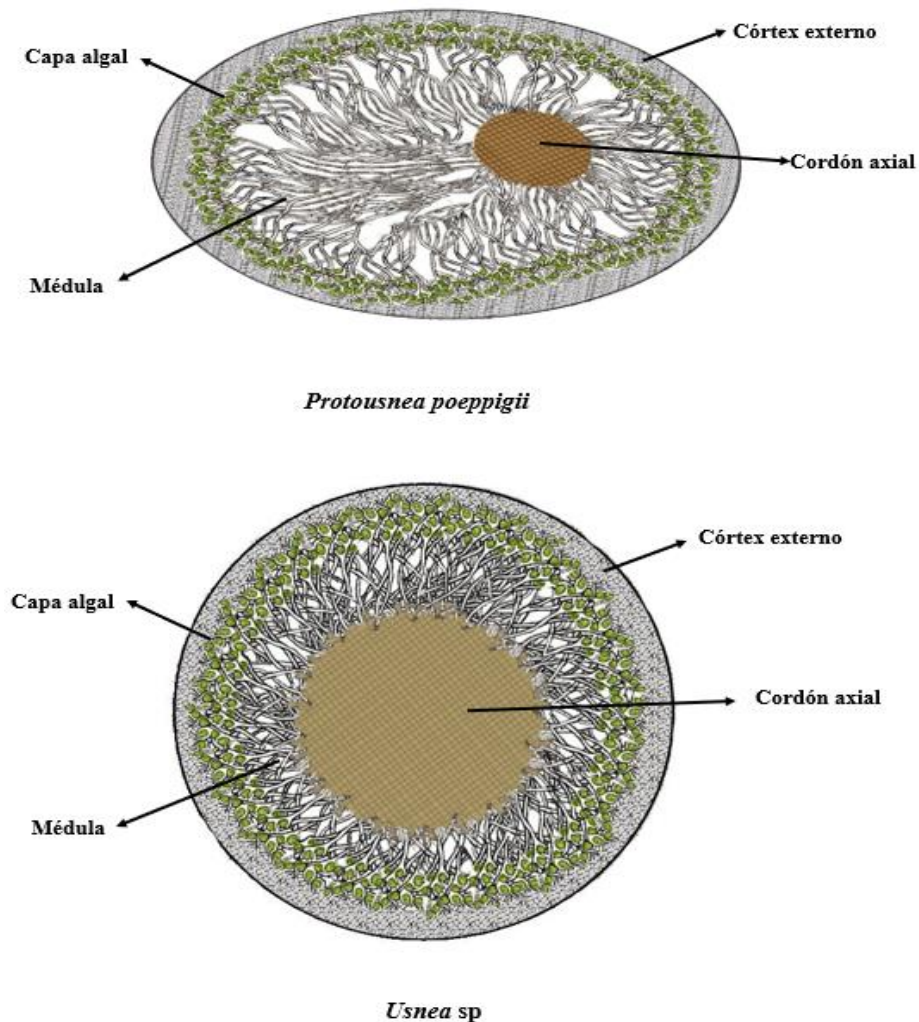
sobre y hacia la superficie de su hábitat y no se pueden eliminar de la superficie sin desmoronarse. Los líquenes foliosos son líquenes con lóbulos frondosos, que se extienden en una capa horizontal sobre el sustrato. Están unidos por rízines y se pueden desprender fácilmente del sustrato. Los líquenes fruticosos son formas arbustivas con muchas ramas, son fácilmente retirables del sustrato (12). La estructura interna de los líquenes fruticosos se puede ver en la Figura N° 1, se compone de un córtex externo, luego hacia el interior la capa algal, médula y un cordón axial en el centro del talo(13).

Los líquenes foliosos están estructurados por una corteza o capa cortical superior que sirve como una cubierta protectora de la superficie del talo, es una capa de hifas muy compactas que puede llegar a medir de 10-40µm. A continuación, le sigue una capa algal, donde el fotobionte se encuentra entremezclado con el tejido fúngico, es una capa de aproximadamente 10-30µm de espesor, que está justo debajo de la corteza superior. Por debajo de esta capa le sigue la médula, donde las hifas de este segmento se organizan en forma más laxa que en la capa superior. Finalmente aparece la corteza inferior con hifas muy compactadas y algunas carbonizadas (rizines) que se introducen en el sustrato permitiendo su adherencia a éste(11).

*Usnea sp* tiene una forma de crecimiento fruticosa, presenta un talo colgante, ramas pálidas de color verde amarillento con simetría radial, un eje cartilaginoso y ácido úsnico en la corteza. Presenta apotecios terminales en el borde talino del mismo color del talo. Este es uno de los géneros más fáciles de identificar ya que al tirar la rama aparece el eje central llamado cordón axial. Sin embargo a nivel específico, se dice que las especies descritas parecen estar conectadas por una serie continua de formas de transición, lo que impide el reconocimiento de especies no bien definidas(13).

El género *Protousnea* se caracteriza por su talo fruticoso, generalmente pendular, su color es verde amarillento a gris verdoso, siendo el ácido divaricático la sustancia medular

más común. El género *Protousnea* se restringe al suroeste de Sudamérica, reportándose alrededor de 7 especies en Chile y Argentina(14). *P. poeppigii* se caracteriza por tener la corteza más lisa, la médula densa en capas externas y más laxa cerca del eje o centro, además se diferencia por presentar un patrón de ramificación simpodial. Los apotecios tiene un disco café brillante y borde talino del mismo color del talo(15).



**Figura N° 1: Estructura de los líquenes fruticosos *Protousnea poeppigii* y *Usnea sp*.** Ambos se componen de un córtex externo, seguido de la capa alga, la médula y un cordón axial. *P. poeppoggii* tiene una forma más bien aplanada, con el cordón axial desplazado hacia la periferia y más médula. *Usnea sp*, presenta una forma más redonda con un gran cordón axial central.

### **3.1.2 Metabolitos de los líquenes**

Su flexibilidad en la ocupación del hábitat les permite producir numerosos metabolitos secundarios únicos que pueden comprender hasta el 30% del peso seco de un talo de líquenes, aunque el 5% -10% es más común(1). Si bien ahora se reconocen las numerosas actividades de los metabolitos de líquenes, su potencial terapéutico no se ha explorado lo suficiente y muchos siguen sin ser explotados farmacéuticamente.

Se sabe que alrededor de 17000 especies y más de 800 metabolitos del liquen son utilizados por el ser humano para varios propósitos, por ejemplo, para perfumería, control de la contaminación, valores dietéticos y medicinales (16). Los metabolitos del liquen muestran una gran variedad de actividades biológicas como antimicobacterias, antivirales, antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, antiproliferativas y citotóxicas, antibióticas, antivirales, antitumorales, antioxidantes y anti-VIH (2, 8, 17-20).

Los líquenes son inherentemente resistentes a la infección microbiana debido a la producción de grandes cantidades de metabolitos secundarios(21). También sus metabolitos secundarios tienen un gran potencial como fuente antifúngica(22). Los metabolitos además son tóxicos para los insectos, los caracoles y los nematodos(8, 17, 23). En la medicina popular, los líquenes se han utilizado ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades, como el eccema, las enfermedades respiratorias, las enfermedades pulmonares y artritis. Se han utilizado tanto cosméticos como alimentos(24). En la Tabla N°1 se encuentran algunos de los compuestos mayormente encontrados en los líquenes y su efecto.

**Tabla N° 1: Principales compuestos encontrados en los líquenes y su actividad.**

Tomada y adaptada de Franck E. Dayan y Joanne G. Romagni.(1)

<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Uso o potencial uso</b>
(-)-16 $\alpha$ -hydroxykaurane	Citotóxico
Ácido úsnico	Antimicrobiano
	Fungicida
Ácido 16 $\beta$ -O-acetilleucotilico	Antimicrobiano
7 $\beta$ -acetoxi-22-hidro-hopano	Antimicrobiano
Alectosarmentina	Antimicrobiano
Atranorina	Fungitóxico
Ácido didímico	Antimicrobiano
Ácido difrático	Fungitóxico
Durvildioliol	Antimicrobiano
Durvildionol	Antimicrobiano
Entoteina	Bactericida
Eulecanorol	Antimicrobiano
Falacinal	Antimicrobiano
Friedelina	Antimicrobiano
Ácido hiascico	Fungitóxico
Ácido lecanórico	Fungitóxico
Ácido leprapínico	Antibacterial
Ácido leucotílico	Antimicrobiano
Leucotilino	Antimicrobiano
Ácido felebico	Antimicrobiano
Ácido polipórico	Antibacterial
Ácido pixínico	Antimicrobiano
Ácido reigeránico	Antimicrobiano
Retrigerdiol	Antimicrobiano
Regulosina	Antimicrobiano
Estrepcilina	Antimicrobiano
Taroxano	Antimicrobiano
Ácido tiofánico	Fungicida
Ácido tiofanínico	Fungicida
Triterpeno C	Antimicrobiano
Triterpeno D	Antimicrobiano
Ácido ursólico	Citotóxico
Ceroína	Antimycobacteria

En particular, aunque los líquenes son una fuente rica de compuestos biológicamente activos y se han identificado más de mil metabolitos secundarios, muy pocos han sido evaluados por sus efectos biológicos. Por ejemplo, un número relativamente pequeño (~ 50 especies) ha sido evaluado para detectar actividad antibiótica, a pesar de que más del 50% de los líquenes probados muestran al menos alguna acción antibiótica. Por lo tanto, es necesario ampliar la investigación en esta área de estudio, con esfuerzos adicionales dirigidos a evaluar las propiedades biológicas de los extractos de líquenes y los metabolitos secundarios de una especie de líquen específico, para identificar los mecanismos precisos de acción de los extractos y compuestos activos(2, 25).

Los metabolitos secundarios del líquen comprenden muchas clases de compuestos que incluyen derivados de aminoácidos, alcoholes de azúcar, ácidos alifáticos, lactonas macrolíticas, compuestos aromáticos monocíclicos, quininas, cromonas, xantonas, dibenzofuranos, depsides, depsidones, depsidonas, terpenoides, esteroides, carotenoides y éteres de difenilo(21).

El micobionte produce los metabolitos secundarios y acumula estos compuestos en el córtex (como atranorina, parietina, ácido úsnico, melaninas fúngicas) o en la capa medular (como el ácido fisódico, ácido fisodálico, ácido protocetrárico), en forma de pequeños cristales extracelulares en la superficie exterior de las hifas(21).

Una de las sustancias más antiguas descubiertas con actividad biológica es el ácido úsnico, un compuesto natural que normalmente se encuentra en las especies de líquenes pertenecientes al género *Usnea*. El ácido úsnico es una sustancia líquida muy activa utilizada en la preparación farmacéutica, activa contra microorganismos y virus, así como analgésicos y antipiréticos(26).

