

Actividad Antifúngica: Análisis Comparativo de Ensayos *In Vitro* e *In Vivo*.

Diana Nieto-Oropeza, Jorge Aguirre-Joya, Alejandro Zugasti-Cruz, Rosa Rodríguez- Jasso, Raúl Rodríguez-Herrera y Cristóbal Aguilar[†].

Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza, s/n, esquina con LC. Salvador González Lobo, Colonia República Oriente, C.P. 25, 000. Saltillo, Coahuila, México. Correo electrónico[†]: cristobal.aguilar@uadec.edu.mx

RESUMEN

El presente trabajo consta de una recopilación de técnicas de evaluación de capacidad anti-fúngica *in vitro* e *in vivo* de agentes, naturales o sintéticos, manejadas en investigaciones recientes. Se observa que las técnicas se han adaptado a las necesidades, tales como las características físicas del agente, la reducción en volúmenes de reactivos y un empleo menor de espacio y tiempo. Los científicos han confrontado con intelecto los problemas provocados por estos microorganismos, ya que provocan severos daños en cosechas, así como en salud humana y animal, provocando pérdidas económicas alrededor del mundo. Las técnicas de evaluación de capacidad anti-fúngica son de gran utilidad para determinar la capacidad de inhibición de algún microorganismo por una o más sustancias ya sean naturales o no. Las técnicas evaluadas permiten realizar ensayos de capacidad desde una microplaca hasta varias hectáreas, pasando por las aplicaciones a nivel invernadero. Las principales ventajas del uso de las técnicas a nivel laboratorio es que permiten estimar de una manera sencilla y rápida, tanto *in vitro* como *in vivo* los compuestos antifúngicos que pudieran escalarse hasta su aplicación final en un cultivo para su protección en contra de fitopatógenos. El principal objetivo del presente artículo es hacer una revisión actualizada de las principales técnicas de actividad anti-fúngicas mundialmente utilizadas.

Palabras Claves: Anti-fúngico, técnicas, *in vivo*, *in vitro*

ABSTRACT

This work analyze different techniques for *in vitro* and *in vivo*, evaluation of the antifungal ability of natural or synthetic agents, driven by recent researches. It is noted that this techniques were

adapted to specific needs, such as physical characteristics of the agent, to reduce reagent volumes and less use of space and time. Scientists confronted with intellect the hazards caused by these microorganisms, as they cause severe problems in crops, human and animal health. For that they cause economic losses worldwide. Antifungal techniques are useful to determinate the antifungal activity of a substance. The techniques allow evaluated scales from a microplate until hectares, through the greenhouse applications. The main advantages of using standard laboratory techniques is to allow estimation of a simple and quick way, both *in vitro* and *in vivo* the compounds with possible applications to scale it in a crop. The main objective of this article is to date the main techniques of anti-fungal activity worldwide used.

Key Words: Antifungal, techniques, *in vivo*, *in vitro*

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos secretados por microorganismos invasores (Gómez- Ortiz, *et al.*, 2014), frecuentemente hongos filamentosos y/o levaduras son los protagonistas de los incidentes de degradación de, fibras naturales (Foksovicz-Flaczyk & Walentowska, 2013) construcciones, de interés histórico (Gómez- Ortiz *et al.*, 2014), artículos de patrimonio cultural (Stupar, *et al.*, 2014) o pérdidas en la producción de comida en el mundo. En el caso de esta última alcanzado un porcentaje que oscila entre el 5 y el 10%, dando como resultado un desenlace negativo en la economía (Belguesmia *et al.*, 2013). Esto sin considerar el incremento de enfermedades humanas de origen fúngico, donde ordinariamente la candidiasis es una de ellas (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2014) o las intoxicaciones originadas por las micotoxinas producidas por hongos que irrumpen en el almacenamiento de alimentos, trayendo como consecuencia un perjuicio en la calidad y cantidad de nutrientes por lo cual hay una

reducción en el valor del mercado (Prakash *et al.*, 2015), además se ha reportado que las pérdidas de frutos a nivel postcosecha en países en vías de desarrollo puede variar entre el 20 y 50 % (SAGARPA, 2015). Con la finalidad de mejorar la salud tanto humana como animal disminuir las pérdidas de frutos y vegetales postcosecha anteriormente mencionada existen alrededor del mundo diversos estudios enfocados en estas áreas, tal es el caso del grupo de Seong-Cheol *et al.* (2013) quienes trabajan con nanopartículas de plata en microestructuras de gelatina en tercera dimensión con la finalidad de inhibir el desarrollo de *Candida albicans* y *Aspergillus parasiticus*, dos patógenos importantes tanto para humanos como para animales

Ernst & Rogers (2005), mencionan que lograr la estandarización de las técnicas de evaluación para determinar la actividad antifúngica de algún compuesto es un desafío día con día. Evidenciando la necesidad existente contar con técnicas

confiables, reproducibles y estandarizadas a nivel mundial.

