



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIPARASITARIO DE
TRES BACTERIAS PRESENTES EN SEDIMENTOS
MARINOS DE LA COSTA YUCATECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ITZEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ



YUCATÁN, SISAL

MÉXICO, D.F. 2016



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. María Isabel Aguilar Laurents

-VOCAL Q.F.B Adriana Guadalupe Mejía Chávez

-SECRETARIO Dr. Sergio Rodríguez Morales

-1er. SUPLENTE Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

-2 do. SUPLENTE Q.F.B Verónica Domínguez Valdez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES MARINOS

UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DIRECCIÓN: Dr. Rodríguez Morales Sergio

SUSTENTANTE: Sánchez Gutiérrez Itzel

TABLA DE CONTENIDO

I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 ENFERMEDADES PARASITARIAS.....	3
2.1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	4
2.1.2 <i>Giardia intestinalis</i>	6
2.1.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
2.2 BÚSQUEDA DE PRODUCTOS NATURALES.....	10
2.2.1 PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN MARINO (PNOM).....	10
2.2.2 DESVENTAJAS PARA EL AISLAMIENTO DE PNOM.....	12
2.3 PRODUCTOS NATURALES PROVENIENTES DE MICROORGANISMOS MARINOS.....	12
2.3.1 BACTERIAS EN LOS AMBIENTES ACUÁTICOS.....	13
2.4 PNM DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	14
2.4.1 FIRMICUTES.....	15
2.4.2 <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	18

2.4.3 ACTINOBACTERIA.....	21
2.4.4 PRODUCTOS NATURALES AISLADOS EN MÉXICO.....	23
2.4.5 <i>Streptomyces rubrogriseus</i>	23
2.5 PNMM CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA.....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	26
IV. HIPOTÉISIS.....	26
V. OBJETIVOS.....	27
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
6.1 MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN.....	28
6.2 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS OBJETO DE ESTUDIO.....	28
6.2.1 CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD BACTERIANA.....	29
6.3 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS EN PEQUEÑA Y MEDIANA ESCALA.....	29
6.5 DETERMINACIÓN DEL PÉRFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS Y ESTUDIOS DE DEREPLICACIÓN.....	31

6.5.1 SEPARACIÓN BIODIRÍGIDA DE LOS EXTRACTOS BIOACTIVOS.....	31
6.5.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	32
6.5.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	32
VII. DETERMINACIÓN DEL PÉRFIL FARMACOLÓGICO.....	34
7.1 LETALIDAD EN <i>Artemia salina</i>	34
7.2 BIOENSAYO DE SUCEPTIBILIDAD MICROBIANA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	35
7.3 ENSAYO DE TOXICIDAD EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA.....	37
7.4 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA POR EL MÉTODO DE SUBCULTIVOS.....	39
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
8.1 IDENTIDAD BACTERIANA.....	40
8.2 ESCALAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO.....	40
8.3 GENERACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.....	42
8.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	45
8.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA.....	46

8.6 PRUEBA DE SUBCULTIVOS DE LA FRACCIÓN SG 2 c1p F4 80:20.....	48
8.7 DETERMINACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y FRACCIONES.....	49
8.8 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).....	50
8.9 ESTUDIOS DE DEREPLICACIÓN.....	51
IX.CONCLUSIONES.....	54
X.PERSPECTIVAS.....	55
XI.BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i>	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	9
Figura 4. Antibióticos producidos por <i>Bacillus sp.</i> marinos a) lipoamida, b) macrolatrina, c) ácido graso y d) isocumarina.....	17
Figura 5. Antibióticos provenientes de <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura 6. Metabolitos aislados de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> marinos.....	20
Figura 7. Esquema general para la obtención de los extractos crudos.....	30
Figura 8. 1) Cromatoplaqueta de extracto crudo y fracciones de <i>Bacillus licheniformis</i> CHCl ₃ :MeOH 6:4 2) Cromatoplaquetas del extracto crudo y fracciones de <i>Streptomyces rubrogriseus</i> CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O 6:4:2, usando como revelador Ninhidrina.....	49
Figura 9- Cromatograma de la fracción SG2 c1p F4.....	50
Figura 10- Cromatograma de la fracción SG2 c1p F4 analizada mediante CL-EM en fase reversa.....	51