### 3.1.3 Efecto antimicrobiano de los líquenes

Las propiedades antimicrobianas de los extractos de líquen y sus metabolitos secundarios se conocen por mucho tiempo y aún evalúan los mecanismos de sus efectos. Los mecanismos probables de acción antimicrobiana de los líquenes son(27):

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular:** La capa de peptidoglicano es importante para la integridad estructural de la pared celular, ya que es el componente más externo y principal de dicha pared. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular actúan inhibiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes bacterianas y, por lo tanto, llegan a la degradación de esta(27).
- **Inhibición de la síntesis de proteínas (traducción):** Los inhibidores de la síntesis de proteínas actúan en el ribosoma, lo que inhibe la síntesis de proteínas del agente patógeno, hace una lectura errónea de la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, inhibe el funcionamiento de las células patógenas(27).
- **Alteración de las membranas celulares:** Las lesiones de las membranas plasmáticas bacterianas conducen a la muerte celular a través de la fuga de los contenidos celulares y la alteración asociada del potencial de la membrana cruzada (que esencialmente son gradientes de concentración de iones)(27).
- **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:** Los inhibidores de los ácidos nucleicos actúan inhibiendo la producción de ácidos nucleicos (ADN y ARN)(27).
- **Actividad antimetabólica:** Los antimetabolitos evitan que una célula lleve a cabo una reacción metabólica. Estos funcionan por inhibición competitiva de las enzimas y por incorporación errónea en los ácidos nucleicos. En ambos casos, las células se vuelven incapaces de funcionar normalmente(27).



Los metabolitos secundarios del líquen son sustancias activas contra microorganismos patógenos. La mayoría de las sustancias liquénicas conocidas con actividad antimicrobiana son ácido úsnico, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, antraquinonas, depsidas, depsidonas y dapsonas, y la mayoría de ellos son mecanismos conocidos de su acción antibiótica(27). Estos mecanismos se describen a continuación:

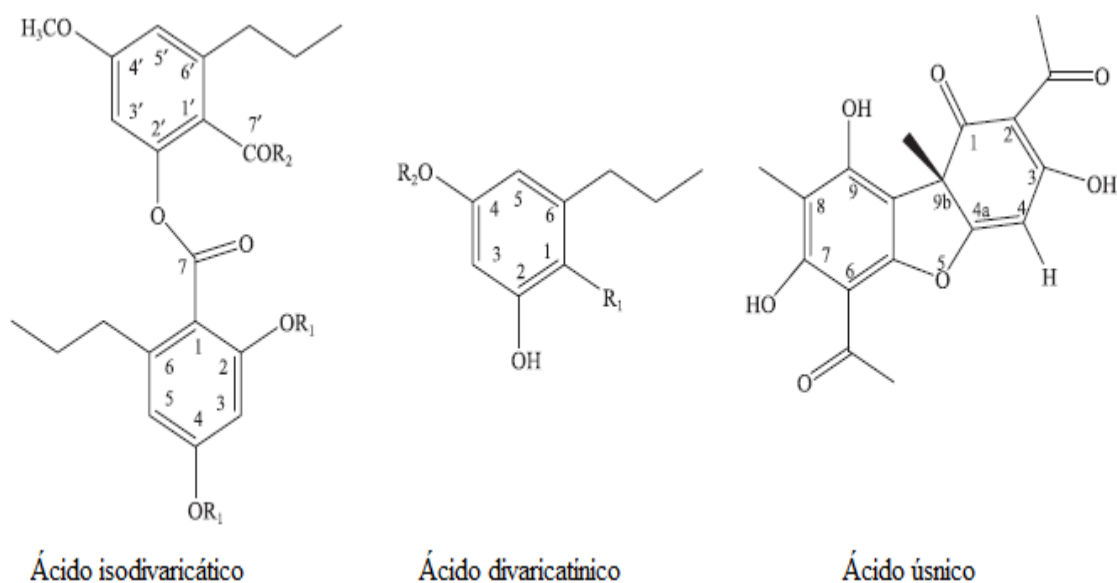
- **Ácido úsnico:** Los mecanismos de la actividad antibiótica del ácido usínico contra bacterias gram positivo se atribuyeron a sus propiedades protonofóricas como un desacoplador de la fosforilación oxidativa(28). También se supone que la inhibición de la síntesis de ARN puede ser un mecanismo general de la acción antibacteriana del ácido úsnico, con mecanismos directos adicionales, como el deterioro de la replicación del ADN estudiado en *B. subtilis* y *S. aureus*(29).
- **Fenoles:** Los posibles mecanismos de su acción incluyen la inhibición de las enzimas microbianas extracelulares, la privación de los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano, o la acción directa sobre el metabolismo microbiano mediante la inhibición de la fosforilación oxidativa, por grupos sulfhidrilo y algunas interacciones no específicas(30).
- **Terpenos:** El mecanismo no está totalmente identificado pero, según su naturaleza lipófila, se supone que actúa interrumpiendo las funciones de la membrana de las células microbianas(30). Algunos autores creen que pueden causar un aumento no específico de la permeabilidad de la membrana celular para la molécula de antibiótico(31).
- **Esteroides:** Estos compuestos están muy presentes en los líquenes. Se ha informado que los esteroides tienen propiedades antibacterianas. La correlación entre los lípidos de la membrana y la sensibilidad para el compuesto esteroideo indica que los esteroides se asocian específicamente con el lípido de la membrana y ejercen su acción al causar fugas de los liposomas(32, 33).

- **Depsidas, tridepsidas y tetradepsidas:** Consisten en dos, tres y cuatro residuos de ácido hidroxibenzoico unidos por grupos éster. Estas son las clases más numerosas de metabolitos secundarios en los líquenes. Más de cien compuestos de líquenes son depsidonas, que tienen un enlace de éter adicional entre los anillos aromáticos. Se cree que las **depsidonas** en el liquen surgen por la ciclación oxidativa de los depósitos. Se ha encontrado que la depsidona y otros compuestos como la atranorina, el ácido divaricático, el ácido lecanórico, el ácido evernico, el ácido salazínico, el ácido fisódico y el ácido estictico poseen una importante actividad antimicrobiana(34-36).
- **Antraquinonas y las xantonas:** Son componentes importantes de muchos líquenes. Se demostró que las antraquinonas, como la parietina, el ácido parietínico, la emodina, el falacinol y el falacinal tienen un alto efecto antimicrobiano, pero el mecanismo no está claro(37).

Entre los metabolitos encontrados de los líquenes que se les asocia un efecto antibacteriano se encuentran: Atranorina (de *Physcia aipolia*), ácido fumarprotocetrárico (de *Cladonia furcata*), ácido girofórico (de *Umbilicaria polyphylla*), ácido lecanórico (de *Ochrolechia androgyna*), ácido fisódico (a partir de *Hipogymnia*), ácido protocetrárico. (de *Flavoparmelia caperata* (= *Parmelia caperata*), ácido estictico (de *Xanthoparmelia conspersa* (= *Parmelia conspersa*)) y ácido úsnico (de *Flavoparmelia caperata*). Se encontró que ácido úsnico es el agente antimicrobiano más fuerte (comparable a la estreptomycin)(38).

En *Protousnea poeppigii* se han identificado metabolitos como el ácido isodivaricático, ácido divaricatínico y ácido úsnico (Figura N°2), todos estos con actividad antibacteriana sobre bacterias gram positivos y gram negativos. Cabe destacar que además *P. poeppigii* poseen fuertes efectos antifúngicos contra *Microsporium gypseum*, *Trichophyton*

*mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. así como contra las levaduras *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* y los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. fumigates*, como también sobre protozoos (39).



**Figura N°2: Estructuras químicas de los metabolitos encontrados en *P. poeppigii*.** Los compuestos corresponden a ácido isodivaricático, ácido divaricatínico y ácido úsnico. Tomado y adaptado de Schmeda-Hirshmann (2008)(39).

En *Usnea* sp. se ha reportado mayormente el metabolito ácido úsnico, que tiene actividad antibacteriana sobre gram positivos y micobacterias, el mecanismo por el cual esta sustancia funciona como antibacteriano es desconocida, pero se ha dilucidado en algunos estudios que puede inhibir la transcripción del ARN(29, 40). Los compuestos que se han encontrado con actividad antimicrobiana en el género *Usnea* se pueden ver en la Tabla N°2. Es importante mencionar que se ha probado que el ácido úsnico tiene incluso actividad sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (SARM) y Enterococos resistentes a vancomicina (ERV)(41). Como regla general, la mayoría de los extractos de líquenes del género *Usnea* son más activos contra las bacterias gram positivo(42).

**Tabla N°2: Principales compuestos de *Usnea* sp.** Especies de *Usnea*, su principal compuesto aislado y la actividad que este presenta. Tomado y adaptado de Shukla (2010)(6).

<b>Especie de liquen</b>	<b>Compuesto característico</b>	<b>Actividad</b>
<i>U. campestris</i>	Ácido úsnico	Antifúngica y antibacteriana
<i>U. difracta</i>	Ácidos úsnico y difractaico	Analgésica, antipirética, antiinflamatoria
	Ácido descarboxili estenosporico	Actividad sobre <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>U. longissima</i>	Ácido úsnico	Inhibición del fotosistema II Inhibidor del crecimiento en plantas
	Ácido úsnico, ácido liquesterínico y ácido evérnico.	Inhibición de la activación del virus Eipstein-Barr
<i>U. misaminensis</i>	Ácido úsnico	Relajante del músculo liso
<i>U. venosa</i>	Ácido úsnico, ácido bárbarico y ácido nórstictico.	-----

### 3.2 Bacterias

Según la composición de la pared bacteriana, se pueden clasificar en bacterias gram positivo y gram negativo, esto es importante pues presentaran distinta permeabilidad en la pared celular para el paso de sustancias(43).

En las bacterias gram positivo la pared celular está compuesta por varias capas de péptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida. Además, contiene ácidos teicoicos que están compuestos principalmente por un alcohol y fosfato. Estos ácidos pueden contribuir al desarrollo celular al prevenir la ruptura de la pared celular y reducir el riesgo de lisis(43). En general estas bacterias son más sensibles a los antibióticos(44).

La pared celular de las bacterias gram negativo está compuesta por una capa o por muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano esta unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. La pared celular de estas bacterias no contiene ácidos teicoicos y el hecho de contener una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica. La membrana externa está compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Dicha membrana puede impedir el paso de antibióticos (por ejemplo, la penicilina), siendo estas más resistentes a los antibióticos que las gram positivo(43).

En general, en estudios sobre la actividad antibacteriana de los líquenes, las bacterias gram negativo fueron más resistentes que las gram positivo. La diferencia de sensibilidad entre bacterias gram positivo y gram negativo se puede atribuir a las diferencias morfológicas entre estos microorganismos, sobre todo a las diferencias en la permeabilidad de la pared celular(45).

### 3.2.1 Resistencia bacteriana

La resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha convertido en un problema a nivel mundial. Desde el principio de la era antibiótica se han descrito resistencias en algunas cepas bacterianas, pero en la actualidad el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos y su uso indiscriminado favorecen la aparición de nuevas cepas resistentes(46). Debido a que las infecciones causadas por bacterias multirresistentes tienen una alta morbilidad y mortalidad, además de un alto costo para la salud pública, la OMS (Organización Mundial de la Salud) advierte sobre la necesidad de medidas urgentes para mejorar la prevención de las infecciones, como también la urgente necesidad de la creación de antibióticos que no tengan como efecto secundario generar una resistencia del microorganismo a este mismo(47).

