

Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*

Antimicrobial activity of secondary metabolites of *Aspergillus fumigatus sensu stricto* on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*

Jorge A Sanchez-Perez^{1,a}, Vilma Béjar Castillo^{1,b}, Fredy Villanueva Cotrina^{1,2,c}, José M. Guevara-Granados^{1,3,d}

¹ Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión", Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Lima, Perú.

³ Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales. Lima, Perú.

^a Tecnólogo médico, ORCID: orcid.org/0000-0001-9834-0895

^b Bióloga, magister en salud pública. ORCID: orcid.org/0000-0003-2733-4492

^c Tecnólogo médico, ORCID: orcid.org/0000-0001-8578-274X

^d Médico patólogo clínico, ORCID: orcid.org/0000-0003-2018-0339

An Fac med. 2020;81(2):180-5. / DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v81i2.16170>

Correspondencia:

Jorge Sanchez Perez
jorge.sanchez2@unmsm.edu.pe

Recibido: 29 de diciembre 2019

Aceptado: 12 de mayo 2020

Publicación en línea: 29 de junio 2020

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento:

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Resolución Rectoral 4274-R-17.

Contribuciones de autoría: SPJA participó en la recolección de resultados, diseño y redacción del artículo. BCV participó en la concepción, diseño y redacción del artículo. VCF participó en la concepción, recolección de resultados y redacción del artículo. GGJM participó en el análisis e interpretación de resultados y revisión crítica del artículo. Todos los autores aprobaron la versión final.

Citar como: Sanchez-Perez J, Béjar V, Villanueva F, Guevara-Granados J. Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. An Fac med. 2020;81(2): 180-5. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v81i2.16170>

Resumen

Introducción. La resistencia a los antibióticos de bacterias Gram positivas es un grave problema de salud pública donde algunas medidas paliativas pueden encontrarse en los principios antimicrobianos de hongos filamentosos. **Objetivo.** Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de un aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. **Métodos.** La fermentación líquida de *A. fumigatus* se realizó en un caldo líquido sulfato, papa y dextrosa, utilizando acetato de etilo para la extracción de metabolitos. Mediante la metodología de disco difusión se evaluó la actividad antimicrobiana considerada como un halo mayor de 6 mm. **Resultados.** Se obtuvo una media de 24,02 ± 2,51 mm y 23,62 ± 4,68 mm de halo de inhibición sobre *Staphylococcus aureus* sensible y resistente oxacilina, respectivamente. Para *Streptococcus pneumoniae* sensibles y no sensibles a penicilina las medias fueron de 25,82 ± 4,05 mm y 26,5 ± 5,39 mm, respectivamente. **Conclusiones.** El extracto crudo de *A. fumigatus* posee metabolitos secundarios de naturaleza alcaloide y esteroides insaturados con actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Antibacterianos; Pruebas de Sensibilidad Microbiana; *Aspergillus fumigatus*; Alcaloides; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae* (Fuente: DeCS Bireme).

Abstract

Introduction. The antibiotic resistance of Gram positive bacteria is a serious public health problem where some palliative measures can be found in the antimicrobial principles of filamentous fungi. **Objective.:** To evaluate the antimicrobial activity of secondary metabolites of a clinical isolation of *Aspergillus fumigatus* on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. **Methods.** The liquid fermentation of *A. fumigatus* was carried out in a liquid broth sulfate, potato and dextrose; using ethyl acetate for the extraction of secondary metabolites. The antimicrobial activity considered as a halo greater than 6 mm was evaluated using the diffusion disk methodology. **Results.** A mean of 24,02 ± 2,51 mm and 23,62 ± 4,68 mm was obtained on sensitive and resistant *Staphylococcus aureus*, respectively. For *Streptococcus pneumoniae* sensitive and non-susceptible, the means were 25,82 ± 4,05 mm and 26,5 ± 5,39 mm, respectively. **Conclusions.** The crude extract of *A. fumigatus* has secondary metabolites of alkaloid nature and unsaturated sterols with antimicrobial activity.

