



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA
PRODUCIDOS POR LA CEPA K-155 DE
Streptomyces sp.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
**Q.F.B. MARIANA AVALOS
GARCÍA**

Tutor: Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Miembros del comité tutorial:
Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte.
Facultad de Química
Dr. Manuel Jiménez Estrada
Instituto de Química

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE/2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Vocal	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Vocal	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro
Secretario	Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Microbiología Industrial,
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de
Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Q.F.B. Mariana Avalos García
Sustentante

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Tutor

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica, profesional y humana que me ha otorgado.

Al posgrado en ciencias Bioquímicas por la enseñanza que me ha permitido el crecimiento como profesionista y el desarrollo de una carrera en el área de Investigación.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por permitirme continuar con un proyecto de vida, por la oportunidad y la confianza depositada para la realización de este proyecto, por las continuas evaluaciones y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, pero sobre todo por la amistad y el cariño que me ha brindado.

A la M. en B. Beatriz Ruiz Villafán por la asesoría brindada para el cultivo de los microorganismos y la realización de las fermentaciones, por la paciencia, por el impulso y los consejos que me ha brindado, pero más allá de ello por los pasos que me ha permitido dar a su lado, por la amistad incondicional y su cariño.

Al E. en B. por el apoyo en la caracterización del material biológico empleado durante el presente proyecto.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por formar parte de mi comité tutorial, y por la asistencia para la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, de Espectrometría de Masas y de Infrarrojo.

A la Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte por aceptar formar parte de mi comité tutorial y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Eneas Aguirre von Wobeser por la ayuda en la elaboración de los árboles filogenéticos.

Al Dr. Federico del Río Portilla por las facilidades otorgadas para realizar la purificación del antibiótico dentro de su laboratorio.

Al M. en C. David Flores Solís por el apoyo y asesoría brindados para la purificación del antibiótico por medio de HPLC.

A los miembros del jurado, la Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Saravia, la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, el Dr. Andrés Navarrete Castro y el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis y los valiosos comentarios.

La realización de ésta investigación estuvo financiada en parte por el donativo IN209210 del Programa PAPIIT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, así como del donativo CB2008-100564-IIBO del CONACyT y por la beca CONACyT número 240139.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1 ANTECEDENTES.....	6
1.1 Aislamiento y caracterización de la cepa k-155 de <i>streptomyces</i>	6
1.2 Género <i>Streptomyces</i>	7
1.3 <i>Streptomyces</i> como productores de metabolitos secundarios bioactivos.....	9
1.3.1. Antibióticos β -Lactámicos y ácido clavulánico.....	11
1.3.2. Aminoglucósidos.....	12
1.3.3. Policétidos.....	12
1.3.4. Estreptograminas.....	14
1.3.5. Glicopéptidos.....	15
1.3.6. Lipopéptidos.....	17
1.3.7. Sideróforos.....	17
1.3.8. Otros metabolitos bioactivos producidos por estreptomicetos.....	18
1.4 Ensayo de inhibición de crecimiento por difusión de disco o Kirby – Bauer test.....	20
1.5 Obtención y purificación de metabolitos secundarios.....	21
1.5.1 Cromatografía.....	22
1.6 Determinación Estructural.....	23
1.6.1. Espectrometría de masas.....	23
1.6.2. Espectroscopia de Infrarrojo.....	24
1.6.3. Resonancia Magnética Nuclear de Protón.....	25
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 Crecimiento de la cepa k-155 de <i>Streptomyces</i> sp.....	28
2.2 Filogenia de la cepa K-155.....	28
2.3 Selección del medio de cultivo para la producción de antibiótico.....	29
2.3.1. Fermentación.....	29
2.3.2. Ensayo de antibiosis.....	30
2.3.3. Actividad intracelular.....	30
2.3.4. Diseño Factorial 2 ³	31
2.4 Extracción de los metabolitos secundarios.....	32
2.5 Fraccionamiento de los componentes del extracto y purificación del antibiótico.....	33
2.5.1. Detección por cromatografía en capa fina.....	33

2.5.2. Detección por Cromatografía en capa Preparativa.....	35
2.5.3 Fermentación 1L.....	36
2.5.4. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna.....	36
2.5.5. Espectro de absorción UV.....	37
2.5.6. Purificación por HPLC.....	37
2.6 Aproximación estructural.....	37
2.7 Concentración mínima inhibitoria.....	38
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1 Filogenia de la cepa K-155.....	39
3.2 Selección del medio de cultivo para la producción de antibióticos.....	42
3.3 Diseño factorial 2 ³	44
3.4 Extracción del metabolito secundario.....	47
3.5 Fraccionamiento de los componentes del extracto.....	49
3.6 Purificación del metabolito secundario bioactivo.....	54
3.7 Aproximación estructural.....	58
3.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	64
4 CONCLUSIONES.....	67
PROSPECTIVA.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69
ANEXO.....	78

RESUMEN

El género *Streptomyces* es un grupo de microorganismos de gran importancia industrial debido a que son los principales microorganismos productores de antibióticos de uso tanto médico, como veterinario y agrícola [20]. El descubrimiento de la estreptomycin en 1943 por el grupo de trabajo de Selman Waksman fue el detonante de la exploración de fuentes naturales en la búsqueda de antibióticos, ya que este fármaco fue el primero en ser producido y comercializado como agente antimicrobiano para tratar la tuberculosis. [9]

Desde entonces se han buscado metabolitos secundarios para el tratamiento de diversas enfermedades. La mayoría de los metabolitos secundarios provenientes de microorganismos, con algún tipo de actividad biológica han sido aislados de cepas del género *Streptomyces*. La actividad antibiótica ha sido la más estudiada, ya que a pesar de que se han descrito muchas moléculas, pocas alcanzan la etapa de uso clínico, se considera que el número de antibióticos descubiertos es un porcentaje muy bajo del estimado de posibles moléculas producidas por actinomicetos. Por lo que la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios continúa y el potencial de descubrir nuevos compuestos de ambientes no explorados sigue siendo relevante [11].

La identificación de una nueva molécula requiere de su purificación, por lo que en el presente trabajo se describe el proceso llevado a cabo para producir, aislar e identificar a el/los metabolitos secundarios responsables de la actividad antibiótica producido por la cepa K-155 aislada de suelo salitroso en el Valle de Chalco, Edo. De Mex.

El microorganismo aislado e identificado como *Streptomyces* sp. cepa K155, fue sometido a un análisis filogenético para determinar su relación con otras especies de *Streptomyces* conocidas y determinar si pertenece a alguna de estas.

Para determinar el medio de cultivo óptimo para la producción de los metabolitos bioactivos fue crecido en diferentes medios de cultivo, de los cuales, se eligió aquel en el que se observó un mayor efecto inhibitorio sobre las cepas de prueba (>20mm de diámetro).

El compuesto fue producido a mayor escala y se extrajo del sobrenadante del medio de cultivo empleando metanol, para posteriormente fraccionarlo por medio de Cromatografía en Columna. La purificación se llevó a cabo por medio de Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés), para finalmente realizar una aproximación a su estructura por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

La identificación estructural resultó ardua debido a la dificultad para purificar al metabolito secundario mayoritario y con actividad antibiótica, ya que presentó un carácter muy polar con mejor solubilidad en agua que en los disolventes empleados para su extracción. Presentó un pico de absorción a menos de 200 nm, mejor estabilidad a pH mayor a 7. Actividad contra microorganismos Gram-positivos y contra *Saccharomyces cerevisiae*, estabilidad a temperaturas mayores a 100°C por 20 minutos. Los espectros de masas indicaron una masa molecular de aproximadamente 600 m/z, mientras que el espectro de RMN muestra señales que pueden indicar la presencia de determinados grupos funcionales como heteroátomos, enlaces N-H e incluso aromáticos, así como hidroxilos o hidrógenos unidos a grupos muy electronegativos como los carbonilos.

Todas estas propiedades nos brindaron una idea del tipo de molécula del que puede tratarse, no obstante, es necesario realizar la purificación para determinar si se trata de una nueva estructura o no.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial, provocando cerca del 25% de los decesos (alrededor de 13.3 millones)[9]. Algunos de los factores que contribuyen a este número incluyen el aumento de enfermedades infecciosas, el uso indiscriminado de antibióticos, las demandas de pacientes por los antibióticos y la sobre-prescripción, así como los microorganismos resistentes [10].

Por ello es que desde hace muchos años se han buscado diversas curas para este tipo de enfermedades, llevando al descubrimiento e incluso a la formulación de fármacos capaces de controlarlas [83].

Las primeras observaciones de antagonismo entre microorganismos llevaron a los científicos a especular sobre la existencia de los ahora llamados metabolitos secundarios que tenían como propósito la supervivencia de los mismos [10]. Posteriormente a este efecto se le describió como antibiótico, término acuñado por el reconocido premio Nobel Selman Waksman, el cual se empleó para designar la acción de sustancias (agentes químicos) producidos por microorganismos y que poseen un efecto antimicrobiano.

La búsqueda de este tipo de compuestos empezó con el descubrimiento de la actinomicina en 1940 [15], seguido de cerca por la estreptomycin, descubrimiento que fue muy importante gracias a que este antibiótico fue el primero en ser usado contra la tuberculosis [10]. El interés siguió creciendo y se encontraron muchos antibióticos más como el cloranfenicol, las tetraciclinas, la eritromicina y la nistatina entre muchos otros. Fue entonces cuando se despertó el interés por los actinomicetos, y en particular por el género *Streptomyces*, pues todos los antibióticos mencionados fueron aislados a partir de microorganismos pertenecientes a este género. Hasta el momento, se han reportado cerca de 22,500 metabolitos secundarios bioactivos, de estos, 16500 tienen actividad antibiótica, cerca del 45 % (10,100) son producidos por actinomicetos, de entre los cuales, el género *Streptomyces* produce más del 70% (7,630).

En la actualidad se siguen encontrando nuevos antibióticos con potencial uso clínico, como el caso de la daptomicina, la epirubicina, análogos del carbapenem y la tienamicina entre otros [75] lo cual sigue resaltando la importancia de este género como productor de metabolitos secundarios bioactivos. Así pues, un enfoque que se ha tomado para favorecer la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica es la búsqueda y el aislamiento de nuevas especies de microorganismos capaces de producir metabolitos secundarios [10].

Por otra parte, tomando en cuenta la estimación de Baltz (2005) de que solamente una trillonésima parte de la tierra se ha examinado en busca de actinomicetos, resulta interesante continuar con la búsqueda de estos microorganismos capaces de producir una gran variedad de antibióticos con diversos espectros antimicrobianos, con una gran diversidad de mecanismos de acción así como una gran diversidad química [68].

JUSTIFICACIÓN

El número de cepas de microorganismos que han desarrollado resistencia a los antibióticos disponibles ha aumentado en los últimos años, por lo que es necesario retomar la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antibiótica. Por otra parte se sabe que el estudio de nuevas especies de microorganismos brinda una mayor posibilidad de encontrar compuestos bioactivos novedosos, en especial de ambientes “desconocidos” o no estudiados previamente. Es por ello que el estudio de los antibióticos producidos por la cepa K-155 de *Streptomyces* sp. resulta relevante debido a que este microorganismo puede tratarse de una nueva especie, proveniente de un ambiente salitroso.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la caracterización de el/los metabolitos secundarios con actividad antibiótica producidos por la cepa K-155 de *Streptomyces* sp.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer la relación filogenética de la cepa K-155 con las especies más cercanas encontradas para determinar si existen reportes previos de actividad antibiótica de estas especies

Establecer las condiciones óptimas para la producción de los antibióticos mediante el empleo de diferentes medios de cultivo

Obtener un incremento de la producción de los antibióticos mediante la modificación y evaluación de los diferentes componentes del medio de cultivo elegido.

Realizar la extracción y purificación de los metabolitos bioactivos.

Llevar a cabo una primera aproximación de su estructura química.

1 ANTECEDENTES

El estudio de antibióticos producidos por microorganismos tuvo su gran auge durante la época de oro en los 40's y 50's, sin embargo con las tecnologías que surgen cada día ayudadas de los análisis clásicos, se siguen encontrando nuevas especies de microorganismos y nuevas moléculas con distintos tipos de actividades.

1.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA K-155 DE *Streptomyces*.

En el 2010 se realizó la caracterización de una cepa de *Streptomyces* que se aisló de suelo salitroso de un jardín en Valle de Chalco en el estado de México [7]. Este microorganismo resultó de interés debido a la actividad antibiótica observada contra 3 cepas de prueba: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 1). Posteriormente, fue sujeto a una caracterización polifásica, ya que preliminarmente se le identificó como perteneciente al género *Streptomyces* por medio de la secuencia parcial del DNA ribosomal 16S, más no se logró identificar su especie. Durante la realización de dicha caracterización se repitió el análisis de DNA ribosomal 16S, se obtuvo la secuencia completa y se encontró una similitud del 98% con dos especies: *Streptomyces aureus* y *Streptomyces thermocarboxydus* según los resultados obtenidos al realizar el alineamiento empleando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del sitio NCBI (National Center for Biotechnology information) y el seqmatch del RDP (Ribosomal Database Project).

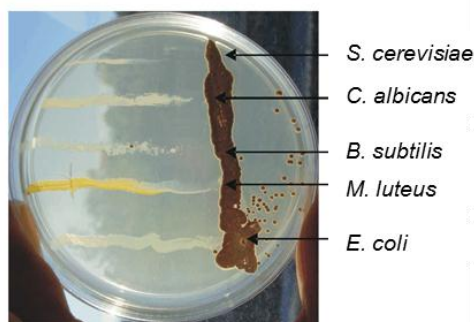


Figura 1. Actividad antibiótica de *Streptomyces* K-155 contra los microorganismos de prueba.
Fotografía facilitada por Catalina Cárdenas. [14]

Se realizó entonces la caracterización morfológica observando su macro y micromorfología, ésta última con ayuda de un microscopio electrónico de barrido. Se encontró que formaba colonias redondas, de color gris debido a las esporas que produce,

las cuales poseen una superficie lisa, así como un pigmento difusible al medio de color café. Estas dos pruebas resultaron diferentes en comparación con las cepas con las que posee parentesco, ya que *S. thermocarboxydus* no produce pigmentos y sus esporas son rugosas, mientras que *S. aureus* produce pigmentos amarillo-ocre y sus esporas son lisas. También se observaron diferencias fisiológicas en cuanto a la tolerancia a diferentes temperaturas de crecimiento, pues como su nombre lo indica, *S. thermocarboxydus* puede crecer a temperaturas mayores a 50°C a diferencia de *S. aureus* y la cepa K-155 que no lo hacen. Otra diferencia fisiológica que se observó fue que la cepa K-155 es más tolerante a concentraciones más elevadas de NaCl (10%) mientras que las otras dos cepas de referencia no lo son.

En cuanto a las fuentes de carbono que emplean se encontraron más diferencias, por ejemplo *S. thermocarboxydus* es capaz de degradar el inositol mientras que *S. aureus* y la cepa K-155 no.

Sin embargo, también se encontraron similitudes entre la cepa K-155 y ambas especies de referencia, como por ejemplo, la maltosa y el D- Arabitol fueron degradados tanto por la cepa K-155 como por *S. thermocarboxydus*, mientras que la trehalosa fue empleada como fuente de carbono por K-155 y *S. aureus*, más no por *S. thermocarboxydus*. Una similitud entre las tres cepas de referencia es el color gris que producen las esporas en el medio YMG (anexo), en la degradación de algunas fuentes de carbono como el almidón, la caseína y la celulosa, y finalmente la similitud en la secuencia de DNA ribosomal, por lo que no fue posible asignarle una especie por medio de esta metodología.

Existen otro tipo de metodologías que pueden posteriormente ser aplicadas para determinar con mayor precisión si la cepa K-155 corresponde a una nueva especie del género *Streptomyces*, por ejemplo la hibridación DNA-DNA o la realización de análisis filogenéticos empleando tanto el gen que codifica para el DNA ribosomal 16 S como otros genes denominados “housekeeping” como el gyrB, el rpoB, el atpD entre otros [34].

1.2 GÉNERO *Streptomyces*

Streptomyces es un grupo de microorganismos pertenecientes a la clase Actinobacteria, son bacterias aerobias Gram-positivas ubicadas dentro del orden de los *Actinomycetales*. Poseen un alto contenido de G + C en su DNA, alrededor del 69-78% mol [51]. Estos microorganismos se encuentran habitando prácticamente todos los ecosistemas, sin embargo son más abundantes en suelo.

Estas bacterias poseen un ciclo de vida característico, el cual inicia con la germinación de una espora que produce uno o más filamentos multinucleados; durante esta etapa existe replicación del DNA sin que se produzca división celular, lo que da lugar a la formación de estructuras filamentosas o micelio vegetativo. Este micelio vegetativo da paso a la formación de micelio aéreo que poco a poco va septándose produciendo esporas que son una forma de latencia y reproducción del microorganismo Fig. 2 [51].

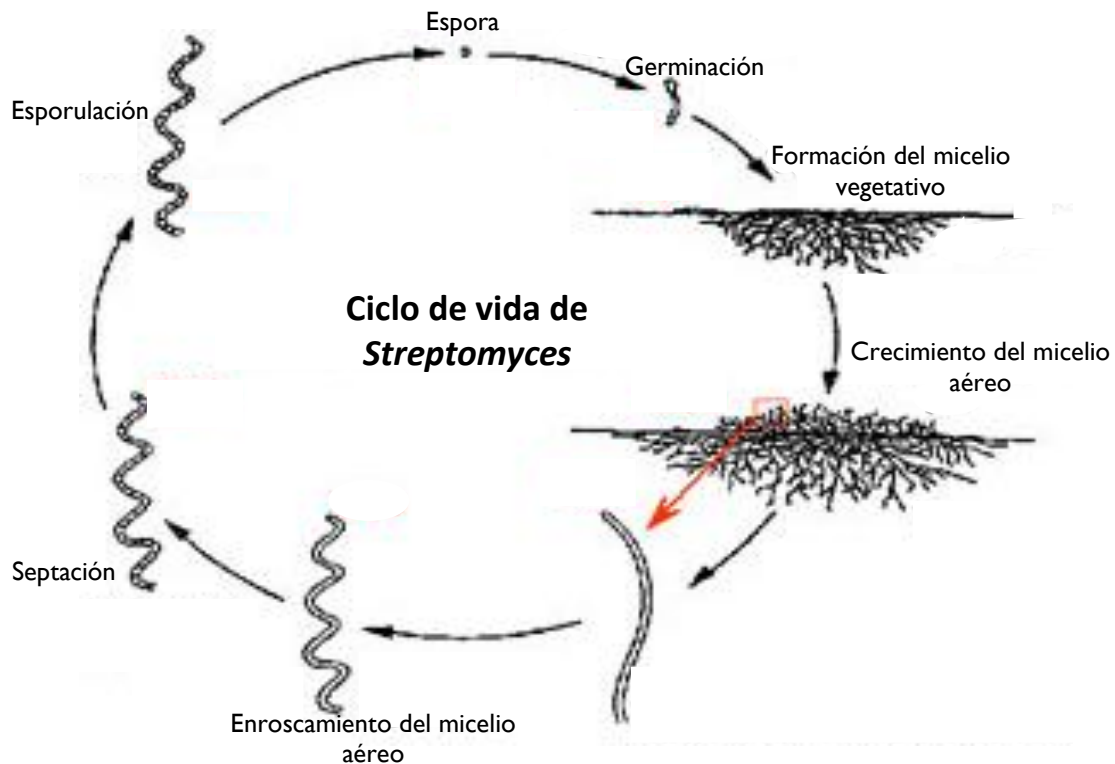


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Modificado de Kinashi, Haruyasu. Universidad de Hiroshima. (http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html)

Durante este ciclo de vida, se llevan a cabo una serie de procesos en diversas etapas. Se sabe que la germinación de la espora se produce en respuesta a la disponibilidad de nutrientes solubles y cuando estos nutrientes se terminan entonces se secretan enzimas para degradar los nutrientes insolubles y así poder asimilarlos. Así pues, se piensa que los antibióticos son secretados durante este mismo tiempo, pues esto evita que otros microorganismos aprovechen los nutrientes ya solubilizados. Durante este periodo, cuando los metabolitos fácilmente asimilables se empiezan a terminar, se forma el micelio aéreo, este micelio crece empleando algunos nutrientes del micelio vegetativo, el cual se degrada parcialmente para proveer de nutrientes al micelio aéreo. En este punto, la secreción de antibióticos también protege estos nutrientes de microorganismos invasores [18], (Fig. 3).

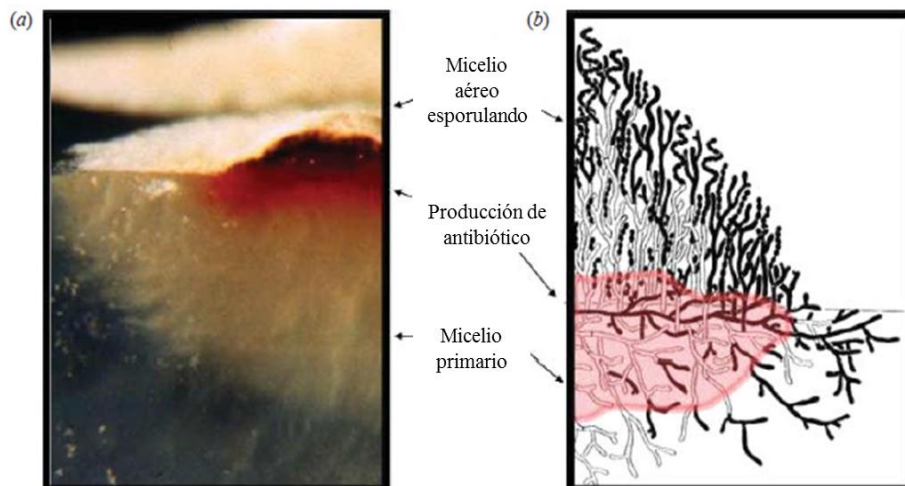


Figura 3. (a) Corte vertical de una colonia de *Streptomyces* creciendo en agar. (b) Diagrama indicando como la producción del antibiótico en la parte baja de la colonia puede proteger los nutrientes liberados de la muerte de las células (en blanco) para que puedan soportar el crecimiento y la esporulación. Las células vivas se muestran en negro. (Tomado de Chater F. 2006)

Las características morfológicas que se presentan durante su ciclo de vida son sumamente importantes, pues son de gran utilidad en una variedad de estudios, desde su caracterización y clasificación hasta su estudio genético. Estas bacterias, cuando son cultivadas en medio sólido, generalmente forman colonias de tipo liquenoides o rugosas, que en un inicio son relativamente lisas pero conforme su ciclo de vida avanza, se tornan rugosas. Finalmente, aquellas colonias capaces de formar esporas presentan una apariencia polvosa.

Presentan además una característica particular dentro de su composición celular, que es la presencia de grandes cantidades de ácido L-diaminopimélico, lo cual lo diferencia de otros actinomicetos.

1.3 *STREPTOMYCES* COMO PRODUCTORES DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS.

El término de metabolito secundario ha estado en discusión debido a que se considera que no forman parte esencial o no tienen un rol explícito en la economía interna del organismo que lo produce [87], a pesar de que algunos de ellos presentan una actividad o función útil para el mismo microorganismo. Por ello desde hace muchos años se han postulado diversas teorías sobre el origen, la evolución y la función de los metabolitos secundarios.

En 1989, Williams D.H. et al, se plantean la pregunta: ¿por qué son biosintetizados los metabolitos secundarios?, llegando a la conclusión de que estos metabolitos son

producidos en respuesta a su entorno. Esta conclusión es aceptada hasta la actualidad, ya que resulta consistente con varias explicaciones, empezando con el por qué los organismos emplean gran cantidad de energía y material genético para la síntesis de estos compuestos, pues esto le provee una ventaja adaptativa favoreciendo su supervivencia. Por otro lado la gran cantidad de moléculas producidas se puede relacionar con el número de receptores o respuestas fisiológicas, pues la diversidad de éstas es amplia y la complementariedad entre las moléculas y los receptores es notable [87].

Además de aceptar la hipótesis de que los metabolitos secundarios son sustancias producidas por los organismos a modo de adaptación al entorno y como método de supervivencia ya que les brindan una ventaja selectiva frente a otros seres vivos, encontramos que estas sustancias son producidas por una gran variedad de organismos, como las plantas [22] y los microorganismos; en estos últimos destacando los hongos y algunas bacterias, dentro de este grupo, se encuentra el caso de estudio: los estreptomicetos [11].

Desde el descubrimiento de la estreptomicina en 1943, el primer antibiótico efectivo para tratar la tuberculosis, los actinomicetos han sido ampliamente estudiados como productores de antibióticos. De los cerca de 22,000 compuestos conocidos hasta el 2002 con actividad biológica y producidos por microorganismos, el 17% es producido por bacterias unicelulares, el 38% por hongos y el 45% es producido por actinomicetos (bacterias filamentosas), dentro de este grupo el género *Streptomyces* produce el mayor número de metabolitos secundarios bioactivos, aproximadamente el 70% [11].

Los actinomicetos siguen siendo un amplio campo de estudio, pues en la actualidad se siguen encontrando moléculas bioactivas con efecto antibiótico, así como otro tipo de actividades, como inhibidores enzimáticos, herbicidas, insecticidas, inmunosupresores, antiparasitarios y antitumorales, entre otros [25].

Incluso en el siglo XXI la tendencia continúa, con la obtención de nuevos antibióticos como la daptomicina, epirubicina, análogos del carbapenem y la tienamicina. Un factor central en el proceso del descubrimiento de nuevos fármacos de extractos microbianos es el aislamiento de nuevas especies de microorganismos que sean productoras de metabolitos secundarios [10] ya que por ejemplo, Baltz en 2005 estimó que solo una parte de 10^{12} de la superficie de la tierra ha sido seleccionada o registrada en búsqueda de actinomicetos [9].