En el año 2017 la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos dividiéndolos en prioridad 1 o crítica, prioridad 2 o elevada y prioridad 3 o media. El grupo de prioridad crítica lo constituyen bacterias multirresistentes, que pueden provocar infecciones graves o letales, septicemias y neumonía. entre estas bacterias se encuentran: *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos, *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos, Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de BLEE (Betalactamasas de espectro extendido). En las de prioridad elevada están: *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina, *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas, *Salmonella*, resistentes a las fluoroquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina y a las fluoroquinolonas. Las bacterias clasificadas en prioridad media son: *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina, *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina, *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas(48).

### 3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo, no fermentador, que se comporta básicamente como un patógeno nosocomial oportunista. Sus mínimos requerimientos nutricionales, su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos, explican su papel ecológico como un importante y eficaz patógeno intrahospitalario, se reconoce como flora normal del cuerpo humano, pero no causa enfermedad en individuos sanos. La infección por este agente comienza con alguna alteración de los mecanismos de defensa del hospedero, esto involucra catéteres urinarios, catéteres intravenosos, quemaduras extensas de la piel, tubos endotraqueales, que facilitaran la colonización bacteriana. Los huéspedes que tienen su sistema inmune comprometido también tienen más riesgo de infección, siendo el principal factor predisponente a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* la estancia prolongada en hospitales, sobre todo en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)(49).

Esta bacteria se caracteriza por poseer múltiples resistencias, convirtiéndose en un problema para la salud pública. Existe un limitado número de antibióticos que son activos contra *P. aeruginosa*, se considera que tienen buena actividad las penicilinas (piperacilina, ticarcilina, carbencilina, azlocilina) asociadas a inhibidores de beta-lactamasas. También tienen buena acción la ceftazidima, cefepime, monobactámicos, carbapenémicos y amonoglicosidos. Sin embargo, la bacteria tiene una alta capacidad mutagénica adquiriendo nuevos mecanismos de resistencia. La bacteria es resistente tanto de manera natural como adquirida a cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos(49).

### 3.2.3 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea(50).

Esta bacteria se puede clasificar según su grupo patógeno. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular(51).

Como para la serotipificación de *E. coli* se realiza un proceso largo y costoso se prefiere identificarlas según su patogenicidad y cuadro clínico. Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC), cuyas características principales se describirán brevemente y se resumen en la Tabla N°3 (50, 51).

*E. coli* se considera un microorganismo uropatogénico, se dice que el 99,5% de las infecciones urinarias en un aparato previamente sano son causadas por *E. coli*, *S. saprophyticus*, *P. mirabilis*, *Klebsiella spp.* y *Enterococo*. De estos cinco agentes etiológicos noombrados *E. coli* supone alrededor del 80% de los aislados. Esta prevalencia es



independiente de la localización geográfica, edad y es bastante uniforme a nivel mundial(52).

**Tabla N°3: Principales características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea.** Tipos de *E. coli* según su clasificación por los síntomas clínicos, se muestra la sintomatología principal, más la epidemiología .Tomado y adaptado de Rodríguez G. (2002) (51).

<b>Grupo</b>	<b>Síntomas clínicos</b>	<b>Epidemiología</b>
ETEC	Diarrea acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero
EHEC	Síndrome hemolítico urémico, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años
EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años

### 3.2.4 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está ubicado en la familia *Micrococaceae*, que son cocos gram positivo, que se disponen en grupos a modo de racimos irregulares. Son organismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales, crecen en muy diversas condiciones ambientales, pero lo hacen mejor entre 30 y 37°C y a un pH próximo a 7. Son resistentes a

la desecación y a los desinfectantes químicos, además toleran concentraciones de NaCl de hasta 12%. *Staphylococcus aureus* se caracteriza por producir la enzima coagulasa, crece en agar sangre como colonias típicas de consistencia cremosa, pigmentadas de color amarillo o dorado y con un halo de  $\beta$ -hemólisis a su alrededor(53).

Aproximadamente un 20% de la población es portadora permanente de *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales y un 30% lo es de manera intermitente. Esta bacteria también puede colonizar otras áreas como la piel y el tracto gastrointestinal. Cuando la integridad de las barreras mecánicas se rompe, estos microorganismos pueden alcanzar tejidos más profundos y producir infección. Algunas de las infecciones asociadas son: endocarditis, infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares, osteomielitis, artritis, fibrosis quística, infecciones cutáneas invasivas, abscesos, neumonía necrotizante, toxiinfecciones alimentarias, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada, impétigo buloso y sepsis(54).

A lo largo de los años *Staphylococcus aureus* ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia a los antibacterianos, aunque actualmente su resistencia a la meticilina constituye el principal problema terapéutico, se han descrito aislados con resistencia a todos los antibacterianos utilizados para el tratamiento de la infección estafilocócica(54).

La resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina se debe a la presencia del gen *mecA*, de localización cromosómica el cual codifica una PBP2a que confiere resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas. Estas cepas se han denominado SARM (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina)(54).

En un principio los SARM se encontraban solo en hospitales, pero pasada la década de los 90s, comenzaron a aparecer estas cepas en la comunidad, separándose en SAMR-IH (*Staphylococcus aureus resistente meticilina intrahospitalario*) y SARM-AC (*Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad*). Las cepas SARM-AC por lo general afectan a niños y adultos jóvenes, así como a deportistas sin factores de riesgo, estos son sensibles a múltiples antibióticos siendo únicamente resistentes a los  $\beta$ -lactámicos. Por otro lado, los SARM-IH además de tener resistencia a meticilina y  $\beta$ -lactámicos tiene resistencia a otros antibióticos generado un problema en su tratamiento, a esto se suma que contiene más factores de virulencia, lo que los hace más agresivos en su patogenia(55).

Se han aislado cepas con sensibilidad disminuida a la vancomicina, estos aislados se denominan VISA (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*), además estos presentan sensibilidad disminuida o resistencia a la teicoplanina. Se suelen aislar con una frecuencia muy baja y por lo general después de un tratamiento prolongado con glucopéptidos. Se han descrito dos tipos de expresión de esta resistencia(54):

- a) la expresión homogénea (CMI de vancomicina 8-16 mg/L)
- b) la expresión heterogénea (CMI de 1-4 mg/L)

Las cepas con expresión heterogénea son más frecuentes y se denominan hetero-VISA. El mecanismo de resistencia consiste en una alteración de la estructura del peptidoglicano, impidiendo su unión a los residuos de D-alanina-D-alanina que es su diana(54).

### **3.2.5 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* es una bacteria gram positivo, en forma de espora, aeróbica a facultativa, ampliamente distribuida en el medio ambiente y con una estrecha relación

fenotípica y genética (16S rRNA) con varias otras especies de *Bacillus*, especialmente *B. anthracis*. La bacteria puede estar en dos formas distribuida en la naturaleza: formando esporas o como célula vegetativa. Cuando coloniza un cuerpo humano, ésta se encuentra como una célula vegetativa(56). La ultraestructura de la célula vegetativa de *B. cereus* se evidenció mediante micrografía electrónica de transmisión, la membrana citoplásmica y la pared celular rodean el citoplasma de la célula(57). La estructura de la espora es alargada, el núcleo está rodeado por la membrana interna, la corteza, la capa interna y la capa externa. Esta forma bacteriana no tiene actividad metabólica y las esporas son relativamente resistentes a las condiciones ambientales extremas, como el calentamiento, la congelación, el secado y la radiación(58).

*B. cereus* es responsable de un número creciente de enfermedades transmitidas por los alimentos en los países industriales(58). Esta bacteria puede causar cuadros intestinales o no intestinales, su patogenicidad está íntimamente asociada con la producción de exoenzimas reactiva / destructiva de tejidos(59). Las esporas son importantes para la propagación de *B. cereus*, y en algunas cepas se sabe que se adhieren a las células epiteliales humanas, lo que se considera un mecanismo de virulencia adicional(60).

Entre estas toxinas secretadas se encuentran cuatro hemolisinas, tres fosfolipasas distintas, una toxina inductora de emesis y tres enterotoxinas formadoras de poros: hemolisina BL (HBL), enterotoxina no hemolítica (NHE) y citotoxina K. En el tracto gastrointestinal (intestino delgado), las células vegetativas, ingeridas como células o esporas viables, producen y secretan una proteína enterotoxina e inducen un síndrome diarreico. La toxina emética, que induce un síndrome de vómito, se sintetiza en el producto alimenticio contaminado, por ejemplo, la leche, el arroz y la pasta, en los que *B. cereus* está creciendo y puede representar un producto metabólico del crecimiento(61-63).

Además de la intoxicación alimentaria, *B. cereus* causa varias infecciones sistémicas y locales tanto en individuos inmunológicamente comprometidos como inmunocompetentes. Entre los más comúnmente infectados se encuentran los neonatos, los drogadictos por vía intravenosa, los pacientes con heridas traumáticas o quirúrgicas y los que tienen catéteres permanentes. El espectro de infecciones incluye bacteriemia fulminante, afectación del sistema nervioso central (SNC) (meningitis y abscesos cerebrales), endoftalmitis, neumonía e infecciones cutáneas similares a la gangrena gaseosa, por nombrar algunas(59).

El espectro clínico de las infecciones por *B. cereus* es multifacético, y las opciones terapéuticas generalmente giran en torno al patrón de susceptibilidad a los antibióticos de la cepa aislada. En general, la mayoría de los aislados son resistentes a las penicilinas y cefalosporinas como consecuencia de la producción de  $\beta$ -lactamasa. Se ha informado también la resistencia de *B. cereus* a eritromicina, tetraciclina y carbapenem. Se declara que el fármaco de elección para tratar infecciones por *B. cereus* es la vancomicina(64, 65).

Las cepas de *B. cereus* aisladas de infecciones generalmente han sido resistentes a los antibióticos beta-lactámicos, incluidas las cefalosporinas de tercera generación, pero se ha demostrado que son susceptibles al cloranfenicol, clindamicina, vancomicina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina y estreptomina(58).

## 4. HIPÓTESIS

Los extractos crudos de los líquenes *Protousnea poeppigii* y *Usnea* sp. obtenidos por extracción fraccionada tienen actividad antibacteriana sobre bacterias patógenas para el ser humano.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la acción antibacteriana de extractos de líquenes de las especies *Protousnea poeppigii* y *Usnea* sp. sobre patógenos de importancia clínica para el ser humano.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de rendimiento de los extractos de *Protousnea poeppigii* y *Usnea* sp. obtenidos por medio de una extracción fraccionada.
2. Determinar actividad antibacteriana de los extractos obtenidos frente a bacterias patógenas para el ser humano.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la fracción del extracto de mayor actividad antibacteriana contra las bacterias seleccionadas en este estudio.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Colecta de los líquenes

Los líquenes fueron colectados en Agosto de 2015 a partir de troncos de diferentes especies arbóreas de la región de Ñuble, Chile, comuna de Pinto, a 82 km al oriente de la ciudad de Chillán, Las Trancas, cuyas coordenadas son 36° 54' 41.1" S, 71° 24' 16,7" W, a 1523 m. snm. Se recogieron dos especies *Protousnea poeppigii* y *Usnea* sp.