Figura 11- Cromatograma con los pesos moleculares identificados mediante el programa Masslynx.....	52
Figura 12- Espectro de Masas de la Piericidina A1.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. PNM aislados de microorganismos pertenecientes al género <i>Bacillus</i> ...	16
Tabla 2. Metabolitos activos aislados a partir de actinomicetos.....	22
Tabla 3- Metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria aislados de <i>Streptomyces</i> sp.....	25
Tabla 4. Resultados obtenidos en la identificación de las cepas mediante ADNr 16S.....	28
Tabla 5- Sistema de elución en SEFS.....	31
Tabla 6 Características de equipo y condiciones de análisis para espectrometría de masas.....	33
Tabla 7. Microorganismos seleccionados de la base de datos del laboratorio de productos naturales debido a sus propiedades inhibitorias.....	41
Tabla 8. Resultados de la evaluación biológica en <i>A. salina</i> y rendimientos de extractos crudo y fracciones obtenidas por EFS.....	44
Tabla 9. CMI de antibióticos de referencia frente a cepas ATCC.....	45
Tabla 10. CL ₅₀ del extracto SG 2 c1p de <i>Streptomyces rubrogriseus</i> y sus fracciones.....	46
Tabla 11. Fotografías de embriones observados a las 72 hrs.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
OMS	Organización Mundial de la Salud
uma	Unidades de Masa Atómica
PNOM	Productos Naturales de Origen Marino
FDA	Food and Drug Administration (siglas en inglés) Administración de Alimentos y Medicamentos
SCUBA	Self-Contained Underwater Breathing Apparatus (siglas en Inglés) Equipo autónomo de respiración
G-C	Guanina-Citosina
PNMM	Productos Naturales Marinos Microbianos
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid (siglas en inglés) ácido ribonucleico
AcCN	acetoniitrilo
AcOEt	acetato de etilo
CHCl ₃	cloroformo
H ₂ O	agua
MeOH	metanol
µg	microgramos
µL	microlitros
min	minutos
nm	nanómetros
mL	mililitros
<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
BaCl ₂	cloruro de bario
UFC	Unidad Formadora de Colonias
ATCC	American Type Culture Collection
rpm	revoluciones por minuto
EMB	eosina azul de metileno
MHB	Mueller Hinton Broth
DMSO	Dimetil sulfóxido
FET	Fish Embryo Toxicity (siglas en inglés) Ensayo de toxicidad en embriones de pez cebra
EPA	Environmental Protection Agency (en inglés) Agencia de Protección Ambiental
SEFS	Separación por Extracción en Fase Sólida
hrs	horas
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography (por sus siglas en inglés)
DDLE	Difracción de Luz evaporativa (Evaporative Light Scattering Detector siglas en inglés)
U.V-Vis	Ultravioleta-Visible
CL-EM	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS) Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
ESI	Ionización por Electrospray (ElectroSpray ionization en inglés)
CCF	Cromatografía en capa fina

I.INTRODUCCIÓN

En todo el mundo las enfermedades parasitarias están ampliamente distribuidas y constituyen uno de los principales problemas de salud pública, afectando primordialmente a los países en vías de desarrollo. Dichas enfermedades están consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las causas más importantes de morbilidad. Además se ven favorecidas por múltiples factores inmunológicos, fisiológicos y nutricionales dependientes de las condiciones socioeconómicas y culturales de los diversos países.

Las principales enfermedades provocadas por protozoarios son la malaria, la leishmaniasis y tripanosomiasis, las cuales cada vez van en aumento; por ejemplo, las estadísticas demuestran que se muere un niño cada 30 segundos por malaria.

Por otro lado existen diversos protozoarios que infestan el intestino humano, entre ellos se encuentran *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis*. En México, las enfermedades gastrointestinales se encuentran clasificadas como el segundo caso de morbilidad, con un porcentaje de 49.1% en niños y 53% de la población en general.

Otro protozoario de importancia clínica es *Trichomonas vaginalis*, ya que ocasiona una de las enfermedades de transmisión sexual más común en todo el mundo, ocasionando infecciones vulvovaginales; y en el hombre puede llegar a causar uretroprostatitis.

El Metronidazol, Tinidazol, Nitazoxanida, Paromicina y Anfotericina son fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de estas parasitosis, sin embargo, en el caso de la Paromicina y Anfotericina son inaccesibles para ciertos sectores de la población debido al elevado costo en el mercado. Adicionalmente, el último fármaco antiparasitario (Nitazoxanida) fue desarrollado hace 35 años. Por ello, es importante la búsqueda de moléculas más efectivas que estimulen los mecanismos de defensa de los hospederos.



Actualmente el ambiente marino representa un área de investigación prometedora para la búsqueda de compuestos bioactivos, de la cual ya se han obtenido fármacos novedosos y otras moléculas se encuentran en fase de desarrollo. Lo anterior, aunado a la gran biodiversidad microbiana presente en el mismo, ha permitido que dichos sistemas acuáticos sean una fuente de elección primaria para el aislamiento de productos naturales marinos (PNM) debido a su elevada potencialidad y los cuales, a diferencia de los obtenidos en fuentes terrestres presentan rutas biogénicas únicas e inusuales.

Esta gran variedad de compuestos producidos por microorganismos marinos se ve reflejada en los más de 22,000 metabolitos secundarios, de los cuales el 70% son producidos por actinomicetos, 20% por hongos, 7% por el género *Bacillus* y de 1-2% por otros grupos bacterianos. Siendo estos de diversas estructuras químicas en las que se incluyen terpenos, policétidos, acetogeninas, péptidos, alcaloides y algunas estructuras no caracterizadas, representando una opción para desarrollar nuevas herramientas farmacológicas con mayor eficacia y selectividad de manera sustentable.

Diversos microorganismos se encuentran de manera ubicua en los ambientes acuáticos, tal es el caso del género *Bacillus* considerado como uno de los principales productores de antibióticos. Otros grupos de bacterias muy importantes para la búsqueda de PNM son los pertenecientes a la familia Actinomycetaceae que forman parte de sedimentos y/o coexistiendo con algunos organismos superiores, manteniendo una vasta producción de sustancias con distintas actividades farmacológicas; por ejemplo, agentes antitumorales, antibióticos, agentes inmunosupresores y agentes antiparasitarios.