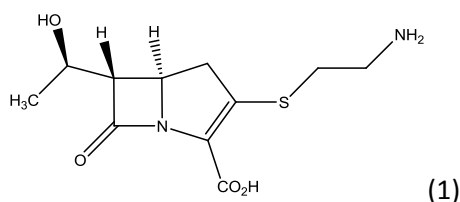
Actualmente, la química orgánica ha logrado sintetizar una gran cantidad de los compuestos que se emplean en la clínica, sin embargo, el número de compuestos totales producidos por los microorganismos sigue siendo mayor, además de que se siguen

encontrando moléculas bioactivas con mayor afinidad, eficiencia e incluso (aunque en menor medida) con nuevos esqueletos que se emplean como base para el desarrollo de fármacos con mayor potencia, efectividad o menor toxicidad.

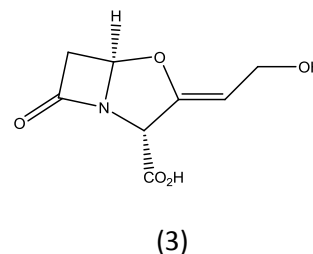
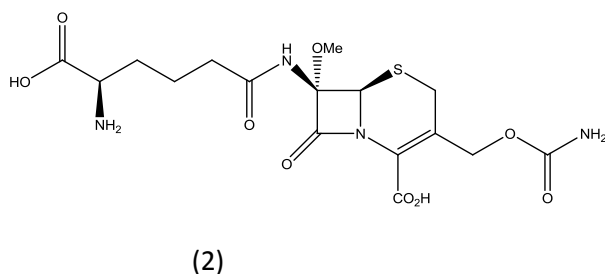
Quizá la actividad más estudiada de los metabolitos secundarios sea la antibiótica, en la cual, los estreptomicetos llevan la delantera, pues el número de estas sustancias producidas por estos microorganismos es muy alto, sin embargo, se estima que aún se desconoce la mayoría de estos, pues en el estudio de los genomas de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* se han encontrado cerca de 30 clusters de genes relacionados con la producción de varios metabolitos secundarios. A pesar de ello, en *S. avermitilis* pocos se han aislado como por ejemplo: las avermectinas, oligomicinas y pentalenolactonas [11]. Por otro lado, no sólo es la diversidad en número de antibióticos producidos sino en su estructura química, por ejemplo, bacterias como *Bacillus* y *Pseudomonas* producen antibióticos de tipo peptídico, mientras que *Streptomyces* produce una gran diversidad de estructuras químicas [71] con una gran variedad de propiedades fisicoquímicas, como las que se describen a continuación.

1.3.1 Antibióticos β -Lactámicos y ácido clavulánico.

Streptomyces cattleya produce el antibiótico Tienamicina (1), que fue descubierto en 1976, posee un esqueleto que consta de un anillo β -Lactámico unido a un anillo de 5 carbonos. Estos antibióticos son efectivos principalmente contra bacterias Gram positivas aunque también pueden tener efecto contra Gram negativas a mayores concentraciones.



Más recientemente se ha encontrado la producción de antibióticos β -Lactámicos en conjunto con inhibidores de las β -Lactamasas como es el caso de *Streptomyces clavuligerus* que produce la cefamicina C (2) y ácido clavulánico (3).

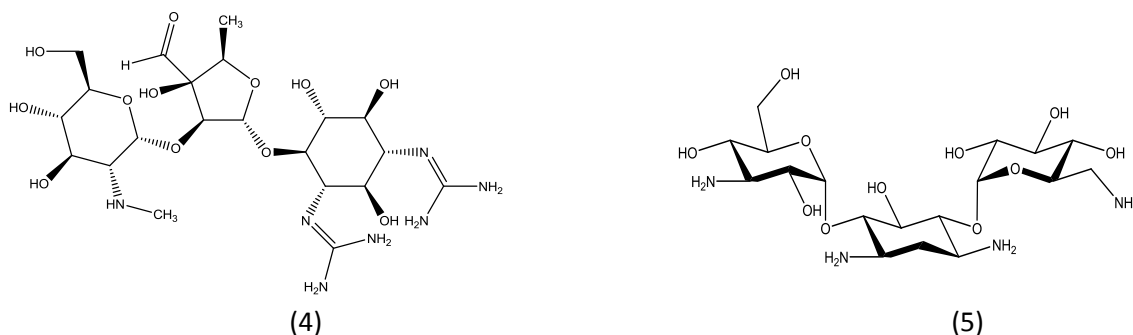


Se han encontrado otros estreptomicetos que producen cefamicina C (2) y ácido clavulánico (3) como *S. jumonjinensis* y *S. katsurahamanos*, sin embargo no se han encontrado cepas productoras únicamente de ácido clavulánico, pero sí de cefamicina C, por lo que se piensa que la producción de ácido clavulánico evolucionó de un productor ancestral de cefamicina como respuesta a la adquisición de resistencia mediada por β -Lactamasas [17].

Ciertas características fisicoquímicas son comunes en algunos antibióticos de este tipo, como por ejemplo la solubilidad en agua, un pico de absorción en el espectro UV de aproximadamente 290 nm, así como su peso molecular relativamente bajo (200-350 uma) [39].

1.3.2 Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son moléculas formadas por un aminociclitol unido a un azúcar, son antibióticos con acción bactericida que actúan principalmente en contra de bacterias Gram-negativas. Un ejemplo es la estreptomina (4) producida por *Streptomyces griseus* y la kanamicina (5) producida por *Streptomyces kanamyceticus* [33].

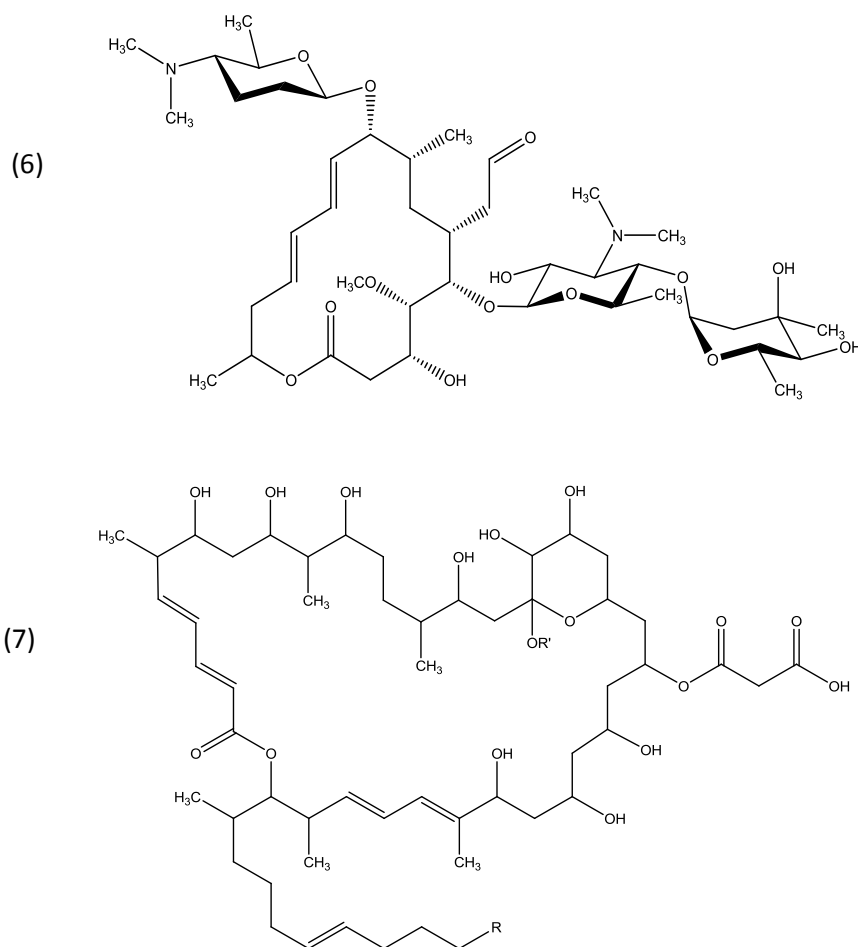


La estreptomina fue el primer antibiótico en ser empleado a nivel clínico, ya que también posee actividad contra los microorganismos causantes de la tuberculosis. Es una molécula altamente polar, gracias a los azúcares que la conforman, debido a que no posee dobles enlaces conjugados, presenta un pico de absorción a menos de 200 nm, y su peso molecular es de 587 uma [28].

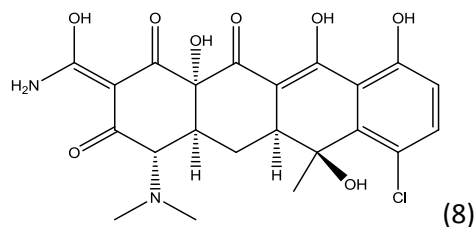
1.3.3 Policétidos

Los policétidos son compuestos que presentan grupos carbonilo y metileno alternados, también llamados policetonas. Estos derivan de condensaciones sucesivas de acetil coenzima A en primer lugar y posteriores condensaciones de otros compuestos derivados como malonil coenzima A. Existen dos grupos con actividad específica contra bacterias, los macrólidos y las tetraciclinas [10].

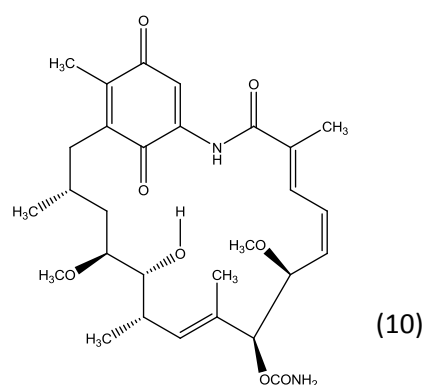
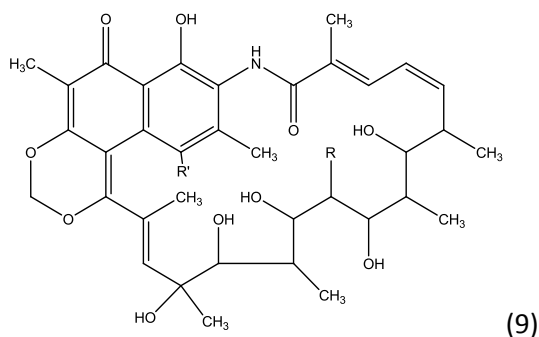
La estructura base de los macrólidos se compone de un anillo de lactona, usualmente de 14-16 átomos de carbono que pueden estar unidos a azúcares. Son inhibidores de la síntesis de proteínas, su mecanismo de acción involucra la unión de la subunidad 23S del rRNA con lo cual bloquea la traducción por la disociación del complejo peptidil-tRNA. Dos ejemplos son la espiramicina (6) producida por *Streptomyces ambofaciens* y las kanchanamycinas (7) de *Streptomyces olivaceus*. La espiramicina tiene un peso molecular de 843 uma, es poco soluble en agua y posee un espectro de absorción UV aproximadamente a 231 debido al par de enlaces conjugados que posee, a diferencia de la eritromicina que no los posee, ésta es soluble en agua y etanol y su absorción máxima se obtiene a menos de 200 nm [28, 73].



Las tetraciclinas son moléculas conformadas por un esqueleto de cuatro anillos, tetracíclicos como su nombre lo indica o de octahydrotetracen-2-carboxamida, sustituidas generalmente con grupos hidroxilo como la clorotetraciclina (8) producida por *Streptomyces aureofaciens* [10].

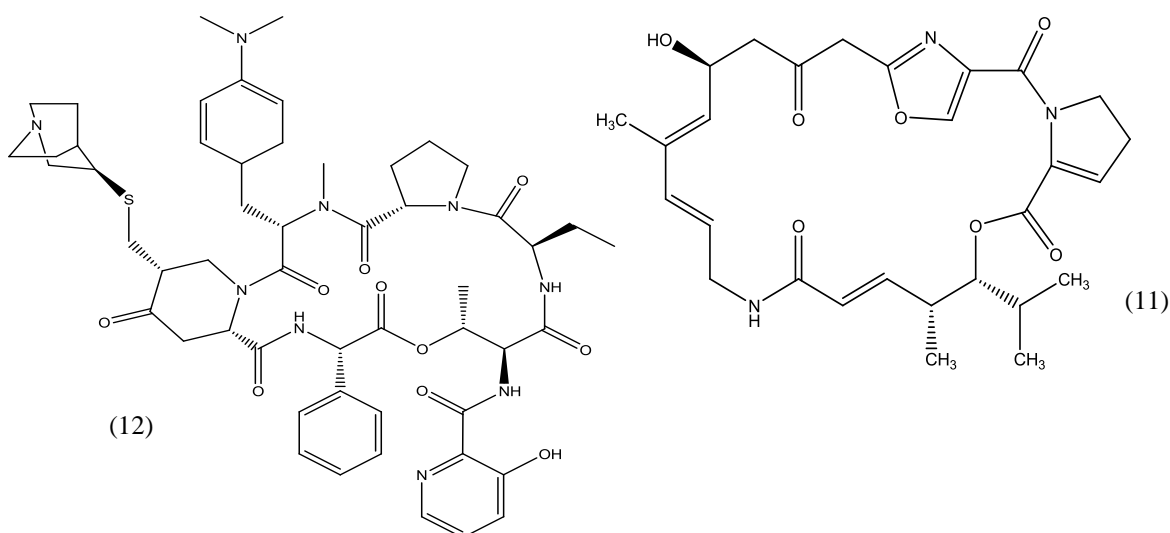


Existen otros tipos de macrólidos, como por ejemplo las ansamicinas, que comparten la estructura de un macrólido a excepción de que en el núcleo poseen un grupo NH. Su espectro antimicrobiano es principalmente contra bacterias Gram-positivas. Sus principales ejemplos son las estreptovarinas (9) [89] producidas por *Streptomyces spectabilis* y la geldanamicina (10) aislada de *Streptomyces hygroscopicus* que además posee un anillo de benzoquinona dentro de la molécula.



1.3.4 Estreptograminas

Las estreptograminas son un grupo que consiste de dos compuestos diferentes; A y B con estructura química diferente. El tipo A son macrolactonas cíclicas poliinsaturadas formadas por un híbrido de péptido-policétido. El grupo B corresponde a hexa o heptadepsipéptidos cíclicos que se cicliza vía un enlace éster entre el carboxilo terminal y el grupo secundario de un residuo de treonina en la posición 2. Tienen un mecanismo de acción singular pues actúan de manera sinérgica inhibiendo la síntesis de proteínas, sin embargo, al ser administradas independientemente el efecto es bacteriostático. La unión de las estreptograminas A provoca un cambio conformacional en la subunidad 50S del ribosoma, lo cual aumenta la actividad de las estreptograminas de tipo B 100 veces. Las estreptograminas B previenen la extensión de las cadenas proteínicas liberando entonces los péptidos incompletos [80]. Los ejemplos de tipo A son la pristinamicina II_A (11) y del tipo B la pristinamicina I_A (12).



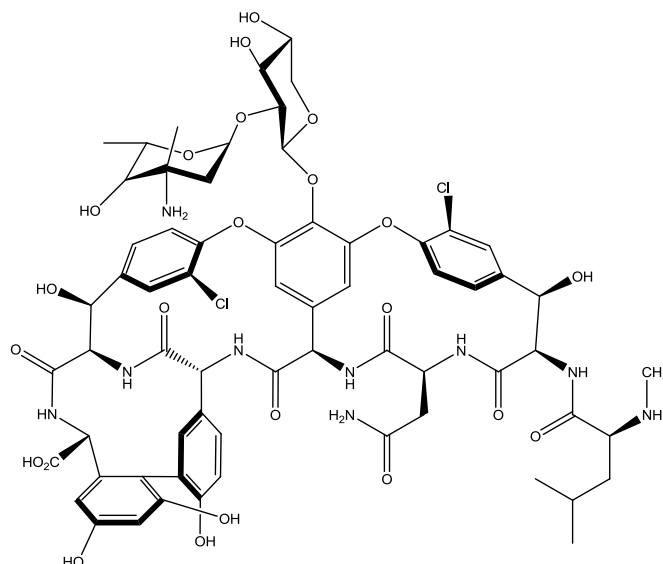
Estas moléculas tienen un peso molecular de aproximadamente 823 y 866 respectivamente debido a su estructura de mayor tamaño, la primera tiene un pico de absorción a 305 nm al igual que la segunda, sin embargo ésta última posee además otros picos a 243, 260 y 281 nm. Son poco solubles en agua, pero solubles en etanol y metanol [97,98]. Son efectivas contra bacterias resistentes a vancomicina como *Staphylococcus aureus* y algunos *Enterococcus*.

1.3.5 Glicopéptidos

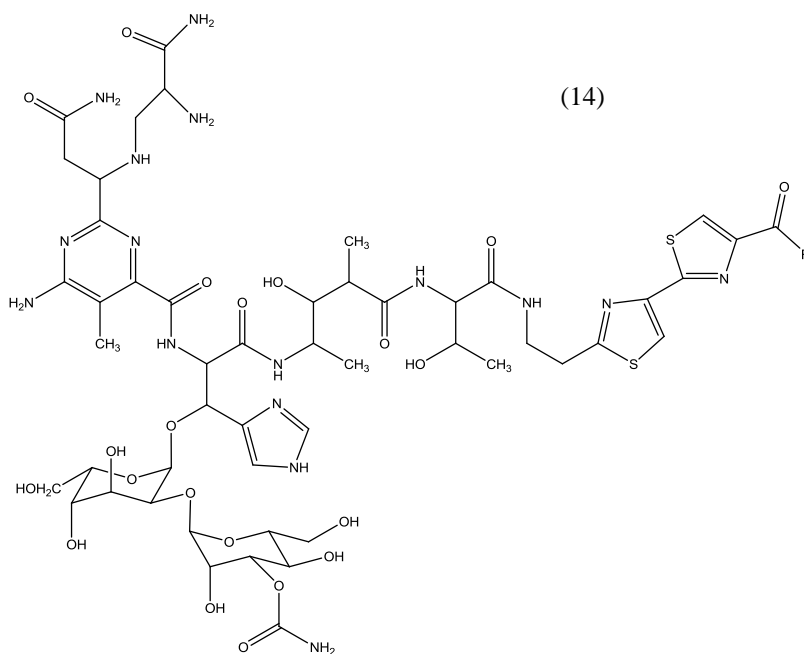
Los glicopéptidos son moléculas que constan de un péptido no ribosomal cíclico o policíclico glicosilado. Actúan contra de microorganismos Gram positivos inhibiendo la transpeptidación de las cadenas de peptidoglucano en su pared celular como la vancomicina (13) [62] aislada de *Streptomyces orientalis* [4]. Existen otros antibióticos glicopeptídicos también sintetizados por *Streptomyces* pero que han adquirido mayor relevancia clínica como antitumorales, como es el caso de las bleomicinas (14) que produce *S. verticillus* usadas en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, como el carcinoma de células escamosas, el cáncer testicular, de cabeza y cuello y algunos linfomas. Su mecanismo de acción no está completamente elucidado pero se ha demostrado que se puede unir a cadenas sencillas o dobles de DNA y cortarlas. Esta actividad requiere de la presencia de Fe (II) y de oxígeno molecular con lo cual puede también generar especies reactivas de oxígeno [64]. Estas moléculas en general son sensibles a la temperatura, por ejemplo, la vancomicina es inestable a temperaturas mayores a 37 °C, cuando se encuentra a pH alcalino, pero también disminuye su estabilidad cuando la temperatura sobrepasa los 50°C, sin importar el pH [62]. La bleomicina por su parte tiene un peso molecular de 2927 uma y es soluble en agua. Al

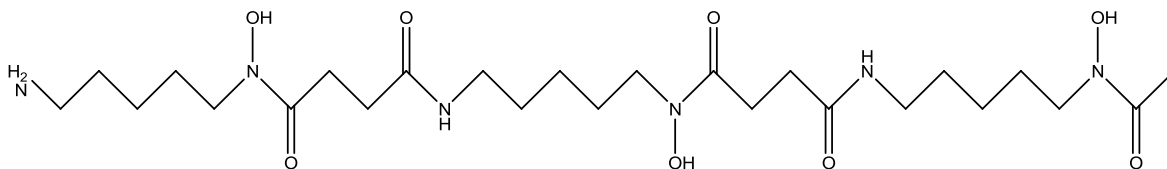
tener un carácter peptídico, su tamaño es más grande y su absorción se obtiene a 280 nm [90].

(13)

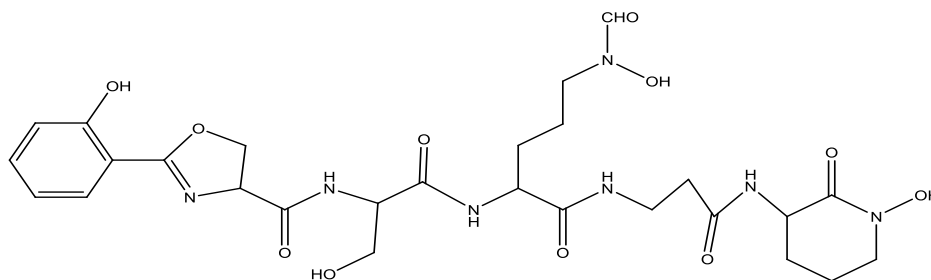


(14)





(16)

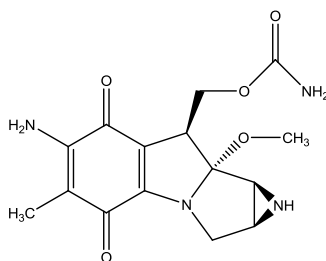


(17)

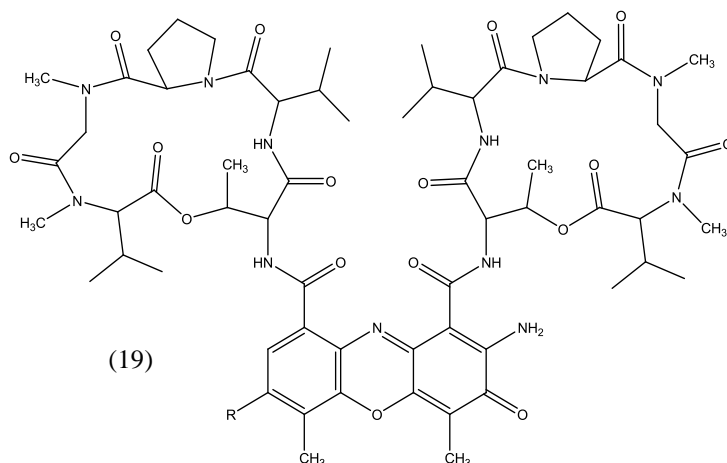
Estos compuestos son muy solubles en agua y polares debido a los hidroxilos y a los grupos carbonilo que poseen [99]. La desferrioxamina tiene pico máximo de absorción UV se obtiene a menos de 200 nm, mientras que para el segundo compuesto tiene varios picos a 203, 245, 255 y 303 nm [28] y son activos principalmente contra microorganismos Gram positivos, aunque a mayores concentraciones también poseen efecto contra algunos hongos y levaduras.

1.3.8 Otros metabolitos bioactivos producidos por estreptomicetos

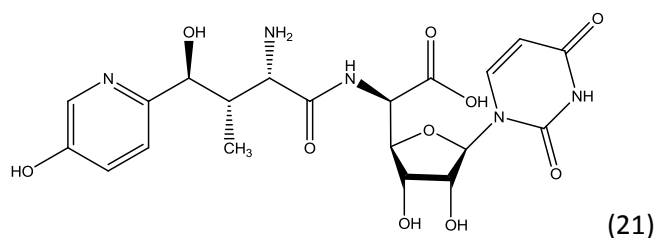
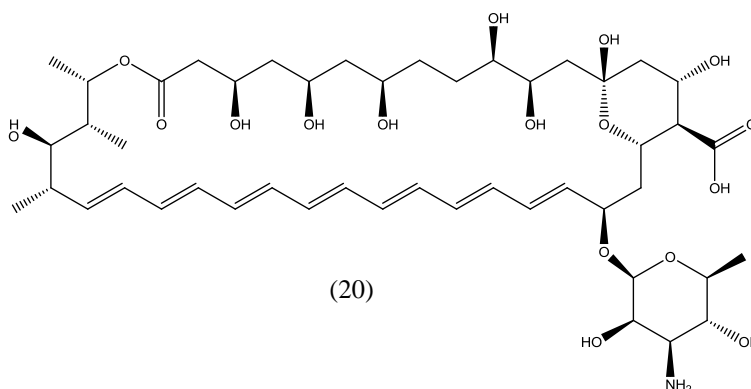
Existen otros compuestos que poseen actividad antibacteriana pero que son más empleados en la clínica y en la industria por su actividad antitumoral, antifúngica, antiparasitaria e inmunosupresora entre muchas otras. Ejemplos de antitumorales son la mitomicina C (18) [28] aislada de *Streptomyces caespitosus* que contiene una quinona, ésteres de carbamato y un anillo de aziridina, y todos ellos participan en su interacción con el DNA. La actinomicina D (19), producida por varias especies de *Streptomyces*, también es un compuesto antitumoral [38] que posee un cromóforo de fenoxazona unido a dos lactonas pentapeptídicas.



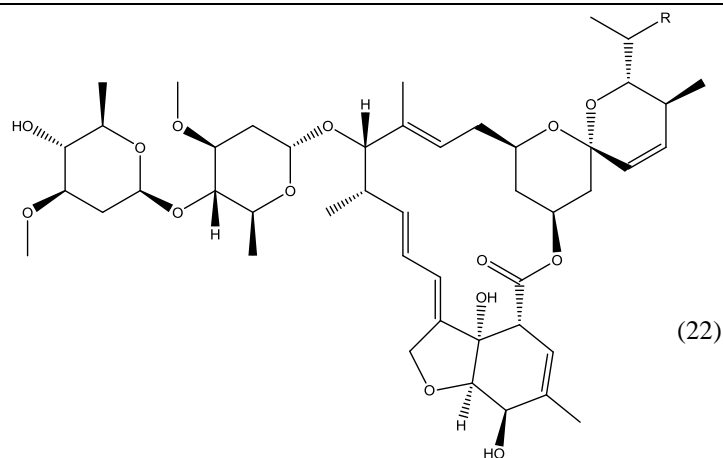
(18)



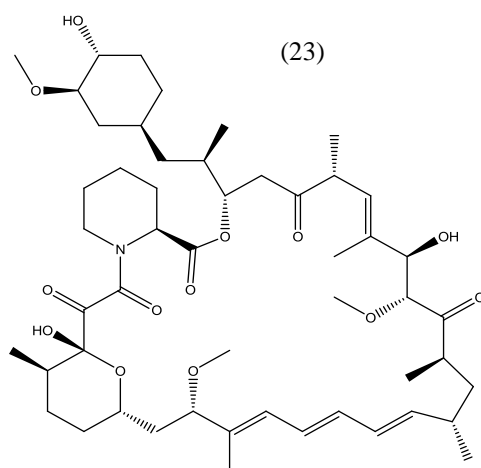
Compuestos con actividad antifúngica existen muchos, dos ejemplos son la nistatina (20) producida por *Streptomyces noursei* [12], la molécula se une al ergosterol de la membrana fúngica formando poros que provocan la salida de potasio y la muerte celular. La nicomicina (21) por su parte también es activo contra hongos e incluso contra algunos insectos, se trata de un nucleósido que inhibe la síntesis de quitina [59].