### 6.2 Determinación taxonómica

Para la determinación taxonómica de los líquenes, se observaron caracteres vegetativos, color del talo y tipo de estructuras reproductivas de origen asexual: presencia o ausencia de soledios, isidios y picnidios fueron analizados con una lupa binocular Kyoma y sexuales como apotecios. El color, dimensiones y forma de esporas fueron estudiados por medio de un microscopio marca Nikon modelo Optiphot equipado con una cámara microfotográfica y ocular graduado. Test de manchas en diferentes partes del talo como cortex externo, médula y cordón axial fueron realizadas considerando las siguientes soluciones: K (solución saturada de Hidróxido de Potasio (KOH) al 20%), C (solución acuosa de hipoclorito de sodio (NaClO) al 50%), KC (aplicación de solución K seguida de C), P (solución alcohólica de parafenilendiamina).

El material estudiado se encuentra depositado en el Herbario de la Universidad de Talca, los vouchers asignados con los números 650, 651 y 653 corresponden a *Protousnea poeppigii*, mientras que los números 654, 655 y 656 corresponden a *Usnea* sp.

### **6.3 Preparación de los extractos**

El material liquénico fue limpiado en forma manual y luego trozado finamente con la ayuda de tijeras. El material ya limpio y trozado fue pesado en una balanza analítica, para cada especie por separado. El peso para *Protousnea poeppigii* fue de 392,85g y para *Usnea* sp. fue de 134,85g. Se realizó una extracción por agotamiento utilizando tres solventes orgánicos correspondientes a éter de petróleo, acetato de etilo y metanol.

A cada una de las especies, se le agregó primero éter de petróleo, se dejaron en este solvente por 24 horas para después agregar el contenido líquido a un balón para realizar la extracción con ayuda de un rotavapor Heidolph que eliminó todo el solvente utilizado concentrando el extracto. Al material liquénico anterior, se le agregó ahora acetato de etilo dejándolo reposar también por 24 horas, se realizó la extracción desde la parte líquida en un rotavapor. Finalmente, al mismo material, se le agregó metanol dejándolo con el solvente por 24 horas, se concentró también en el rotavapor.

Se obtuvieron finalmente 3 extractos para cada una de las especies provenientes de diferentes solventes orgánicos (en total se obtuvieron 6 extractos). Los extractos obtenidos fueron pesados en una balanza analítica a modo de calcular el rendimiento de la extracción para cada una de las especies y luego se guardaron en recipientes de vidrio con tapa y se almacenaron en un refrigerador a 4°C hasta su uso.

### **6.4 Preparación del stock de concentraciones**

Para un primer screening, se prepararon concentraciones de 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 1250, 2500 y 5000 µg/ml. Estas concentraciones se prepararon a partir de una



solución stock de 5000 µg/ml que se preparó pesando 5mg de cada uno de los extractos obtenidos para las dos especies de líquenes. Estas se pesaron en tubos Eppendorf y se agregó 1 ml de acetona para disolver. Para preparar las otras concentraciones se fueron realizando diluciones seriadas a la mitad de la concentración anterior. Una vez preparadas se utilizaron para impregnar los discos.

### **6.5 Preparación de los discos**

Con ayuda de una perforadora se hicieron discos usando papel filtro Whatman N°6. Estos discos tuvieron un diámetro de 6mm, una vez cortados se esterilizaron con radiación UV por 15 minutos. Los discos se impregnaron con las concentraciones preparadas anteriormente, para cada uno de los extractos obtenidos de las dos especies de líquenes. Cada disco, se impregnó con 20µl de la solución preparada, para las diferentes concentraciones. Una vez impregnados los discos, se secaron a temperatura ambiente y fueron guardados en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

### **6.6 Obtención y conservación de las cepas**

Las bacterias, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 08105, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus cereus* fueron obtenidas desde el cepario del Laboratorio de Microbiología localizado en Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca.

Las cepas se conservaron en caldo Mueller-Hinton y se fueron haciendo repiques cada 72 horas para mantener la cepa viable y joven. Este procedimiento se realizó agregando 10ml del caldo más 1ml de la cepa precedente. Se incubó por 18 horas a 37°C y las horas

restantes se incubaron a 4°C. Pasadas las 72 horas se realizó otro traspaso y así sucesivamente.

## **6.7 Pruebas de susceptibilidad**

Se realizaron los test de susceptibilidad en triplicado por medio de la técnica de difusión en disco. Con ayuda de un espectrofotómetro Modelo visible 6300 JENWAY, se midió la turbidez del inóculo bacteriano dejando las 4 cepas en 0,5 de McFarland. Para obtener esta turbidez la absorbancia del inóculo en longitud de onda de 625nm debe estar en un rango de 0,8 a 1.

Se inocularon 50µl de la cepa en una placa de 80 mm con agar Mueller-Hinton, se sembró en césped. Luego los discos fueron colocados con las distintas concentraciones, de los diferentes extractos, de ambas especies de líquenes para cada una de las cepas. La placa contendrá entonces las distintas concentraciones del extracto a probar más un control correspondiente al disco impregnado con el solvente utilizado para preparar dichas concentraciones (acetona). Las placas se dejarán incubando a 37°C por 18 horas en la incubadora BIOBASE Biochemistry incubator.

Pasado el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición contra un fondo oscuro con luz reflejada. Estos halos se midieron por la parte posterior de la placa con ayuda de una regla anotándose el diámetro en milímetros.

Cada placa ocupada contenía un control negativo correspondiente a un disco de papel filtro Wathman N°6 de 6mm que contenía el solvente utilizado para preparar las concentraciones (Acetona). Además, se incluyó un control positivo correspondiente a un

sensidisco de ampicilina (AM), considerándose una cepa sensible cuando el halo de inhibición logrado por este sensidisco era mayor o igual a 17mm. Según CLSI 2018.

### **6.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Para calcular la CMI se realizó la técnica de microdilución en caldo, en microplaca de 96 pocillos. Se preparó un stock de 50000 µg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) de extracto obtenido con el solvente éter de petróleo para cada una de las especies liquénicas. A partir de la solución stock se preparó una dilución 1/10 utilizando caldo Mueller-Hinton (MH).

A la primera columna de placa se le agregó 50µl del stock preparado y a la segunda columna 100µl de la dilución 1/10 antes mencionada. A los pocillos restantes en la fila se les agregó 50µl de caldo MH, posterior a esto se realizaron diluciones seriadas, se tomaron 50µl del segundo pocillo (que contiene la dilución 1/10 del stock en caldo MH) y se dispensaron en el tercer pocillo que previamente contiene 50µl de caldo. De este tercer pocillo se tomaron 50µl para dispensar en el cuarto pocillo y así sucesivamente. Terminadas las diluciones se agregaron 50µl de la cepa en estudio. Esta correspondía a una cepa fresca de 18 horas de incubación que se ajustó a 0,5 de McFarland, utilizando un espectrofotómetro.

En esta placa, además se incluyó un control positivo, correspondiente a un control de crecimiento de la cepa, que contenía el caldo MH más la cepa en cuestión, un control negativo que incluía el stock preparado más caldo MH y un control con DMSO que contenía dicho solvente más la cepa. Este proceso se realizó para las cepas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, en diferentes placas, ensayando los extractos obtenidos desde éter de petróleo tanto de *Protousnea poeppigii* y *Usnea* sp por triplicado.

Terminado el proceso descrito estas placas se leyeron en el lector de microplacas Infinite M200 PRO NanoQuant a 620nm. Luego se incubaron a 37°C por 24 horas y se volvieron a leer. La CMI corresponde entonces a la menor concentración de extracto que inhibe el crecimiento visible del microorganismo estudiado. Para la interpretación de resultados se comparó la turbidez de la medición inicial con la turbidez de la medición luego de la incubación, además se compararon las distintas diluciones con el control positivo, la primera dilución que no presente un aumento en la turbidez es indicativa que no ocurrió crecimiento bacteriano, por lo tanto, es considerada como la CMI.

### **6.9 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Luego de la determinación de la CMI, se homogeneiza el contenido de los pocillos y se siembran en césped con pipeta Pasteur acodada 100 µl (todo el contenido) de los pocillos donde no hay crecimiento (turbidez) en agar MH. Se procedió a incubar a 37°C y realizar un recuento de las colonias que han crecido tras 24-48 horas de incubación. Se compararon los valores de los obtenidos de los pocillos sembrados con el del pocillo considerado control positivo (éste nos da la cantidad de bacterias inoculadas y representa el 100%) el cual cuenta con el conteo bacteriano del inóculo inicial.

### **6.10 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron expresados en función de la media de los ensayos (realizados por triplicado). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 6. Las diferencias entre los grupos se analizaron con test de ANOVA seguido de Comparaciones múltiples. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Rendimientos

Se calcularon los rendimientos en porcentaje (%) para cada una de las extracciones en diferentes solventes, para ambas especies como se puede ver en la Tabla N°4. Para la especie *P. poeppigii* y *Usnea* sp. el mayor rendimiento se obtuvo con el solvente acetato de etilo. Para ambas especies el más bajo rendimiento se obtuvo con éter de petróleo.

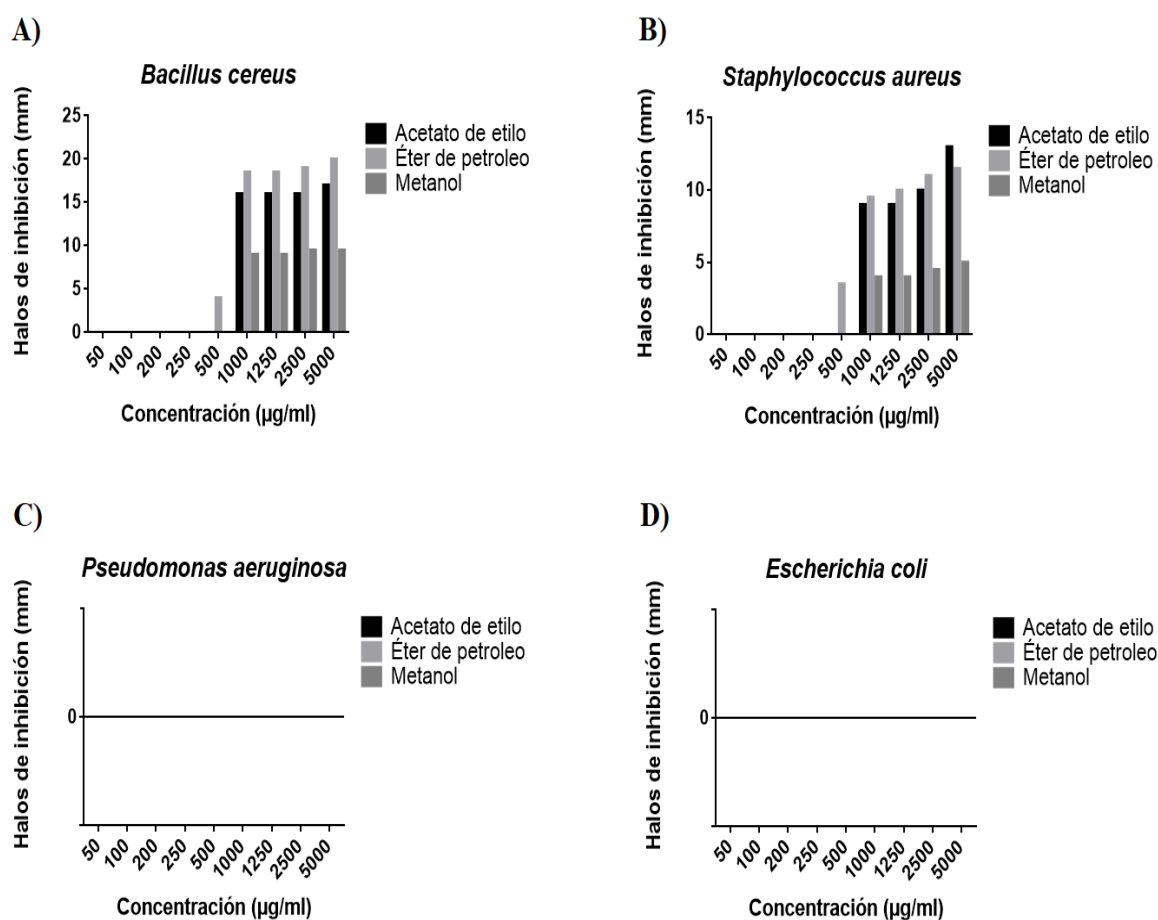
**Tabla N°4: Rendimiento de la extracción para cada solvente en las especies líquénicas.** Se tiene el peso inicial de la biomasa, el peso de cada extracto obtenido en gramos (g) y su respectivo rendimiento en porcentaje (%)