TÉCNICAS ANTIFÚNGICAS IN VITRO

Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MCF)

La técnica de MIC consiste en hacer crecer las células fúngicas en SBD (Caldo Sabouraud Dextrosa) para posteriormente realizar una suspensión de esporas en una solución salina y ajustarlas a 2×10^4 esporas/ml del micro organismo a emplear (microorganismo a controlar), en este caso se usaron *Candida spp* y *Cryptococcus neoformans*, posteriormente se inoculan 100 μ L de esporas con 100 μ L de las soluciones del compuesto a evaluar como anti-fúngico o con actividad biológica reportada, en una microplaca de 96 pocillos, se dejan reaccionar durante 18 h. Para determinar la MCF se colocan 10 μ L de muestra del paso anterior cultivadas nuevamente en SBD, ambos procedimientos se llevan a cabo a 35°C (Fig. 1). A los 180 minutos Wang K *et al.* (2014) lograron reducir en un 99.9% la



Fig. 1. Amplificación de los pocillos con las técnicas descritas.

concentración de esporas de los microorganismos anteriormente mencio-

nados, utilizando un péptido catiónico procedente del veneno de la avispa *Polybia Paulista* (polybia-MPI). El fundamento de la técnica es que se conoce con exactitud el número de células (esporas) presentes en el medio en un inicio y se mide la disminución de las mismas en función del tiempo, por medio de conteo en capara de Neubauer, como efecto de las sustancias probadas como antifúngicas. Las esporas en los hongos filamentosos son las estructuras de resistencia y propagación del microorganismo, por lo cual se busca que los compuestos antifúngicos sean capaces de destruir a las esporas, ya sea mediante mecanismos de alteración en la presión osmótica, formación de poros en las membranas o lisis celular.

La técnica fue estandarizada por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institutes), en el año de 1997.

Técnica de macrodilución

Esta técnica es muy similar a la anterior pero en lugar de realizarse en microplaca se realiza en tubos en los cuales se maneja un control negativo, en el cual no se agrega sustancia antifúngica alguna y uno positivo en el cual se agrega una sustancia antifúngica comercial (Da Silva-Bomfim *et al.*, 2015) prepararon 12 tubos con el medio RPMI-1640, de los cuales dos se utilizaron como controles, uno negativo y uno positivo, se realiza la evaluación de inhibición fúngica, en este caso del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el cual ya ha sido

reportado por diversos grupos de trabajo por presentar actividades biológicas de interés, como antioxidantes, antifúngicas, etc. El tubo 2 se inoculó con 500 μL del aceite a una concentración de 19, 200 μg /mL, posteriormente se transfirieron 500 μL al tubo 3 y así consecutivamente, al final descartando los últimos 500 μL . El hongo *F. verticillioides* (10^4 /CFU) fue integrado como uno de los últimos pasos. Después de transcurrir el tiempo establecido se cuenta la reducción de las UFC en cada una de las muestras y los controles para determinar así la efectividad del compuesto a cierta concentración

Técnica en portaobjetos.

Con esta técnica se pretende evitar el deterioro y consecuente pérdida en de monumentos en roca. (Gómez- Ortiz *et al.*, 2014) evaluaron la actividad antifúngica del hidróxido de calcio y zinc dihidratado calentado a 60°C un portaobjetos para después cubrirlo con 4 mL de $\text{Ca} [\text{Zn} (\text{OH})_3]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (hidróxido de calcio y zinc dihidratado). Se deja secar para después adicionar 1 mL de solución de esporas ($1 \cdot 10^6$ esporas/mL) de los microorganismos responsables de la degradación de este tipo de sustratos (Fig. 2). Con la finalidad de evaluar las condiciones de exposición a un ciclo de luz oscuridad de 12 h y condiciones de almacenamiento en oscuridad, el experimento se dividió en 2 grupos, el primero se llevaría a cabo en condiciones de oscuridad a 27°C y a una humedad relativa

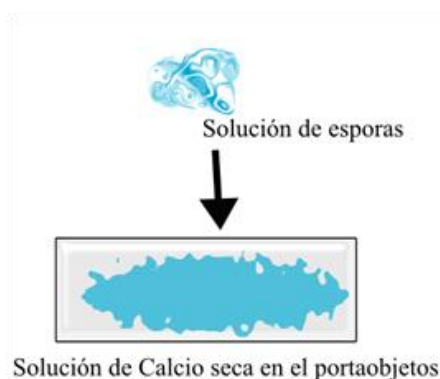


Fig. 2. Portaobjetos con solución seca.

del 80%, mientras el segundo con 12 h de oscuridad y 12 h de luz a 27°C y 80% de humedad. Al finalizar 120 h de experimento se realizó un conteo de esporas para determinar la actividad antifúngica del hidróxido de calcio y zinc dihidratado. El fundamento de la técnica es que el tratamiento con el agente antifúngico presentara una menor concentración de esporas que el grupo control, el cual no tiene el compuesto antifúngico. El mecanismo específico de la reducción de la concentración de esporas dependerá de la sustancia antifúngica.