El género más relevante perteneciente a dicha familia es el *Streptomyces* ya que de éste se han aislado más del 80% de moléculas bioactivas. Actualmente de dicho género se han obtenido 3 compuestos antiparasitarios aislados de esponjas del mediterráneo: Butenólido, Estaurosporina y Valinomicina con alta efectividad contra *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*, respectivamente.



En estudios previos realizados en el laboratorio de productos naturales de la Unidad Académica Sisal se llevó a cabo el aislamiento y colección de cepas bacterianas obtenidas a partir de sedimentos marinos de 12 lugares distintos de la Península de Yucatán, las cuales se caracterizaron mediante estudios genéticos. Aún no se conoce de todas su potencial farmacológico, por lo tanto en este trabajo se realizó un estudio sistemático de separación biodirigida para determinar sí tres de las cepas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Streptomyces rubrogriseus*) presentes en esta base de datos producen compuestos antiparasitarios.

II.MARCO TEÓRICO

2.1 ENFERMEDADES PARASITARIAS

Los países más afectados por enfermedades parasitarias son aquellos que se encuentran en vías de desarrollo.¹ Las enfermedades causadas por protozoarios amitocondriados (microorganismo unicelulares de 10 a 50 micras) con mayor relevancia son la malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis (americana y africana). La malaria causa aproximadamente de 700,000 a 2 millones de muertes por año en África, Asia y América.²

Otro grupo de parásitos que ocasionan daño en gran medida son *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. Actualmente se estima que 280 millones de personas son infestadas al año por *E. histolytica* y *G. intestinalis*, causando grandes daños a nivel gastrointestinal. Aproximadamente 2.5 millones de casos fatales han sido reportados, únicamente considerando las enfermedades diarreicas.³ En el caso de infestados por *T. vaginalis* se tiene registrada una prevalencia de 180 millones por año.⁴

A pesar de la implementación de campañas de salud y de educación sexual la prevalencia de *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* aún mantienen un alto impacto en las diversas poblaciones. Además la erradicación de las mismas se ve disminuida debido a la ausencia de vacunas y tratamientos efectivos.⁵



2.1.1 *Entamoeba histolytica*

Es un protozoo no flagelado que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal, presenta cuatro fases de vida: 1) quistes esféricos, 2) prequistes, 3) metaquistes y 4) trofozoitos. La fase con mayor relevancia es durante la formación de los trofozoitos que tienen formas muy variables y plenamente desarrolladas, presentando movimientos rápidos mediante la formación de pseudópodos filiformes.⁶ **Figura 1**

La infestación se adquiere por la ingesta de tan sólo un quiste maduro que se encuentre en el agua o en alimentos contaminados.⁷ Después en el intestino delgado se forma una ameba de 8 núcleos (amebas metaquísticas); posteriormente se transforma en trofozoitos que se establecen posteriormente en el colon para ser eliminados en las heces.

Los síntomas generales que se presentan incluyen diarrea abundante, cólicos abdominales, fiebre, mucosidad y sangre en heces (disentería), ocasionados por los mecanismos de patogenicidad más comunes como son la adhesión de los trofozoitos a las células endoteliales o las células efectoras del sistema inmune (células polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos).⁸

Dentro de las parasitosis, la amebiasis es la tercera causa de mortalidad a nivel mundial después de la malaria y la esquistosomiasis.⁹ Datos epidemiológicos indican que al menos el 9% de la población mexicana se encuentra infestada con *E. histolytica* en la Ciudad de México.¹⁰