Especie	Peso inicial (g)	Solvente	Peso Extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>Protousnea poeppigii</i>	392,85	Acetato de etilo	18,47	4,70
		Éter de petróleo	4,59	1,17
		Metanol	26,71	<b>6,80</b>
<i>Usnea</i> sp.	134,85	Acetato de etilo	1,76	1,31
		Éter de petróleo	0,79	0,59
		Metanol	4,02	<b>2,98</b>

### 7.2 Screening

Se realizó un screening para probar diferentes concentraciones por medio de difusión en disco para ambas especies de líquenes en las 4 cepas bacterianas. Para las bacterias gram positivo, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, se encontró actividad

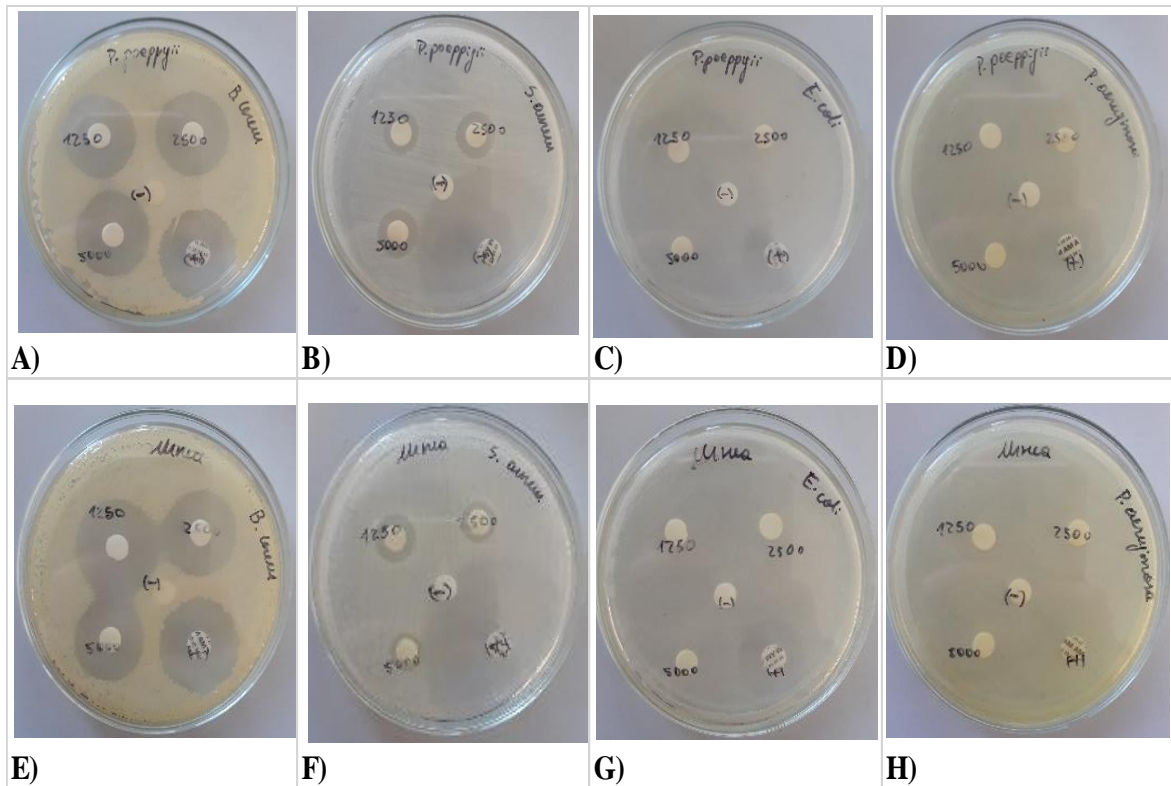
antibacteriana en las concentraciones más altas de 1000, 1250, 2500 y 5000  $\mu\text{g/ml}$ . Solo en el extracto obtenido con éter de petróleo se obtuvo inhibición a concentraciones más bajas de 500  $\mu\text{g/ml}$  como se puede evidenciar en la Figura N°3. Para las bacterias gram negativo *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* no se encontró actividad antibacteriana en ninguna concentración. Por ello se siguieron realizando los ensayos por triplicado con las concentraciones de 1250, 2500 y 5000  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura N°3: Screening de concentraciones.** Difusión en disco con diferentes concentraciones de 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 1250, 2500 y 5000  $\mu\text{g/ml}$ , con. En las cepas bacterianas, *Bacillus cereus* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Escherichia coli* (C) y *Pseudomonas aeruginosa* (D).

### 7.3 Actividad antibacteriana

En general, no se encontró actividad antibacteriana en ningún extracto, a ninguna concentración para las bacterias gram negativo: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Pero si se encontró actividad antibacteriana para las bacterias gram positivo *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* como se puede demostrar en la Figura N°4.



**Figura N°4: Halos inhibitorios producidos por el extracto obtenido en éter de petróleo.** Halos inhibitorios en placas de agar MH, con las diferentes cepas sembradas en césped, para el extracto obtenido desde éter de petróleo de las dos especies de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea* sp. A y E= *B. cereus*, B y F= *S. aureus*, C y G= *E. coli*, D y H= *P. aeruginosa*, siendo A, B, C y D discos impregnados con extracto de *P. poeppigii* y E, F, G y H discos impregnados con extracto de *Usnea* sp. a concentraciones de 1250, 2500 y 5000 µg/ml. Control negativo (-) al centro de la placa. Control positivo (+) un sensidisco de ampicilina (AM). El valor del control positivo para *B. cereus* fue de 22mm y para *S. aureus* de 30mm considerándose sensibles.

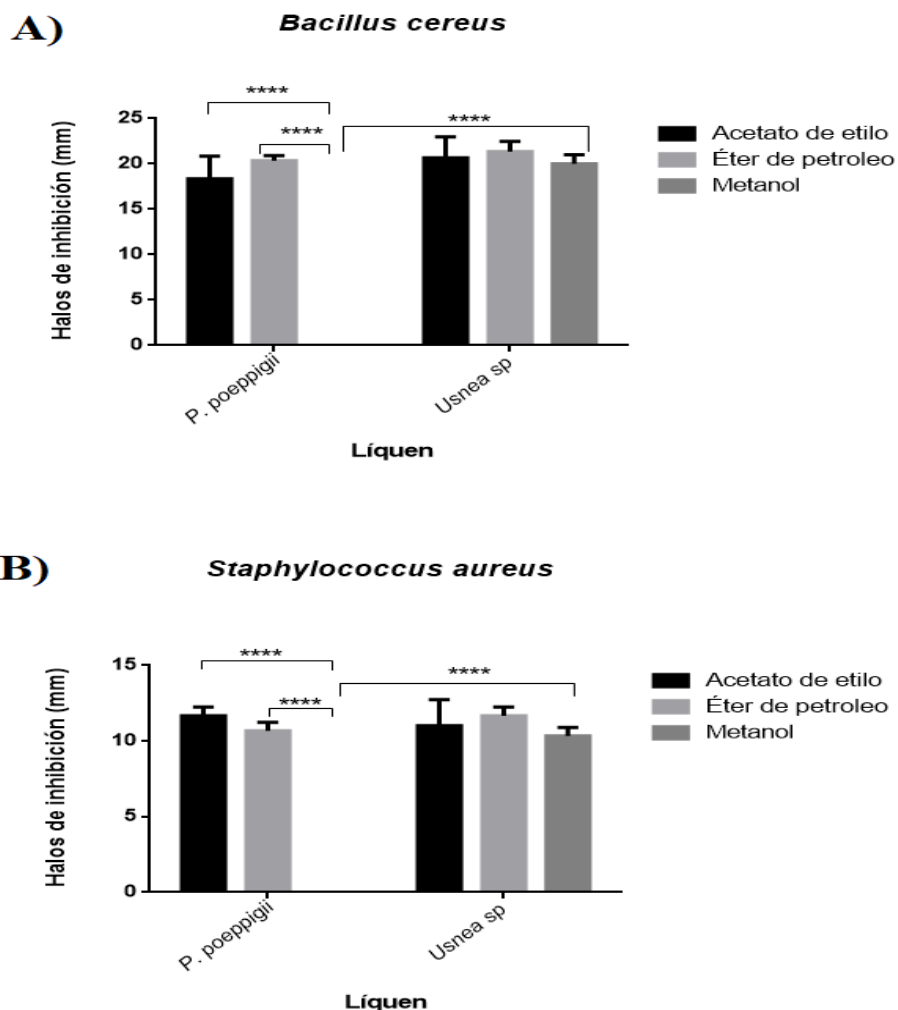
En el caso de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en *Usnea* sp. no se encontró una diferencia significativa entre los tres extractos (acetato de etilo, éter de petróleo y metanol). Si se encontró diferencia significativa al comparar los efectos de las dos especies de líquenes. El extracto de metanol de *Usnea* sp. fue activo contra las bacterias gram positivo, en cambio el extracto de metanol de *P. poeppigii* no lo fue ( $p < 0,0001$ ) (Figura N°5).

Respecto a los extractos de *P. poeppigii* al actuar sobre *B. cereus* se encontró que los extractos de acetato de etilo y éter de petróleo presentan efecto antibacteriano, al contrario del extracto de metanol que no presenta, pero entre ambos extractos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa de los halos generados. Para *Usnea* sp no se encontraron diferencias significativas entre los extractos. (Figura N°5 A).

En cuanto a *S. aureus* se encontró diferencia significativa entre los extractos de *P. poeppigii*, el extracto de acetato de etilo y éter de petróleo presentan mejor actividad antibacteriana que el extracto de metanol que no presenta inhibición ( $p < 0,0001$ ). Para *Usnea* sp tampoco se encontraron diferencias significativas entre los extractos. Se encontró además en *S. aureus* que el extracto de acetato de etilo de *P. poeppigii* y el de éter de petróleo del mismo liquen no presentan diferencias significativas entre sí (Figura N°5 B).