Técnica de cromatografía en capa fina (TLC).

Según lo reportado por Kumar *et al.* (2012). Las placas de TLC de gel de sílice fueron preparadas en soporte de vidrio. Se secaron y activaron a 70°C durante 45 minutos. Luego se agregaron 30 μL (5 mg/mL) de la cumarina extraída *Clausena*

excavata. Las placas fueron posteriormente secadas con aire para evaporar el solvente. Las esporas (10^5 esporas/ml) suspendidas en caldo de papa dextrosa fueron esparcidas sobre las placas, como se observa en la Figura 3, e incubadas en una cámara húmeda por 2-3 días a 28°C.

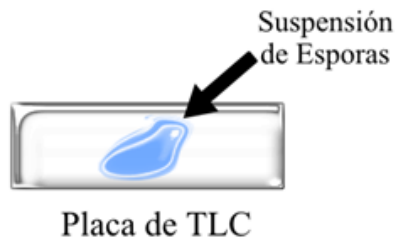


Fig. 3. Placa de TLC inoculada

Técnica de unidades formadoras de colonias (CFU).

Para la técnica fueron suspendidas 3 a 5×10^4 células /ml de agua, de *Cryptococcus neoformans* y se toma una alícuota de 10 μ L e incorporan 90 μ L de las suspensiones con diferentes concentraciones del compuesto activo, que en el caso reportado corresponde a un péptido sintético, dejándolas incubar durante 6-8 horas a 37°C. Posteriormente se incuba en PDA a 30°C durante 2 a 3 días. El porcentaje de inhibición de CFU se determina usando la Ecuación 1. (Conti *et al.*, 2013).

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{CFU Experimental}}{\text{Control}} \times 100 \right) \text{ Ec. 1}$$

Técnica por gota gruesa.

Ryu *et al.* (2014) prepararon placas de bactoagar al 1.5% (p/v) con mohos (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*) y placas con agar YPD (Extracto de levadura peptona dextrosa) con levaduras (*Candida albicans*). Adicionaron una gota entre 10 y 25 μ L (Fig. 4) de los compuestos antifúngicos

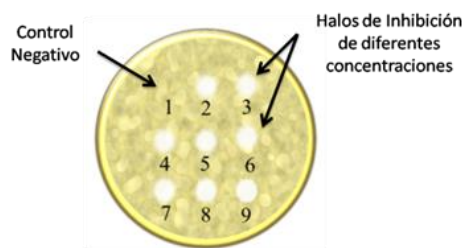


Fig. 4. Las gotas inoculadas en una caja

aislados de *Lactobacillus platarum* HD1. Usaron unidades arbitrarias (Au) con la siguiente formula: $(100/d) D$, donde la D es el factor de dilución y d la dosis. Reportaron que 640 Au/ml son indispensables para la inhibición de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* mientras que en el caso de *Candida albicans* tan solo 8 Au/ml, de los compuestos aislados se puede prevenir o retardar su crecimiento.

Técnica con discos de papel.

En el 2014 Stupar *et al.*, la refirieron como la técnica de micro atmósfera sin embargo en diversos estudios se manejaron diferencias espaciales por ejemplo la central (Gorantla *et al.*, 2014) la marginal o periférica (Singh Tomar *et al.*, 2014) y la múltiple (Ryu *et al.*, 2014).

Gorantla *et al.*, (2014) posicionaron el disco de papel en el centro de la esfera fúngica (Fig. 5a) examinado así capacidad de los

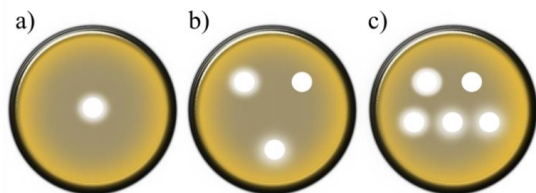


Fig. 5. Técnica con discos de papel. a) Posicionamiento central b) Posicionamiento periférico c) Posicionamiento múltiple

agentes fenacina-1-ol y fenacina-1-acido carboxílico, producidos por *Pseudomonas* de la cepa FPO4. Ambos compuestos obtuvieron resultados alentadores por ejemplo *Trichophyton rubrum* fue sensible a una concentración de 4 mg/mL de fenacina-1-acido carboxílico, mientras que para *Candida tropicalis* y *Candida albicans* se necesitaron 8mg/ml para inhibir su crecimiento