Las avermectinas (22) son los compuestos antiparasitarios más conocidos producidos por *Streptomyces*, su molécula es una lactona macrocíclica, su efecto se da a nivel de los canales de ión cloruro, pues facilita la entrada de estos iones produciendo una hiperpolarización y parálisis muscular [66].



Así pues los estreptomicetos producen compuestos bioactivos contra otros organismos, tanto procariontes como eucariontes, en su mayoría se les ha encontrado un uso humano como los antibióticos descritos anteriormente y como la rapamicina (23) producida por *Streptomyces hygroscopicus*, ya que este compuesto es inmunosupresor por lo cual es ampliamente empleado en los trasplantes de órganos para evitar rechazo.



La lista de metabolitos secundarios sigue, sin embargo su descripción es interminable pues se siguen encontrando derivados de interés debido a las diferencias estructurales que modifican la potencia, la toxicidad o incluso su espectro de acción.

1.4 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POR DIFUSIÓN DE DISCO O KIRBY – BAUER TEST

Este método para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos es el más empleado sobre todo en la clínica, se han realizado estandarizaciones y actualmente el CLSI o Instituto de estándares de laboratorios clínicos es el encargado de actualizar y modificar el método original [91].

El test de Kirby Bauer se emplea para determinar la sensibilidad o resistencia a los antibióticos, principalmente de microorganismos patógenos como auxiliar en la determinación del tratamiento antibacteriano adecuado para el paciente. Sin embargo, esta metodología bien puede ser aplicada en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, ya que la información generada es la misma: la presencia o ausencia de crecimiento alrededor de los discos indica la capacidad de la sustancia colocada en el disco de inhibir al organismo.

Es una metodología ampliamente empleada pues es muy fácil de realizar, consiste en una caja Petri con agar en la que se inocula al microorganismo por estría masiva, y sobre este se colocan los discos previamente impregnados con el antibiótico a probar. El compuesto difundirá a partir de los discos hacia el agar por lo que los microorganismos sensibles a ese antibiótico no crecerán alrededor del disco creando el llamado halo de inhibición.

Para realizar el ensayo de inhibición de manera cuantitativa se puede emplear también este método, conociendo la concentración de la muestra aplicada en cada disco, pero también existen otras metodologías que nos permiten determinar la concentración mínima inhibitoria, por ejemplo, el ensayo en placa de 96 pozos, el cual consiste en colocar en cada pozo una concentración determinada del microorganismo de prueba junto con una concentración conocida y diferente del antibiótico en cada pozo, determinando así crecimiento o inhibición del mismo por densidad óptica [41].

1.5 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Existen diversas técnicas empleadas actualmente para la recuperación de los metabolitos secundarios, sin embargo la más usada cuando se busca el aislamiento, la purificación y la elucidación o identificación de las estructuras químicas de los mismos, empieza por medio de una extracción con disolventes orgánicos. Cuando los metabolitos bioactivos son extracelulares lo más común es la separación por partición en la que se separan los componentes de una mezcla de acuerdo a la solubilidad relativa de cada compuesto en cada fase. Para este tipo de separación se emplean disolventes orgánicos inmiscibles con el agua por lo que al formar dos fases facilitan su separación. Ejemplos son el hexano, el cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo y butanol. Los disolventes como la acetona y el metanol se usan principalmente cuando los metabolitos son intracelulares, pues estos ayudan a disolver la membrana y la pared celular, desnaturalizar y precipitar proteínas como las enzimas y así liberar los metabolitos secundarios. Estos disolventes también se emplean cuando los metabolitos son muy polares no fácilmente extraíbles con otro tipo de disolventes.

El siguiente paso de la extracción es la purificación, que suele empezarse con un fraccionamiento. Este puede llevarse a cabo por diferentes tipos de cromatografías dependiendo de la cantidad de metabolito que se desea obtener.

1.5.1 Cromatografía

En primer lugar se emplea la cromatografía en capa fina o CCF. Ésta técnica es una de las más empleadas debido a su facilidad de uso y bajo costo. Consiste en una fase estacionaria colocada sobre una placa; el material más común empleado es la sílica, pero pueden emplearse otros como la celulosa o el óxido de aluminio [79] e incluso algunos se emplean como adsorbentes dentro del medio o de la fase de la cual se desea separar el compuesto de interés por medio de interacciones hidrofóbicas o polares, como por ejemplo, la resina amberlite®, que son ésteres poliméricos con lo cual se facilita la extracción y la purificación.

Sobre este soporte o adsorbente de la CCF, se coloca la muestra en la base de la placa y se lleva a cabo la separación por medio de elución con un disolvente o mezcla de estos mismos conocida como fase móvil. La selección de la fase móvil depende de diversos factores como las propiedades de los disolventes y la naturaleza de las interacciones entre disolventes, sin embargo, la más importante es la naturaleza del compuesto que se desea separar. Por ejemplo, compuestos polares se adsorben fuertemente con fases polares estacionarias como la sílica por lo que se requerirá una fase móvil más polar para que este eluya por la placa, mientras que compuestos como los hidrocarburos son sustancias de baja polaridad, por lo que no será necesario que la fase móvil interactúe con mayor fuerza que la fase estacionaria para separar el compuesto de interés [79]. Esta técnica también se emplea como un análisis previo para determinar el sistema de elución a utilizar para su escalamiento a un sistema de separación de mayor tamaño.

Con la misma metodología de la cromatografía en capa fina se lleva a cabo la cromatografía en capa preparativa (CCP) la diferencia radica en el grosor de la fase estacionaria que permite colocar y separar una mayor cantidad de muestra.

Otro tipo de cromatografía empleada para el fraccionamiento de mezclas es la cromatografía en columna, aplica el mismo principio que la CCF, con una fase estacionaria (usualmente sílica gel) y una fase móvil que depende de la mezcla a fraccionar. Sin embargo, ésta técnica nos permite separar y coleccionar los diferentes componentes de la mezcla. Los componentes se separan de acuerdo a su tamaño y a su capacidad de interactuar con la fase estacionaria. Una ventaja de esta técnica es que permite el monitoreo de los compuestos durante la elución, por ejemplo en el caso de compuestos coloridos estos se observan a simple vista como bandas que migran a través de la

columna, si los compuestos no son coloridos, en ocasiones se pueden monitorear por medio de luz UV iluminando la columna con esta luz y de la misma manera se observarán bandas fluorescentes correspondientes a los compuestos que absorben a longitud de onda UV, finalmente si los compuestos de interés tienen actividad biológica, la separación se monitorea por medio de los ensayos biológicos como por ejemplo los ensayos de antibiosis.

Finalmente, la cromatografía líquida de alta eficiencia, o HPLC por sus siglas en inglés, es una técnica mejorada de la cromatografía en columna, pues se basa en los mismos principios a diferencia de que en ésta, la fase móvil no eluye con ayuda de la gravedad sino por medio de presión ejercida por medio de una bomba. La elución se lleva a cabo de forma más rápida y tiene una mejor resolución para la separación de compuestos debido a que se emplean columnas empacadas con una fase estacionaria que permite el uso de partículas más pequeñas, con diámetros de poro mucho menores que la sílica empleada en columna lo cual crea una mayor superficie de interacción entre los compuestos y la fase estacionaria.

En la actualidad existen una diversidad de fases estacionarias que permiten realizar una diversidad de cromatografías ya sea TLC, de columna o HPLC por ejemplo cuando se usa sílica como fase estacionaria se le denomina fase normal pues la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. La fase reversa consiste en la sílica modificada añadiéndole cadenas hidrocarbonadas, generalmente de 8 o 18 carbonos. En este caso la fase móvil consiste de disolventes polares como el agua o el metanol.

1.6 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

1.6.1 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica ampliamente empleada en la identificación de compuestos ya que permite conocer su peso molecular y algunas propiedades de su estructura, lo cual resulta de ayuda en la elucidación estructural de los compuestos desconocidos. Posee diversas ventajas, entre ellas que se crea un espectro que la mayoría de veces es como una “huella química” de los compuestos, por lo cuál puede ser comparado con espectros ya reportados o con muestras estándar. Sin embargo, la principal ventaja de esta técnica radica en su sensibilidad, ya que la cantidad necesaria para realizar este tipo de análisis se encuentra en el orden de pmolar.

La técnica consiste en 4 etapas, la primera es la ionización de la muestra, la cual, puede realizarse por diferentes metodologías que se mencionarán más adelante, esta ionización

rompe la muestra en diferentes fragmentos los cuales en el segundo paso son acelerados mediante un campo eléctrico. En seguida estos iones son dispersados de acuerdo a su relación de masa/carga (m/z) los cuales son finalmente detectados

Existen diferentes técnicas de ionización. A continuación se mencionarán dos de acuerdo a las empleadas en el presente trabajo.

1.6.1.1 Ionización por impacto electrónico MS-IE

Este tipo de ionización no implica la colisión entre un electrón y la molécula, sino que más bien indica el acercamiento del electrón a la molécula neutra, se da una interacción y se transfiere energía a la entidad neutra. La ionización de la molécula se lleva a cabo en la fuente de iones del espectrómetro que consiste de una cámara hueca que contiene la muestra de forma gaseosa. Alrededor de esta se encuentra un filamento que puede ser de tungsteno calentado hasta los 2000 K con lo cual se produce el flujo de electrones. El filamento se mantiene en un potencial negativo con respecto a la cámara. Los electrones son entonces acelerados hacia la cámara entrando por un pequeño hueco donde entran en contacto con la muestra en forma de vapor dando lugar a la ionización. Los iones que son formados son empujados hacia fuera de la cámara por un electrodo repelente de iones que posee un potencial variable positivo con respecto al de la cámara [46].

1.6.1.2 FAB (FAST ATOM BOMBARDMENT) MS-FAB⁺

Este tipo de ionización se emplea para compuestos que prácticamente no poseen presión de vapor, es decir, que no se volatilizan. Se utiliza para obtener espectros de masas de azúcares, compuestos iónicos y proteínas pequeñas.

En este método se emplean átomos de argón o xenón. La muestra es disuelta en un disolvente con alto punto de ebullición como el glicerol, se coloca en una placa con un potencial elevado para que los iones sean rápidamente acelerados y alejados para formar una corriente y ser detectados [46].

1.6.2 Espectroscopia de infrarrojo

Otra técnica complementaria muy utilizada en la elucidación estructural es la espectroscopia Infrarroja. Se basa en la medida de absorción de diferentes frecuencias de Infrarrojo. La radiación de infrarrojo es una sección del espectro electromagnético que posee números de onda de 13,00 a 10 cm^{-1} también medidos en longitud de onda de 0.78 a 1000 μm . La información que se genera es usualmente presentada en forma de un espectro con la longitud de onda o número de onda en el eje de las X y Y la intensidad de absorción o porcentaje de transmitancia en el eje de las Y.

Esta técnica se basa en la vibración que presentan las moléculas, pues cuando la frecuencia de vibración específica es igual a la frecuencia de la radiación IR incidida sobre la molécula, ésta absorbe la radiación. El número total de bandas de absorción observadas es generalmente diferente al número total de vibraciones fundamentales. Algunas bandas adicionales se generan por la aparición de sobretonos, interacciones o acoplamientos entre vibraciones fundamentales, por ello, estas combinaciones generan un espectro de infrarrojo único para cada compuesto que puede ser interpretado con ayuda de tablas que agrupan las señales características de cada grupo funcional.

Esta técnica se puede realizar de diferentes maneras, dos de las más comunes son en sólido o en disolución. En sólido se puede emplear una pastilla de bromuro de potasio moliendo la muestra justo con esta matriz y formando una pastilla por medio de presión. Y en disolución empleando tetracloruro de carbono generalmente para la región de 4000 a 1330 y disulfuro de carbono de 1330 a 625 por la ventana transparente que poseen en la región de infrarrojo, es decir, prácticamente no presentan señales de absorción [32].

1.6.3 Resonancia magnética nuclear de protón.

En las últimas décadas la espectroscopía de resonancia magnética nuclear ha tomado un lugar muy importante en la determinación de la estructura de compuestos orgánicos, se emplea para elucidar la estructura de distintos tipos de moléculas y en la actualidad es una herramienta muy versátil en el estudio de biomacromoléculas, pues permiten obtener una resolución a nivel atómico, por ejemplo, se puede identificar la conformación de moléculas como las proteínas en solución, el plegamiento adquirido, si se encuentran en un estado ionizado, los aminoácidos presentes en el sitio activo, también se puede emplear para determinar la estructura de compuestos farmacológicamente activos y cómo se da la unión con sus receptores. Incluso, en la actualidad, se ha empleado para determinar los compuestos o familias de compuestos presentes en el metaboloma de organismos como plantas, hongos y bacterias [21].

Esta técnica se basa en la propiedad de spin (I) que poseen los núcleos de los átomos. Puede ser un spin entero ($I=0,1,2,3\dots$), fraccional ($I=1/2, 3/2, 5/2\dots$). El spin genera un campo magnético que a su vez resulta en un momento magnético (μ). Cuando un núcleo con un spin diferente de 0 se coloca en un campo magnético este es capaz de absorber energía. La frecuencia (ν_0) a la que un núcleo en particular absorbe energía depende del tipo de núcleo, caracterizado por su radio giromagnético (γ) y la fuerza del campo magnético (B_0). Esta relación la explica la ecuación de Lamor {1} [92].

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad \{1\}$$

En presencia de un campo magnético externo se presentan dos estados de spin, $+1/2$ y $-1/2$. El de menor energía ($+1/2$), precesa en dirección al campo magnético, mientras que los de mayor energía lo hacen en sentido contrario. La distribución de Boltzman describe el comportamiento de ambos estados, resultando en un pequeño exceso en la proporción del estado de menor energía, lo cual da un aumento en la absorción neta de energía cuando el núcleo es irradiado con la radiofrecuencia correcta. La energía absorbida es después disipada a los alrededores, a esto se le conoce como relajación caracterizada por el tiempo de relajación spín-red (T1). Un segundo mecanismo de relajación spin-spin (T2) es el que describe el regreso al equilibrio de la magnetización transversa. Esta magnitud es siempre menor o igual a T1 [93].

1.6.3.1 Desplazamiento químico

Es claro que el ambiente específico de cada núcleo modifica ligeramente el campo magnético que este experimenta. Los núcleos sufren apantallamiento dependiendo de la densidad electrónica que los rodea. Por ello la frecuencia a la cual el núcleo es capaz de absorber energía es característica del ambiente del núcleo. El desplazamiento químico (δ) se expresa en partes por millón (ppm) {2} [21].

$$\delta(ppm) = \frac{10^6 (v_{muestra} - v_{referencia})}{v_{referencia}} \quad \{2\}$$

El desplazamiento químico es independiente de la fuerza del campo magnético del espectrómetro usado. El tetrametilsilano (TMS) es usado como referencia para los espectros de ^1H y ^{13}C , y se le asigna un desplazamiento químico de 0.00 ppm.

1.6.3.2 Acoplamiento spin-spin

Muchas de las señales en resonancia no aparecen como líneas solas, muchas de ellas se dividen en multipletes debido al efecto de los núcleos vecinos. Este fenómeno, ocurre vía los electrones de enlace y nos da información acerca de la interconexión de los núcleos acoplados. La separación entre dos líneas es la misma para cada resonancia y se le conoce como constante de acoplamiento (J) expresada en Hertz. Esta constante depende de la naturaleza y el número de enlaces involucrados pero es independiente del campo magnético aplicado en el que se registra el espectro [21].

Tanto el desplazamiento químico como el fenómeno de acoplamiento spin-spin hacen a la RMN muy útil en la determinación estructural.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

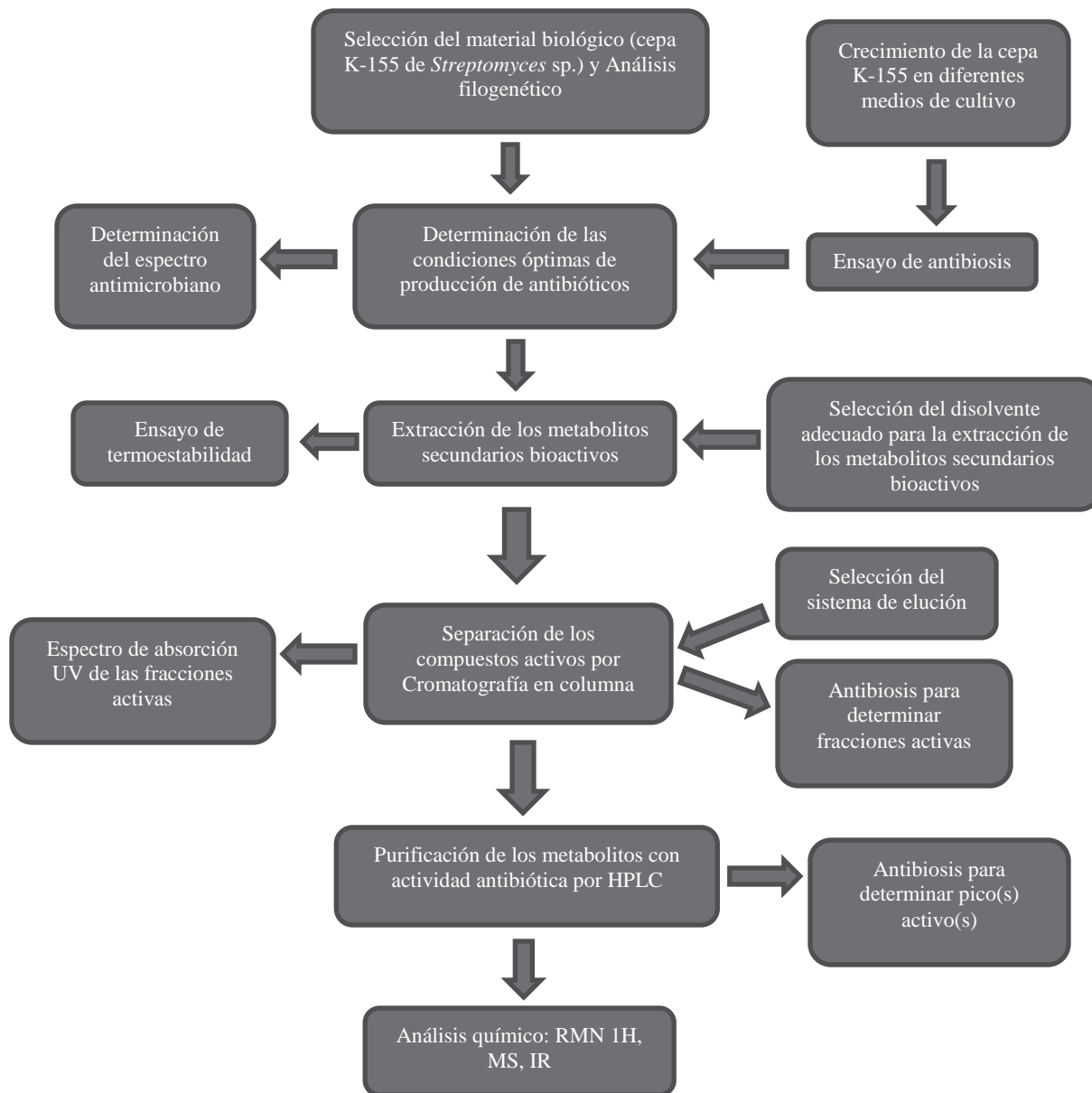


Diagrama 1. Descripción de la metodología general empleada para la producción, extracción y caracterización de los metabolitos secundarios con actividad antibiótica.

En este proyecto se buscó la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana producidos por la cepa K-155 de *Streptomyces* sp., para ello fue necesario realizar fermentaciones sumergidas para la obtención de dichos compuestos así como el empleo de técnicas analíticas para su separación, purificación y elucidación estructural.

2.1 CRECIMIENTO DE LA CEPA K-155 DE *Streptomyces* sp.

La cepa K-155 fue aislada en un trabajo previo (Cárdenas, 2009), su identificación se realizó en el 2010 mediante una caracterización polifásica (Avalos, 2010) en ella se determinó que pertenece al género *Streptomyces*, sin embargo su identificación a nivel de especie aún no se ha determinado, debido a su similitud con 2 especies de *Streptomyces* (*S. aureus* y *S. thermocarboxydus*). Esta cepa es capaz de esporular por lo que fue conservada de acuerdo a la metodología convencional para su trabajo a corto y mediano plazo, conservando las esporas en glicerol al 20%.

Para inocular los cultivos se partió del stock de esporas conservadas en glicerol al 20%, en primer lugar fue necesario verificar su pureza realizando un cultivo en medio TSB y YMG (Anexo), para lo cual se prepararon 50 mL de cada medio de cultivo líquido y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL bafleados. Se esterlizaron en autoclave a 121°C 15 lb presión por 20 min. Los matraces se inocularon con 50 µL del stock de esporas (10^{10} esporas/mL), se incubaron por 24 h a 29°C con agitación a 180 rpm. De estos cultivos se tomó una asada y se estirió en los mismos medios de cultivo sólidos para la obtención de colonias aisladas características de este género.

Una vez determinada la pureza del stock de esporas, este fue usado para todos los experimentos subsecuentes.

2.2 FILOGENIA DE LA CEPA K-155

Debido a que se cuenta con la secuencia de DNA ribosomal completa y por duplicado proveniente del estudio de la caracterización polifásica de la cepa K-155, fue pertinente realizar un análisis filogenético para determinar si este tipo de estudio computacional nos permite conocer con mayor precisión con que especie de *Streptomyces* posee mayor parentesco la cepa K-155, para así establecer si existe algún antecedente sobre metabolitos producidos por esta.

Para ello se realizó un análisis empleando el método de “maximum likelihood” empleando el programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), con el cual se comparó la secuencia del DNA ribosomal de la cepa K-155 con las aproximadamente 500 secuencias de DNA ribosomal 16S reportadas en el Ribosomal Database Project

correspondientes a las especies o cepas tipo aceptadas dentro de la taxonomía de este género.

2.3 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO

En estudios anteriores [7], se encontró actividad antibiótica contra microorganismos Gram positivos y levaduras en medio sólido, Agar YMG.

En primer lugar se buscó un medio de cultivo líquido adecuado para la producción de los metabolitos secundarios con la actividad antibiótica mencionada. Para ello se probaron los siguientes medios de cultivo mínimos y complejos (Anexo):

- YMG
- NMMP
- MM
- Caldo Nutritivo
- Bennet
- M4

Estos medios de cultivo fueron seleccionados tomando en cuenta la literatura relativa a *Streptomyces*, pues se sabe que en condiciones de estrés como la escasez de nutrientes, estos microorganismos producen una mayor concentración de los metabolitos secundarios. Por otra parte los medios de cultivo complejos como el Bennet o el YMG son ampliamente empleados en la producción de antimicrobianos como los antifúngicos y antibióticos.

2.3.1 Preinóculo, inóculo y fermentación

Se realizaron fermentaciones por duplicado de cada medio de cultivo evaluado. Para ello se prepararon 3 matraces (2 para la fermentación y 1 para el preinóculo) Erlenmeyer bafleados de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo respectivo. Para el preinóculo se tomaron 50 μ L de la suspensión de esporas en glicerol de la cepa K-155 y se adicionaron a un matraz Erlenmeyer bafleado con 50 mL del medio de cultivo. Se incubaron por 24 h a 29°C con agitación a 180 rpm. Pasado este tiempo el cultivo se centrifugó, se lavó con solución salina isotónica y se resuspendió en 10 mL de agua destilada estéril, de esta suspensión se tomaron 500 μ L para inocular cada matraz de fermentación. Se tomaron muestras de 5 mL a las 24, 48, 96, 120, 144, 168 y 192 horas. Estas muestras se

centrifugaron y se filtraron con una membrana Millipore de 0.45 μm , el sobrenadante se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se concentró a vacío empleando el equipo Speedvac savant ISS110 de Thermolab. Con este concentrado de volumen final de 200 μL se realizaron los ensayos de antibiosis.

2.3.2 Ensayo de antibiosis

El efecto antibiótico fue el indicador de que los metabolitos se están produciendo en ese medio de cultivo. Para realizar estos ensayos se eligieron las siguientes cepas de prueba:

- *Escherichia coli* (Gram negativo)
- *Micrococcus luteus* (coco Gram positivo)
- *Bacillus subtilis* (Bacilo Gram positivo)
- *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura)

Estos microorganismos fueron crecidos previamente por 24 h. Las bacterias en Caldo nutritivo y las levaduras en YD (Anexo). Los cultivos fueron empleados para inocular cajas petri con agar nutritivo por estría masiva; sobre este inóculo se colocaron los biodiscos de 6 mm de diámetro impregnados con 25 μL del sobrenadante del medio de fermentación empleado (Fig. 7). Las cajas se mantuvieron en refrigeración (4°C) al menos una hora para permitir una mejor difusión del sobrenadante en el agar y posteriormente se incubaron de 15-18 h (“overnight”) a 37°C. El efecto antibiótico se observó por la generación de halos de inhibición del crecimiento de las cepas de prueba y se midió el diámetro del halo en mm. Dentro de este experimento se realizó también la determinación del pH del sobrenadante a lo largo de la fermentación para determinar a qué pH se producen y son activos los antibióticos de interés.