Se puede generalizar que los extractos de *P. poeppigii* extraídos con acetato de etilo y éter de petróleo presentan acción inhibitoria similar sobre las bacterias gram positivo *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, no pudiéndose decidir en base a estadísticas cual de estos extractos genera mayor acción antibacteriana. Del mismo modo ocurre para los extractos de *Usnea* sp, incluyendo también al extracto metanolico.

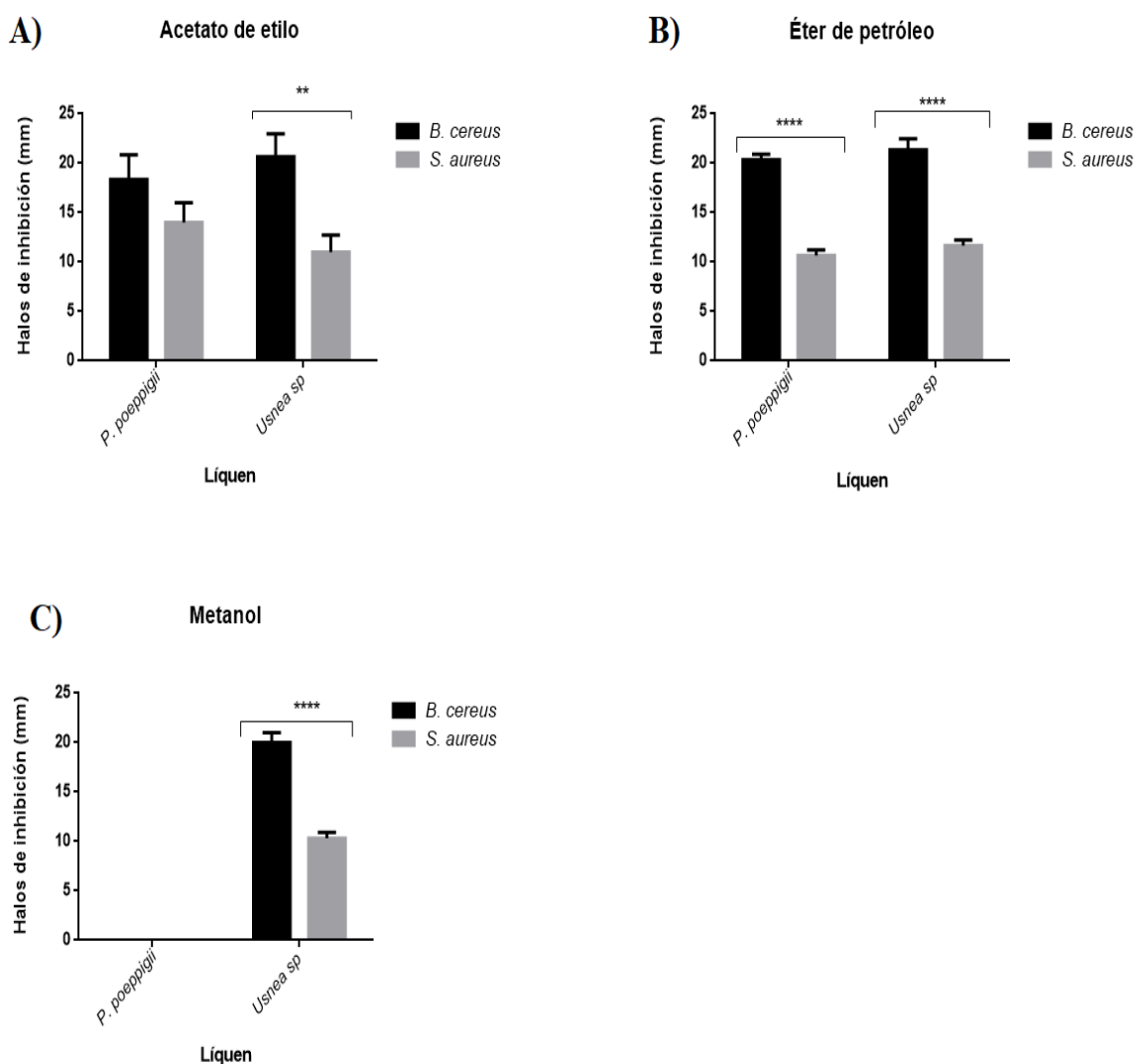




**Figura N°5: Halos de inhibición para *B. cereus* y *S. aureus*. de los líquenes *Protousnea poeppigii* y *Usnea sp*, clasificado en los diferentes solventes.** Halos de inhibición en mm generados por los extractos de *Protousnea poeppigii* y *Usnea sp*. según el solvente usado en la extracción acetato de etilo, éter de petróleo y metanol en las cepas *Bacillus cereus* (A) y *Staphylococcus aureus* (B). Se realizó un test de ANOVA de dos-vías, seguido de comparaciones múltiples para evaluar significancias. Se denota \*\*\*\*  $p < (0,0001)$ .

Se realizó una comparación entre las cepas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, comparando los halos inhibitorios generados por los distintos extractos, en ambas especies de líquenes como se grafica en la Figura N°6. Se puede comprobar mediante ANOVA de dos vías que *B. cereus* es más inhibido que *S. aureus* en los tres extractos probados.

El extracto de acetato de etilo proveniente de *P. poeppigii* no genera diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, pero si lo hace este mismo extracto de *Usnea sp.* ( $p < 0,005$ ) (Figura N°6 A). En los extractos de éter de petróleo se encontró que ambas especies de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea sp.* son más activas sobre *Bacillus cereus*  $p < (0,0001)$  (Figura N°6 B). En el extracto de metanol de *Usnea sp.* también se encontró una diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura N°6 C).



**Figura N°6: Comparación de halos entre las cepas de *B. cereus* y *S. aureus*.** Media de halos inhibitorios en *B. cereus* y *S. aureus* para los líquenes *P. poeppigii* y *Usnea sp.*, separado en base al solvente usado en la extracción. Se realizó un test de ANOVA de dos-vías para evaluar significancia, se detona \*\*  $p < (0,005)$ , \*\*\*\*  $p < (0,0001)$ .

## 7.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se trabajó con la media de los valores obtenidos, para calcular la CMI se hizo una diferencia entre la medición inicial de la absorbancia y el valor de ésta luego de 24 horas de incubación a 37°C, como se puede ver en la Tabla N°5 y N°6, si la diferencia da positiva se interpreta que hubo crecimiento bacteriano, si la diferencia es negativa o cero se asume que el crecimiento se inhibió, considerándose este primer valor de cambio como la CMI. La CMI del extracto de *P. poeppigii* para *S. aureus* fue de 500µg/ml en el caso de *B. cereus* fue de 5000µg/ml. Para *Usnea* sp se encontraron CMI de 500µg/ml para *S. aureus* y 5000µg/ml en *B. cereus*.

**Tabla N°5: CMI de los extractos de éter de petróleo en *S. aureus*.** Valores de absorbancia (Abs) inicial y luego de 24 horas de incubación a 37°C, diferencia de las mediciones para evidenciar el crecimiento bacteriano de *S. aureus*, frente a diluciones seriadas del extracto obtenido desde éter de petróleo para las distintas especies de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea* sp. más los respectivos controles.

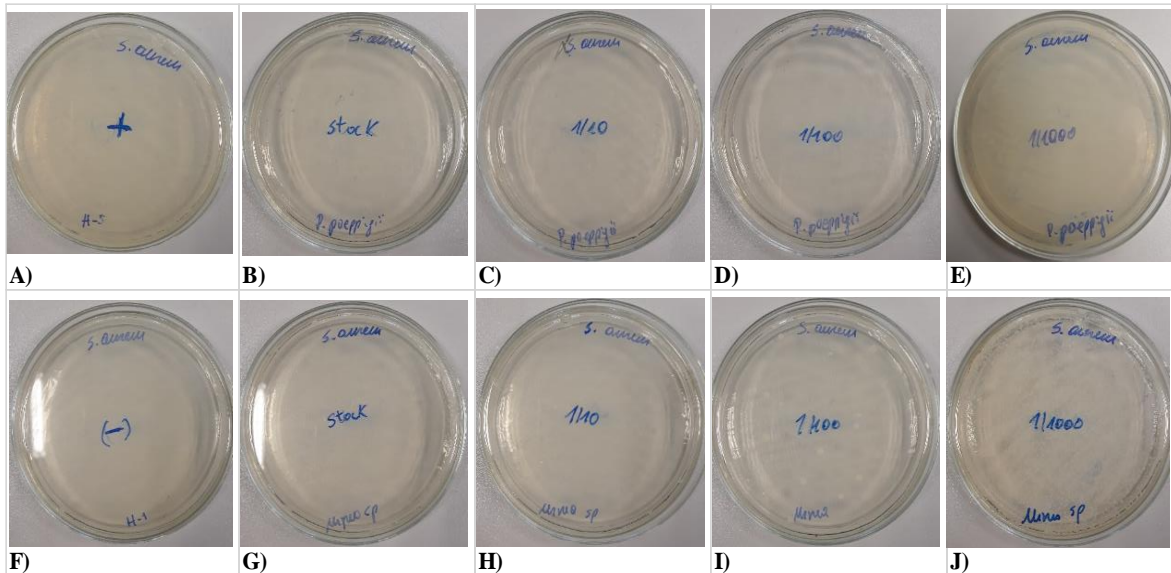
<i>Staphylococcus aureus</i>		Diluciones seriadas											Control positivo	Control negativo	Control DMSO	
		50000 µg/ml	5000 µg/ml	500 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,05 µg/ml	0,005 µg/ml	0,0005 µg/ml	0,00005 µg/ml	0,000005 µg/ml				
<i>P. poeppigii</i>	Medición inicial (Abs)	1,298	0,575	0,331	0,239	0,163	0,130	0,255	0,120	0,113	0,106	0,108	0,110	0,115	1,924	0,116
	Medición a las 24 horas (Abs)	0,481	0,435	0,303	0,242	0,164	0,175	0,316	0,300	0,244	0,255	0,311	0,161	0,319	1,845	0,130
	Diferencia de las mediciones	<b>-0,816</b>	<b>-0,141</b>	<b>-0,028</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,045</b>	<b>0,060</b>	<b>0,180</b>	<b>0,131</b>	<b>0,149</b>	<b>0,203</b>	<b>0,050</b>	<b>0,204</b>	<b>-0,078</b>	<b>0,014</b>
<i>Usnea</i> sp.	Medición inicial (Abs)	1,907	0,204	0,187	0,158	0,136	0,166	0,218	0,173	0,128	0,109	0,112	0,107	0,114	1,925	0,113
	Medición a las 24 horas (Abs)	1,828	0,184	0,182	0,171	0,258	0,356	0,359	0,346	0,396	0,325	0,309	0,367	0,341	1,835	0,124
	Diferencia de las mediciones	<b>-0,079</b>	<b>-0,020</b>	<b>-0,006</b>	<b>0,014</b>	<b>0,122</b>	<b>0,191</b>	<b>0,141</b>	<b>0,173</b>	<b>0,268</b>	<b>0,216</b>	<b>0,197</b>	<b>0,260</b>	<b>0,226</b>	<b>-0,090</b>	<b>0,011</b>

**Tabla N°6: CMI de los extractos de éter de petróleo en *B. cereus*.** Valores de absorbancia (Abs) inicial y luego de 24 horas de incubación a 37°C, diferencia de las mediciones para evidenciar el crecimiento bacteriano de *B. cereus*, frente a diluciones seriadas del extracto obtenido desde éter de petróleo para las distintas especies de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea sp.* más los respectivos controles.