Una diferencia de la técnica central, en este caso el papel es remplazado por un recubrimiento que contenía cinamaldehído y natamicina, evaluándola los días 1, 3, 5 y 7 del experimento, con el peculiar halo de inhibición formado. Se expresa el porcentaje de inhibición en la Ecuación 2, donde $\bar{\varnothing} Total$ es el diámetro de la caja Petri y $\bar{\varnothing} No\ crecimiento$ el halo (Balaguer *et al.*, 2014).

$$Inhibicion(\%) = \frac{\bar{\varnothing} No\ crecimiento}{\bar{\varnothing} Total} \times 100 \text{ Ec. 2}$$

Los hongos *Fusarium oxysporum*, *A. flavus* y *Phanerochaete chrysosporium*

siendo seleccionados por Singh Tomar *et al.*, (2014) fueron sujetos a un ensayo ante una proteína multifuncional extraída de la semilla de calabaza, llamada 2S albumina, las concentraciones manejadas rondaban entre los 50 y 100 μg , alojándolos en discos de papel los cuales se ubicaron en la zona marginal o periférica del crecimiento micelial, produciendo regiones limpias (Fig. 5b).

Ryu E. H., *et al.* (2014), evidenciaron la capacidad antifúngica de *Lactobacillus plantarum* HD1 que fue aislada de un producto vegetal fermentado de origen coreano, conocido como kimchi. Optaron por el agar extracto de malta (MEA) para el crecimiento fúngico, mientras 5 discos de papel remojados con 100 μl de muestra con diversas concentraciones fueron depositados entre el desarrollo micelial que cubría el agar, incubado durante 48 horas (Figura 5c).

Técnica de dilución en tubo de agar

La técnica fue realizada en tubos cónicos con 7 ml de agar, adicionándoles 1 ml de las soluciones de extracto crudo y fracciones purificadas de *Cichorium intybus*. Se muestra en la Figura 6 una ejemplificación grafica de



Fig. 6. Tubo cónico usado por Rehman *et al.*, (2014)

los tubos cónicos manteniéndolos en una posición inclinada hasta la solidificación.

Fusarium solani, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* fueron inoculados e incubados durante 3 días a 25 °C (Rehman A., *et al.*, 2014).

Asimismo Chatterjee S., *et al.*, en el 2014, utilizaron 5 ml del medio Richard con diferentes concentraciones de s-quitosan y depositaron solo 100 µl de suspensión de esporas de *Macrophomina phaseolina* (2.9×10^6 esporas/ml). Evaluaron la elongación del tubo germinativo cada 48 horas usando el microscopio de contraste.

Técnica de disco de difusión

Un stock de soluciones de complejos de iones metales de lantánidos fueron disueltos en DMSO (Dimetil sulfoxido), los cuales consecuentemente añadidos en PDA. Después de solidificar, un disco de cultivo fúngico de 5 mm fue colocado en el centro de la caja. (Fig. 7). Posteriormente cada caja fue enrollada con Parafilm e incubada a

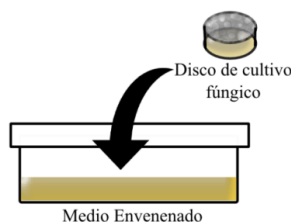


Fig. 7. Demostración grafica de la posición del disco de cultivo fúngico

29°C durante una semana acorde a Chandra S. & Agrawal S. (2014). Durante el periodo de incubación se evalúa cinéticamente el

crecimiento radial del microorganismo, expresado en mm de crecimiento.

La técnica se cita con otros nombres tales como la técnica de comida envenenada por Chandra & Agrawal 2014 y la técnica de efecto de contacto por Li *et al.*, en el 2014.

Técnica de actividad de vapor

La técnica consiste en enganchar con un cable de nylon, las cubiertas de PP (polipropileno), las cuales sustituyeron la tapa de la placa Petri en la evaluación de Manso S., *et al.*, (2015), quienes evaluaron la capacidad del aceite esencial de la canela, con 100 µl de esporas de *Aspergillus* y *Penicillium*, los hongos se incubaron a diferentes temperaturas 25°C a 37°C y 25°C a 6°C, respectivamente. Durante el periodo de incubación se evalúa cinéticamente el crecimiento radial del microorganismo, expresado en mm de crecimiento.

Técnica de superposición

Algunos de los Compuestos antifúngicos sintetizados por *Lactobacillus casei* AST18, fueron probados contra *Penicillium chrysogenum*, como detallaron Li H., *et al.* (2014), inoculando en cajas petri que contenían agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), en tres líneas largas de 3 cm con *Lactobacillus casei* AST18 (Fig. 8a) e incubándolas a 37°C durante 72 horas (Fig. 8b).