2.3.3 Actividad antibiótica intracelular

Según los antecedentes [7], en medio sólido se observó la producción de metabolitos secundarios en la cepa K-155 en agar YMG después de incubar por 6 días, así que resultó relevante determinar si la producción de estos metabolitos era realmente extracelular o si se trataba de metabolitos intracelulares y únicamente se liberaban al medio cuando el microorganismo empezaba a morir. Para ello se empleó el medio YMG líquido, se realizó la fermentación de la misma manera que para la selección del medio de cultivo, pero en este caso se hizo por sacrificio de matraz, es decir, que cada muestra correspondió al contenido de un matraz de 250 mL con 50 mL de medio inoculado. El cultivo se centrifugó, se recuperaron las células, se lavaron 2 veces con SSI (solución salina isotónica, NaCl

0.85%), se le retiró bien todo el sobrenadante de SSI y se conservaron congeladas a -20°C para trabajar todos los tiempos juntos y romper las células por sonicación.

La sonicación se llevó a cabo con el siguiente buffer

Concentración	Sustancia
75 mM	KH ₂ PO ₄ pH= 7.0
2 mM	DTT
1 mM	EDTA

Tabla 1. Composición del buffer empleado para sonicar las muestras de biomasa de la cepa K-155.

(NOTA) Al momento de sonicar se le añade inhibidor de proteasas (cocktail protease inhibitor de SIGMA).

La sonicación se realizó con 3 mL de células a 50 W por 30 segundos con 5 pulsos, dejando un intervalo de 1 minuto de reposo en hielo durante cada pulso.

El debrís celular se separó del sobrenadante centrifugando a 13000 rpm por 15 minutos en microtubos de 1.5 mL.

Se probó el debrís celular y el sobrenadante (conteniendo el extracto intracelular) concentrado a 200 µL empleando el speedvac para determinar el efecto antibiótico realizando los ensayos de antibiosis ya descritos.

2.3.4 Modificación del medio YMG

Una vez que se determinó en qué medio de cultivo se producía el antibiótico, se modificó para determinar si al modificar las concentraciones de los componentes de dicho medio se obtiene una mejor actividad antibiótica. Para ello se empleó un diseño factorial 2³ (dos niveles y tres variables), en el cual, las modificaciones que se realizaron fueron a un nivel alto y bajo en relación al medio original (tabla 2). El nivel alto (+) se refiere a un incremento del 50% de cada componente del medio de cultivo y el nivel bajo a una disminución del 50% de cada componente respecto al YMG original. El diseño quedó organizado como se muestra en la tabla 3, donde cada experimento corresponde a un medio de cultivo de diferente composición.

Medio YMG

Componente	Concentración g/100 mL
Extracto de levadura (L)	0.4
Extracto de malta (M)	1
Glucosa (G)	0.4

Tabla 2. Composición del medio de cultivo YMG.

Experimento o Medio	[L]	[M]	[G]	[L] g/100 mL	[M] g/100 mL	[G] g/100 mL
1	-	-	-	0.2	0.5	0.2
2	+	-	-	0.6	0.5	0.2
3	-	+	-	0.2	1.5	0.2
4	+	+	-	0.6	1.5	0.2
5	-	-	+	0.2	0.5	0.6
6	+	-	+	0.6	0.5	0.6
7	-	+	+	0.2	1.5	0.6
8	+	+	+	0.6	1.5	0.6

Tabla 3. Composición de cada medio de cultivo empleado en el diseño factorial 2^3 . [L]; extracto de levadura, [M]; extracto de malta, [G]; glucosa.

Este experimento se llevó a cabo de igual manera que las fermentaciones previamente realizadas, partiendo de un preinóculo con las esporas en glicerol. Después de 24 h se centrifugó, se lavó con SSI y se resuspendió en 10 mL de agua destilada estéril. De ésta suspensión se tomaron 500 μ L para inocular cada matraz de los diferentes medios. También se tomaron muestras a las 24, 48, 72, 96, 144 y 192 horas.

Las muestras se centrifugaron y se separó el sobrenadante de la biomasa, ésta se empleó para determinar crecimiento por peso seco, y del sobrenadante se tomaron 2 mL para medir el pH de cada condición. El volumen restante se concentró 4 veces y con ello se determinó actividad antibiótica.

2.4 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios se extrajeron a partir de una fermentación pequeña en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo seleccionado. Después de crecer a la cepa K-155 por 6 días, se centrifugó el cultivo y se filtró a través de membranas Millipore de 0.45 μ m para separar la biomasa del sobrenadante. La extracción se realizó a partir de éste último.

Debido a que se desconocía la naturaleza química de los metabolitos con actividad antibiótica, así como sus propiedades de polaridad y solubilidad para realizar su extracción del resto de componentes del sobrenadante se emplearon por separado disolventes de diferente polaridad: hexano, éter etílico, tetracloruro de carbono, cloroformo, acetato de etilo, acetona, butanol, y metanol. Para el caso de la acetona y el metanol que son miscibles con el agua, fue necesario eliminar el agua del sobrenadante por medio de liofilización para después adicionar el disolvente. Se emplearon 10 mL de disolvente, éste se agitó para solubilizar los componentes y finalmente se filtró para separar el extracto de los residuos de sobrenadante liofilizado. El disolvente conteniendo el extracto se evaporó empleando un rotavapor y el residuo se resuspendió en agua destilada esterilizada (Fracción A) para poder realizar los ensayos de antibiosis. Los residuos de sobrenadante liofilizado se disolvieron nuevamente en el volumen mínimo de agua necesario (Fracción B) para realizar también los ensayos de antibiosis.

La extracción con disolventes no miscibles en el agua, se realizó empleando un embudo de separación, en el cual se adicionó el sobrenadante, enseguida se agregó el disolvente seleccionado, se agitó, se dejó escapar el vapor formado y se dejó reposar para permitir la separación de fases. El procedimiento se repitió al menos tres veces para asegurar la completa extracción de los componentes solubles. Las fracciones de cada disolvente se juntaron y el disolvente se evaporó empleando el rotavapor. El residuo se resuspendió en el volumen mínimo de agua destilada esterilizada para solubilizarlo (en ciertos casos se empleó una mínima porción del disolvente empleado para la extracción, el cual posteriormente fue evaporado) [Fracción D] antes de realizar los ensayos de antibiosis. La Fracción C fue el sobrenadante residual con los componentes que no se extrajeron con el disolvente empleado.

Con cada fracción obtenida de cada uno de los diferentes disolventes empleados se realizó un ensayo de antibiosis en placa para determinar en cual se mantenía la actividad antibiótica, para determinar así el disolvente ideal para extraer a los metabolitos secundarios. Ésta metodología se resume en la Fig. 4.

2.5 FRACCIONAMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO Y PURIFICACIÓN DEL ANTIBIÓTICO.

2.5.1 Cromatografía en capa fina

Una vez que se obtuvo un extracto crudo se analizó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) para conocer si dicho extracto presentaba una gran cantidad de componentes, estimados por el número de manchas observadas. Fue entonces necesario en primer lugar

determinar los disolventes que componen la fase móvil y que permiten una adecuada separación del extracto. Para esta determinación se emplearon placas de aluminio de 10 x 5 cm recubiertas de sílica gel de MERCK (Cat. No. 1.05554 TLC Silicagel 60 F254) para revelar con luz UV. En estas placas se aplicaron 3 µL del extracto.

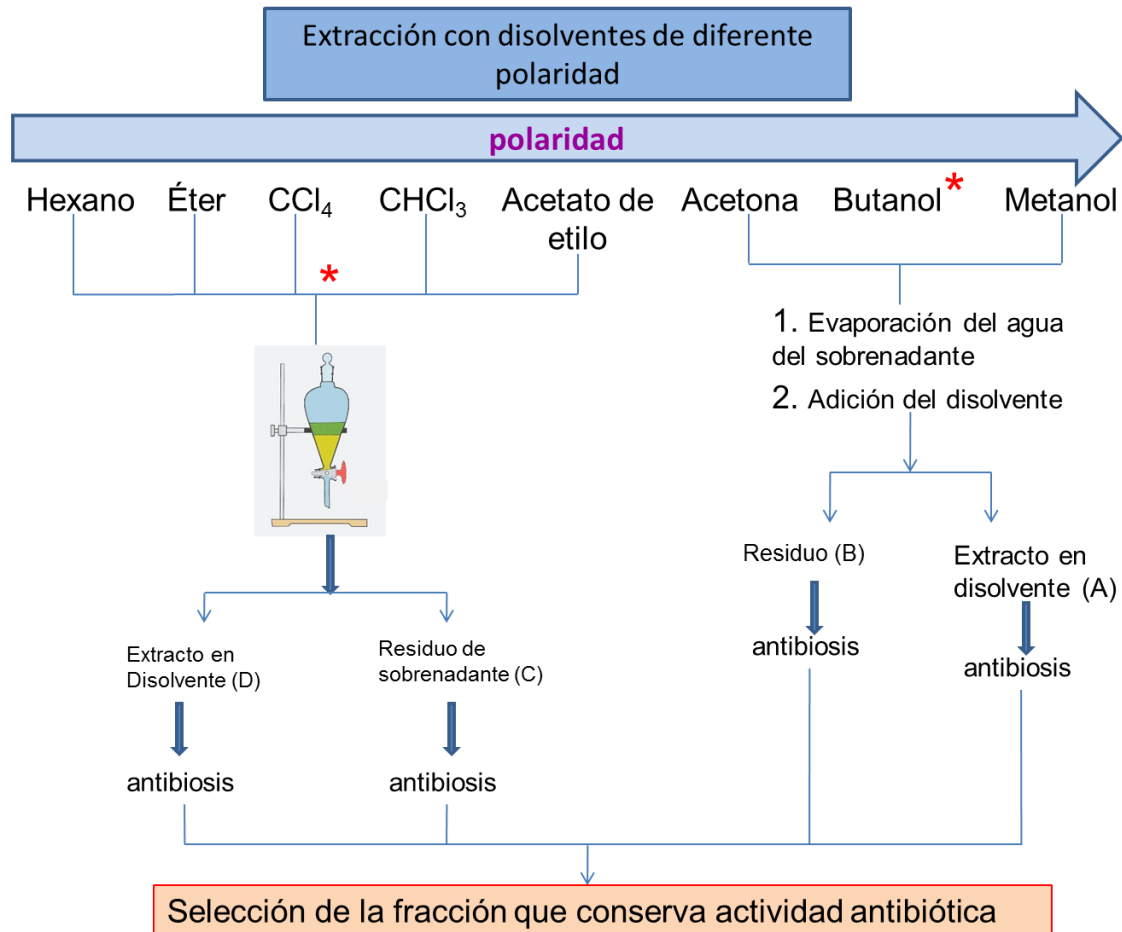


Figura 4. Diagrama del Procedimiento general de la selección del disolvente para la extracción de los metabolitos secundarios bioactivos El asterisco representa el butanol, que es polar pero inmisible con el agua.

Para eluir las cromatoplacas se probaron diferentes mezclas de disolventes, y dos fases, normal y reversa al igual que en la determinación del disolvente adecuado para la extracción, los metabolitos son desconocidos, por lo cual se realizaron las siguientes mezclas con disolventes de diferente polaridad y constante dieléctrica que permitieran la separación en fase normal de los componentes presentes en el extracto:

- * Hexano:acetona:agua 1:5:1
- * Hexano:acetona:metanol 4:4:2

- * Acetonitrilo:Agua 1:1, 7:3
- * Acetonitrilo:Isopropanol 1:1, 7:3

Para la fase reversa se emplearon mezclas de Acetonitrilo:agua, (4:6, 1:1 y 9:1)

Estas mezclas se colocaron en cámaras de elución que se dejaron saturar por aproximadamente 1 hora y en las cuales posteriormente se colocó la placa a eluir cuidando que quedara derecha para que el eluyente corriera de manera pareja.

Una vez que se eluyó cada cromatoplaaca hasta cerca de 0.5 cm del borde, se retiró de la cámara de elución, se dejó evaporar el disolvente, y se reveló en primer lugar con luz UV y posteriormente con una mezcla de metanol:ácido sulfúrico 80:20 .

Se seleccionó la mezcla de disolventes con la cual se observaron un mayor número de manchas, mejor definidas y separadas.

2.5.2 Cromatografía en capa fina preparativa

Una vez que se obtuvieron las condiciones de elución se realizó el mismo procedimiento, pero esta vez realizando una cromatografía en capa fina preparativa para poder recuperar las diferentes manchas o fracciones y realizar ensayos de antibiosis para así poder determinar la fracción activa.

Para esta cromatografía se emplearon cromatoplaacas en vidrio de 20 x 20 cm recubiertas de sílica gel de 2 mm de espesor de MERCK, (Cat. No. 1.05745.0001 PLC Silica gel 60).

En la cámara de elución se colocó la mezcla de disolventes elegida. La muestra se colocó a 1.5 cm de la base. Se aplicaron 10 mL del extracto metanólico. Se dejó eluir hasta 1.5 cm del borde superior. Se observaron las bandas con luz UV y se fraccionaron recuperándolas raspando la placa con ayuda de una espátula y colectándolas en matraces Erlenmeyer de 150 mL.

A cada fracción de sílica se le adicionó agua destilada suficiente para cubrirla, se agitó por 10 minutos y se dejó reposando por 1 hora aproximadamente para favorecer la solubilización de los componentes activos. La suspensión se colectó en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugaron para separar la sílica y ésta se volvió a lavar con un volumen de agua. Ambos lavados se juntaron, se tomó una muestra de 5 mL, se hicieron alícuotas de 1 mL en microtubos de 1.5 mL y se concentraron a 200 µL empleando el sistema a vacío: speedvac Savant ISS110 de Thermolab. Se juntaron los volúmenes concentrados de cada fracción y se emplearon para realizar ensayos de antibiosis en Agar Nutritivo (Anexo) contra las cepas de prueba.

2.5.3 Fermentación de 1l en el medio seleccionado

Después de seleccionar el medio de cultivo donde se obtiene una mayor producción de metabolitos secundarios bioactivos, fue necesario escalar a una fermentación de mayor volumen para obtener una mayor cantidad de los metabolitos, para lo cual se preparó 1L del medio seleccionado y se inoculó con 1% de biomasa de un preinóculo de 24 horas en el mismo medio de cultivo .

Debido a que la mejor producción del metabolito se encontraba aproximadamente a la semana, la fermentación se detuvo a los 6 días, se centrifugó a 8000 rpm, se separó el sobrenadante y se filtró con ayuda de vacío a través de filtros Millipore de 0.45 µm.

Se recuperaron aproximadamente 700 mL de sobrenadante, los cuales se liofilizaron con el equipo Labconco Freeze Dry System LYPH LOCK® 4.5. Al residuo seco se le adicionaron 100 mL de metanol y se dejó reposar por una hora para favorecer la extracción de la mayor cantidad de metabolito posible. Se centrifugó para separar los residuos insolubles y se recuperó únicamente el metanol, el cual se evaporó empleando el rotavapor, y el residuo se resuspendió en una mezcla de acetonitrilo:agua (70:30).

2.5.4 Cromatografía en columna (CC)

La cromatografía en columna se realizó para fraccionar el extracto, y eliminar compuestos sin actividad antibiótica y que no interfirieran al momento de su purificación por medio de HPLC . Para esta cromatografía se empleó una columna de 1 m de alto por 2 cm de diámetro que se empacó con sílica gel. El procedimiento a seguir fue el que se describe a continuación:

La columna se empacó con sílica gel 100 (MERCK CAT. No. 1.10185). empleando acetonitrilo, con ayuda de una pipeta de vidrio se adicionó el extracto cuidando que quedara sobre el empacado de manera uniforme. Se probaron dos gradientes de elución, hexano: metanol empezando por hexano 100%, siguiendo con hexano:metanol 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 90:10 y finalmente 100% de metanol y acetonitrilo:agua desde 100% de acetonitrilo que fue modificándose con variaciones del 10% y finalmente empleando 100% de agua. Se colectaron fracciones de 25 mL.

El disolvente (Hexano y acetonitrilo) de cada una de las fracciones obtenidas se evaporó por medio de rotavapor hasta 10 mL de volumen final, se tomó una alícuota de 1 mL y se evaporó empleando el Speedvac. Se realizó ensayo de antibiosis con cada fracción colectada y concentrada a 200 µL contra las cepas de prueba para determinar en qué fracción o fracciones se estaba recuperando el metabolito con actividad antibiótica.

2.5.5 Espectro de absorción UV

Con el fin de determinar la longitud de onda de máxima absorción de los metabolitos secundarios que presentan actividad antibiótica, se realizó un barrido de longitud de onda empleando las fracciones obtenidas de la cromatografía en capa fina preparativa, la cromatografía en columna así como el extracto metanólico resuspendido en agua y el sobrenadante del medio de cultivo sin extraer. El barrido se realizó de 190 a 800 nm, para el sobrenadante completo y de 190 a 400 nm para las fracciones empleando el espectrofotómetro de UV/vis Ultrospec 2100 pro de Amersham Biosciences.

2.5.6 Purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC

El resto del volumen total de cada fracción se concentró hasta 1 mL para su purificación por medio de HPLC con el equipo Varian ProStar con detector UV-Vis, empleando una columna de Macherey-Nagel Nucleodur C18 Pyramid de 5 μ m.

Para la purificación fue necesario en primer lugar filtrar la muestra para evitar la presencia de impurezas que pudieran tapar la columna o dañar el equipo. Así pues la muestra se filtró para posteriormente inyectarla en el cromatógrafo. Para la elución se tuvo que realizar primero un ensayo previo para determinar la mezcla de elución a utilizar. Se probaron tres sistemas, uno con gradiente de acetonitrilo:agua, otro solo con agua y un último con un buffer de acetato de trietilamonio. Finalmente, se eluyó con acetato de trietilamonio ya que presentó la misma definición de picos que con agua, con la ventaja de mantener un pH estable. Se colectaron las diferentes fracciones que abarcaran a los picos observados a 220 nm, se evaporó la fase móvil y se resuspendió el residuo en agua MilliQ estéril para realizar los ensayos de antibiosis y determinar cuál era el pico activo.

Una vez que se determinó qué pico era activo, se repitió el procedimiento para contar con una mayor concentración del metabolito de interés.

2.6 APROXIMACIÓN A LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Con la muestra conteniendo el metabolito de interés, es decir el antibiótico, se realizaron los análisis subsecuentes. Se evaporó a sequedad la fase móvil para eliminar el disolvente, se realizaron varios lavados con agua MilliQ, y una vez obtenido el polvo seco del antibiótico, éste se empleó para las pruebas de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de masas.

Los análisis se realizaron en el Instituto de Química, en los respectivos Laboratorios de Espectroscopía de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de masas.

2.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

A la par se realizó esta determinación siguiendo el procedimiento de Wiegand et al., 2008 [86] modificado empleando a *Micrococcus luteus* y a *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismos de prueba.

En primer lugar se realizó la estandarización del inóculo por medio de un crecimiento con cultivos “overnight”. Para esto, se cultivaron los microorganismos de prueba por 14-18 h. De esta suspensión se tomó una alícuota de 10 μL para cada tubo con 5 mL de medio de cultivo. Se dejaron crecer hasta cierta densidad óptica (0.5, 0.7 y 1.0). De estos nuevos cultivos se realizó una dilución 1:100 (10^{-2}) y posteriores diluciones de 1:10 hasta 10^{-6} . Las diluciones se plaquearon en caja Petri y se incubaron “overnight”. Se contaron las colonias y se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC) por medio de la siguiente fórmula.

$$N = \frac{C * 10}{10^{-D}}$$

Donde N = UFC*mL⁻¹; C = #colonias por placa; D = dilución 1:10

Se empleó la suspensión bacteriana a una densidad óptica que diera como resultado un total de 10^8 UFC/mL pero al momento de inocular el protocolo sugiere realizar una última dilución de 1:100.

Una vez que se determinó a que densidad óptica se debía trabajar, se prepararon las siguientes diluciones del antibiótico, partiendo de un stock de 1 mg/mL: 500, 250, 125, 62.25, 31.25, 15.6, 7.8 y 3.9 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluó el antibiótico purificado y una fracción activa de la cromatografía en columna (Fracción 20). Las diluciones se realizaron en caldo nutritivo (anexo).

El ensayo se realizó en placa de 96 pozos por medio de microdilución, en cada pozo se añadieron 100 μL de la dilución del antibiótico y 100 μL de la suspensión del microorganismo de prueba. Se incubó overnight de 18-24 horas y se midió el crecimiento por turbidez con ayuda de un lector de placas a 600nm.

Como controles positivos se emplearon la eritromicina que es activa contra microorganismos gram positivos y la cicloheximida que inhibe el crecimiento de levaduras.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa K-155 fue aislada como parte de un trabajo previo (Cardenas, 2009), de suelo salitroso en Valle de Chalco, Estado de México y conservada en forma de esporas en una suspensión de glicerol al 20% con una concentración de 1×10^8 esporas/mL. Esta cepa resultó de interés debido a su actividad antibiótica contra microorganismos Gram positivos y levaduras, observada durante su caracterización polifásica llevada a cabo en un estudio anterior (Avalos, 2010). Dentro de este estudio se demostró la pertenencia de dicho microorganismo al género *Streptomyces*, y se describió la cepa, más no se le pudo asignar especie debido a su similitud con dos especies de *Streptomyces* (*Streptomyces aureus* y *Streptomyces thermocarboxydus*) según una comparación realizada empleando el BLAST del NCBI. Por esta razón, y debido a que se cuenta con la secuencia completa correspondiente al DNA ribosomal 16S, el cual es ampliamente empleado en la taxonomía bacteriana, el primer estudio que se realizó fue la filogenia de la cepa K-155 basándonos en esta secuencia contra las aproximadamente 500 cepas tipo reportadas en el RDP (Ribosomal Database Project) para el género *Streptomyces* para determinar con qué especie se encuentra más relacionada filogenéticamente.

3.1 FILOGENIA DE LA CEPA K-155

El árbol filogenético resultante se muestra en la Fig. 5. Con este análisis se determinó que la cepa K-155 presenta mayor similitud con *S. thermocarboxydus* formando un clado con *S. lusitanus*, pues *S. aureus* queda muy lejos en el árbol filogenético formando un clado con *S. durmitorensis*.

En la Fig. 6 se observa un acercamiento de la región del árbol filogenético donde se encuentra la cepa K-155. Aquí se nota que forma un clado con *S. thermocarboxydus* y con *S. lusitanus*. Por ello se decidió realizar otro árbol filogenético más para compararla únicamente con las cepas más relacionadas, el resultado se muestra en la Fig. 7. Éste árbol nos muestra que la clasificación de las cepas de *Streptomyces* cercanas a la cepa K-155 no es muy clara, pues la cepa SCSIO de *S. lusitanus* se encuentra separada de la cepa tipo de esta especie, y forma un clado con la cepa CA-23 de *S. thermocarboxydus*. Por ello, a pesar de que K-155 se encuentra dentro de este grupo, no se asocia directamente con ninguna cepa de *S. thermocarboxydus*, por lo que aún se mantiene la duda de si pertenece o no a esta especie. En términos generales se le puede asociar con *S. thermocarboxydus*, sin embargo para determinarlo con mayor precisión se emplearán las secuencias de genes “housekeeping” o de mantenimiento, ya que son genes encargados de funciones básicas celulares como la girasa (*gyrB*), la ATP sintasa (*atpD*), la RNA polimerasa (*rpoB*) entre

otros, por lo cual se encuentran altamente conservados pero con regiones variables que en combinación, permiten una identificación más precisa a nivel de especie [67].

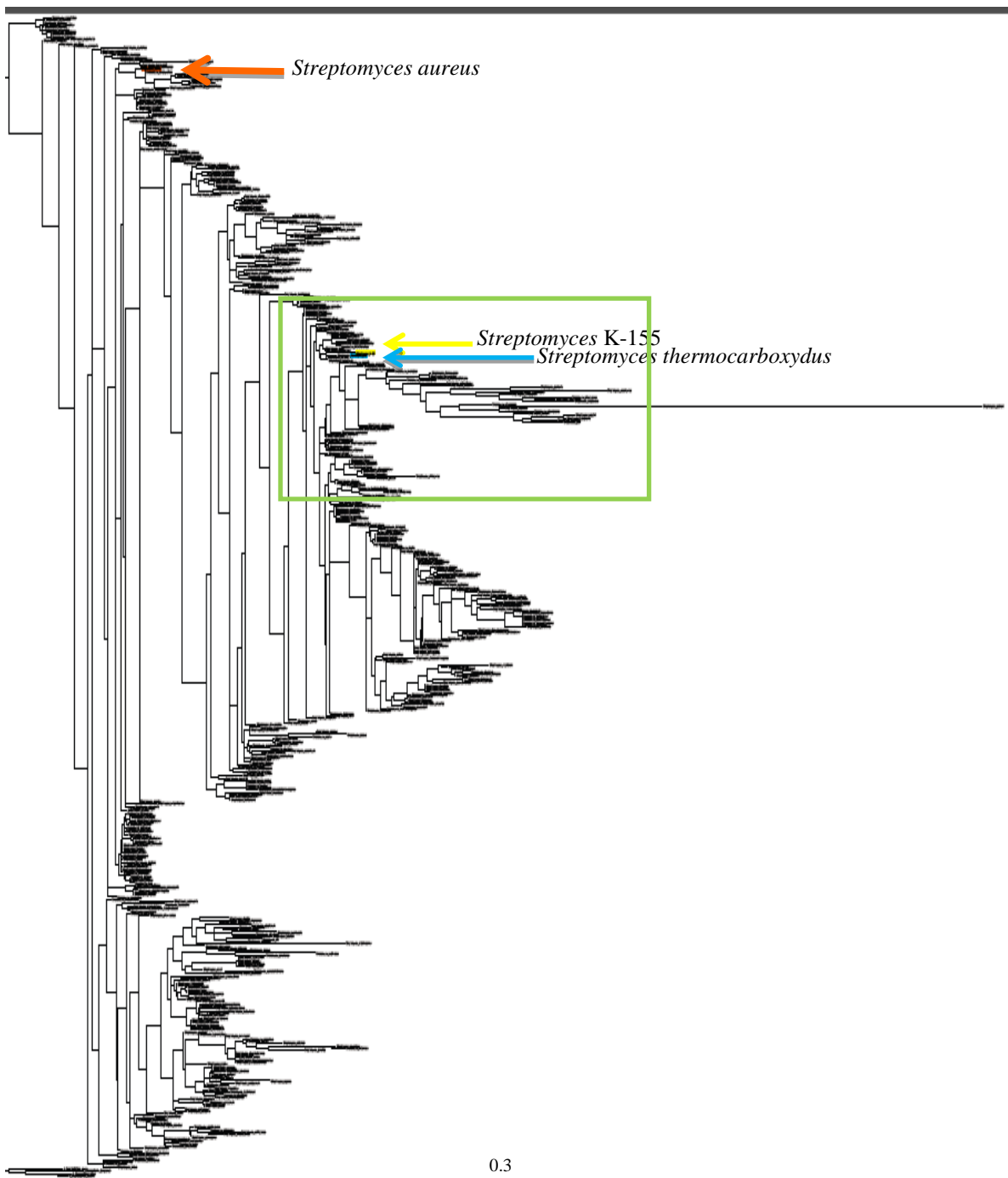


Figura 5. Árbol filogenético realizado con la secuencia del gen 16S empleando el programa MUSCLE. En rojo se señala la ubicación de *Streptomyces aureus*, en amarillo la de la cepa K-155 y en azul la de *Streptomyces thermocarboxydus*. En verde se señala la región empleada para realizar la figura 1b. (Árbol filogenético elaborado con ayuda del Dr. Eneas Aguirre von Wobeser).