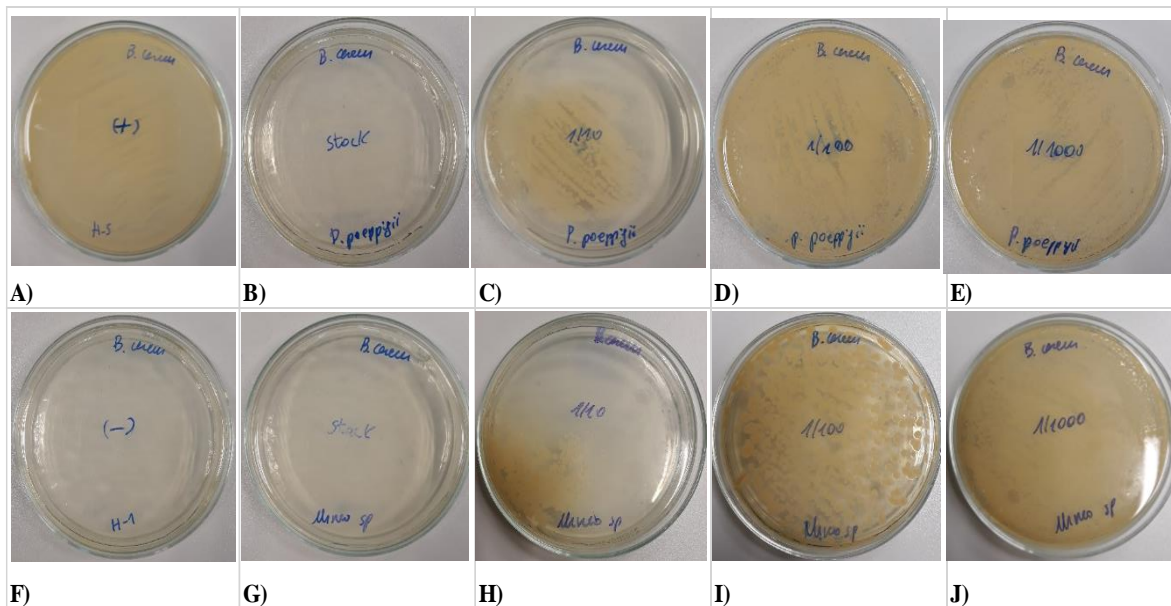
<i>Bacillus cereus</i>		Diluciones seriadas											Control positivo	Control negativo	Control DMSO	
		50000 µg/ml	5000 µg/ml	500 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,05 µg/ml	0,005 µg/ml	0,0005 µg/ml	0,00005 µg/ml	0,000005 µg/ml				
<i>P. poeppigii</i>	Medición inicial (Abs)	1,679	0,672	0,358	0,245	0,185	0,128	0,116	0,106	0,105	0,103	0,106	0,107	0,110	1,354	0,097
	Medición a las 24 horas (Abs)	0,577	0,593	0,397	0,503	0,456	0,422	0,384	0,169	0,117	0,189	0,235	0,183	0,331	0,815	0,218
	Diferencia de las mediciones	<b>-1,102</b>	<b>-0,078</b>	<b>0,039</b>	<b>0,258</b>	<b>0,271</b>	<b>0,294</b>	<b>0,268</b>	<b>0,063</b>	<b>0,012</b>	<b>0,086</b>	<b>0,129</b>	<b>0,075</b>	<b>0,222</b>	<b>-0,540</b>	<b>0,121</b>
<i>Usnea sp.</i>	Medición inicial (Abs)	1,973	2,021	0,313	0,245	0,206	0,152	0,119	0,115	0,106	0,105	0,104	0,107	0,108	1,981	0,101
	Medición a las 24 horas (Abs)	1,756	1,922	0,764	0,511	0,520	0,390	0,255	0,228	0,183	0,262	0,209	0,098	0,357	1,864	0,221
	Diferencia de las mediciones	<b>-0,217</b>	<b>-0,100</b>	<b>0,451</b>	<b>0,266</b>	<b>0,314</b>	<b>0,238</b>	<b>0,137</b>	<b>0,112</b>	<b>0,077</b>	<b>0,156</b>	<b>0,105</b>	<b>-0,009</b>	<b>0,249</b>	<b>-0,117</b>	<b>0,120</b>

### 7.5 Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se sembró el pocillo con la concentración stock (50000 µg/ml) la dilución 1/10, 1/100 y 1/1000, además de un control positivo y un control negativo desde la misma placa de microdilución (Figura N°7 y Figura N°8). La CMB en el caso de *P. poeppigii* para *S. aureus* es de 500µg/ml, mientras que en *B. cereus* es >5000µg/ml para el extracto de *Usnea sp.* la CMB contra *S. aureus* es de 5000µg/ml, mientras que en *B. cereus* es >5000µg/ml.



**Figura N°7:** CMB de los extractos de éter de petróleo en *S. aureus*. A= control positivo, F= control negativo. B a E extracto de *P. poeppigii*. G a J de *Usnea* sp. B y G=50000 $\mu$ g/ml, C y H=5000 $\mu$ g/ml (dilución 1/10), D e I=500 $\mu$ g/ml (dilución 1/100), E y J=50 $\mu$ g/ml (dilución 1/1000). La CMB de *P. poeppigii* se encuentra en D y la de *Usnea* sp. en H.



**Figura N°8:** CMB de los extractos de éter de petróleo en *B. cereus*. A= control positivo, F= control negativo. B a E extracto de *P. poeppigii*. G a J de *Usnea* sp. B y G=50000 $\mu$ g/ml, C y H=5000 $\mu$ g/ml (dilución 1/10), D e I=500 $\mu$ g/ml (dilución 1/100), E y J=50 $\mu$ g/ml (dilución 1/1000). La CMB de *P. poeppigii* se encuentra en B y la de *Usnea* sp. en G.

## 8. DISCUSIÓN

Se puede decir que los extractos de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea* sp. tienen actividad antibacteriana sobre las bacterias gram positivo, pero no sobre las gram negativo probadas en este estudio. Además, se agrega que los extractos obtenidos de éter de petróleo y acetato de etilo presentan mayor inhibición que el obtenido desde metanol en el caso de *P. poeppigii*.

Los resultados obtenidos en este estudio, se diferencia de lo encontrado por Schmeda-Hirschmann (2008), que obtuvo extractos del liquen *P. poeppigii* a partir de los solventes metanol y diclorometano, encontrando actividad antibacteriana sobre bacterias gram negativo como *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, encontró inhibición sobre bacterias gram positivo como *S. aureus* sensible a meticilina y resistente a este antibiotico, resultados comparables a los encontrados en el presente estudio(39). En el presente trabajo, el extracto de metanol no presentó actividad inhibitoria, lo cual se contradice con los resultados del autor mencionado anteriormente. Esta diferencia se podría deber a un error en la obtención del extracto, o a diferencias en la metodología de prueba, ya que los ensayos inhibitorios del trabajo nombrado se realizaron por el método de dilución en agar.

Según los resultados de Schmeda-Hirschmann (2008), éstos revelan que para *S. aureus* sensible a meticilina, la CMI para el extracto de diclorometano obtenido a partir de *P. poeppigii* fue de 125µg/ml y de 500µg/ml para el extracto de metanol(39). En este trabajo, este último valor de CMI es el mismo encontrado para *S. aureus* utilizando éter de petróleo.

Para el caso de *B. cereus* no hay estudios que evalúen si los extractos de *P. poeppigii*, tienen actividad antibacteriana sobre dicha bacteria, siendo este el único trabajo

que señala la inhibición encontrada. La CMI del extracto de *P. poeppigii* obtenido desde éter de petróleo para *B. cereus* es de 5000µg/ml siendo mayor a la encontrada para *S. aureus*.

Santiago et al., (2011) encontró que los extractos crudos, extraídos en acetona de *U. fragilescens*, *U. ceratina* y *U. esperantiana* tienen una alta actividad inhibitoria (>15 mm de halo), mientras que *U. glabrata*, *U. ceratina* y *U. hesperina* presentan una muy alta inhibición (>19mm de halo). También exponen que estos extractos fueron más efectivos sobre *B. subtilis* que sobre *S. aureus*, señalando también que algunas de las zonas de inhibición son de diámetro comparable a antibióticos como la estreptomicina y tetraciclina(42). Los extractos de *Usnea* sp. del presente estudio presentan mayores halos inhibitorios, siendo de aproximadamente 20 mm para *B. cereus* y de 10 mm para *S. aureus*, siendo más grandes a los encontrados en el estudio de Santiago et al, presentado con anterioridad.

Cobanoglu, G et al., (2016) quien obtuvo extractos de los líquenes *U. florida* y *U. subfloridana* a partir de los solventes metanol y cloroformo informa que la máxima actividad antibacterina se manifiesta en los extractos de cloroformo del liquen *Usnea subfloridana* contra las bacterias gram negativo *Escherichia coli* (CIM = 3 µg / ml) y *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 27 µg / ml). Mientras que los extractos de metanol de las especies de líquenes tuvieron efectos nulos o débiles en las bacterias analizadas, en particular no tuvieron acción sobre gram negativos. El autor concluye que los extractos de cloroformo mostraron una fuerte actividad antibacterina contra las bacterias gram negativo, particularmente *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero no así los de metanol(66). Este estudio puede ser comparable a los resultados obtenidos, pues tampoco se encontró actividad antibacteriana en los extractos de metanol.

En comparación, Dülger et al. (1997) determinaron los efectos antibacterianos en *Usnea florida* y encontraron que los extractos de cloroformo, etanol, acetona y acetato de etilo eran todos activos contra *Escherichia coli* (67). Además, un estudio previo de Çobanoğlu et al.(2010) indicó que los extractos de acetona y cloroformo de algunas especies de líquenes estaban activos contra estas dos bacterias gram negativas (68). De estos estudios se puede suponer que la actividad inhibitoria sobre las gram negativas depende del solvente usado para la extracción. También se puede deducir que dependiendo del solvente usado puede variar el grado de actividad inhibitoria, variando también según la especie de líquen.

En general, en estudios sobre la actividad antibacteriana de los líquenes, las bacterias gram negativo fueron más resistentes que las gram positivo. La diferencia de sensibilidad entre bacterias gram positivo y gram negativo, se puede atribuir a las diferencias morfológicas entre estos microorganismos, sobre todo a las diferencias en la permeabilidad de la pared celular(45).

Según el solvente utilizado se pueden extraer diferentes tipos de compuestos. Esto está definido por la polaridad que dicho solvente presente. El éter de petróleo se clasifica como de baja polaridad, extrayendo principalmente ceras, grasas, aceites fijos y aceites volátiles en plantas. El acetato de etilo es de polaridad media y extrae en plantas principalmente compuestos alcaloides, agliconas y glucósidos. El metanol por su parte es categorizado como de mediana polaridad, pero más alta que la del acetato de etilo, se caracteriza por extraer azúcares, aminoácidos y glucósidos respecto a fitocompuestos (69).