Keywords: Antibacterial agents; Microbial Sensitivity Tests; *Aspergillus fumigatus*; Alkaloids; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae* (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La obtención, aislamiento y purificación de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de la fermentación de hongos filamentosos es una metodología ampliamente utilizada bajo diversas condiciones y objetivos. Los hongos producen determinados metabolitos durante su interacción y desarrollo en distintas circunstancias ambientales como temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH o tiempo de fermentación en medio líquido ⁽¹⁾. Es así como elaboran diversos compuestos de variada naturaleza química como alcaloides, sesquiterpenlactonas, esteroides insaturados y politerpenos ^(2,3,4). En el género *Aspergillus* se han reconocido alrededor de 226 metabolitos secundarios, los cuales poseen diversa actividad biológica: antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral ^(5,6).

Para la extracción de los metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* se ha obtenido el hongo de diversas fuentes: marinas, endofíticos, de suelos, entre otros; y se ha evaluado su actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos patógenos ^(7,8,9). La cinética del metabolismo de *Aspergillus* spp. se puede dividir en dos fases: trofofase e idiofase. La primera es fundamental para el desarrollo de moléculas precursoras y cofactores para la síntesis de metabolitos secundarios en la siguiente fase. Y la idiofase, o fase estacionaria, donde la depleción de la concentración de carbohidratos y conidias conduce a una mayor producción de metabolitos secundarios los cuales no son indispensables para el correcto funcionamiento de las vías metabólicas esenciales del crecimiento, contrario a los metabolitos primarios, sino surgen como respuesta de adaptación, depredación y competencia ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

A nivel regional de América Latina ocupamos el cuarto lugar en frecuencia (54%, 84/154) de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) aislado de hemocultivos ⁽¹⁴⁾. Respecto a infecciones invasivas por neumococo, el aislamiento de cepas resistentes a penicilina ha disminuido ante la introducción de la vacuna conjugada heptavalente; sin embargo, las cepas resistentes que ocasionan me-

ningitis o infecciones no meníngeas aún sobrepasan el 50% (49/56) ⁽¹⁵⁾.

El objetivo del presente estudio fue demostrar la capacidad antimicrobiana del extracto crudo de *Aspergillus fumigatus sensu stricto*, aislado de una muestra clínica correspondiente a un aspergiloma pulmonar, sobre cocos Gram positivos causantes de infecciones de alto impacto epidemiológico. Ello como una alternativa para descubrir y producir mejores y más accesibles compuestos antibióticos que sean eficientes ante la resistencia de estas bacterias.

MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional utilizando un aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto* (AF303), obtenido a partir de un paciente con aspergiloma, cuya caracterización genotípica la incluye dentro de la sección *Fumigati* ⁽¹⁶⁾.

Muestra

Se emplearon 30 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (S.au), 15 sensibles y 15 resistentes a meticilina; y 27 cepas de *Streptococcus pneumoniae* (S.pn), 15 sensibles y 12 no sensibles a penicilina. Se contó igualmente con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Las cepas bacterianas fueron identificadas, determinando sus perfiles de susceptibilidad antimicrobianos y se encontraban conservadas en la Sección de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Obtención de un cultivo monospórico

Se realizó una primera resiembra en agar papa dextrosa (APD) y se incubó por 7 días a 35° C para el estudio de las características macroscópicas y microscópicas. La concentración de las conidias estuvieron en un rango de 1×10^6 – 4×10^6 conidias/mL; por ello se realizó un subcultivo en agar sulfato, papa, dextrosa (SPG) el cual fue incubado a 37°C por 7 días. Se preparó una solución Tween 80

al 1% y 10 mL fueron vertidos al subcultivo, se agitó la mezcla con ayuda de un vórtex y dejándose en reposo para un correcto desprendimiento de conidias de la superficie. En una batería de tubos con 4,5 mL de caldo peptonado se realizaron diluciones al medio con 0,5 mL de la suspensión de conidias hasta alcanzar la concentración indicada previamente ⁽⁷⁾.

Fermentación líquida

Para la pre-fermentación, en un matraz Erlenmeyer se añadió 45 mL de caldo SPG más los 5 mL del cultivo monospórico y fue incubado a temperatura ambiente por 5 días en agitación constante de 120 rpm. Luego, el volumen fue transferido a un caldo SPG fresco de 250 mL llevándose a un tiempo de incubación de 7 días en las mismas condiciones de rotación y temperatura. En ambos casos se mantuvo una relación proporcional de 1/5 entre el volumen del caldo de cultivo y el volumen del matraz de Erlenmeyer.