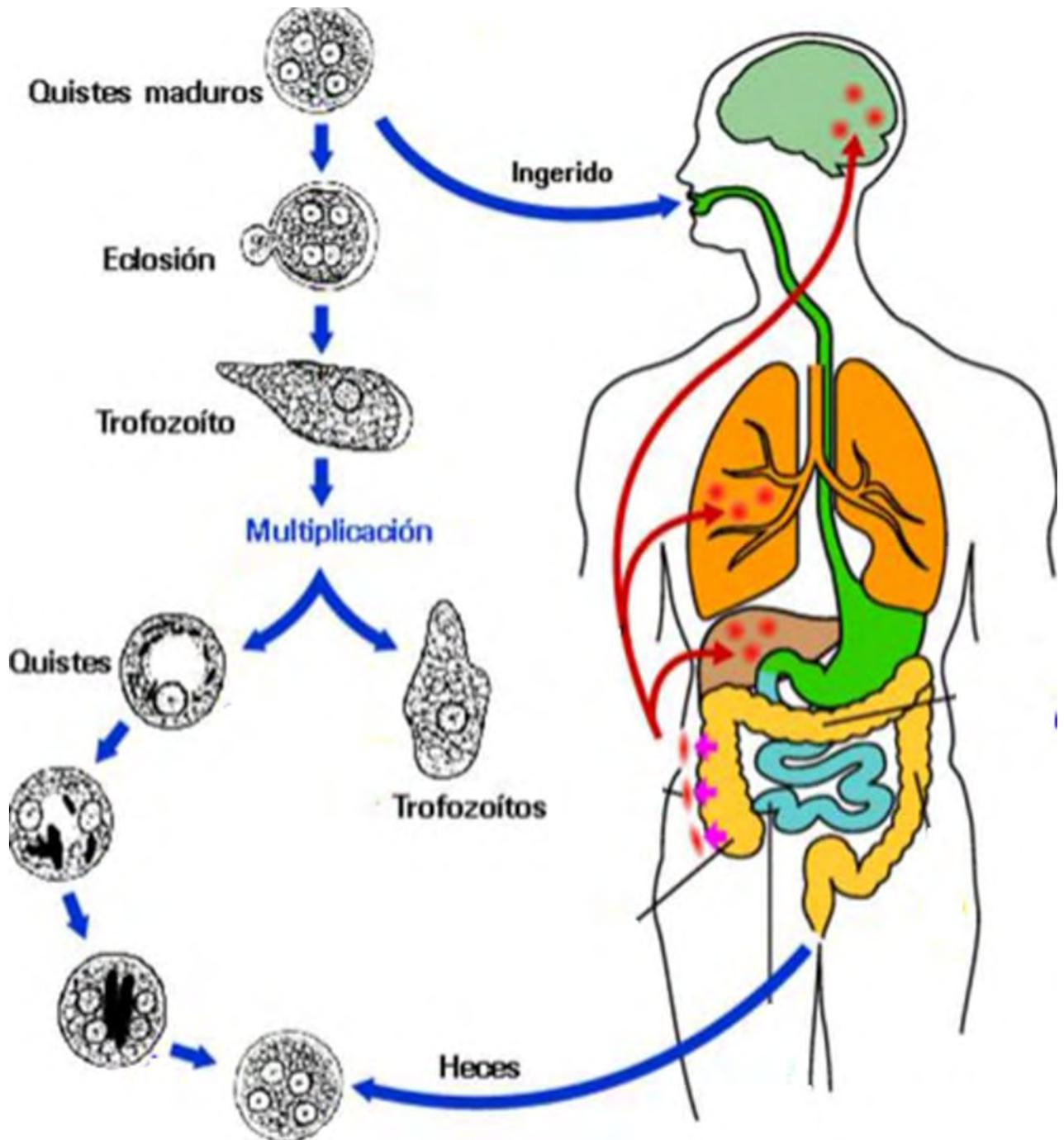


Figura 1- Ciclo de vida de *E. histolytica*

Tomado y modificado de www.cdc.gov/entamoeba [Junio 2016]



2.1.2 *Giardia intestinalis*

Parásito piriforme que mide de 10 a 20 micras de largo por 5 a 15 de ancho. Las dos fases más importantes del ciclo de vida de dicho parásitos son: trofozoito y quiste.¹¹ Los trofozoitos se localizan en el intestino delgado fijados principalmente en el duodeno donde se multiplican por fisión binaria **Figura 2** y los que caen a la luz intestinal dan origen a los quistes que son eliminados por las heces. **Figura 2**¹²

El mecanismo de patogenicidad de *G. intestinalis* se ha identificado debido a la adherencia del trofozoito a la mucosa generando la obstrucción mecánica e interferencia en la absorción de las grasas y vitaminas liposolubles y el desarrollo de bacterias o levaduras en el intestino delgado, generando así la producción en exceso de sales biliares.¹³

Una vez que el hospedero se encuentra infestado, el periodo de incubación se hace evidente de 1 a 2 semanas, seguido de varios síntomas como náusea, diarrea, espasmos estomacales y vomito. **Figura 2.**^{11,12}

Este padecimiento se encuentra con mayor frecuencia en niños, razón por la cual se conoce como la parasitosis de las “guarderías infantiles”.¹⁴ Se calcula que las comunidades rurales de América latina poseen 108 millones de habitantes con carencias básicas de saneamiento por lo tanto aproximadamente el 15% de esta población presenta infección por *G. intestinalis*.¹⁵