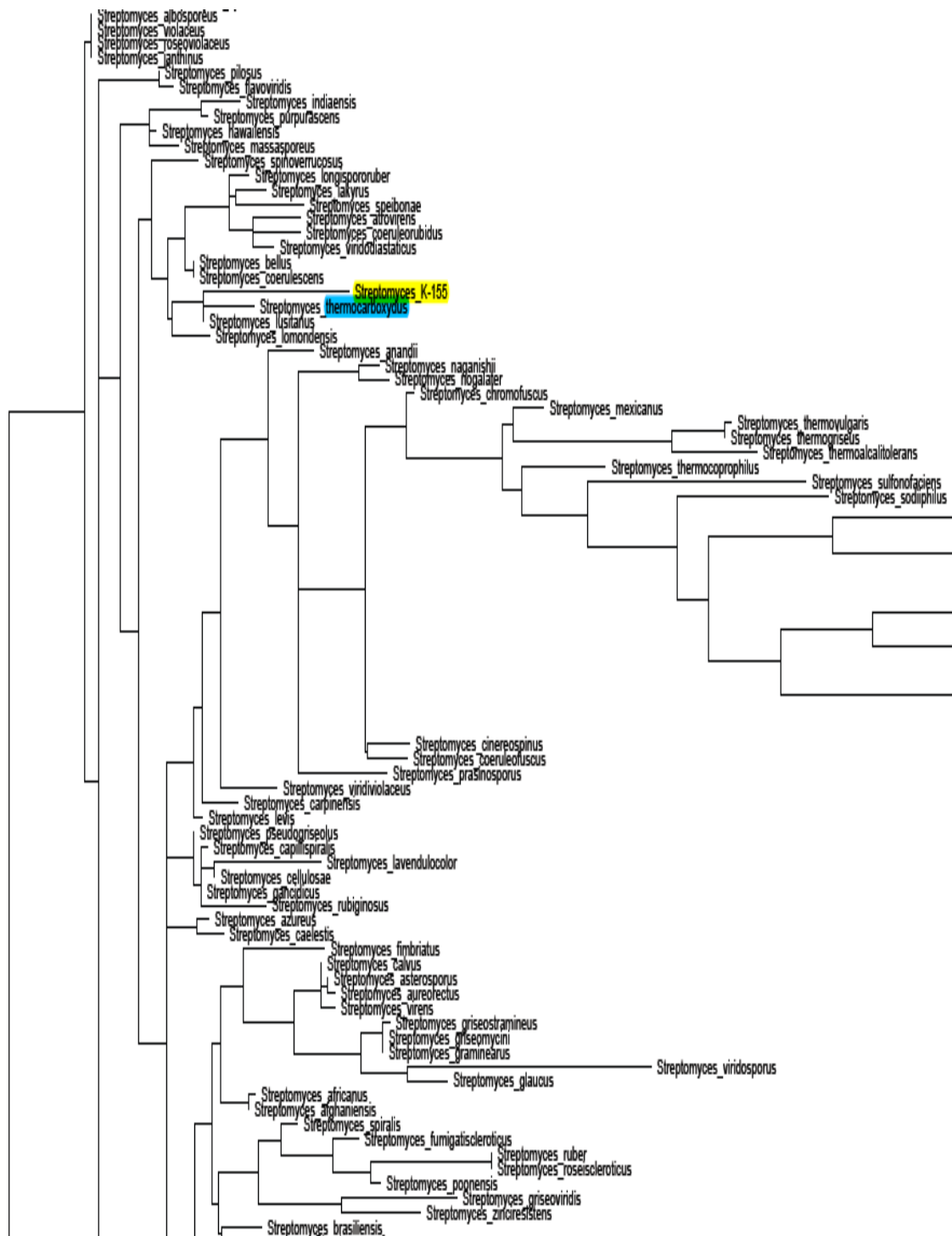


Figura 6. Región del árbol filogenético donde se encuentra la cepa K-155 con las especies más cercanas a ésta en base al gen 16S. (Árbol filogenético elaborado con ayuda del Dr. Eneas Aguirre von Wobeser).

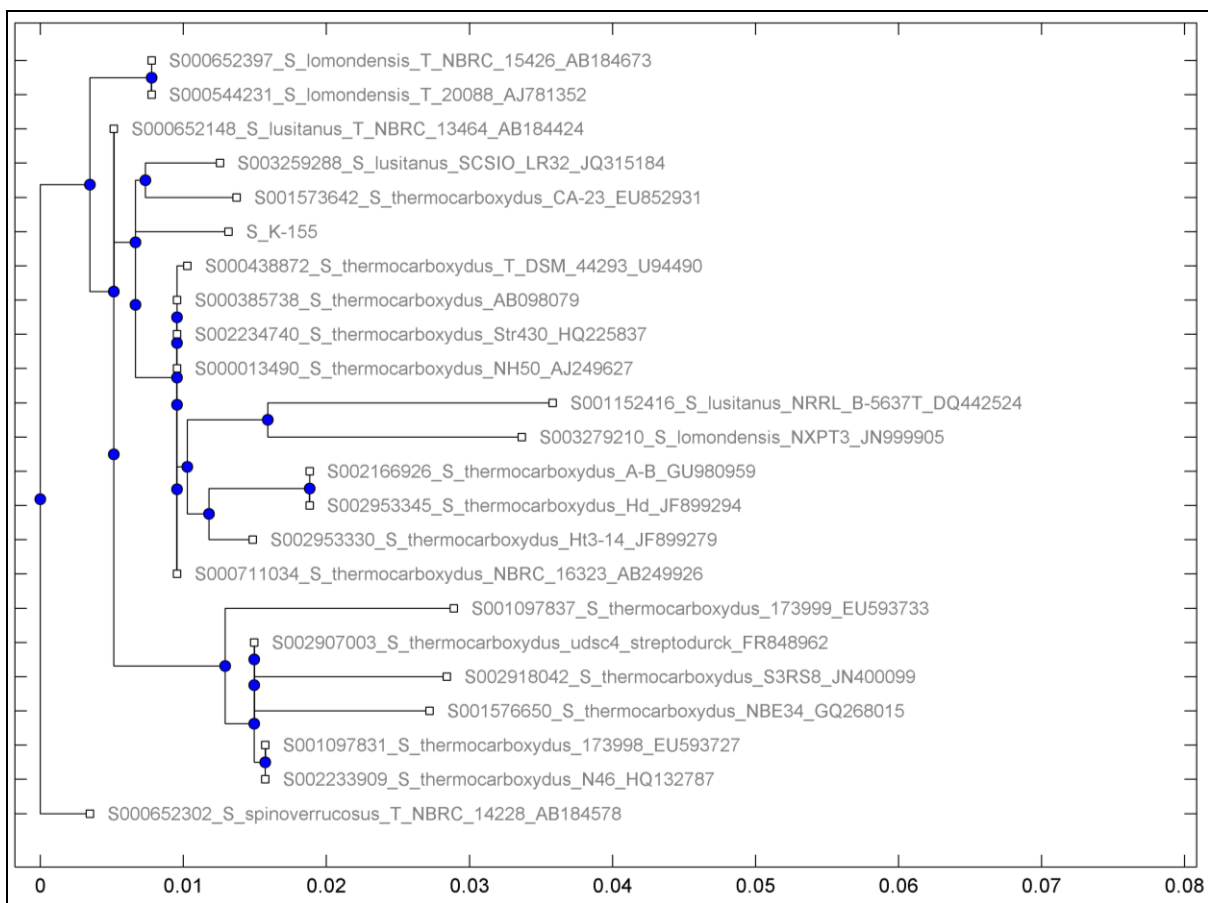


Figura 7. Arbol filogenético elaborado con la cepa K-155 y las especies más cercanas, *S. thermocarboxydus*, *S. lusitanus* y *S. lomondensis*. (Elaborado con ayuda del Dr. Eneas Aguirre von Wobeser).

A pesar de que no se ha determinado con certeza si la cepa K-155 pertenece o no a la especie *S. thermocarboxydus*, debido a la ambigüedad de los resultados obtenidos con la secuencia del DNA ribosomal 16S, su estudio posee relevancia ya que en el estudio y descripción de la especie de *S. thermocarboxydus* no se le encontró actividad antibiótica [53] lo cual incrementa la probabilidad de que los metabolitos aislados sean nuevos, por ello, se decidió continuar con la búsqueda de estos compuestos.

3.2 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Cuando se descubrió que la bacteria K-155 era capaz de inhibir a las cepas de prueba *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, se decidió buscar un medio de cultivo adecuado para la producción de los compuestos con actividad

antibiótica. Se probaron 6 medios de cultivo diferentes YMG, NMMP, MM, Caldo Nutritivo, Bennet y M4.

En medio NMMP y en medio YMG se observó actividad contra bacterias Gram Positivas como *Micrococcus luteus* principalmente y *Bacillus subtilis* en menor medida. Se observaron halos de inhibición de 20 mm de diámetro contra *M. luteus*. El efecto antibiótico se observó a partir de las 144 horas en medio YMG (Fig. 8) y a partir de las 48 horas en medio NMMP, sin embargo, la actividad contra *S. cerevisiae* se observó únicamente en el medio YMG. Esto nos indica que el tipo de metabolitos que se producen en cada medio son diferentes, pues los producidos en el medio YMG poseen una actividad con mayor espectro de acción o quizá se producen diversos metabolitos cada uno con una actividad específica contra un tipo de microorganismo, mientras que los metabolitos producidos en el medio NMMP son de un espectro de acción más específico.

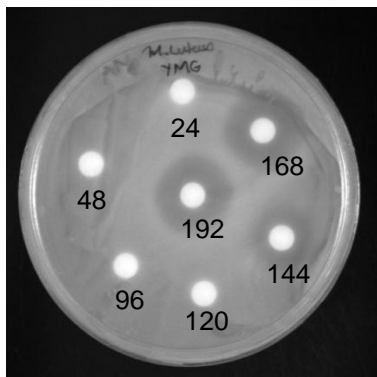


Figura 8. Resultados del ensayo de antibiosis del sobrenadante concentrado de YMG obtenido a diferentes tiempos de fermentación desde las 24 h hasta las 192 h contra *M. luteus*. La actividad se observa a partir de las 144 horas.

En los medios restantes no se observó actividad antibiótica, por lo que se eligió al medio YMG como el más adecuado para la producción de metabolitos secundarios bioactivos. En ninguno de los medios de cultivo empleados se obtuvo actividad contra bacterias Gram negativas. Con este resultado podemos descartar la pertenencia de los metabolitos activos al grupo de los aminoglucósidos, ya que éstos tienen actividad principalmente contra bacterias Gram negativas.

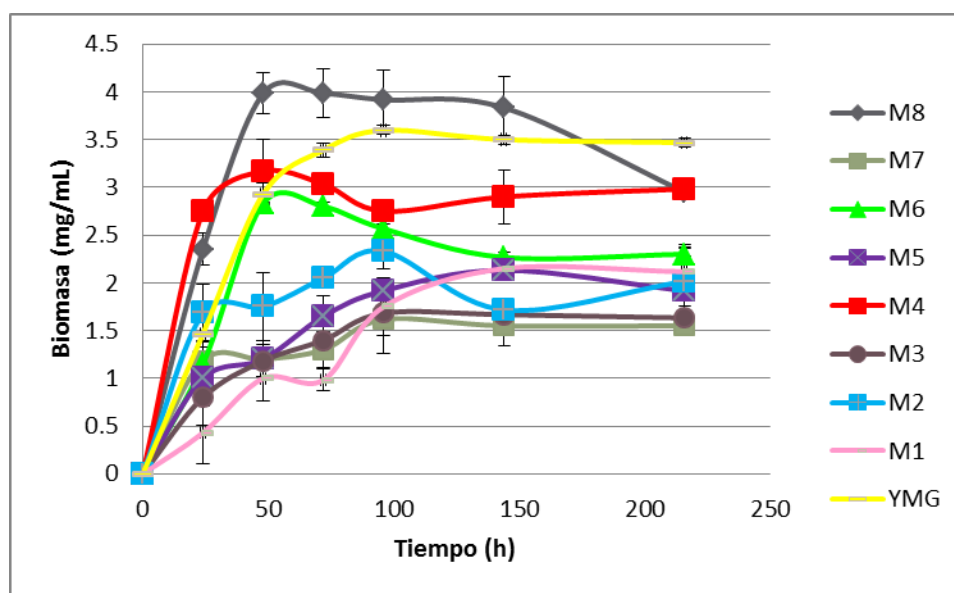
Existen reportes [8, 65, 78] de producción de metabolitos bioactivos (antifúngicos y antibióticos) en medios de cultivo que poseen entre sus componentes extracto de levadura y glucosa, por lo que tomándolos en cuenta y determinando que bajo las condiciones evaluadas se produjeron los metabolitos de interés en este medio, se eligió como el adecuado para realizar las fermentaciones de las cuales se llevaría a cabo la extracción de los metabolitos secundarios con actividad antibiótica.

La actividad antibiótica se observó en el sobrenadante del medio de cultivo, sin embargo, debido a que se encontró la actividad a tiempos tardíos de la fase estacionaria, se decidió determinar si la actividad era de tipo extracelular o intracelular.

El extracto intracelular se obtuvo por sonicación de cada tiempo de muestreo. Se separó el sobrenadante y el debris celular por centrifugación, ambas fracciones fueron empleadas para realizar ensayos de antibiosis, el sobrenadante colocado sobre un biofiltro y el debris sobre un pozo en el agar. En ningún caso se obtuvo actividad antibiótica, confirmando así que la actividad es extracelular.

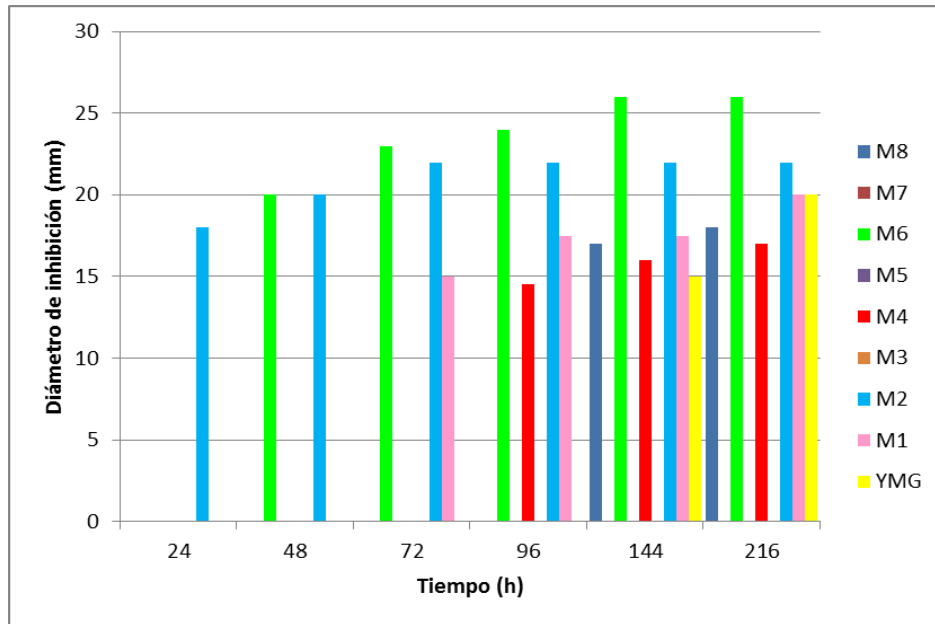
3.3 MODIFICACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Para mejorar la producción de los antibióticos, se realizó un diseño factorial de dos niveles con tres variables tomando como base al medio YMG, modificando las concentraciones de sus componentes ya que se conoce que los constituyentes del medio de cultivo son un factor importante en la producción de antibióticos [44]. En primer lugar se realizó la curva de crecimiento de los 8 medios de cultivo resultantes del diseño experimental (Gráfica 1.), en ella se observa que los medios de cultivo con mayor concentración de nutrientes como el medio 8, y en aquellos con un porcentaje mayor de extracto de levadura y de glucosa (medio 4 y 6) poseen una biomasa mayor.



Gráfica 1. Crecimiento de K-155 de *Streptomyces* sp. en los diferentes medios modificados.

La producción de los antibióticos se determinó por medio del incremento en el diámetro de los halos de inhibición. Los resultados se presentan en la gráfica 2.



Grafica 2. Efecto antibiótico en función del diámetro de inhibición de los diferentes medios de cultivo del diseño factorial 2³.

La gráfica anterior nos muestra que tanto el medio 2 como el medio 6 tienen producción de los antibióticos a un menor tiempo. Para el caso del M2 se produce desde las 24 horas, mientras que para el M6 a partir de las 48 horas. Recordando la composición de los medios (ver tabla 3), la similitud que se observa es que ambos tienen un porcentaje de extracto de levadura mayor y un menor porcentaje de extracto de malta, por lo que se infiere que la variación de estos componentes en el medio resulta esencial para la producción de los antibióticos. Según el análisis de los resultados de esta fermentación, se encontró que, individualmente, la modificación de la concentración de extracto de levadura ejerce un mayor efecto sobre la producción de los antibióticos, mientras que la modificación del extracto de malta es la que ejerce un menor efecto. Esto coincide con los resultados, ya que en todos aquellos medios que tuvieron un porcentaje elevado de extracto de levadura (2, 4, 6 y 8) hay producción de los metabolitos secundarios bioactivos tanto en mayor proporción como en menor tiempo.

A su vez, en todos aquellos medios de cultivo con el extracto de levadura elevado hay un mayor crecimiento, entonces se infiere que la mejor producción de los antibióticos se da en los medios de cultivo en los que el microorganismo crece bien, pero que aún se encuentra sometido a condiciones de estrés por la escasez de nutrientes o el consumo rápido de los mismos, lo cual lo induce a la producción de los metabolitos bioactivos. Por ello en el medio 8 donde todos los componentes se encuentran en mayor proporción, los metabolitos se producen a tiempos más largos de la fase estacionaria. En los medios que tienen menor concentración de nutrientes, principalmente de extracto de levadura como

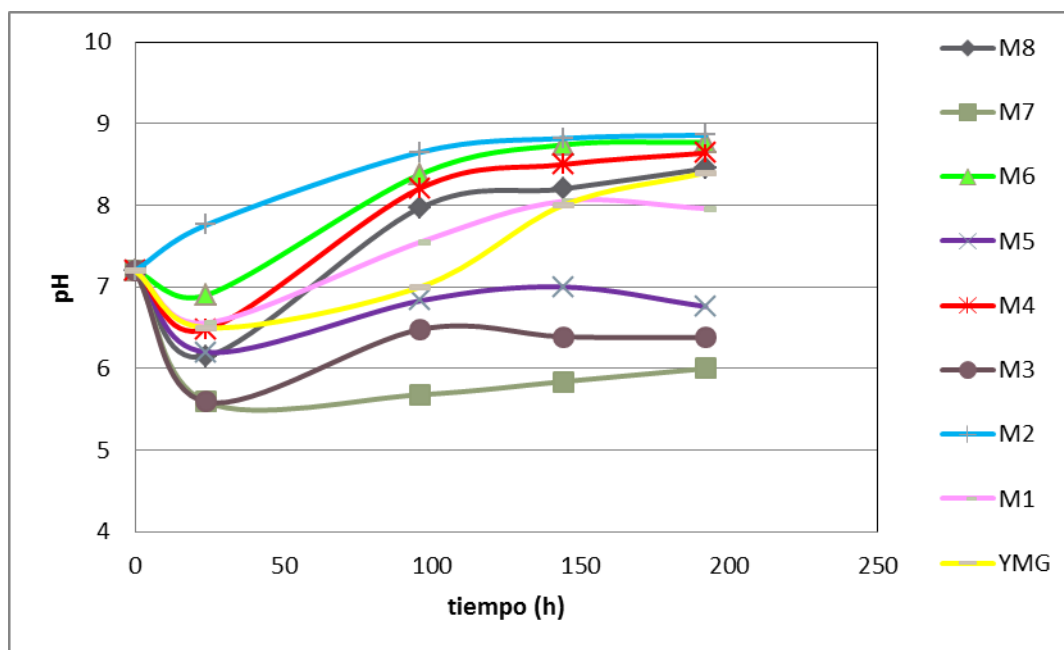
el 3, 5 y 7 no se producen antibióticos o al menos no en cantidad suficiente para ser efectivos debido al poco crecimiento del microorganismo.

Por otra parte, al evaluar la interacción entre los 3 componentes del medio de cultivo, se observó que al disminuir el porcentaje de glucosa se obtiene un mayor efecto sobre la producción de los antibióticos, por ello en el medio 2 con extracto de levadura elevado y glucosa disminuida se producen más rápido los metabolitos, sin embargo, el crecimiento también se ve limitado porque se consume la glucosa en menor tiempo, llegando a la fase estacionaria a partir de las 24 horas, por lo tanto se detiene la producción del metabolito. En contraste, en el medio 6 los metabolitos bioactivos empiezan a producirse a partir de las 48 horas. Sin embargo, como este posee una mayor concentración de glucosa, el microorganismo sigue creciendo por más tiempo y produce una mayor cantidad de metabolitos bioactivos.

A estos resultados se les puede sumar también el efecto que ejercen las fuentes de nutrientes, llamada represión catabólica. Para el caso de la glucosa la represión por fuente de carbono puede no considerarse, pues en general los reportes de represión catabólica por glucosa mencionan que esta ejerce un efecto represor a partir del 6% o incluso mayor, pues para la producción de doxorubicina por *S. peucetius* se necesita una concentración mayor a 100mM, [44,69] y la concentración mayor empleada para este estudio no rebasa los 35 mM. Por otra parte la fuente de nitrógeno puede también ejercer un efecto en la producción de antibióticos. A pesar de que no existe un consenso general sobre la influencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de antibióticos, pues algunos reportan un efecto inhibitorio mientras que otros reportan estimulación [70] se han realizado estudios de evaluación de nutrientes como el extracto de levadura y el extracto de malta [1,56,81]. También se menciona que la acumulación de los antibióticos en muchos casos aumenta después de que la fuente de nitrógeno ha sido consumida casi por completo, lo cual lleva a pensar que la fuente de nitrógeno presente en el extracto de levadura es más fácilmente metabolizable por la cepa K-155 que el extracto de malta. Sin embargo para determinarlo con certeza sería necesario realizar un estudio más profundo.

Durante este estudio se realizó también la determinación del pH del cultivo a lo largo de la fermentación (Gráfica 3). Ésta se realizó para verificar que éste no fuera un factor que influyera sobre el efecto antibiótico y que pudiera dar un falso positivo, así, después de realizar las determinaciones de pH, se realizó un control con los medios sin inocular, a los cuales se les ajustó el pH según cada determinación durante la fermentación, es decir entre un rango de 5 hasta 9, se concentraron de la misma manera que las muestras y se realizaron los ensayos de antibiosis con este concentrado. No se observó efecto de inhibición de los microorganismos de prueba por lo que el efecto inhibitorio no se debe al

pH. Por otra parte, se encontró que los medios en los que hay producción de los metabolitos se encuentran a un pH mayor a 7 (gráfica 3), por lo que se puede inferir que la fermentación debe encontrarse a un pH alcalino para observar el efecto antibiótico. Esto puede deberse a dos situaciones, ya sea que los metabolitos se producen o se secretan cuando la fermentación alcanza este pH, o quizá que los metabolitos son estables y/o activos a pH mayor a 7.



Gráfica 3. Valores de pH de los diferentes medios de cultivo a lo largo de la fermentación.

Con este diseño se encontró que el medio 6 (ver tabla 2) con un mayor porcentaje de extracto de levadura y glucosa y menor porcentaje de extracto de malta favorece la producción del metabolito secundario con actividad antibiótica, por lo que se decidió emplear este medio como el medio de fermentación para realizar todos los ensayos siguientes.

A continuación se realizó la fermentación empleando matraces Fernbach de 2800 mL con 1 L de medio de cultivo.

3.4 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS

El medio de cultivo (M6, Gráfica 2) en el cual se observó un mayor efecto inhibitorio fue tratado con disolventes orgánicos (hexano, éter etílico, tetracloruro de carbono, cloroformo, acetato de etilo, acetona, butanol, y metanol). Solo se observó actividad contra *M. luteus* y *S. cerevisiae*, en el extracto metanólico (Fig. 9), lo cual nos dió un

primer indicio de la naturaleza polar de los compuestos bioactivos. Los residuos insolubles en metanol y acetona también mostraron antibiosis, pero no fueron estudiados posteriormente.