Culminado el tiempo de fermentación, se filtró el caldo de cultivo usando una bomba al vacío acoplado a un sistema estéril con filtro de poro de 0,22 µm.

Extracción de metabolitos secundarios

En una pera de decantación se mezcló un volumen del caldo de cultivo mas un volumen de acetato de etilo, en proporción al tercio realizando 3 lavados consecutivos. Se obtuvieron dos fases tras la extracción: una fase orgánica y una fase acuosa. Ambas fases se utilizaron para la evaluación antimicrobiana por difusión en agar. La fase orgánica se evaporó al aire circulante a 40°C y se obtuvo una masa cruda de producción de metabolitos secundarios.

Caracterización química cualitativa del extracto crudo

El extracto crudo obtenido fue disuelto en etanol (v/v) para evaluar semicuantitativamente las reacciones de identificación de alcaloides (reacción de Mayer), terpenos y esteroides (reacción de Liebermann-Burchard) y lactonas (reacción de Legal).

Evaluación antimicrobiana

Siguiendo las especificaciones del manual M100-A2 del *Clinical & Laboratory*

Standards Institute (CLSI) se prepararon los medios estandarizados Agar Müller-Hinton (MH) y MH con 5% de sangre de carnero para S.au y S.pn respectivamente. Se prepararon discos estériles en blanco (Whatman N° 42) de 6 mm de diámetro los cuales fueron impregnados con 25 uL del extracto crudo de AF303 por triplicado, concentrado en unidades de 100 mg/mL, utilizando DMSO 5% (Figura 1). Se dejaron secar por 15 minutos y se conservaron en congelación a -20° C. Igualmente, se impregnaron discos control con 25 uL de la fase acuosa de la extracción orgánica, y discos control negativo con DMSO 5%.

Se evaluó la actividad del extracto crudo sobre cepas referenciales (ATCC) de ambos géneros de bacterias Gram positivas, además de la muestra de cepas clínicas. Se consideró la presencia de actividad antimicrobiana por la observación de un halo de inhibición mayor a 6 mm (7,8,9).

Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico R Core Team (2013) para el análisis de proporción de varianzas y diferencia de promedios de dos grupos mediante la prueba de hipótesis con una significancia de 5%. Para el análisis exploratorio de datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, constatando la distribución normal. Finalmente se aplicó la prueba paramétrica de Tukey para el análisis múltiple de medias de los halos de inhibición.

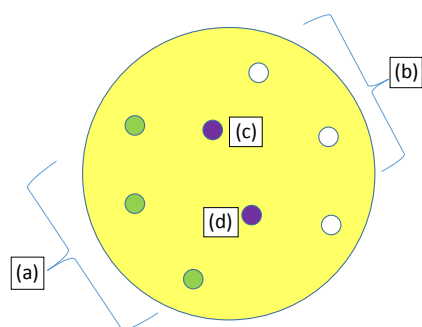


Figura 1. Plantilla para la disposición de discos de 6 mm, en una placa de Petri de 90 mm con agar Mueller-Hinton, cargados con 25 uL de extracto crudo de la fermentación líquida de *Aspergillus fumigatus*. (a) Disco con 25 uL del extracto crudo de AF, (b) Disco con 25 uL de la fase acuosa de AF, (c) Cepa referencial AF, (d) Control negativo – DMSO 5%.

RESULTADOS

Del aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto*, se obtuvo una masa de 182 mg en 600 mL de caldo de cultivo. Se evidenciaron alcaloides, y esteroides y triterpenos, mas no se detectó la presencia de sesquiterpenlactonas. La valoración de las reacciones en escala semi-cuantitativa se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la caracterización química del extracto crudo de AF 303 procedente del aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto*.

Metabolitos secundarios	Reactivo de ensayo	Reacción
Alcaloides	Mayer	+++
Esteroides insaturados y triterpenos	Lieberman-Burchard	++
Sesquiterpenlactonas	Legal	-

(-) Negativo,
(+) Baja evidencia
(++) Evidencia
(+++) Alta evidencia

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo de *A. fumigatus sensu stricto*, presentaron actividad an-

timicrobiana sobre la totalidad de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

La presencia de actividad antimicrobiana del extracto se evidenció por un halo de inhibición mayor de 6 mm, así como de las cepas referenciales ATCC (7,8,9). Realizando el ensayo por triplicado se obtuvo un promedio 20 mm sobre S.au ATCC 25923, y de 22 mm sobre S.pn ATCC 49619.