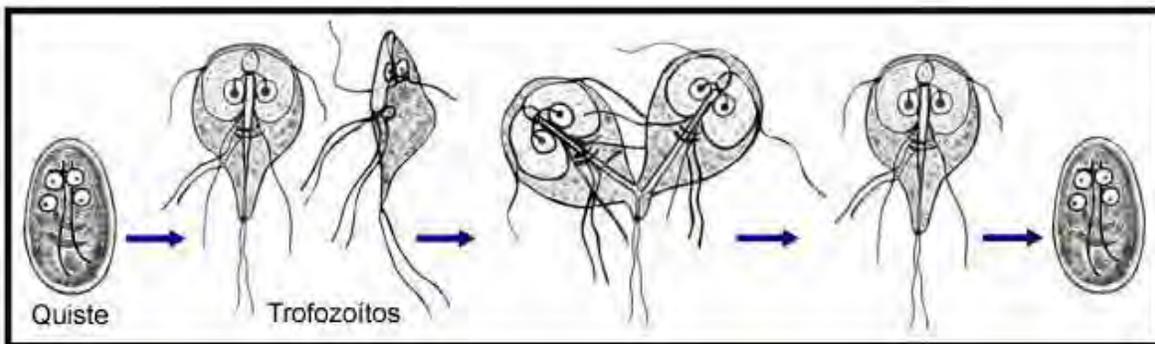
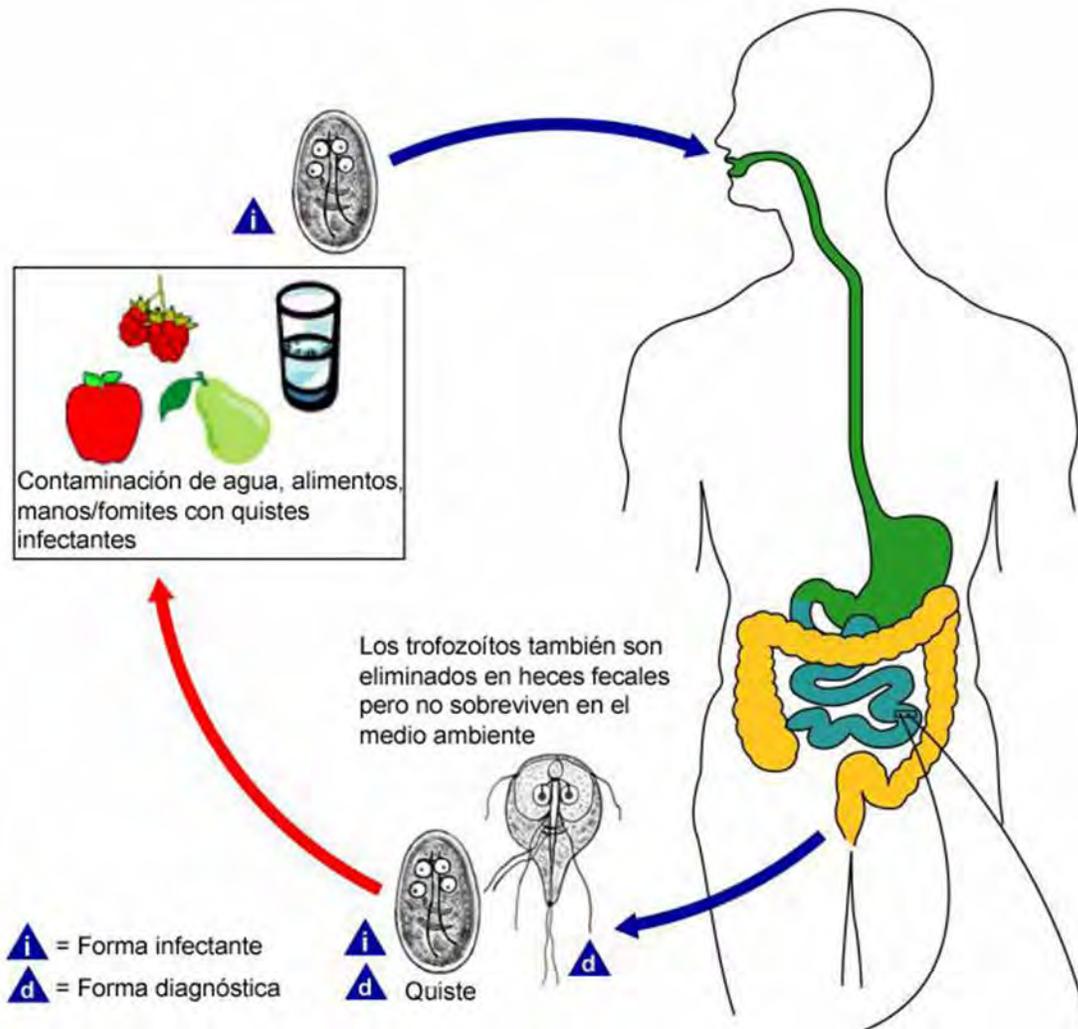


Figura 2-Ciclo de vida de *G. intestinalis*

Tomado y modificado de www.cdc.gov/giardia [Junio 2016]



2.1.3 *Trichomonas vaginalis*

La tricomoniosis es causada por el protozooario *Trichomonas vaginalis* el cual posee 4 flagelos, mide aproximadamente 10 micras de largo y 7 de ancho; su distribución tiene lugar en las vías urogenitales.¹⁶

A diferencia de otros protozoarios éste únicamente existe en forma de trofozoito por lo tanto no sobrevive en ambientes externos, multiplicándose de forma asexual mediante fisión binaria longitudinal.^{17,12} **Figura 3.**

Las mujeres desarrollan un amplio espectro de sintomatología, con severas inflamaciones en la vagina, escozor y fluido excesivo. Éste parásito se adhiere al epitelio escamoso del tracto urogenital, también puede encontrarse en las trompas de Falopio y la pelvis, en el caso de los hombres las afecciones con alta probabilidad de presentarse son uretritis y prostatitis.¹⁴

La tricomoniosis es una de las enfermedades de transmisión sexual que presenta un número alto de casos a nivel mundial.¹⁸ La OMS estima que al menos 174 millones de casos surgen al año, la mayoría de estos son asintomáticos (50%); detectada en su mayoría en personas entre 15-50 años de edad en todos los grupos raciales y niveles económicos.¹⁹