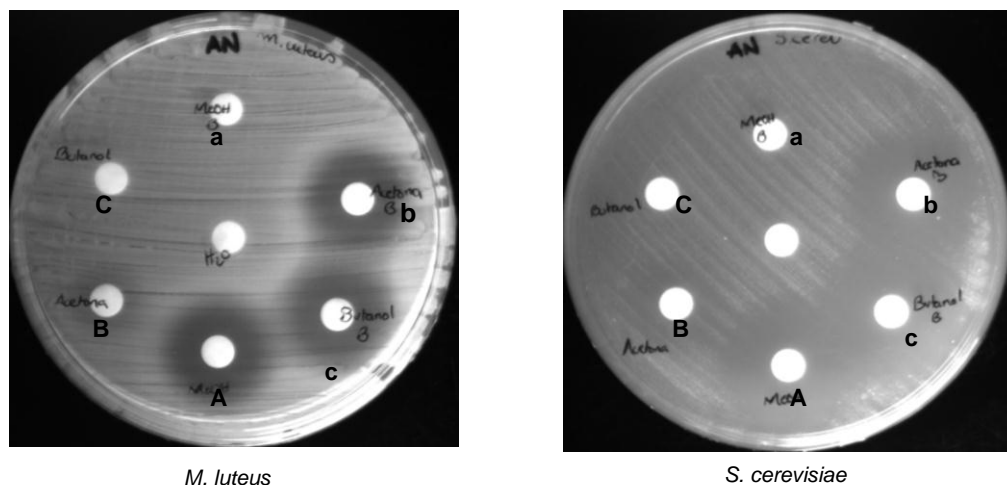


Figura 9. Antibiosis con los extractos de los disolventes polares sobre *M. luteus* y *S. cerevisiae*. A, B y C: extracto de metanol, acetona y butanol, respectivamente, del medio de cultivo; a, b, y c: residuo del sobrenadante no soluble en metanol, acetona y butanol, respectivamente.

Con este resultado podemos descartar algunos compuestos de tipo peptídico únicamente constituidos por aminoácidos, como el tioestreptón, ya que disolventes como el metanol los precipitan; esto debido a que estos disolventes tienen la propiedad de alterar la capacidad del agua para separar y solubilizar a los grupos cargados de algunas proteínas, por lo que estas interaccionan entre sí formando agregados. Sin embargo, existen compuestos con porciones peptídicas como los lipopéptidos o glicopéptidos que sí son solubles en metanol.

Con los disolventes orgánicos menos polares e inmiscibles con el agua no se obtuvo actividad antibiótica, y como se muestra en la Fig. 9, en el caso del butanol la actividad se mantuvo en los componentes que no se extrajeron con el disolvente y se mantuvieron en la fase acuosa.

Una vez determinada la actividad antibiótica del extracto metanólico, se realizó la prueba de termoestabilidad de los compuestos activos presentes en dicho extracto (Fig. 10) y en el sobrenadante crudo (datos no presentados). Para ello ambos materiales se concentraron y se sometieron a diferentes temperaturas, desde 37°C hasta 121°C por 20 minutos. Se realizó el ensayo de antibiosis con estas muestras y se encontró que el efecto inhibitorio se mantuvo lo que indicó que los compuestos bioactivos son termoestables. (Fig. 10). Esta propiedad resulta muy interesante e importante, ya que la resistencia a altas temperaturas nos permitió determinar que la purificación subsecuente se podía

realizar a temperatura ambiente sin necesidad de tener cuidados adicionales, además de que es una propiedad deseable en el manejo y preservación o almacenaje de este tipo de compuestos.

Los antecedentes de los antibióticos conocidos indican que por lo general los glicopéptidos son termolábiles como la vancomicina [62], por lo que este resultado nos permite inferir que los metabolitos activos no pertenecen a este grupo.

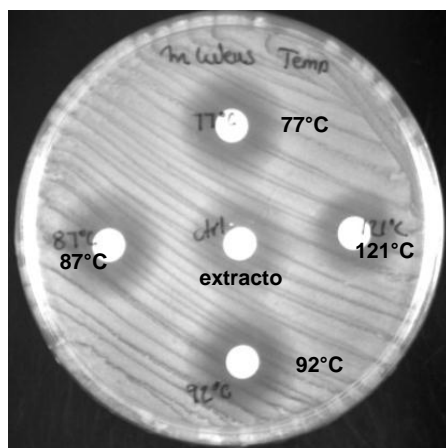


Figura 10. Actividad antibiótica contra *M. luteus* después de someter el extracto metanólico a temperaturas de 77, 87, 92 y 121°C durante 20 minutos.

3.5 FRACCIONAMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO

Una vez que se determinó la antibiosis y termoestabilidad del extracto de metanol, se realizó una separación por medio de una cromatografía en capa fina (CCF, Gel de Sílice) y se probaron diferentes mezclas de elución: hexano:acetona:agua (1:5:1) hexano:acetona:metanol (4:4:2) , acetonitrilo:agua (1:1, 7:3) y acetonitrilo:isoporopanol (1:1, 7:3) . Las cromatoplasmas fueron reveladas empleando luz UV y una mezcla de metanol:ácido sulfúrico 80:20. Como se observa en la Fig. 11, los mejores sistemas de elución fueron el conformado por hexano:acetona:agua en proporción 1:5:1 y acetonitrilo:agua 7:3 pues se observa una mejor separación de los componentes del extracto. En el primer caso la acetona proporciona una fase de polaridad media que permite que el hexano y el agua se mezclen.

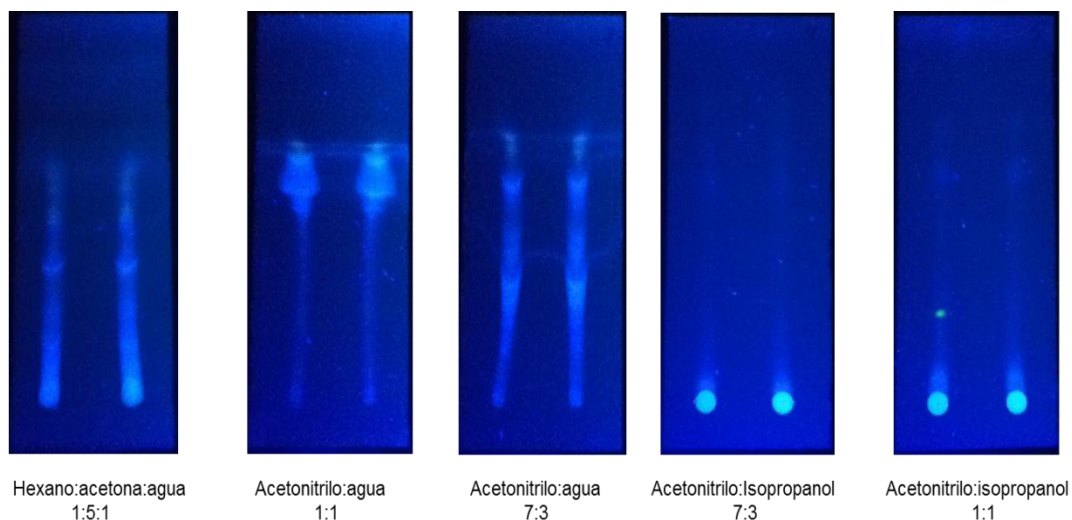


Figura 11. CCF del extracto metanólico en fase normal empleando diferentes sistemas de elución.

Como se mencionó en la descripción de la metodología, también se realizó CCF en fase reversa (Gel de Sílice C-18), pero como se observa en la Fig. 12, a pesar de que en la proporción acetonitrilo:agua 1:1 se observan varias manchas, la mayor parte de los componentes del extracto se encuentran en la parte superior de las cromatoplasas eluidas con proporciones de 4:6 y 1:1 indicando que no hubo una buena separación de los componentes del extracto. Se adicionó ácido acético para observar si se obtenía una mejor separación y/o definición de las manchas, sin embargo, el patrón es prácticamente el mismo con y sin ácido. En la proporción de 9:1 no hubo separación, por lo que se decidió que es mejor para el tipo de compuestos presentes en el extracto, un sistema de separación de fase normal empleando acetonitrilo:agua como sistema de elución a pesar de que no se trata del sistema más empleado, pues con una fase estacionaria normal usualmente se emplean disolventes menos polares como eluyentes, sin embargo, existen reportes que emplean este tipo de sistema con disolventes polares en cromatografía en columna [6].

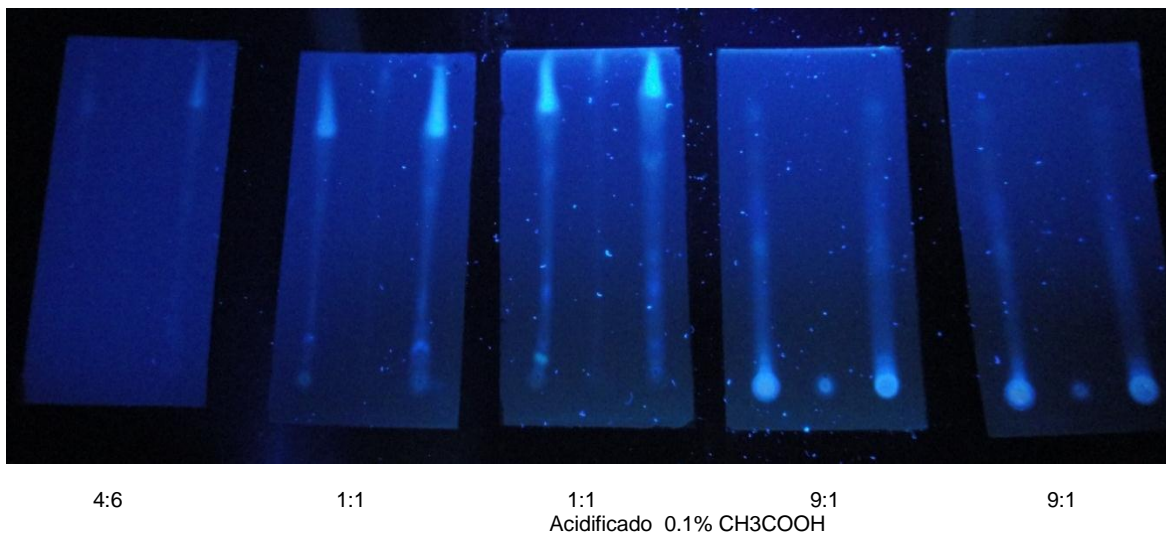


Figura 12. TLC del extracto metanólico en fase reversa empleando acetonitrilo:agua como sistema de elución en diferentes proporciones.

Para realizar la separación de los componentes activos del extracto metanólico se realizó cromatografía en capa fina preparativa (CCP, Gel de Sílice) usando como fase móvil hexano:acetona: agua (1:5:1). Los compuestos fueron observados como bandas utilizando una lámpara de luz UV a 254 y 365 nm. Se dividió la placa cromatográfica en 12 fracciones de mayor a menor polaridad, las cuales fueron analizadas por medio de ensayos de antibiosis en placa encontrándose que las fracciones 2 y 3 mantuvieron actividad (Fig.13). El R_f de estas fracciones fue de 0.15 y 0.18 respectivamente, es decir se encontraron muy cerca del punto de aplicación confirmando el carácter polar de los metabolitos al ser retenidos por la sílica.

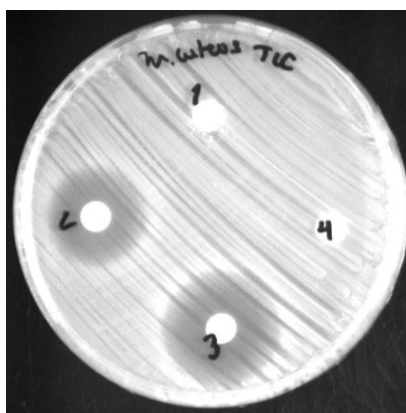


Figura 13. Ensayo de antibiosis contra *M. luteus* de las primeras 4 fracciones de la cromatografía en capa fina preparativa del extracto en MeOH eluída con Hexano:acetona:agua 1:5:1. Las fracciones 2 y 3 se refieren a las bandas activas recuperadas con R_f de 0.15 y 0.18 respectivamente.

Se realizó el mismo procedimiento (CCP) con la segunda mezcla de elución (acetonitrilo:agua, 7:3), logrando separar 12 fracciones, de las cuales el efecto antibiótico se observó en las fracciones 1 y 2 (Fig. 14), siendo la fracción 1 el punto de aplicación, el Rf de la fracción 2 fue de 0.06 lo que nos indica que se mantuvo muy cerca del punto de aplicación y que el metabolito es muy polar.

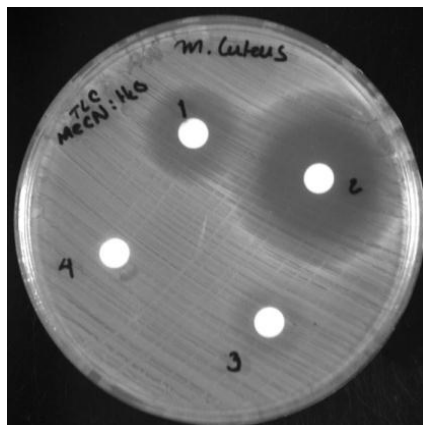


Figura 14. Ensayo de antibiosis contra *M. luteus* de las fracciones activas obtenidas a partir de la CCP del extracto en MeOH, eluida con acetonitrilo:agua 7:3. Fracciones 1 y 2 con actividad biológica.

Tanto a estas fracciones, como a las de las mezcla de elución anterior, se les determinó su espectro absorción en el UV (190-400 nm; H₂O), para conocer la longitud o el rango al cual absorben los compuestos activos, y en todos los casos se obtuvo un pico con longitud de onda menor a 200 nm (Fig. 15), lo cual nos proporciona un indicio de que los metabolitos no poseen dobles enlaces conjugados que permitieran observarlos en el rango de la luz UV, de 200-400nm.

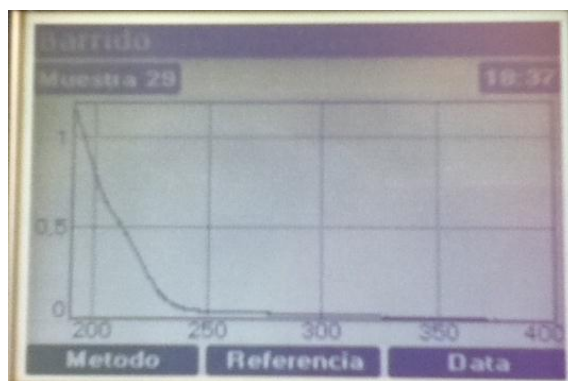


Figura 15. Espectro de absorción UV de la fracción 20 de la CCP eluica con acetonitrilo:agua 7:3.

Posteriormente, se procedió a separar los constituyentes del extracto metanólico por cromatografía en columna (Gel de Sílice). Para ello se empleó el extracto metanólico concentrado en rotavapor (1.5 g.) proveniente de 1 L de cultivo. Se empleó un gradiente de hexano-metanol para realizar la elución, en primer lugar hexano 100% y posteriormente incrementando la cantidad de metanol (50:50) hasta terminar con metanol 100%. Al final después de eluir repetidas veces con metanol 100%, aún se observaban pigmentos retenidos en la columna por lo que se decidió hacer una elución final con agua destilada. Todas las fracciones obtenidas fueron empleadas para realizar ensayos de antibiosis encontrando que los compuestos con actividad antibiótica habían permanecido en la columna y se habían recuperado hasta la última elución con agua. Esto nos conduce a la conclusión de que el o los metabolitos bioactivos son sumamente polares y que al adsorberse en la sílica, es necesario emplear un disolvente tan polar como el agua para recuperarlo. Esta característica polar nos da pauta para pensar que no se trata de metabolitos con baja o nula solubilidad en agua como la daptomicina (lipopéptido) [77] y las estreptograminas [97,98]

Debido a la fuerte interacción entre la sílica y los metabolitos activos, se decidió entonces emplear el otro sistema de elución probado (acetonitrilo:agua) el cual además no representa un problema con la miscibilidad y facilita la separación de los componentes del extracto por polaridad. El extracto metanólico se evaporó, se obtuvieron nuevamente aproximadamente 1.5 g, los cuales se resuspendieron en una mezcla de acetonitrilo:agua, 7:3, se empleó un gradiente desde el 100% de acetonitrilo hasta el 100% de agua. De esta cromatografía se colectaron 39 fracciones, las cuales fueron probadas por ensayo de antibiosis encontrando actividad desde la fracción 18 hasta la fracción 22, siendo las fracciones 19,20 (50% ACN/50 %H₂O) y 21 (40% ACN/60% H₂O) las más activas (Fig.16). Cabe resaltar que con esta elución se eliminan la mayor cantidad de compuestos coloridos sin actividad antibiótica en las fracciones previas, 16 y 17, por lo cual la purificación subsecuente resulta más fácil. El rendimiento en total de la suma de estas fracciones fue de aproximadamente 8 mg por cada litro de sobrenadante.

Se probó también la resina Amberlite XAD7H (Sigma-Aldrich) para intentar extraer los metabolitos por adsorción. Sin embargo, los metabolitos no se adhirieron a esta y permanecieron en el sobrenadante. Esto también nos indicó su gran afinidad y solubilidad en agua, por lo cual fue necesario continuar con la metodología antes empleada.

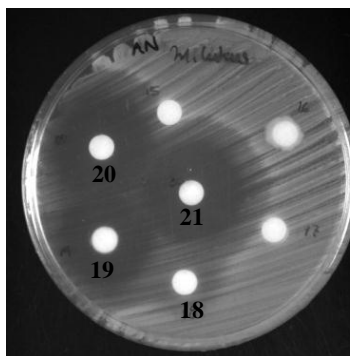


Figura 16. Ensayo de antibiosis contra *M. luteus* de las fracciones activas (19-21) de la cromatografía en columna eluída con acetonitrilo:Agua.

3.6 PURIFICACIÓN DEL METABOLITO SECUNDARIO BIOACTIVO.

Las fracciones activas (19-21) obtenidas en la columna eluída con acetonitrilo agua, se separaron en sus constituyentes por medio de HPLC. Para ello se empleó un cromatógrafo VARIAN PRO STAR con detector UV-VIS y una columna de Macherey-Nagel C18 Pyramid, compatible con disolventes 100% acuosos. Esta columna se empleó ya que tiene la ventaja de poseer cadenas de carbono unidas a grupos OH en algunas de las cadenas lo que permite que interaccionen tanto compuestos muy polares como otros menos polares e incluso permite la interacción de regiones polares y no polares de una molécula al mismo tiempo como se observa en la Fig. 17.

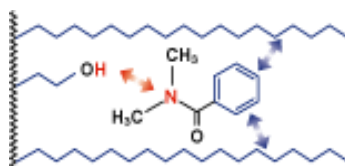


Figura 17. Representación de la interacción entre una molécula y la columna de HPLC. Tomada del catálogo de Macherey-Nagel Ed. VII.

En estas condiciones se encontró que la mejor separación se obtuvo con un método isocrático de agua al 100% con un flujo de 1ml/min y con el detector 220 nm. Con esta separación se obtuvieron varios picos pequeños y un pico mayoritario (Fig. 18). Debido a que la separación inicial se realizó de la fracción 19 de la cromatografía en columna, se esperaba que el pico mayoritario fuera el correspondiente al metabolito activo. Se realizó la separación de los picos por minuto para confirmar que el pico mayoritario fuera el compuesto biológicamente activo. Se colectaron los siguientes picos: 2.5 min., los picos entre los minutos 3 y 4, los picos entre los minutos 4 y 5, 5.1 min, la fracción entre 6 y 7 minutos y finalmente el pico mayoritario de 7 a 9 minutos que se fraccionó en 3 porciones de 1 minuto cada una. De las fracciones recolectadas se encontró actividad por medio del

ensayo de antibiosis a partir del minuto 7 al minuto 9 (Fig.19), lo cual confirmó que el pico mayoritario corresponde con el compuesto activo. El mayor efecto inhibitorio se obtuvo del minuto 8 al 9 que es donde se encuentra la mayor parte del compuesto.

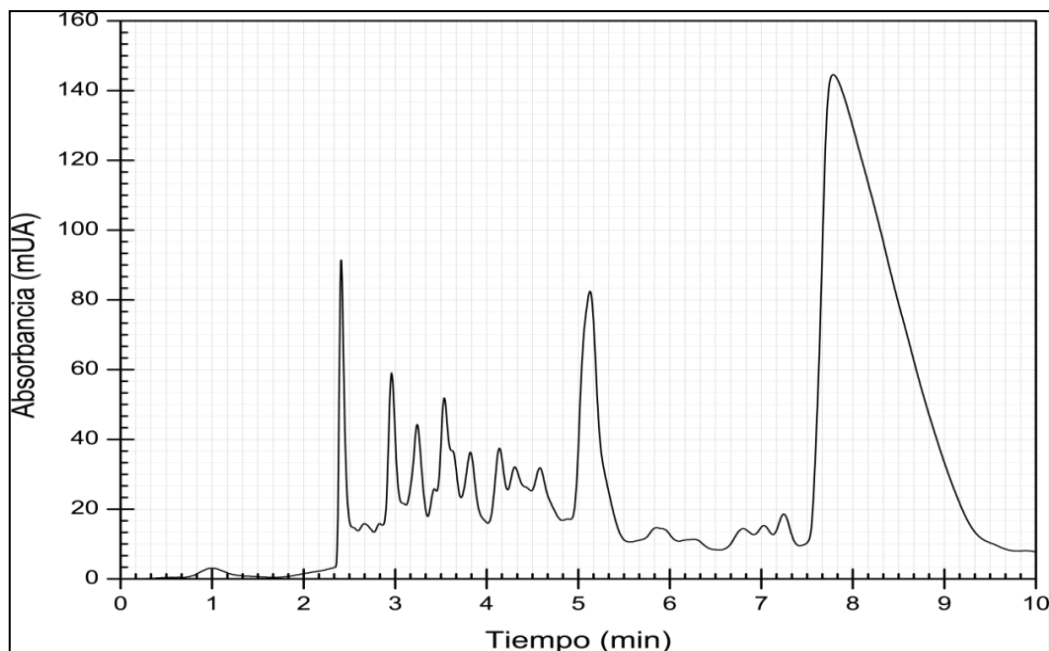


Figura 18. Cromatograma de la purificación por HPLC de la fracción 19 obtenida de la cromatografía en columna. Método isocrático con agua 100%.

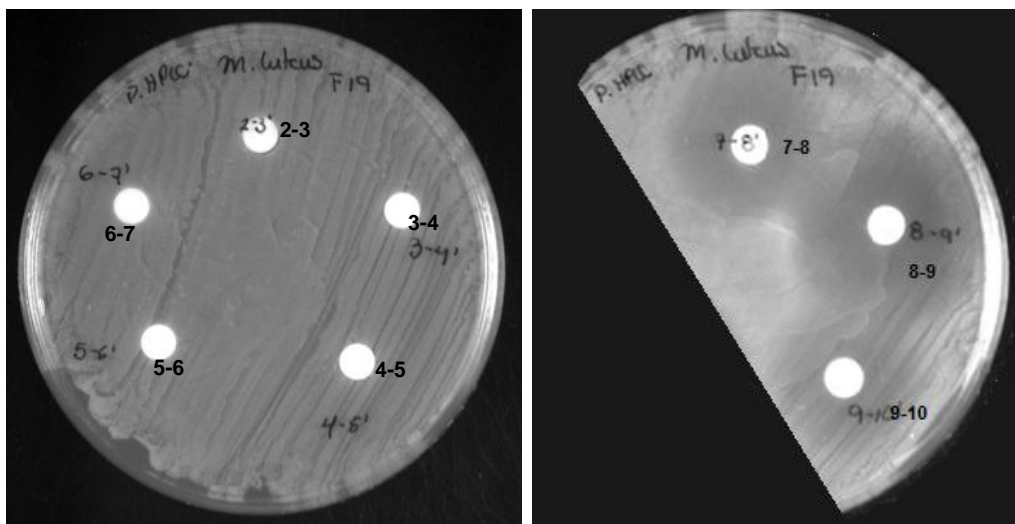


Figura 19. Ensayo de antibiosis contra *M. luteus* de las fracciones por minuto de la purificación por HPLC. Cada biodisco representa una fracción colectada correspondiente a un minuto, desde el minuto 2 hasta el 9. Minutos 7-8, 8-9 y 9-10 resultaron las fracciones activas.

Sin embargo, al repetir este método de purificación para obtener la totalidad del metabolito secundario bioactivo presente en las fracciones 19-21, se encontró que el perfil de elución cambió, observándose una amplia curva en lugar del pico observado a los ocho minutos, lo cual nos hizo pensar que el compuesto se estaba degradando, sin embargo al determinar el pH del agua ésta se encontraba a pH = 5 quizá por el tiempo que llevaba almacenada, así que la afectación en el compuesto que impedía la obtención de un pico como anteriormente se había observado se debía al pH ácido. Esto nos lleva a pensar que el antibiótico es estable a pH neutro e incluso ligeramente alcalino, ya que recordando el diseño factorial 2^3 de la modificación del medio de cultivo, la actividad antibiótica se observaba incluso cuando el sobrenadante estaba en un pH cercano a 9. Tomando en cuenta esta variación del agua empleada, se decidió emplear un eluyente que actuara como el agua pero sin acidificar el pH. Se seleccionó el buffer de acetato de trietilamonio (TEAA) ya que permite mantener un pH de 7, es ampliamente utilizado en HPLC con columnas de fase reversa y es muy volátil.

Bajo estas condiciones se probaron nuevamente diferentes gradientes, en primer lugar se eluyó la muestra con un gradiente de TEAA, pH=7 + acetonitrilo hasta el 10% a los 15 minutos, se colectaron 6 fracciones, 2.5 - 4, 4 - 5, 5 - 6, 6 - 7, 7 - 8.5 y de 15 - 16.5 minutos (Figura 20).