Para el ensayo por disco difusión sobre cepas clínica de *S. au* sensibles a la metilicina (15/39) se obtuvo un promedio, de los halos de inhibición, de 24,02 +/- 0,57 mm; para *S. aureus* resistentes a metilicina (15/30) se obtuvo un promedio de 23,62 +/- 4,68 mm (Tabla 2). Al evaluar el extracto orgánico sobre cepas de neumococo sensibles a penicilina (15/27), se obtuvo un promedio de 25,82 +/- 4,05 mm; sobre las cepas no sensibles (12/27) se obtuvo un promedio de 26,5 +/- 5,39 mm (Tabla 3, Figura 2).

Al comparar la diferencia de promedios entre las cepas sensibles y resistentes de S.au y S.pn, se determinó esta-

Tabla 2. Promedio de los diámetros de inhibición por triplicado producidos por el extracto crudo de AF303 (procedente del aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto*.), sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*

Códigos	Diámetro de inhibición en		Códigos	Diámetro de inhibición en	
	MSSA (mm)	Disco 6 mm		MRSA (mm)	Disco 6 mm
3528	23,6		3421	22,3	
3920	25		3492	22,3	
3718	21,6		3217	20,7	
3735	24,6		3701	23	
3564	27		c-3741	21	
3273	27,3		3363	30	
3739	24		2018	33,3	
3718	21,6		c-3491	21	
3925	25,3		1993	34	
3567	25,3		6288	22,3	
2234	20,6		c-3629	23	
2980	20,3		c-3704	18,7	
2999	26,3		2343	20	
3029	26,7		7898	21	
7721	20,7		4532	21,7	

MSSA: *Staphylococcus aureus* metilicina sensible
MRSA: *Staphylococcus aureus* metilicina resistente
AF303: extracto crudo de cepa clínica de *Aspergillus fumigatus sensu stricto*

Tabla 3. Promedio de los diámetros de inhibición por triplicado producidos por el extracto crudo de AF303 (procedente del aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto*.), sobre cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae*.

Códigos	Diámetro de inhibición en PSSP (mm)		Códigos	Diámetro de inhibición en PRSP (mm)	
	Disco 6 mm			Disco 6 mm	
O:32	33,2		O:128	24,7	
O:15	18,7		9CH	27	
O:54	26,3		35CH	28,7	
8C	22		61CH	29,7	
29H	19,7		75CH	30,3	
8H	28,3		1B	25	
33C	24,3		29B	20,3	
39CH	29		34B	20,3	
O:55	27,3		123B	22	
O:91	22,3		124B	21	
O:22	23,3		12C	28,7	
60CTE	27,7		99H	39,3	
6CH	30,7				
3B	26,7				
151B	28,7				

PSSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino sensible

PRSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino no sensible

AF303: extracto crudo de cepa clínica de *Aspergillus fumigatus sensu stricto*

dísticamente ($p < 0,05$) que el promedio obtenido sobre las cepas sensibles no es mayor al promedio sobre las cepas resistentes. Mediante la comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey se observó que no existe diferencia significativa entre ambos grupos (Figura 3).

DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo, de la cepa proveniente de micosis invasiva (AF 303), presentaron actividad antimicrobiana sobre la totalidad de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Este es el primer reporte en la región el cual evalúa la extracción de principios activos provenientes de una cepa clínica de AF, ya que estudios previos han tomado como muestra hongos ambientales provenientes de suelos y plantas (endofíticos) ^(1,7,8,9). Las distintas formas de interacción desde el desarrollo infeccioso del hongo, con las características del medio (ambiental o interno humano), además de factores genéticos

intrínsecos de cada especie, determinan la importancia de evaluar cepas de aislamientos clínicos por la particularidad en la generación de metabolitos secundarios ⁽⁴⁾.