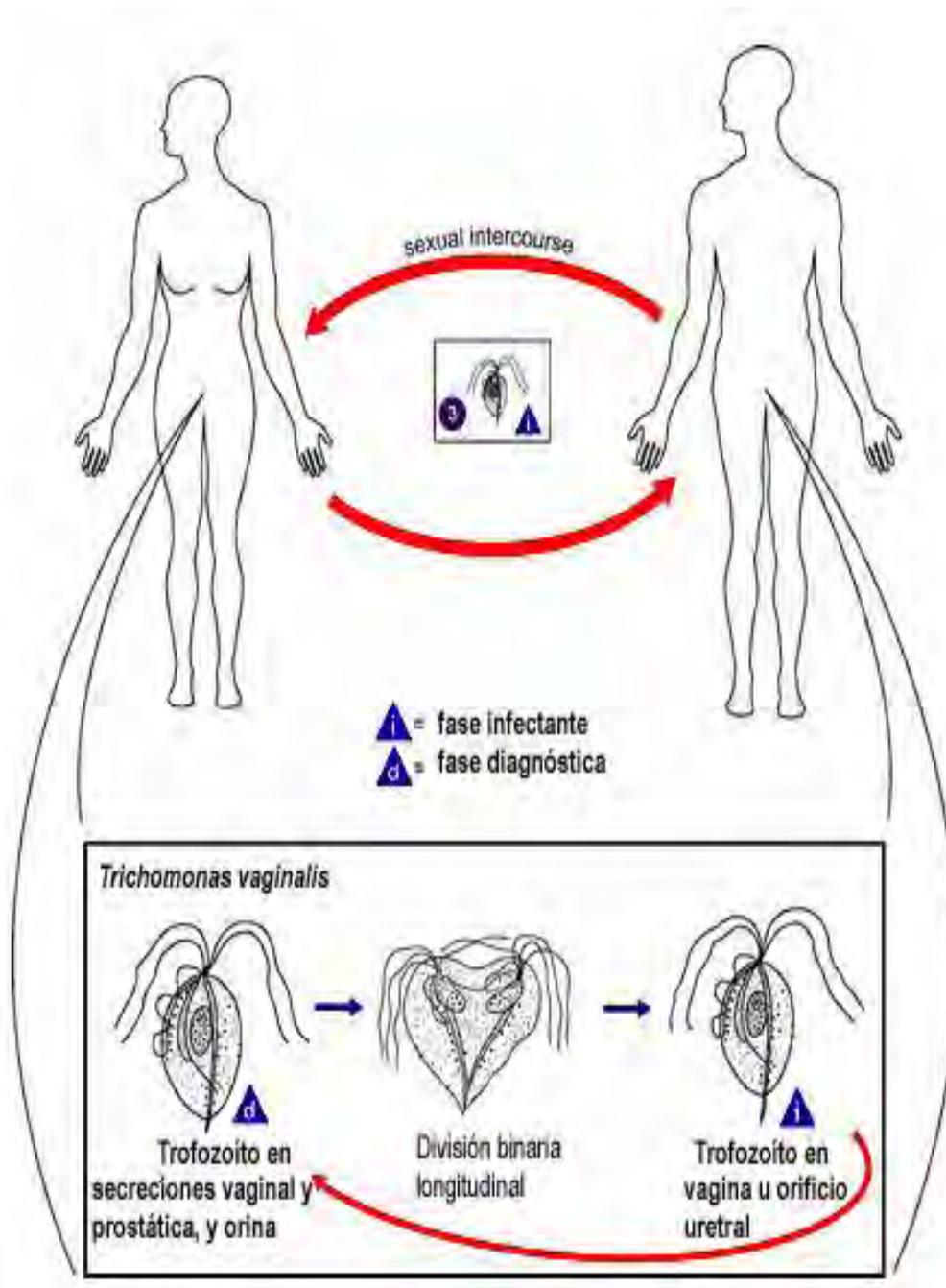


Figura 3-Ciclo de vida de *T. vaginalis*

Tomada y modificada de www.cdc.gov/std/trichomonas/default [Junio 2016]



2.2 BÚSQUEDA DE PRODUCTOS NATURALES

Se conoce como productos naturales a todo producto de origen orgánico o inorgánico que se halle en la naturaleza y que pueda ser aislado o procesado por el hombre, sin modificar su estructura. Por otra parte los metabolitos secundarios aislados de productos naturales se caracterizan por tener un peso molecular menor a 2,000 **uma** y por tener una distribución restringida dependiendo de las condiciones en las que se encuentren los organismos.²⁰

La naturaleza mantiene interacciones dinámicas, lo que permite tener un amplio panorama para la búsqueda de compuestos químicos en los diferentes ecosistemas que nos ofrece. La gran producción y diversidad de productos naturales tanto de los organismos unicelulares como pluricelulares parece no tener una función directa en el desarrollo y crecimiento de los mismos. Sin embargo presentan importancia en la expresión del metabolismo secundario proveniente de la especialización de la célula, dando así moléculas que en su mayoría fungen como mecanismo de defensa o de regulación, específicos para cada especie.²⁰

Los productos naturales juegan un papel predominante para la generación de moléculas novedosas que funcionan como herramientas farmacológicas. Moléculas con una alta diversidad estructural como lo son los terpenoides, policétidos, macrólidos, polienos, glicopéptidos, fenicoles, entre otras.²¹

2.2.1 PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN MARINO (PNOM)

Los productos naturales obtenidos de organismos terrestres no dejan de ser un campo amplio de investigación debido a la facilidad de acceso y a todos sus antecedentes etnofarmacológicos. Sin embargo conforme avanza el tiempo las distintas disciplinas dedicadas a la ciencia tornan la mirada hacia una zona geográfica poco estudiada, como lo es el ambiente marino.