Posteriormente fue cubierto con PDA templado que contenía 10^4 esporas/ml

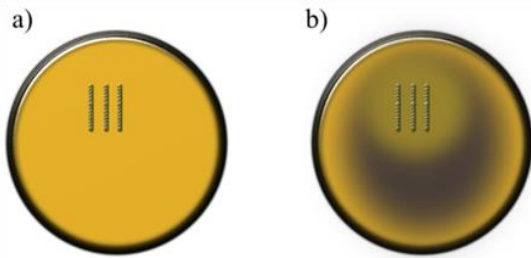


Fig. 8. a) Los *Lactobacillus casei* AST18 activados en el agar MRS. b) Actividad antifúngica con la superposición de esporas en PDA

entonces incubadas a 30 °C. Fueron analizadas después de 24 horas con ayuda de microscopía electrónica.

Técnica de sándwich

Dutta *et al.* (2015) elaboraron recubrimientos a base de un carbohidrato, quitina, abundante en el exoesqueleto de los crustáceos e insectos, Reactivando *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum* y ajustándolos con PBS a 10^7 esporas/mL. Se inocularon 10 μ L de la suspensión entre dos recubrimientos, de una superficie de 1 cm² (Fig. 9) Después de 24 horas de contacto se recogió el sándwich en una solución acuosa de tiosulfato de sodio al 0.3 %. Y observaron en un microscopio de luz blanca.

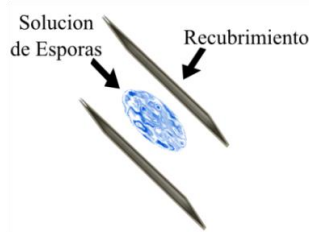


Fig. 9. Sándwich con recubrimientos de quitina

Técnica con tejido natural cubierto de un líquido iónico

Para esta técnica una muestra de un gramo de lino seco fue recubierta con concentraciones de 8, 80, 800 y 5000 μ g de [DDA][NO₃]. El lino fue posteriormente colocado en medio agar e inoculado con los hongos *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens*, *Paecilomyces variotti* y *Penicillium ochrochloron* por un periodo de 4 semanas a una humedad relativa del 90% y una temperatura de 29°C. (Foksowicz-Flaczyk. & Walentowska, 2013)

Técnica litográfica para monumentos.

Las construcciones mayas, fueron realizadas de piedra caliza hace miles de años pero han sufrido por la contaminación de hongos filamentosos como *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*. Gómez- Ortiz *et al.* (2014) llevaron a cabo una prueba *in vitro* con piezas de piedra caliza de diferentes litotipos, esterilizándolas durante 48 h con luz UV y un tratamiento de 6 h en autoclave. Los fragmentos fueron sumergidos en soluciones de Ca [Zn (OH)₃]₂ •2H₂O, enseguida un baño ultrasónico durante 5 min y se llevó un proceso de deposición asistido por etanol. Para el paso posterior en un cuarto de secado nuevamente se esterilizo bajo la luz UV durante 24 horas. Subsiguientemente, 1 ml de solución de esporas fue depositado en los fragmentos e incubaron con una humedad relativa del 80% a 27°C y con

Artículos

simulación de un fotoperiodo natural, que consiste en 12 h de oscuridad y las otras 12 h de luz, el experimento fue ejecutado durante 21 días.

Técnica Fotodinámica.

Como potencial tratamiento antifúngico, se encuentra la opción de la inactivación fotodinámica (PDI) ya que cuenta con las ventajas como amplio espectro de acción y daño limitado al tejido del hospedador como detallan Zheng *et al.* (2015), esto se lleva a cabo con Ftalocianinas de Zinc (ZnPcs) o de Silicon (SiPcs). En la investigación de Zheng B.Y., *et al.*, usaron SiPcs preparando un stock de soluciones en DMF y guardándolas en oscuridad, para después ser inoculadas con *Candida albicans* (2.5×10^7 células/ml), la mezcla llevada a centrifugación con un doble lavado con DMF, resuspendidas con 0.8 ml de DMF y sonicadas por 10 min. La mezcla anterior se acomodó en una placa de 96 pocillos por 3 h a 37°C en la oscuridad para luego ser irradiados durante 30 min con luz blanca visible, con una lámpara de halógeno de 500 W en un depósito de agua de refrigeración. El experimento se realizó por triplicado.