Una cepa ambiental de AF se encuentra influenciada por factores abióticos (temperatura, pH, nutrientes) y factores bióticos (depredadores y competidores). Si bien es cierto, un AF causante de infección está igualmente influenciada por los mismos factores en el medio interno, estos cambian drásticamente según las condiciones en homeostasis (37°C, pH 7,35 – 7,45, bioelementos), además de enfrentarse a las moléculas y células del sistema inmunológico. En el presente estudio se muestra una media estadística superior a la mayoría de estudios donde evalúan cepas ambientales. Esto difiere de la hipótesis que señalaba que un hongo pierde la propiedad de generar metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana al encontrarse fuera de su planta hospedera ⁽¹⁸⁾.

Una explicación tentativa para estos resultados es que los metabolitos secundarios

de AF, al ser una plétora de principios activos, no poseen los mismos sitios diana de los antibióticos betalactámicos evaluados en este estudio. Se podría decir que existe una sinergia entre las moléculas presentes en el extracto que ejercerían acción sobre más de un blanco en la estructura bacteriana ⁽⁷⁾.

La principal limitación de este tipo de estudios es la falta de estandarización, la cual es transversal en el procesamiento desde la extracción de metabolitos secundarios hasta la evaluación antimicrobiana. Existe un amplio rango de condiciones y técnicas que varían de autor en autor, como son: solvente de extracción, volumen del inóculo del extracto crudo, medio de cultivo de fermentación, condiciones de incubación, puntos de corte, entre otros ^(19, 20). El sesgo por la inexistencia de normalización del protocolo impedirá que estos resultados sean extrapolados para otras cepas clínicas, siempre y cuando no se reproduzcan las mismas condiciones experimentales del presente estudio.

Cepa clínica	Código	Actividad antimicrobiana de AF303 por disco	Figuras
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino sensible	3735	24,7 mm	
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	3741	21 mm	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilino sensible	8C	22 mm	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilino resistente	1B	25 mm	

Figura 2. Actividad antimicrobiana producida por el extracto crudo de AF303 (procedente del aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto*), sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

La fortaleza del estudio fue obtener un óptimo rendimiento en la obtención de la masa cruda en comparación a otras metodologías de fermentación. En com-

paración con otros estudios donde obtuvieron 600 mg en 2 L y 8,3 g en 30 L^(6,7,8), el rendimiento de este estudio es más eficiente según la cepa, condiciones

de fermentación y concentración del extracto.

El rango de halos de inhibición según los antecedentes varían desde 12 mm a

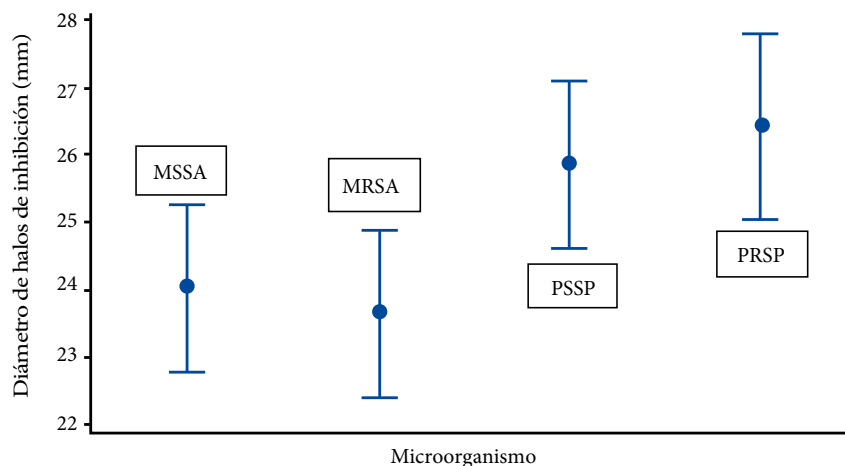


Figura 3. Intervalos de los diámetros de inhibición antimicrobiana por difusión en disco, producidos por el extracto crudo de AF303 procedente del aislamiento clínico de *A. fumigatus sensu stricto*, sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

MSSA: *Staphylococcus aureus* metilino sensible

MRSA: *Staphylococcus aureus* metilino resistente

PSSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino sensible

PRSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino resistente.

30,3 mm^(2,6), siendo también ausente la actividad antimicrobiana. Los hallazgos de este estudio son consistentes con Valgas y Kalyani y col. quienes utilizando una concentración de 100 mg/mL obtuvieron una media del halo de inhibición sobre Sau ATCC 25923 de 20 y 18 mm^(17,18). Otros estudios han tomado como punto de corte un diámetro mayor a 9 mm^(6,8), 10 mm⁽²⁾ y 12 mm⁽¹⁾ respectivamente, lo cual se relaciona con el tamaño del disco que los autores utilizaron en sus ensayos.