Los sistemas de disolventes utilizados en la extracción se seleccionan en función de su capacidad para disolver la cantidad máxima de componentes activos deseados y la cantidad mínima de componentes no deseados. La extracción de compuestos hidrófilos utiliza disolventes polares como el metanol, el etanol o el acetato de etilo. Para la



extracción de más compuestos lipófilos, se utilizan diclorometano y una mezcla de diclorometano / metanol(70).

Además, el grado de actividad o efectividad depende de las especies del liquen en relación con los tipos de metabolitos secundarios involucrados. Una variedad de resultados diferentes en los estudios de actividad biológica puede deberse a diferentes condiciones del hábitat y las especies vecinas del material liquénico recolectado, que puede afectar la producción de metabolitos secundarios en un talo liquénico(66).

Según los ensayos de CMI los extractos tienen mejor acción bactericida sobre *S. aureus* que sobre *B. cereus* lo que se contrarresta en lo encontrado en las pruebas de difusión en disco que informa lo contrario. Esta diferencia se puede explicar ya que se dice que este último método no siempre es confiable para determinar la actividad antibacteriana de los compuestos naturales, es decir, el extracto de liquen, porque la polaridad de los compuestos naturales puede afectar la difusión de los compuestos en el medio de cultivo(71). Los compuestos con menos polaridad se difundieron más lentamente que los más polares(72).

Dado que los microorganismos han desarrollado resistencia a muchos antibióticos, los farmacólogos deben buscar nuevas fuentes de agentes antimicrobianos. Todos estos resultados sugieren que los líquenes y sus metabolitos producen sustancias bioactivas nuevas e importantes para el tratamiento de diversas enfermedades causadas por microorganismos(27). Entonces de aquí radica la importancia de encontrar nuevos compuestos activos frente a bacterias y fuentes desde donde obtenerlos.

## 9. CONCLUSIÓN

Los extractos de líquenes *P. poeppigii* y *Usnea* sp. tienen actividad antibacteriana sobre las bacterias gram positivo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, pero no sobre las gram negativo *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Además, los extractos obtenidos de éter de petróleo y acetato de etilo presentan mayor inhibición que el obtenido desde metanol en el caso de *P. poeppigii*, no así, en el caso de *Usnea* sp. en los cuales no se encontró diferencia significativa entre los tres extractos. Según el método de difusión en disco los extractos de estos líquenes son más activos sobre *B. cereus* que sobre *S. aureus*. pero no se da esta misma relación para la CMI, teniendo que *S. aureus* es más sensible al extracto que *B. cereus*. Se agrega que la CMB coincide en su gran mayoría con la CMI.

## 10. REFERENCIAS

1. E. Dayan F, G. Romagni J. Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook*. 2001;12(6):229-32.
2. Boustie J, Grube M. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*. 2005;3(2):273-87.
3. Feuerer T, Hawksworth DL. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation*. 2007;16(1):85-98.
4. Bhattacharyya DS, Deep R, Singh S, Nayak B. Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity 2016. 28-44 p.
5. Honegger R. Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991;42:553-78. 1991.
6. Shukla V, Joshi GP, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2010;9(2):303-14.
7. Shrestha G, St. Clair LL. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*. 2013;12(1):229-44.
8. Lawrey JD. Biological Role of Lichen Substances. *The Bryologist*. 1986;89(2):111-22.
9. Pogue JM, Kaye KS, Cohen DA, Marchaim D. Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(4):302-12.
10. Molnár K, Farkas E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. *Zeitschrift für Naturforschung C* 2010. p. 157.

11. Mason E HJ. The Biology of Lichens. Third Edition ed. Great Britain: Edward Arnold; 1983.
12. Jayanthia S, Priyaa P, Devib M, Smilyc B. Lichens: Origin, types, secondary metabolites and applications. Youth Education and Research Trust (YERT). 2012;1.
13. Clerc P. Species Concepts in the Genus *Usnea* (Lichenized Ascomycetes). The Lichenologist. 1998;30(4-5):321-40.
14. Calvelo S, Stocker-Wörgötter E, Liberatore S, Elix JA. "genus-species" *Protousnea* (Parmeliaceae, Ascomycota), a Genus Endemic to Southern South America: BIONE; 2005. 1-15, p.
15. Krog H. *Lethariella* and *Protousnea*, two new lichen genera in the Parmeliaceae. Norwegian Journal of Botany. 1976;23:83-106.
16. Ingólfssdóttir K. Usnic acid. Phytochemistry. 2002;61(7):729-36.
17. Lawrey JD. Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. Bryologist. 1989:326-8.
18. Ingólfssdóttir K, Hjalmarsdóttir MA, Sigurdsson A, Gudjonsdóttir GA, Brynjólfssdóttir A, Steingrímsson O. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to protolicheterinic acid from the lichen *Cetraria islandica*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997;41(1):215.
19. Hidalgo ME, Fernandez E, Quilhot W, Lissi E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. Phytochemistry. 1994;37(6):1585-7.
20. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, et al. Depsides and Depsidones as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Discovery of Novel Inhibitors through 3D Database Searching. Journal of Medicinal Chemistry. 1997;40(6):942-51.
21. Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften. 1999;86(12):559-70.

22. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;56(1-2):9-16.
23. Ahad AM, Goto Y, Kiuchi F, Tsuda Y, Kondo K, Sato T. Nematocidal principles in "oakmoss absolute" and nematocidal activity of 2, 4-dihydroxybenzoates. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1991;39(4):1043-6.
24. Zeybek U, John V. Likenler (Lichenes). *Kimyasal Bileskleri ve Tibbi, Kullammlari* "har,acia JTPA. 1992;31(1):37-48.
25. Basile A, Rigano D, Loppi S, Di Santi A, Nebbioso A, Sorbo S, et al. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(4):7861-75.
26. Proksa B, Proksova A. Lichen Metabolites. Usnic Acid and its Biological Activity. *Farmaceuticky Obzor*. 1999;68:139-43.
27. Kosanić M, Ranković B. Lichen secondary metabolites as potential antibiotic agents. *Lichen Secondary Metabolites*: Springer; 2015. p. 81-104.
28. Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA, Al-Jawhari DA. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins*. 1996;4(2):96-102.
29. Maciąg-Dorszyńska M, Węgrzyn G, Guzow-Krzemińska B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS microbiology letters*. 2014;353(1):57-62.
30. Cowan MM. *Clinical Microbiology Reviews-Plants Products as Antimicrobial Agents*. Ohio Department of Microbiology Miami University. 1999;4(2):564-82.
31. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(10):3357-60.

32. Epanand RF, Savage PB, Epanand RM. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2007;1768(10):2500-9.
33. Mohammed SG. Comparative study of in vitro antibacterial activity of miswak extracts and different toothpastes. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 2013;8(1):82-8.
34. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*. 2012;19(13):1166-72.
35. Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and chemical toxicology*. 2013;53:112-8.
36. Ranković B, Kosanić M, Manojlović N, Rančić A, Stanojković T. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Medicinal Chemistry Research*. 2014;23(1):408-16.
37. Manojlović NT, Solujic S, Sukdolak S. Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeferi*. *The Lichenologist*. 2002;34(1):83-5.
38. Ranković B, Mišić M. The Antimicrobial Activity of the Lichen Substances of the Lichens *Cladonia Furcata*, *Ochrolechia Androgyna*, *Parmelia Caperata* and *Parmelia Conspresa*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2008;22(4):1013-6.
39. Schmeda-Hirschmann G, Tapia A, Lima B, Pertino M, Sortino M, Zacchino S, et al. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. *Phytother Res*. 2008;22(3):349-55.
40. Francolini I, Norris P, Piozzi A, Donelli G, Stoodley P. Usnic Acid, a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(11):4360.

41. Elo H, Matikainen J, Pelttari E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant *enterococci* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Naturwissenschaften*. 2007;94(6):465-8.
42. Santiago KAA, Sangvichien E, Boonpragob K, dela Cruz TEE. Secondary metabolic profiling and antibacterial activities of different species of *Usnea* collected in Northern Philippines. *Mycosphere*. 2013;4(2):267-80.
43. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Introducción a la microbiología: Editorial Medica Panamericana Sa de*; 2007.
44. *Introducción a la microbiología (2a ed.): Euned*.
45. Nostro A, Germano MP, D'angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in applied microbiology*. 2000;30(5):379-84.
46. Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistenciabacteriana. *Revista médica*. 2013;4.
47. Fernández R. Resistencia bacteriana a los antibióticos: un problema mundial de salud pública. *Galicia Clínica*. 2017; Vol. 78, Nº. 3:114-5.
48. Tacconelli E, N., Magrini. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*. 2017:5.
49. Gómez Álvarez CA, Leal Castro AL, Pérez de Gonzalez MdJ, Navarrete Jiménez ML. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2005;53:27-34.
50. Nataro J, Bopp C, Fields P, Kaper J, Strockbine N. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. *Manual of Clinical Microbiology*. SM Press, Washington DC; 2007.

51. Guadalupe R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. 2002;44.
52. Dalet F, Río G. Infecciones urinarias: Médica Panamericana; 1997.
53. Torres AF, Ros AMG, González MBP, de los Santos Blázquez Yepes M. *Staphylococcus aureus*.
54. Berga AP. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*: ICG Marge, SL; 2009.
55. Cervantes E, García R, Salazar P. Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio. 2014;4:196-204.
56. Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. Int J Syst Bacteriol. 1991;41(3):343-6.
57. Kotiranta A, Haapasalo M, Kari K, Kerosuo E, Olsen I, Sorsa T, et al. Surface Structure, Hydrophobicity, Phagocytosis, and Adherence to Matrix Proteins of *Bacillus cereus* Cells with and without the Crystalline Surface Protein Layer. Infection and Immunity. 1998;66(10):4895.
58. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes and Infection. 2000;2(2):189-98.
59. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 2010;23(2):382.
60. Andersson A, Granum PE, Rønner U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. International Journal of Food Microbiology. 1998;39(1):93-9.
61. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infection and Immunity. 1995;63(11):4423.



62. Lund T, Granum PE. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. Microbiology. 1997;143(10):3329-36.
63. Lund T, De Buyser M-L, Granum PE. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology. 2000;38(2):254-61.
64. Kiyomizu K, Yagi T, Yoshida H, Minami R, Tanimura A, Karasuno T, et al. Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia. Journal of Infection and Chemotherapy. 2008;14(5):361-7.
65. Savini V, Favaro M, Fontana C, Catavittello C, Balbinot A, Talia M, et al. *Bacillus cereus* heteroresistance to carbapenems in a cancer patient. Journal of Hospital Infection. 2009;71(3):288-90.
66. Cobanoğlu G, Sesal C, Acikgoz B, Karalti I. Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Physcia aipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida*, *Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*. Modern Phytomorphology. 2016;10:19-24.
67. Dülger B, Gücin F, Kara A, Aslan A. *Usnea florida* (L.) Wigg. likeninin antimikrobiyal aktivitesi. Turkish J Biology. 1997;21:103-8.
68. Çobanoğlu G, Sesal C, Gökmen B, Çakar S. Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. South Western Journal of Horticulture. 2010;1(2):153-8.
69. Houghton P, Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts: Springer US; 2012.
70. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2011;8(1).
71. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of microbiological methods. 2010;81(2):121-6.

72. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*. 2006;40(2):223-31.