Técnicas con kits comerciales

Mediante el uso de los principales kits comerciales se determina la concentración mínima inhibitoria, la empresa TREK Diagnostic Systems de origen Estadounidense maneja el YeastOne®, de fácil ejecución y proporciona de manera

resultados fiables, Bertout *et al.* (2011) siguieron las instrucciones del fabricante, los platos del kit contenían diluciones sucesivas dobles de los agentes antifúngicos, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, vorticonazol, flucitosina, amfotericina B y caspofungina, inoculando la suspensión de los microorganismo, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, para el registro de la concentración mínima el desarrollo de un color rojo se generaba luego de 48 h.

E- Yeast® (Fig. 10) es una prueba con un gradiente estable de concentraciones de varios medicamentos en tiras de plástico (Biomerieux, 2015) flucanazol, itraconazol, entre otros. Trpkovic *et al.* (2012), utilizaron la prueba anteriormente mencionada, analizando la susceptibilidad de *Criptococcus neoformans* en un medio solidificado de RPMI 1640 suplementado con 2% de glucosa y un buffer con ácido morfolino propano sulfónico, luego de una reducción de humedad del agar aludieron el posicionamiento de dos tiras del kit en la placa, incubándolas a 35°C durante 72 h.



Fig. 10. E- Yeast®. Fuente www.biomerieux-diagnostics.com

TÉCNICAS ANTIFÚNGICAS IN VIVO

Nivel campo

En dos locaciones de una provincia de Turquía, en las cuales el suelo es de arcilla, infestadas naturalmente con *A. niger* (3×10^4 CFU/ g suelo), fueron sujetas a experimentación. La primera provincia fue esparcida con materia orgánica que contenía 11.25 ppm P_2O_5 y 17.5 ppm K_2O , en cambio en la segunda las concentraciones fueron más altas, 18.32 ppm P_2O_5 y 47.6 ppm K_2O . Especifican que el lote sembrado era de 1 m^2 donde se usaron 5 g de semillas de cebolla, mientras la temperatura rondaba entre los 18°C y una humedad del 79% (Ozer & Arin 2014).

De Corato *et al.*, en el 2014 examinaron ante 8 cepas fúngicas, semillas de guisantes, berenjenas, melones y fresas fueron analizados en la variante de invernadero. Donde las semillas sanas fueron sumergidas en una solución que contenía 10^4 esporas/ml. Para luego ser sembradas en macetas de papel. Entre el día 5 y 8, cuando empezaba la germinación, las semillas fueron trasplantadas para ser aplicadas con vapor de explosión, que es generado en la industria del bioetanol, las diluciones de 1:2, 1:4 y 1:8 fueron irrigadas durante el riego.

Cámara Húmeda

Para la realización de la técnica, Tian *et al.* (2015) seleccionaron 12 tomates Cherry con características físicas similares y en buenas condiciones para después consignarlos en contenedores de

poliestireno con tapas para llevar a cabo la experimentación antifúngica *in vivo* de su compuesto PAE (perialdehído), abundante en Herberilla. Los tomates fueron sometidos a una esterilización con 700 ml/L de etanol durante un periodo de 2 min prosiguiendo con dos lavados de agua estéril destilada y un tiempo de secado de una hora.

La superficie de los tomates fue lacerada con un sacacorchos provocando una herida aproximada de 4 mm, donde se inoculo $10 \mu\text{L}$ de hongos seleccionados, la cual fue ajustada a 106 esporas/ml. Dentro de los contenedores se encontraban 2 frascos similares donde se colocaron agua y las soluciones de PAE disueltas en Tween-20 e incubadas a una temperatura de 18°C . Después de 21 días la actividad fúngica fue detectada. (Fig. 11).

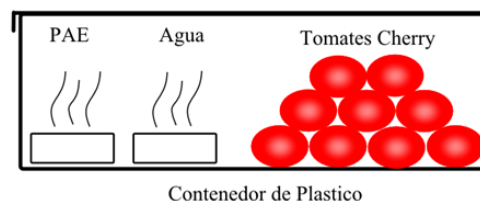


Fig. 11. Cámara húmeda descrita por Tian *et al.* (2015)

Material entero

Grahovac *et al.* (2014) usaron para la técnica material entero, manzanas maduras de la variedad Golden Delicious para estimar la efectividad de metabolitos producidos por *Streptomyces higrscopicus* por lo cual esterilizaron las manzanas sumergiéndolas durante 2 en etanol al 70%, para luego ser

Artículos

enjuagadas con agua destilada. Provocándoles heridas con un clavo estéril. En donde se inocularon 10 µl de líquido centrifugado de *Streptomyces higroscopicus* o con el control en este caso agua destilada para después añadir los líquidos de *Colletotricum acutatum* y *Colletotricum gloesporioides*. Las manzanas al final fueron acomodadas sobre dos toallas de papel húmedas, sobrepuestas en unas rejillas que se encontraban dentro de un contenedor de plástico. Las manzanas se dejaron incubar durante 14 días a 24°C.