Un objetivo ulterior en este tipo de estudio de naturaleza preliminar será caracterizar la fracción de acetato de etilo donde por estudios de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) y espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (MS-GC), con los cuales se pueda eventualmente aislar novedosos compuestos antimicrobianos. Esto podría conllevar al estudio de nuevos principios activos sobre bacterias resistentes. Diversos autores señalan que la metodología de este tipo de estudios abre nuevas perspectivas en investigación biomédica, siendo la fuente de información para líneas secundarias sobre resistencia antimicrobiana en la era pos-antibiótica⁽⁸⁾. Asimismo, es necesario que estudios posteriores puedan reproducir la metodología sobre bacterias Gram negativas de importancia clínica en

infecciones asociadas a la atención en salud o adquiridas en la comunidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Carbohidratos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos UNMSM, por la caracterización química del extracto orgánico de *Aspergillus fumigatus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jacometti N, Said S, Yoko I, Kenupp J. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. *Microbiol. Res.* 2002; 157: 207–211. DOI: doi.org/10.1078/0944-5013-00150
- Acosta M, Guevara M, Crescente O. Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium campoceras* y *Aspergillus flocculosus*, aislados de ambientes marinos. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 2011; 40: 25-39.
- Svahn S [Internet]. Analysis of Secondary Metabolites from *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium nalgiovense*: Antimicrobial Compounds from Filamentous Fungi Isolated from Extreme Environments. [Fecha de acceso: 23 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:784360/FULLTEXT04.pdf>
- Sanchez J, Wang C. The chemical identification and analysis of *Aspergillus nidulans* secondary metabolites. *Methods Mol Biol.* 2012; 944: 97–109.
- Coleman J, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E. Antifungal Activity of Microbial Secondary Metabolites. *PLoS ONE.* 2011; 6(9): e25321. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0025321

- Shaaban M, Nasr H, Hassan A, Asker M. Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic *Aspergillus Fumigatus*: Structural Elucidation And Bioactivity Studies. *Rev. Latinoamer. Quim.* 2013; 41(1): 50–60.
- Hernández A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios detectados por fermentación en medio líquido de *Aspergillus* sp nativo del Páramo de Cruz Verde (Tesis para optar el título de microbióloga industrial). Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 2012.
- Synytysya A, Monkai J, Bleha R, Macurkova A, Ruml T, Ahn J, et al. Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017; 7(3): 257–261. DOI: doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.011
- Prabavathy D y Valli Nachiyar C. Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus* sp isolated from *Justicia adathoda*. *Indian Journal of Science and Technology.* 2012; 5(9): 3317–3320.
- Jae-Hyuk Y, Keller N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005;43: 437-58.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaaseen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Micology.* 2014; 48: 141-73.
- Nierman W, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 2005; 438(26): 1151-56. DOI: 10.1038/nature04332
- Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF, Larsen TO. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2009; 47(1): S53–71.
- Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of *Staphylococcus aureus* bacteremia in nine Latin American countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61. DOI: 10.1128/AAC.00816-17
- Luna-Muschi A, Castillo F, Deza M, Mercado E, Egoavil M, Sedano K, et al. Invasive pneumococcal disease in hospitalised children from Lima, Peru before and after introduction of the 7-valent conjugated vaccine. *Epidemiology and Infection.* 2019; 147, e91, 1–5. DOI: 10.1017/S0950268819000037
- Béjar V, Villanueva F, León SR, Guevara-Granados JM, Uribe A, Vergaray G, et al. Identificación molecular de *Aspergillus fumigatus* aislados de pacientes con aspergilosis invasiva. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2019; 36(1):81-6. DOI: 10.17843/rpmpes.2019.361.3403
- Valgas C, Machado de Souza M, Smânia E, Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.* 2007; 38(2): 369-80. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>
- Kalyani P, Hemalatha K. In Vitro Antimicrobial Potential of *Aspergillus niger* (MTC-961). *International Journal of Chem Tech Research.* 2017; 10(4): 430-435.
- Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 2011; 18: 448-459.
- Balouri M, Sadiki M y Koraichi Ibsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2016; 6: 71–79.