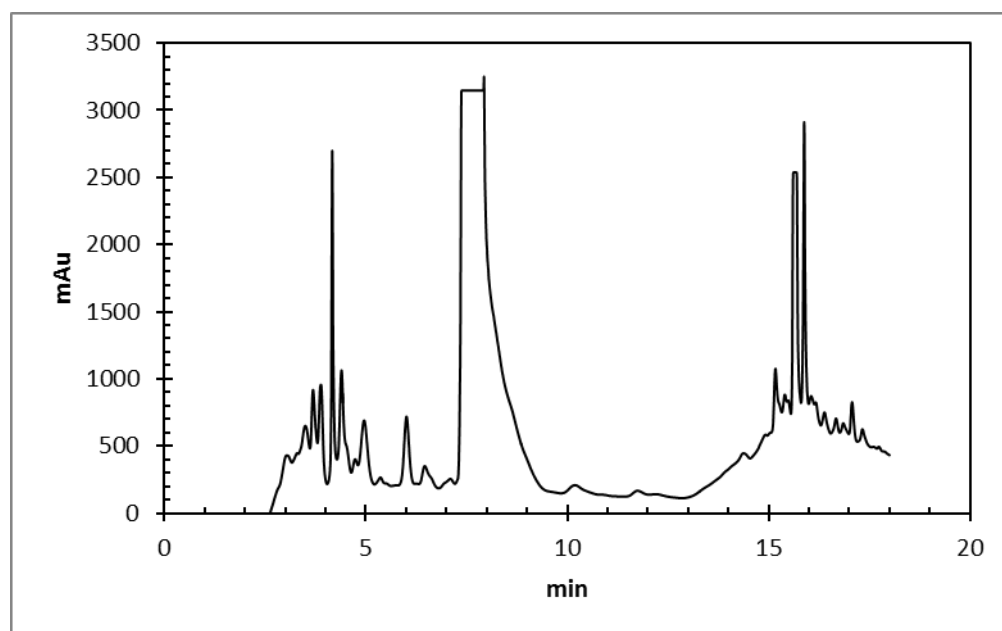


Figura 20. Cromatograma de la purificación por HPLC de la fracción 20 de la cromatografía en columna con. Gradiente de TEAA/acetonitrilo.

Con este nuevo sistema de elución se colectaron tres fracciones activas: de 6 a 7 min, de 7 a 8.5 min y de 15 a 16.5 min, ésta última con menor actividad (Fig. 21). Esto nos puede

sugerir la presencia de más de un metabolito secundario activo y el hecho de que durante la extracción, el fraccionamiento y la purificación se hayan aislado y prácticamente mantenido juntos puede darnos una pista de que se tratan de moléculas muy similares. También se empleó en el ensayo de antibiosis el buffer de TEAA tratado de la misma manera y se determinó que éste no posee actividad antibiótica, por lo que los halos de inhibición observados corresponden al metabolito de interés

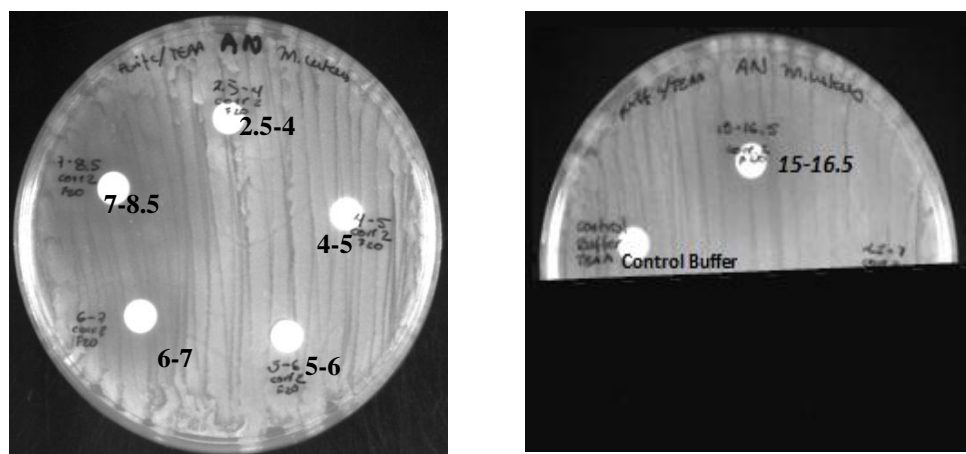


Figura 21. Ensayo de antibiosis contra *M. luteus* de las fracciones colectadas del HPLC, eluidas con TEAA/Acetonitrilo. Fracciones activas: minuto 6-7 y 7-8.5 así como del minuto 15 al 16.5.

Al realizar la purificación únicamente con TEAA, se obtuvo un cromatograma muy similar al obtenido al eluir con agua (Fig. 22), se determinó nuevamente que el pico mayoritario entre 10 y 11 minutos corresponde al compuesto activo por lo que entonces se decidió realizar la purificación únicamente con TEAA.

Una vez que se purificó el pico correspondiente al antibiótico se evaporó a sequedad en rotavapor para eliminar el buffer, seguido por un lavado con agua milliQ, reptiendo el proceso varias veces y liofilizando. Al final del pre la evaporación se obtuvo un polvo blanco. Este polvo se resuspendió en agua MilliQ para pasarlo nuevamente por la columna de HPLC y realizar una segunda purificación para asegurar la presencia de un solo pico en la muestra. Esta vez se eluyó con agua 100% y nuevamente se colectó un solo pico con actividad antibiótica.

El polvo obtenido se llevó a sequedad completamente y con él se realizaron los análisis espectroscópicos, espectrométricos y la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Se obtuvieron aproximadamente 20 mg de 3L de fermentación, lo cual es un rendimiento bastante elevado comparado con el rendimiento total de 8 mg/L de las fracciones activas 19-21 obtenidas por cromatografía en columna.

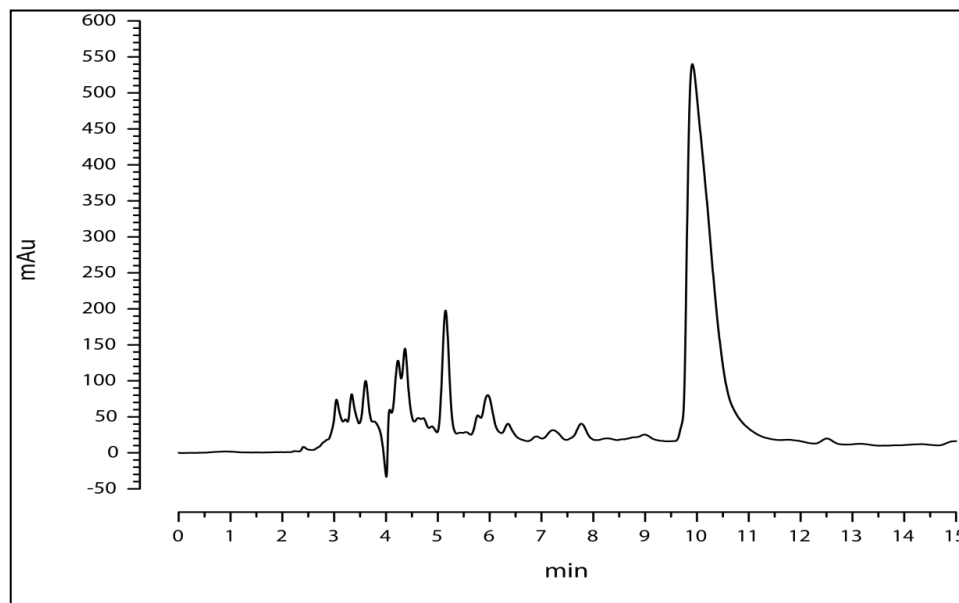


Figura 22. Cromatograma de la purificación de los compuestos biológicamente activos eluyendo isocráticamente con TEAA 100%

3.7 APROXIMACIÓN A LA ELUCIDACION ESTRUCTURAL

Al obtener el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) únicamente se observaron 3 señales, que al ser analizadas se determinó que correspondían al acetato de trietilamonio (TEAA) y al agua deuterada (Fig. 23 a), indicando que el buffer no había sido eliminado completamente. La muestra había sido sometida a 15 lavados empleando tanto el rotavapor como el Speedvac y finalmente liofilizando para eliminar el agua, y tomando en cuenta que el buffer es muy volátil resultó un poco extraño que permaneciera en la muestra, lo cual nos lleva a pensar que podría existir cierta interacción entre el TEAA y el antibiótico, quizá la formación de un aducto o de algún complejo, o quizá simplemente a pH = 7 quedó un residuo del TEAA cuando se lleva a sequedad, y de alguna manera co-eluyó con el antibiótico de interés al momento de realizar la segunda purificación. Sin embargo al realizar un análisis computacional del espectro con ayuda del programa MestreNova se observaron distintos picos no correspondientes al acetato de trietilamonio, indicando la presencia del antibiótico y dándonos algunas pistas sobre los grupos funcionales o enlaces que pudiera poseer la molécula (Fig. 23 b).

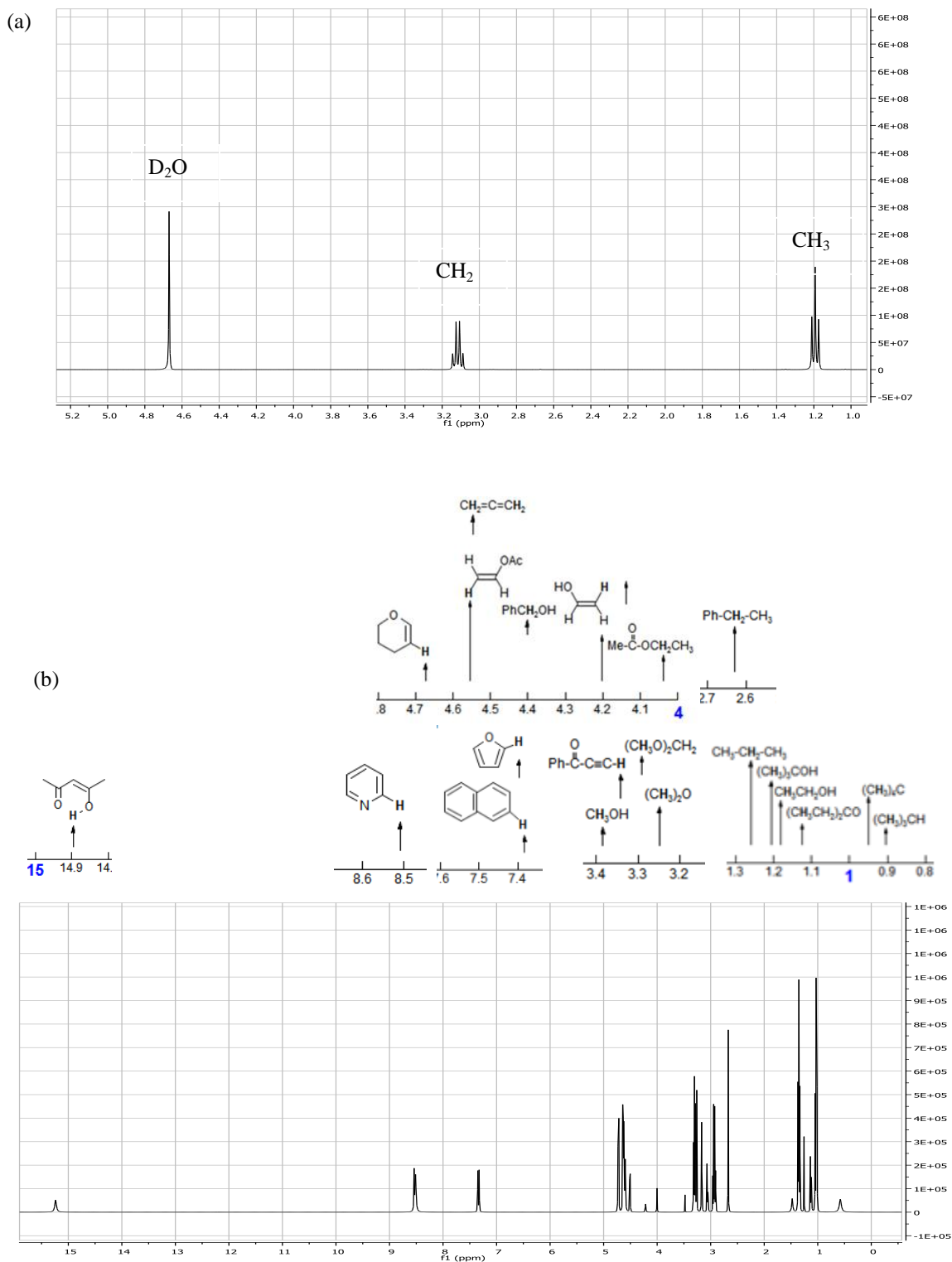


Figura 23. Espectros de RMN de protón. (a) espectro original donde las 3 señales más intensas corresponden a los hidrógenos del acetato de trietilamonio. (b) espectro ajustado, eliminando las señales del acetato de trietilamonio.

En el espectro de RMN ^1H ajustado se observan señales dentro de la región de C-H alrededor de 1 y 3 ppm al igual que en el espectro original, sin embargo, las señales más llamativas son las de 7.3 y 8.5 ppm que no corresponden al TEAA, por lo cual nos podrían sugerir la presencia de grupos aromáticos, heteroátomos o enlace N-H así como un pico a campo bajo (15 ppm) que puede tratarse de OH's unidos a átomos más electronegativos o formando puentes de hidrógeno con grupos carbonilo.

En los espectros de masas MS-IE y MS-FAB⁺ (Fig. 24 a y b respectivamente) se observan los picos correspondientes al buffer de TEAA. En el primer caso se obtiene un pico base de 86 m/z, sin embargo se observa un ión molecular correspondiente a 603 m/z. Este resultado nos apunta a la presencia de átomos de N de número impar, sin embargo la muestra fue completamente fragmentada, formando diversos picos de baja intensidad por lo que se procedió a observar el espectro de FAB. En este espectro se observa el pico del ión molecular del acetato de trietilamonio en 102 m/z, sin embargo, también se observa otro pico mayoritario de 239 m/z, el ión correspondiente al peso molecular en este caso se observa a 578m/z. Así pues, este espectro nos brinda mayor información sobre los fragmentos del antibiótico pues al ser de mayor peso molecular no corresponden al TEAA. Estos espectros se compararon empleando la base de datos del "massbank" [95], sin encontrar similitud con algún tipo de molécula. Las más cercanas fueron carotenoides y fragmentos o moléculas de tipo peptídico, sin embargo la molécula no posee colorido como los carotenoides ni presenta absorción en la región de 280 nm que es donde absorben las proteínas gracias a los aminoácidos aromáticos presentes en ellas, sin embargo esto no descartaría la presencia de péptidos no aromáticos o enlaces peptídicos.

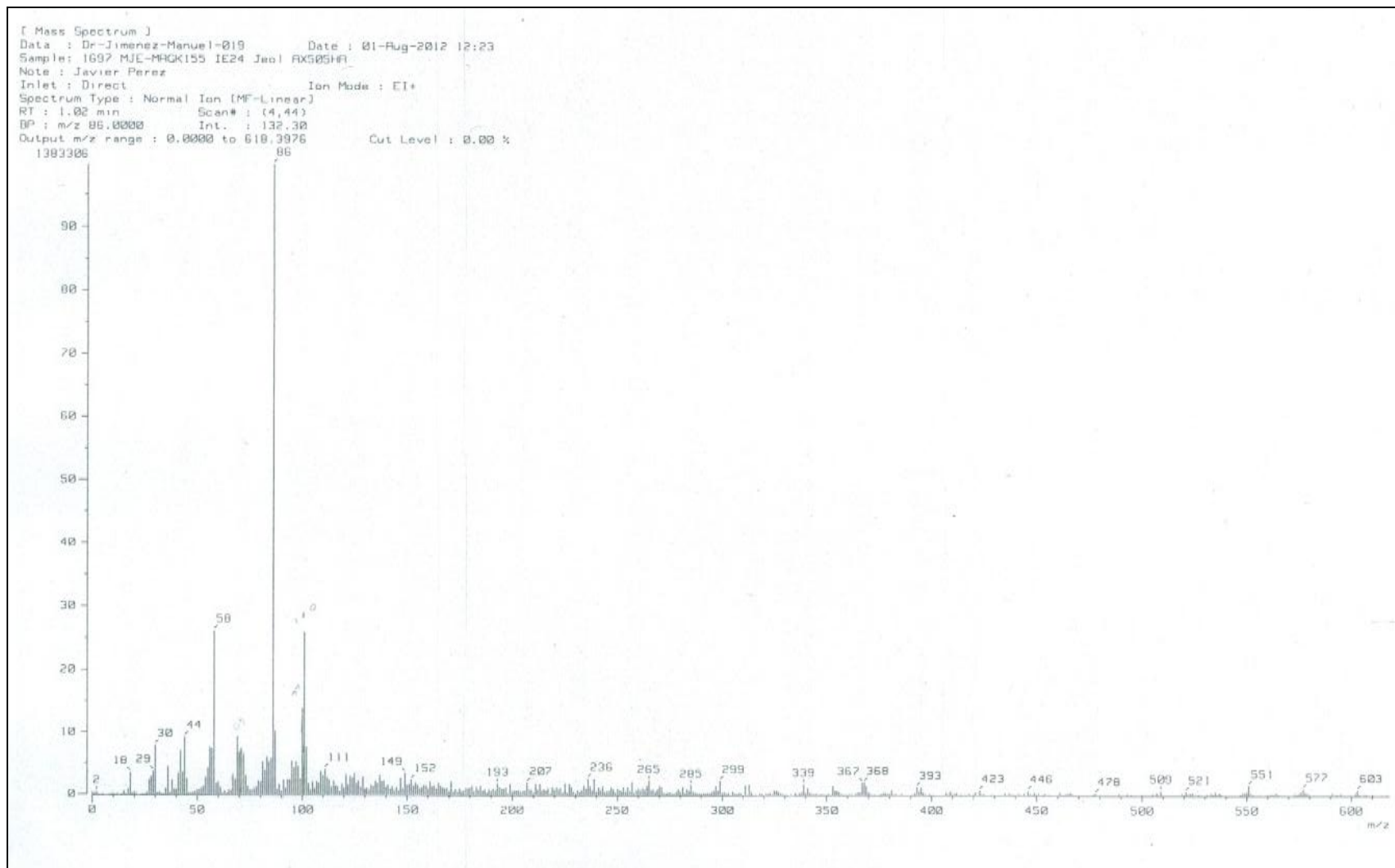


Figura 24a. Espectro de masas del compuesto purificado. IE-MS.

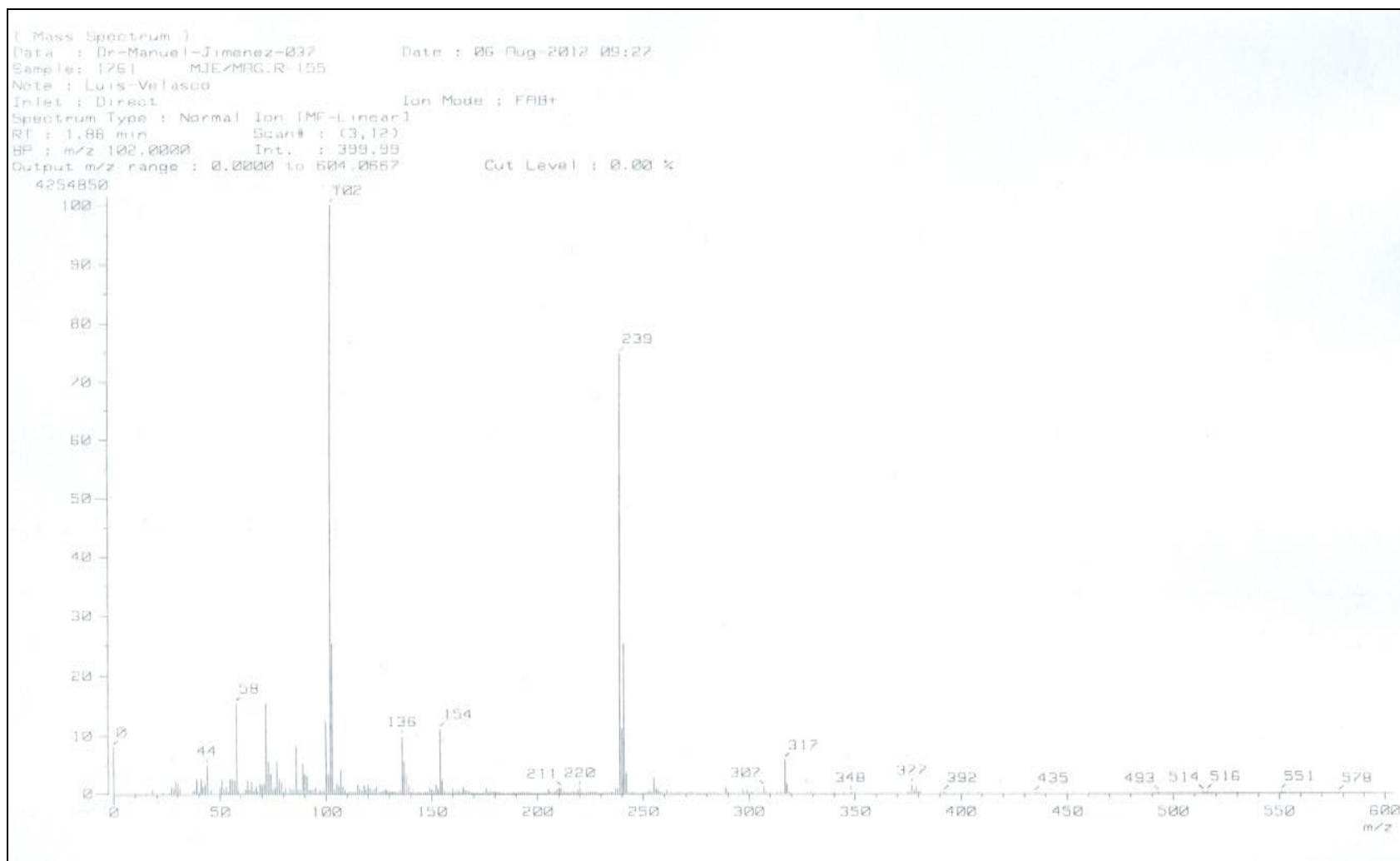


Figura 24b. Espectro de masas del compuesto purificado. FAB⁺-MS.

En el espectro de infrarrojo (Fig.25) se observan señales intensas cerca de 2900 cm^{-1} correspondiente a la unión C-H así como en 2400 y 2600 cm^{-1} que pueden tratarse de enlaces amino, sin embargo debido a que el buffer posee este tipo de enlaces no se puede descartar la pertenencia de las señales al TEAA, pues también se observa un pico a 1670 cm^{-1} característico de grupo carbonilo que de igual manera se puede encontrar en el antibiótico o en el grupo acetato del buffer.

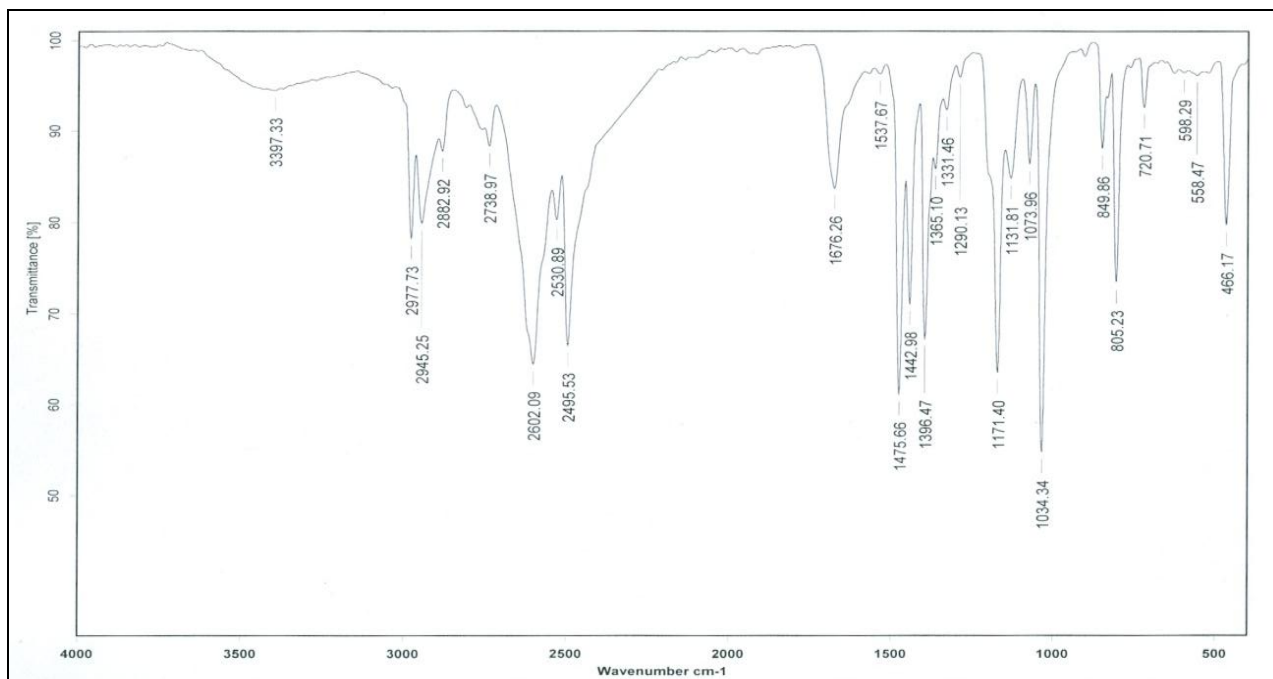


Figura 25. Espectro de Infrarrojo del metabolito purificado.