Para calcular la eficacia obtenida sobre el patógeno la expresión de $Efficacy = \frac{K - T}{K} \times 100(\%)$, donde la K representa el diámetro necrótico desarrollado con el tratamiento de agua destilada y la T representa el diámetro necrótico con el tratamiento del líquido de *S. higroscopicus*.

Otro ensayo en material entero fue con hojas de tomate y de fresas, las cuales fueron rociadas con concentraciones de saponinas extraídas de *Allium nigrum* L., 10, 50 y 100 ppm. Las hojas fueron inoculadas con un disco de agar micelial de *Botrytis cinerea* y *C. gloesporioides*, incubándolas en una cámara de plástico cerrada con papel seco durante de 10 días a 22 °C (Mostafa *et al.*, 2013)

Material en rebanadas

El proceso de la técnica comienza con el corte de 2 rebanadas de pan con una altura de 12 cm y 1.5 cm de ancho, e inocular por

nebulización solamente una rebanada con *Penicillium roqueforti* DPPMAF1 a una concentración de 10² conidias/mL. La otra rebanada actuó como control. Recluidas ambas porciones en bolsas de poliestileno a una humedad constante e incubadas durante 28 días. Lo particular de la investigación por Giuseppe-Rizello *et al.*, en el 2011 fue la panificación realizada con una masa fermentada de germen de trigo. Antiguamente ya se habían reportado los efectos positivos en la vida de anaquel de un pan de trigo con este tipo de masa fermentada.

CONCLUSIONES

El uso correcto de las técnicas para determinar la capacidad antifúngica ya sea *In vitro* o *In vivo*, dependiendo de las características de los microorganismos a inhibir permitirá una mejor estimación de la verdadera capacidad de la sustancia probada para posteriormente escalar su efecto hasta llegar a una comercialización del producto y aplicación real que permita solucionar los problemas de pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas, así como disminuir las enfermedades humanas y animales provocadas por hongos, levaduras y bacterias. Se puede observar que algunas técnicas comparten similitudes, como el fundamento de absorbancia que permite medir la concentración fúngica en una solución, como la técnica de macrodilución y la técnica comercial de YeastOne ®.

Mientras otras se complementan para una aplicación, el nivel invernadero es un claro ejemplo puesto que proporciona un medio más controlado en temperaturas y humedades, para después pasar a un nivel campo.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigación en Alimentos (DIA) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por las facilidades otorgadas para la realización de este artículo de revisión.

REFERENCIAS

Balaguer MP, Fajardo P, Gartner H, Gomez-Estaca J, Gavara R, Almenar E & Hernandez-Munoz P (2014) Functional properties and antifungal activity of films based on gliadins containing cinnamaldehyde and natamycin. *Int. J. Food Microbiol.* 173:62-71.

Belguesmia Y, Rabesona H, Mounier J, Pawtowsky A, Le Blay G, Barbier G, Haertlé T & Chobert JM (2013) characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellan-xanthan beads during batch fermentation. *Food Cont.* 36:205-211.

Bertout S, Dunyach C, Drakulovski P, Reynes J & Mallie M (2011) Comparison of the sensitive Yeast One® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining

MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathol. Biol.* 59:48-51.

Biomerieux. Disponible: www.biomerieux-diagnostics.com.

Chandra S & Agrawal S (2014) Spectroscopic characterization of Lanthanoid derived from a hexadentate macrocyclic ligand: Study on antifungal capacity of complex. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy.* 124: 564-570

Chatterjee S, Chatterjee BP & Guha AK (2014) A study on antifungal activity of water-soluble chitosan against Macrophomina phaseolina. *Int. J. Biol. Macromol.* 67:452-457.

Conti S, Radiocini G, Ciociola T, Longhi R, Polonelli L, Gatti R, Cabras T, Messina I, Castagnola M & Vitali A (2013) Structural and functional studies on a proline-rich peptide isolated from swine saliva endowed with antifungal activity towards *Cryptococcus neoformans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1828:1066-1074.

Da Silva-Bomfim N, Polis-Nakassugi L, Pinheiro-oliveira JF, Yumie-Kohiyama C, GaleraniMossini SA, Grespan R, BotiãoNerilo S, Mallmann CA, AbreyuFilho BA & Machinski Jr M (2015) Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides*(Sacc.) Nirenberg. *Food Chem.* 166:330-336.