Debido a que gran territorio de nuestro planeta está cubierto por agua con una elevada biodiversidad, no hay duda de que estos ecosistemas ofrecen un gran potencial como fuente de nuevos compuestos con altas posibilidades de ser utilizados en la terapéutica.²²



Los organismos marinos macro y micro de formas, tamaños y colores inusuales han evolucionado para colonizar una gran variedad de nichos ecológicos, produciendo un vasto número de compuestos químicos tan complejos que presentan actividades biológicas realmente importantes, con varios tipos de rutas bioquímicas y mecanismos de acción diferentes a su contraparte terrestre, aumentando sus capacidades de supervivencia y adaptabilidad.²³

Históricamente se tiene registro que hace tan sólo 75 años emergió el estudio químico asociado a los PNOM. Recientemente se ha estimado que 22,000 moléculas diferentes han sido aisladas y químicamente definidas provenientes de la vida marina.²²

En los primeros estudios del ambiente marino se observaron importantes aspectos bioquímicos sujetos a organismos como esponjas, cnidarios, algas y pepino de mar con actividades farmacológicas importantes.

Incluso se han obtenido medicamentos provenientes de organismos marinos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), como es el caso de agentes antineoplásicos conocidos como Halaven®, Yondelis® y del analgésico Prialt®; obtenidos a partir de una esponja, una ascidia y un molusco, respectivamente.²³

En el caso de la Trabectedina (Yondelis®) es utilizado para el tratamiento específico de sarcomas y cáncer de ovario; demás se encuentra en otros estudios clínicos con la posibilidad de que funcione con la misma eficacia para otro tipo de tumores. Actualmente se utiliza para su semisíntesis un producto derivado de *Pseudomonas fluorescens* llamado cianosafracina B.²³



2.2.2 DESVENTAJAS PARA EL AISLAMIENTO DE PNOM

Se ha logrado obtener muestras en profundidades cada vez mayores por medio del SCUBA, lo que ha permitido la obtención de moléculas nuevas con actividades biológicas cada vez más específicas; además se ha tenido una mejoría en el desarrollo de técnicas para el aislamiento e identificación de compuestos naturales. Sin embargo aún la obtención de moléculas novedosas es un proceso largo y complejo que involucra grandes costos y algunas dificultades como: ²⁴

- ❖ Incertidumbre taxonómica
- ❖ Purificación de compuestos solubles en agua
- ❖ Efecto de dilución y alto contenido en sales
- ❖ Cantidades pequeñas de metabolitos
- ❖ Inestabilidad de los metabolitos
- ❖ Compuestos no visibles a ciertos detectores

2.3 PRODUCTOS NATURALES PROVENIENTES DE MICROORGANISMOS MARINOS

A pesar de que se ha tenido un gran éxito en el aislamiento de compuestos con actividades biológicas sorprendentes a partir de organismos superiores, puede ser que el organismo *per se* no sea el productor de las sustancias bioactivas. Fenical y colaboradores determinaron aproximadamente 20 años atrás la importancia de las asociaciones entre los macroorganismos con las comunidades microbianas existentes en el ambiente marino.²⁵

Ahora es claro que mientras algunos productos naturales marinos se encuentran localizados en tejidos de organismos superiores, otros son producidos por microorganismos endo- o epibióticos (**PNMM Productos Naturales Marinos Microbianos**). Los microorganismos son responsables de una gran cantidad de producción de metabolitos secundarios.²⁵



Tal es el caso de la obtención del macrólido Swinolido A que originalmente fue aislado e identificado a partir de las células de la esponja *Thonella swinhoei*, posteriormente se observó que dicho compuesto no es generado directamente de la esponja; ya que se ha encontrado a este mismo compuesto en la cianobacteria *Aphanocapsa feldmanni*, por lo tanto se especula que mediante un proceso endosimbionte permite fungir a una especie como el productor directo y a otra únicamente como reservorio.²⁵

2.3.1 BACTERIAS EN LOS AMBIENTES ACUÁTICOS

Las bacterias son microorganismos con un tamaño aproximado de 0.5-5 μm de longitud y diversas formas (cocos, bacilos, vibrios o espirilos), se caracterizan por poseer una pared celular compuesta por un copolímero de N-acetil-glucosamina y N-acetilmurámico con cadenas laterales de péptidos que contienen aminoácidos inusuales que permiten la diferenciación bioquímica e inmunológica de las cepas bacterianas.²⁶