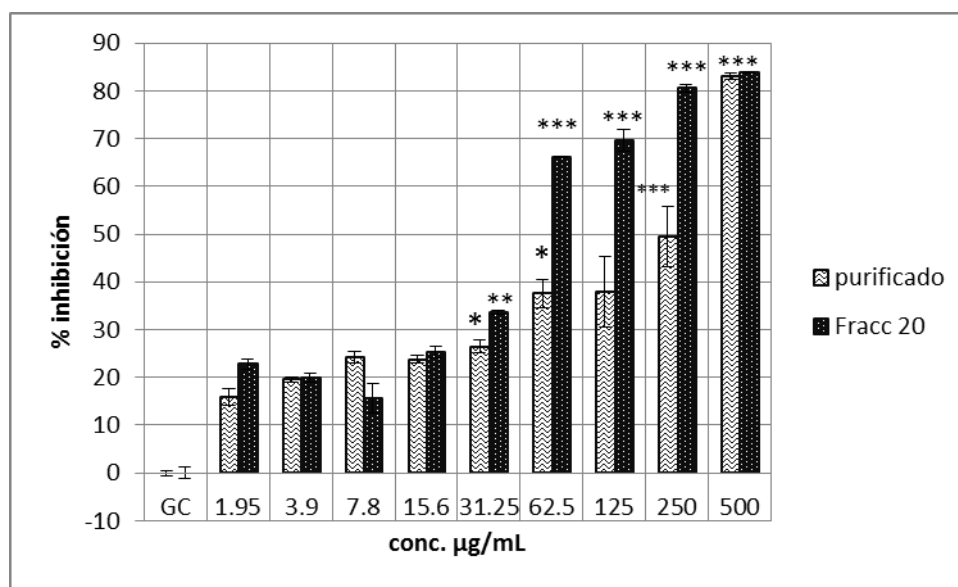
Finalmente, la información obtenida con base en los espectros presentados, resulta escasa para poder presentar o proponer una estructura química, sin embargo, con las características fisicoquímicas observadas como su elevada polaridad y solubilidad en agua, su absorción a una longitud de onda menor a 200 nm , la masa molecular de aproximadamente 600 m/z , los grupos funcionales que aparecen en el espectro de RMN y el espectro de acción antimicrobiano podemos recortar la pertenencia del metabolito a activo a dos grupos principalmente: los macrólidos y los sideróforos. No obstante, puede darse el caso de que el metabolito pertenezca a otra clase de antibióticos, incluso de los ya descartados, lo cual hablaría de que se trata de una nueva estructura.

3.8 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

El ensayo de concentración mínima inhibitoria se realizó para determinar la efectividad del antibiótico, pues como se mencionó anteriormente, una de las razones por las que se siguen buscando metabolitos bioactivos es encontrar compuestos que tengan un mejor efecto sobre los microorganismos de prueba.

Como se describió en el diseño experimental, este ensayo se realizó en placas de 96 pozos, en las cuales se inocularon las cepas de prueba, *Saccharomyces cerevisiae* y *Micrococcus luteus*, y en cada pozo se adicionó una concentración conocida del compuesto purificado. También se empleó la fracción activa número 20 proveniente de la cromatografía en columna eluída con acetonitrilo:agua.

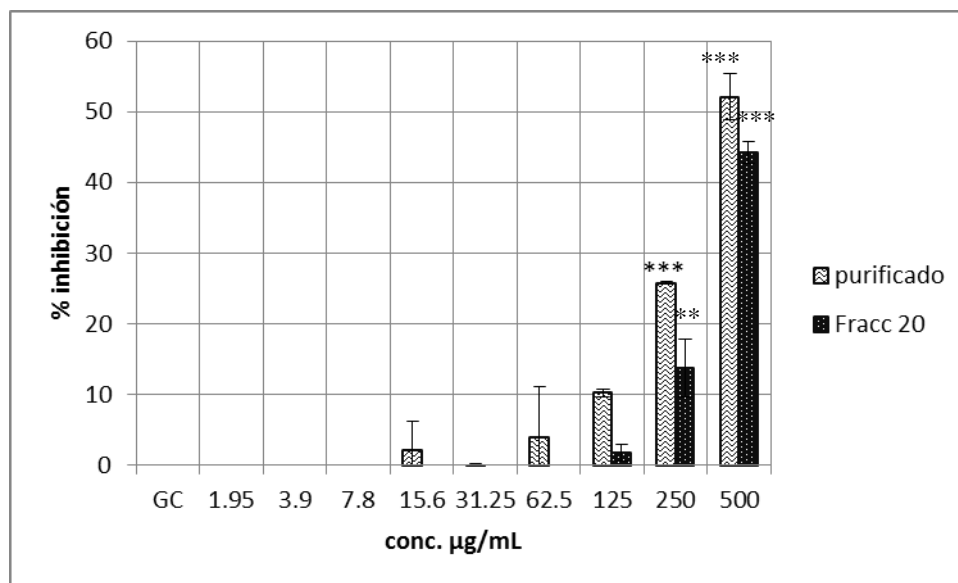
Después de incubar por 20 horas, se midió la absorbancia de cada pozo y se obtuvieron resultados que se resumen en las siguientes gráficas.



Gráfica 4. Determinación del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones del compuesto purificado contra *M. luteus*. Barras con líneas onduladas indican el compuesto obtenido después de la purificación con HPLC y las barras negras punteadas la fracción 20 obtenida de la cromatografía en columna. GC; control de crecimiento.

La gráfica del efecto inhibitorio contra *M. luteus* nos muestra que existe un efecto antibiótico, pues a partir de la concentración más pequeña probada (1.95 µg/mL) se observa inhibición comparada con el control de crecimiento, sin embargo al realizar el análisis estadístico empleando un análisis de varianza o ANOVA empleando el programa GraphPad Prism, se determinó que las concentraciones de 31.25 y de 62.5 µg/mL presentan una diferencia estadísticamente significativa comparadas con el control de

crecimiento, y que en las concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la diferencia es aún mayor para el compuesto purificado. Para el caso de la fracción 20 se encontró una concentración inhibitoria estadísticamente significativa también a partir de 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Grafica 5. Determinación del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones del compuesto purificado contra *S. cerevisiae*. Barras con líneas onduladas indican el compuesto obtenido después de la purificación con HPLC y las barras negras punteadas la fracción 20 obtenida de la cromatografía en columna. GC; control de crecimiento.

En el caso de *S. cerevisiae* la diferencia significativa se obtiene para las concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparadas con el control de crecimiento. Estos resultados son interesantes ya que, a pesar de que los controles positivos empleados (eritromicina contra *M. luteus* y cicloheximida contra *S. cerevisiae*) inhiben a los microorganismos de prueba a concentraciones mucho menores de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ambos son específicos para cada microorganismo, es decir la eritromicina no tuvo actividad contra *S. cerevisiae* y viceversa, la cicloheximida no inhibe a *M. luteus*, lo que nos dice que el antibiótico obtenido sigue siendo activo contra bacterias Gram positivas y levaduras incluso después de la purificación a diferencia de los antibióticos comerciales probados que solo son activos contra un tipo de microorganismo.

Con este mismo programa estadístico se calculó la concentración inhibitoria cincuenta o CI_{50} la cual dio los resultados presentados en las siguientes tablas.

Fracción evaluada	CI ₅₀ (µg/mL) contra <i>M. luteus</i>
Compuesto purificado	276.1
Fracción 20	35.81

Fracción evaluada	CI ₅₀ (µg/mL) contra <i>S. cerevisiae</i>
Compuesto purificado	489.3
Fracción 20	357.0

Para ambos microorganismos observamos un efecto inhibitorio a mayores concentraciones del antibiótico, sin embargo no se logró llevar a una concentración inhibitoria total, debido a que el antibiótico aún no se encuentra puro. Basándonos en que el antibiótico se encuentra en una proporción muy pequeña según los análisis químicos realizados pues el pico mayoritario en el espectro de masas corresponde al acetato de trietilamonio nos da un indicio de que el antibiótico tiene un efecto inhibitorio aún mayor a concentraciones menores, por lo que para determinar realmente la concentración mínima inhibitoria se necesitará el compuesto puro. Otro aspecto a observar en estos resultados es que el efecto inhibitorio es mayor sobre *M. luteus* que sobre *S. cerevisiae* pero en ambos casos la CI₅₀ es menor en la fracción 20 de la CC, esto nos dice que en dicha fracción existe una mayor cantidad de compuesto que en el extracto “purificado” por HPLC. No obstante, se necesitaría emplear el compuesto puro del metabolito para observar el efecto inhibitorio al 100%.

Finalmente, como se mencionó anteriormente en los ensayos de antibiosis realizados por el método de difusión en disco, se probó el buffer empleado para la elución por HPLC (acetato de trietilamonio) y se determinó que éste no ejerce un efecto antibiótico por lo que se determinó que el efecto observado se debe al compuesto bioactivo de interés.

4 CONCLUSIONES

La especie más cercana a la cepa K-155 es *S. thermocarboxydus*, sin embargo existen diferencias que con la información obtenida hasta el momento no permiten asociarla con certeza a esta especie dando un indicio de su posible pertenencia a una nueva especie lo cual fortalece la idea de que pueda tratarse de un antibiótico novedoso.

El medio óptimo para la producción de los metabolitos secundarios de la cepa K-155 resultó ser YMG, en el cuál son excretados al medio de cultivo. De éste, se recuperaron únicamente con metanol.

La modificación de la concentración de los nutrientes mediante un diseño experimental factorial 2^3 resultó en un incremento del efecto antibiótico.

Las propiedades encontradas fueron las siguientes:

- ✓ Es activo contra bacterias Gram positivas y levaduras pero no contra bacterias Gram negativas
- ✓ Soluble en agua y metanol
- ✓ Elevada polaridad
- ✓ Termoestable
- ✓ Estabilidad y mejor actividad en pH básico
- ✓ Pico de absorción a menos de 200nm
- ✓ Peso molecular de aproximadamente 600m/z

Estas características no son propias de todos los antibióticos por lo que nos permiten descartar antibióticos aminoglucosídicos, tetracilinas, macrólidos de tipo poliénico, beta lactámicos, la mayoría de los glicopéptidos y algunos lipopéptidos como la daptomicina, por lo que quizá se pueda proponer su pertenencia a la familia de los macrólidos o tratarse de un sideróforo, ya que la mayoría de las características arriba mencionadas corresponden a este tipo de moléculas. Sin embargo, falta realizar pruebas analíticas más específicas como la RMN de carbono que junto con la de protón nos permita realizar espectros bidimensionales que nos ayuden a elucidar su estructura junto con los estudios ya realizados.

PROSPECTIVA

Realizar nuevamente la purificación del metabolito secundario a mayor escala para obtener una mayor cantidad del mismo, y poder realizar los análisis estructurales restantes.

Una vez determinada la estructura, analizar si puede poseer otro tipo de actividades biológicas.

BIBLIOGRAFIA

- [1] **Abdelghani, T.** (2011). Production of antibacterial metabolites by strain no.10/2 (*S.albovinaceus*) and media optimization studies for the maximum metabolite production. *IJPI's J. Biotech. Biotherap.* 1(5).
- [2] **Andrews, J. M.** (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 5-16.
- [3] **Anderson A, Wellington E.** (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51. 797-814.
- [4] **Ashford, P.-A., & Bew, S. P.** (2012). Recent advances in the synthesis of new glycopeptide antibiotics. *Chemical Society reviews*, 41(3), 957-78.
- [5] **Asolkar, R. N., Maskey, R. P., Helmke, E., & Laatsch, H.** (2002). Chalcomycin B, a New Macrolide Antibiotic from the Marine Isolate *Streptomyces* sp. B7064. *Journal of Antibiotics*, 55(10), 893-898.
- [6] **Augustine, S. K., Bhavsar, S. P., & Kapadnis, B. P.** (2005). A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *Journal of biosciences*, 30(2), 201-11.
- [7] **Avalos, Mariana.** (2010). Caracterización Polifásica de una cepa de *Streptomyces* aislada de una región del Valle de Chalco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- [8] **Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Seguin, E., & Tillequin, F.** (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(6), 403-12.
- [9] **Baltz, R.H.** (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* 55, 186-196.
- [10] **Badrinath G.M. Balachandran L.** (2012) Antibacterial Agents from Actinomycetes-A Review. *Frontiers in Bioscience E4*, Jan 1, 240-253.

- [11] **Berdy, J.** (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58(1), 1-26.
- [12] **Brautaset, T., Sekurova O.N., Sletta, H., Ellingsen, T.E., Strlm, A.R., Valla, S., Zotchev, S.B.** (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7(6), 395-403.
- [13] **Cai, P., Kong, F., Ruppen, M. E., Glasier, G., & Carter, G. T.** (2005). Hygrocins A and B, Naphthoquinone Macrolides from *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Natural Products*, 68, 1736-1742.
- [14] **Cárdenas Catalina.** (2009). Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de Safranal. Tesis de maestría- Facultad de Química, UNAM.
- [15] **Cassel, G.H., Mekalanos, J.** (2001). Development of antimicrobial agwnts in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *JAMA* 285, 601-605.
- [16] **Ceylan, O., Okmen, G., & Ugur, A.** (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eurasian Journal of Biosciences*, 82, 73-82.
- [17] **Challis, G. L., & Hopwood, D.** (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl , 14555-61.
- [18] **Chater, K. F.** (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1469), 761-8. doi:10.1098/rstb.2005.1758
- [19] **Choma, I. M., & Grzelak, E. M.** (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1218(19), 2684-91. Elsevier B.V.
- [20] **Clardy, J., Fischbach, M. a, & Walsh, C. T.** (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nature biotechnology*, 24(12), 1541-50.

- [21] **Colegate, S.M., Molyneux, R.J.** (2008). Bioactive Natural Products, Detection, Isolation and Structural Determination. 2nd Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 78-80,
- [22] **Croteau,R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Chapter 24.
- [23] **Dyson, Paul.,** (2011). *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. Horizon Scientific Press. P.95, Cap. 4. *Streptomyces* Protein Secretion, Tracy Palmer and Matthew Hutching.
- [24] **Demain, A.L., & Fang, A.** (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 69, 1-39.
- [25] **Demain A.L., Sanchez S.** (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* 62, 5–16.
- [26] **Demain, A.** (2012). Industrial Microbiology. *Science*, 214(4524), 987-995.
- [27] **Driscoll, A. J., Bhat, N., Karron, R. a, O'Brien, K. L., & Murdoch, D. R.** (2012). Disk diffusion bioassays for the detection of antibiotic activity in body fluids: applications for the Pneumonia Etiology Research for Child Health project. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54 Suppl 2(Suppl 2), S159-64.
- [28] **Drucker, D.B.** (1987). Microbiological applications of HPLC. Cambridge University Press.
- [29] **Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., & Proksch, P.** (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature protocols*, 3(12), 1820-31.
- [30] **Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D., & Wellington, E. M.** (2001). Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(2), 127-33.
- [31] **Elias, B. C., Said, S., de Albuquerque, S., & Pupo, M. T.** (2006). The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. *Microbiological research*, 161(3), 273-80.
- [32] **Frank A. Settle.** (1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Ed. Prentice Hall. Chapter 15. P.249-251, 260-261.

- [33] **Garrod, LP.** Churchill Livingstone. (1981). Antibiotic and Chemotherapy; p. 131
- [34] **Guo, Y., Zheng, W., Rong X., Huang, Y.** (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **58**. 149-159.
- [35] **Haslam, E.** (1986). Secondary Metabolism. Fact and Fiction. *Natural Product Reports*.
- [36] **Harvey, A.** (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*, 5(7), 294-300.
- [37] **He, W.; Wu, L; Gao, Q.; Du, Y.; Wang, Y.** (2006). Identification of AHBA Biosynthetic Genes Related to Geldanamycin Biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Curr. Microbiol.* 52, 197-203.
- [38] **Hollstein, U.** (1974). Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chem Rev.* 74(6), 625-652.
- [39] **Hou, J.P.,** Poole, J.W. (1971). β -lactam antibiotics.: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60 (4).
- [40] **Huang, H., Yang, T., Ren, X., Liu, J., Song, Y., Sun, A., Ma, J., et al.** (2012). Cytotoxic angucycline class glycosides from the deep sea actinomycete *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32. *Journal of natural products*, 75(2), 202-8.
- [41] **Irith Wiegand, Kai Hilpert, Robert E.W. Hancock.** (2008). Agar and Broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3(2).
- [42] **Isoherranen, N., Soback, Stefan.** (1999). Chromatographic methods for Analysis of Aminoglycoside antibiotics. *Journal of AOAC International*. 82 (5).
- [43] **Ivanova, V., & Gesheva, Victoria Kolarova, M.** (2000). Dihydroniphimycin: New Polyol Macrolide Antibiotic Produced by *S. hygroscopicus* 15 Isolation and Structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, 53(6).
- [44] **Iwai, Y., & Omura, S.** (1982). Conditions for Screening of New Antibiotics. *Journal of Antibiotics*, 35(2), 123-142.

- [45] **Jensen, P. R.** (2010). Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(3), 219-24.
- [46] **John L. Holmes, Christiane Aubry and Paul M. Mayer.** (2007). Assigning Structures to ions in Mass Spectrometry. CRC Press.
- [47] **Jukes, T.H.** (1985). Some Historical Notes on Chlortetracycline *Clin Infect Dis.* (1985) 7(5): 702-707
- [48] **Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., & Walsh, C.** (2005). Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical reviews*, 105(2), 425-48.
- [49] **Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., & Venkateswarlu, Y.** (2010). Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333. *Research in microbiology*, 161(5), 335-45. Elsevier Masson SAS.
- [50] **Keller, N. P., Bennett, J., & Turner, G.** (2011). Secondary metabolism: then, now and tomorrow. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 48(1), 1-3.
- [51] **Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A.** (2000). Practical *Streptomyces* Genetics I. The John Innes Foundation p. 161-171.
- [52]
- [53] **Kim, B.S., Falconer, C., Williams, E., Goodfellow, M.** (1998). *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydotrophic species from soil. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 48, 59-68.
- [54] **Kodani, S., Kobayakawa, F., & Hidaki, M.** (2012). Isolation and structure determination of new siderophore tsukubachelin B from *Streptomyces* sp. TM-74. *Natural product research*, (August 2012), 37-41.
- [55] **Kurtböke, D. I.** (2012). Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(5), 1843-52.
- [56] **Kumar, S.N., Siji, J.V., Ramya, R., Nambisan, B., Mohandas, C.** (2012). Improvement of antimicrobial activity of compounds produced by *Bacillus* sp. associated with a Rhabditis sp. (entomopathogenic nematode) by changing carbon and nitrogen sources in fermentation media. *J. Microb. Biotech. Food Sc.* 1(6) 1424-1438.

- [57] **Lee, P. C., & Ho, C. C.** (1996). Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 73-75.
- [58] **Matsuo, Y., Kanoh, K., Jang, J.-H., Adachi, K., Matsuda, S., Miki, O., Kato, T., et al.** (2011). Streptobactin, a tricatchol-type siderophore from marine-derived *Streptomyces* sp. YM5-799. *Journal of natural products*, 74(11), 2371-6.
- [59] **McCarthy, P.J., Troke, P.F., Gull, K.** (1985). Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 131(4), 775-780.
- [60] **Miao, V., Coëffet-Legal, M.F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C.J., Wrigley, S.K., Baltz, R.H.** (2005), Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*. 151(Pt 5):1507-23.
- [61] **Neilands, J.B.** (1981). Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 715-731.
- [62] **Nieto, B.M., Perkins, H.R.** (1971) Physicochemical properties of Vancomycin and Iodovancomycin and their complexes with diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine. *Biochem J.* 123, 773-787
- [63] **Nowakowska, J., Halkiewicz, J., & Lukasiak, J. W.** (2002). TLC determination of selected macrocyclic antibiotics using normal and reversed phases. *Chromatographia*, 56(5-6), 367-373.
- [64] **P.P Hung, C.L.Marks, & P.L.Tardew.** (1965). Isolation and Characterization of a New Antibiotic , ABBOTT 29119 , from *Streptomyces erythreus*, 13(2), 216-217.
- [65] **Prapagdee B., Kuekulvong C., Mongkolsuk S.** (2008). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4(5):330-337.
- [66] **Reddy, P.P.** (2013). Avermectins. Recent advances in crop protection. Ed. Springer India. p.13-24.
- [67] **Rong, X., Huang, Y.** (2012). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA

- hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Sys. Appl. Microbiol.* 35: 7-18.
- [68] **Sanchez, S., Guzman, S., Avalos, M., Ruiz, B., Rodriguez, R., & Jimenez, M.** (2012). Microbial Natural Products : *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*.
- [69] **Sánchez, S. et al.** (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antib.* 63,442-459.
- [70] **Sánchez, S., Demain, A.L.** (2002) Metabolic regulation of fermentation processes. *Enz. Microbial Tech.* 31, 895-906.
- [71] **Santana, C., Segura, D., & Sanchez, S.** (1994). Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Revista latinoamericana de microbiología.* 36(2), 139-158. Asociación Mexicana de Microbiología.
- [72] **Sasaki, K., Rinehart, K.L., Antosz, F.J.** (1972). Chemistry of the Streptovaricin. *J. Antib.* (25)1.
- [73] **Satoshi Omura.** (2002). Macrolide antibiotics. Chemistry, biology and practice 2nd Edition. Academic Press.
- [74] **Shenin, Y. D., Novikova, I. I., & Suika Uarkaja, P. V.** (2010). Isolation and characterization of antibiotics produced by *Streptomyces chrysomallus* R-21 and *S. globisporus* L-242 strains. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(9), 854-864.
- [75] **Sivaramkrishna, H. Girish, M.** (2009). Microbes: an eternal source of innovative drugs. *Express Pharma.* 16-30 June.
- [76] **Sontag, B., Gerlitz, M., Paululat, T., Rasser, H.F., Wollny, I.G., Hansske, F.G.** (2006). Oxachelin, a novel iron chelator and antifungal agent from *Streptomyces* sp. GW9/1258. *J. Antib.* 59(10), 659-663.
- [77] **Steenbergen, J. N., Alder, J., Thorne, G. M., & Tally, F. P.** (2005). Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55(3), 283-8.
- [78] **Sultan, M.Z., Khatune, N.A., Sultana, Z., Bhulyan, S.A., Sadik, M.G., Choudury, M.A., Gafur, M.A., Rahman, A.A.** (2002). In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. *Biotech.* 1(2-4), 100-106.

- [79] **Touchstone J.C., Dobbins M.F.** Practice of Thin Layer Chromatography. 1983. 2nd edition. p. 22-42. Ed, John Wiley and Sons.
- [80] **Vannuffel, P., Cocito C.** (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*. 51(1), 20-30.
- [81] **Venkata Ratna Ravi Kumar Dasari, Murali Yugandhar Nikku and Sri Rami Reddy Donthireddy.** (2011) Screening of Antagonistic Marine Actinomycetes: Optimization of Process Parameters for the Production of Novel Antibiotic by *Amycolatopsis alba* var. nov. DVR D4. *J. Microbial. Biochem. Technol.* 3(5).
- [82] **Waksman A.S.** (1959). Strain specificity and production of antibiotic substances. X. Characterization and classification of species within the *streptomyces griseus* group. *Microbiol.* 45, 1043-1046.
- [83] Waksman Selman and antibiotics-ACS National Historical Chemical Landmarks (2007)
- [84] **Watts, J. L., & Shyrock, T. R. et al.** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals ; Approved Standard Third Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 28(8).
- [85] **Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D.** (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology*, 176(5), 386-90.
- [86] **Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R.** (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-75.
- [87] **Williams, D., Stone, M., Hauck, P., & Rahman, S.** (1989). Why are secondary metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *Journal of Natural Products*, 52(6), 1189-1208.

- [88] **Yu, J., Liu, Q., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q., Yan, J., Qi, X., et al.** (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*, 99(6), 2087-2091.
- [89] **Siminoff, P., Smith, R.M., Sokolski, W.T., Savage, G.M.** (1957). Streptovaricin I. Discovery and biologic activity. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 75, 576-583.

Páginas de internet consultadas:

- [90] <www.patentgenius.com/patent/3953594.html> Process for preparing bleomycin group antibiotics. Umezawa et al., Abril 27, 1976. Consultada por última vez el 5 de octubre de 2012.
- [91] <<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>>. Consultada por última vez el 25 de julio de 2012.
- [92] <<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>>. Consultada por última vez el 30 de agosto de 2012.
- [93] <<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>> Consultada por última vez el 30 de agosto de 2012.
- [94] <http://www2.chemistry.msu.edu/facilities/nmr/900Mhz/MCSB_NMR_applications.html> Consultada por última vez el 30 de agosto de 2012.
- [95] <<http://www.massbank.jp/?lang=en>> Consultada por última vez el 20 de agosto de 2012.
- [96] <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB04220>> Consultado por última vez el 18 de septiembre de 2012.
- [97] <www.drugfuture.com/chemdata/pristinamycin.html> Consultado por última vez el 3 de Octubre de 2012.
- [98] <www.druglead.com/cds/virginiamycin.html> Consultado por última vez el 3 de octubre de 2012.
- [99] <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00746>> Consultado por última vez el 4 de octubre de 2012.

ANEXO

Medios de Cultivo

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

TSB (Caldo soya tripticaseína)

Sustancia	Cantidad
Digerido pancreático de caseína	17.0 g
Digestión enzimática de harina de soya	3.0 g
Dextrosa	2.5 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
H ₂ O destilada	1.0 L

pH final = 7.2 Se esteriliza en autoclave.

YMG (Extracto de Levadura, Extracto de malta, Glucosa)

Sustancia	Cantidad
Extracto de levadura	4.0 g
Extracto de malta	10.0 g
Glucosa	4.0 g
Agua Destilada	1.0 L

NMMP (Liquid Minimal Medium. Hodgson, 1982)

Sustancia	Cantidad
(NH ₄)SO ₄	2.0 g
Difco Casaminoácidos	5.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6 g
PEG 6000	50.0 g
Elementos menores	1 mL
Agua Destilada	800 mL

Elementos menores	Cantidad
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.0 g
CaCl ₂ anhidro	1.0 g

Nota: Al momento de usar se añaden por cada 100 mL de medio:

15 mL de Buffer NaH₂PO₄/K₂HPO₄ (0.1M, pH = 6.8)

2.5 mL de fuente de Carbono al 20%

2.5 mL de Factores de crecimiento si los requiere

MM (Minimal Medium. Hopwood, 1967)

Sustancia	Cantidad
L-asparagina	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
Glucosa	10 g
Agua Destilada	1 L

Nota: La glucosa se añade después de esterilizar.

Caldo Nutritivo

Sustancia	Cantidad
Extracto de carne	3.0 g
Peptona de gelatina	5.0 g
Agua Destilada	1 L

Bennet

Sustancia	Cantidad
Glucosa	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
NZ-Amina A	2.0 g
Agua Destilada	1 L

M4 (Sacarosa y sales minerales)

Sustancia	Cantidad
Sacarosa	24.0 g
NH ₄ Cl	2.02 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
NaCl	5.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	20 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	50 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1 mg
Agua Destilada	1 L

YD (Extracto de Levadura y Glucosa)

Sustancia	Cantidad
Extracto de Levadura	10.0 g
Glucosa	10.0 g
Agua destilada	1 L