De Corato U, Viola E, Arcieri G, Valerio V, Cancellara F A & Zimbardi F (2014) Antifungal activity of liquid waste

Artículos

- obtained from the detoxification of steam-exploded plant biomass against plant pathogenic fungi. *Crop. Protect.* 55:109-118.
- Dutta AK, Egusa M, Kaminaka H, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H & Ifuku S (2015) Facile preparation of surface *N*-halamine chitin nanofiber to endow antibacterial and antifungal activities. *Carbohydr. Polym.* 115: 342-347
- Ernst EJ & Rogers PD (2005) Antifungal Agents: *Methods and Protocols*. Humana Press. USA
- Foksowicz-Flaczyk J & Walentowska J (2013) Antifungal activity of ionic liquid applied to linen fabric. *Int. Biodet. Biodeg.* 84:412-415.
- Giuseppe-Rizello C, Cassone A, Coda R & Gobbeti M (2011) Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem.* 127:952-959
- Gómez-Ortíz NM, González-Gómez WS, De la Rosa-García SC, Oskam G, Quintana P, Soria-Castro M, Gómez-Cornelio S & Ortega-Morales BO (2014) Antifungal activity of Ca [Zn (OH)₃]₂ •2H₂O coatings for the preservation of limestone monuments: An *in vitro* study. *Int. Biodet. & biodeg.* 91:1-8
- Gorantla JN, Nishanth Kumar S, Nisha GV, Sumandu AS, Dileep C, Sudaesan A, Sree Kumar MM, Lankalapalli RS & Dileep Kumar BS (2014) Purification and characterization of antifungal phenazines from a fluorescent *Pseudomonas* strain FPO4 against medically important fungi. *J. Mycol. Médicale.* 24:185-192.
- Grahovac J, Grahovac M, Dodic J, Bajic B & Balaz J (2014) Optimization of cultivation médium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*. *Crop Protect.* 65:143-152.
- Kumar R, Saha A & Saha D (2012) A new antifungal coumarin from *Clausena excavata*. *Fitoterapia.* 83:230-233.
- Manso S, Becerril R, Nerin C & Gómez-Lus R (.2015) Influence of pH and temperatura variations on vapor phase action of antifungal food packaging against five mold strains. *Food Cont.* 47:20-26.
- Mostafa A, Sudisha J, El-Sayed M, Ito S, Ikeda T, Yamauchi N & Shigyo M (2013) Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. *Phytochem. Lett.* 6:274-280.
- Ozer N & Arin L (2014) Evaluation of fungal antagonists to control black mold disease under field conditions and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion following seed and set treatment. *Crop Protect.* 65:21-28.
- Prakash B, Kedia A, Mishra PK & Dubey NK (2015) Plant essential oils as preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Cont.* 47:381-391.

Artículos

- RAE. Real Academia Española. Disponible: <http://www.rae.es/>
- Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, Alirezaee M, Shams-Ghahfarokhi M, Amani A, Mirahmadi R & Tolouei R (2014) Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida spp.* isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J. Mycol. Medicale.* 24:e43-e50
- Rehman A, Ullah N, Ullah H & Ahmad I (2014) Antibacterial and antifungal study of *Cichoriumintybus*. *Asia Pacific J. Trop. Dis. Suppl2:* S943-S945.
- Ryu EH, Yang EJ, Woo ER & Chang HC (2014) Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol.* 41:19-26.
- SAGARPA. Disponible en: www.sagarpa.gob.mx
- Seong-Cheol K, Jung-Wan K, Gook-Jin Y, Sang-Woo N & Sang-Yul L (2013) antifungal effects of 3D scaffold type gelatin/Ag nanoparticles biocomposite prepared by solution plasma processing. *Curr. Appl. Phys.* 13:S48-S53.
- Singh Tomar PP, Nikhil K, Singh A, Selvakumar P, Roy P & Kumar-Sharma A (2014) Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 448:349-354.
- Stupar M, Grbić ML, Džamić A, Unković N, Ristić M, Jelikić A & Vukojević J (2014) Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkoniumchloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African J. Bot.* 93: 118-124.
- Tian J, Zeng X, Lü A, Zhu A, Peng X & Wang Y (2015) Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes. *LWT-Food Sci. Technol.* 60:63-70.
- Trpkovic A, Pekmezovic M, Barac A, Crncevic-Radovic L & ArsicArsenijevic V (2012) In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. *J. Mycol. Medicale.* 22:243-248.
- Wang K, Yan J, Dang W, Xie J, Yan B, Yan W, Sun M, Zhang B, Ma M, Zhao Y, Jia F, Zhu R, Chen W & Wang R (2014) Dual antifungal properties of cationic antimicrobial peptides pilybia-MPI: Membrane integrity disruption and inhibition of biofilm formation. *Peptides.* 56:22-29.
- Zheng BY, Jiang XJ, Lin T, Ke MR & Huang JD (2015) Novel silicon(IV) phthalocyanines containing piperidinyl moieties: Synthesis and in vitro antifungal photodynamic activities. *Dyes Pigm.* 112: 311-316.