Al menos se conocen 17 linajes (*phyla*) principales que derivan del estudio de cultivos de laboratorio y muchos otros mediante la secuenciación de genes rRNA.²⁶ Los principales *phyla* de las especies cultivables de *Bacteria* son tres grandes grupos: bacterias Gram positivas, Cianobacteria y Proteobacterias (Gram negativas). Las bacterias Gram positivas pueden separarse en dos subgrupos, por debajo o por encima del 50% de contenido en Guanina-Citocina (G-C).²⁶

Un gran número de bacterias viven en los sedimentos marinos, los cuales contienen cantidades limitadas de materia orgánica con la mayoría de las fuentes de carbono presentes en forma compleja tales como la quitina y/o celulosa.^{26,27} Un estimado sobre la biodiversidad en los océanos alcanza 3.6×10^{29} células microbianas/mL, la cual va disminuyendo desde la costa (1 a 3×10^6 células/mL hasta 10^4 células/mL en la zona nerítica (10-200m de profundidad a nivel del mar).²⁵ Dichas bacterias coexisten con organismos tanto pelágicos (habitan en la columna de agua) como los bentónicos (que viven en el suelo marino).²⁸



Las bacterias Gram negativas se han estudiado principalmente con una perspectiva taxonómica y ecológica, mientras que para el segundo grupo bacteriano (Gram positivas) se ha realizado mayormente con propósitos de búsqueda en los mecanismos de generación de metabolitos secundarios; probablemente porque las primeras no presentan genes que los expresen.²⁹

Una de las diferencias fisiológicas recientemente identificada de las bacterias marinas fue el requerimiento específicamente de sodio para su crecimiento (bacterias estrictas); por ejemplo, de la proteobacteria *Blastobacter* tomada de la columna de agua de la costa de la Península de Ojika, Japón, se aisló un análogo de la enzima convertidora de la endotelina y mostró desarrollo únicamente en agua de mar. Sin embargo no hay una razón *a priori* para suponer que las bacterias que carecen de esta adaptación específica no deban ser consideradas como parte de la comunidad bacteriana marina autóctona.²⁹

2.4 PNM DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Las bacterias Gram positivas son numéricamente menos abundantes en los océanos y se han estudiado en menor cantidad que las Gram negativas, sin embargo como ya se mencionó anteriormente los microorganismos pertenecientes al primer grupo bacteriano son un recurso rico de moléculas novedosas.²⁹

Los metabolitos secundarios reportados de microorganismos marinos son completamente diferentes a sus contrapartes terrestres. Ya que estos se han adaptado a las variaciones significativas de presión, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes de la columna de agua o sedimentos, además de su diferencia filogenética. Generando así una amplia variedad de compuestos con diferentes actividades como antimicrobianos, antifúngicos, antituberculosos, antivirales, antimicrobianos y antiprotozoarios, entre otras.



2.4.1 FIRMICUTES

Microorganismos pertenecientes a la familia Bacillaceae, se caracterizan por tener un bajo contenido de G-C. El género *Bacillus* son los microorganismos pertenecientes a dicho phylum con mayor producción de metabolitos secundarios aislados de diversas fuentes marinas **Tabla 1**. Dentro del ambiente marino este tipo de microorganismos se encuentra de manera ubicua y tienen la capacidad de tolerar cambios drásticos en condiciones adversas de temperatura, presión, salinidad y pH.³⁰

Al menos el 8% del genoma de las cadenas del género *Bacillus* codifican principalmente para la síntesis de antibióticos. Algunos de estos compuestos bioactivos son utilizados como agentes quimioterapéuticos para tratamientos de enfermedades de humanos y animales.³¹

Las cepas aisladas de *Bacillus* producen diversas clases de sustancias con estructuras químicas como lipopéptidos, polipéptidos, macrolactonas, ácidos grasos, policétidos, lipoamidas e isocumarinas, con amplio rango de actividades.³¹**Figura 4.**



MICROORGANISMO	COMPUESTO	ORIGEN
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Macrolactina A	Sedimento
<i>B. cereus</i>	Péptido YM-266183	Cáracol marino <i>Littorina sp.</i>
<i>B. silvestris</i>	Bacilistatina ½	Cangrejo
<i>Bacillus sp.</i>	Halobacilina / Loloatina A/B	Sedimento
<i>Bacillus sp.</i>	Bogorol A/	Gusano marino
<i>B. pumilus</i>	5 Análogos de Surfractina	Sedimento
<i>B. mojavensis</i>	Iso-C16 Fengicina B, anteiso-C17 Fengicina B y Monjavensina A	Ostra <i>Pinctada martensii</i>
<i>Bacillus sp</i>	Mixirin A-C	Lodos marinos
<i>Bacillus sp.</i>	Bacilamida	Columna de agua
<i>B. laterosporus</i>	Basiliscamidas A/B	Columna de agua
<i>B. marinus</i>	Marihisin A-C	Rizosfera
<i>B. atrophaeus</i>	Bacilamidas A-C	Esponja <i>Dysidea avara</i>
<i>Bacillus sp.</i>	leodomicina A-D y Linieodolidos A/B	Sedimento
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Difficidina y Oxidifficinida	Sedimento
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Macrolactina A-F	Sedimento

Tabla 1. PNM aislados de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*.



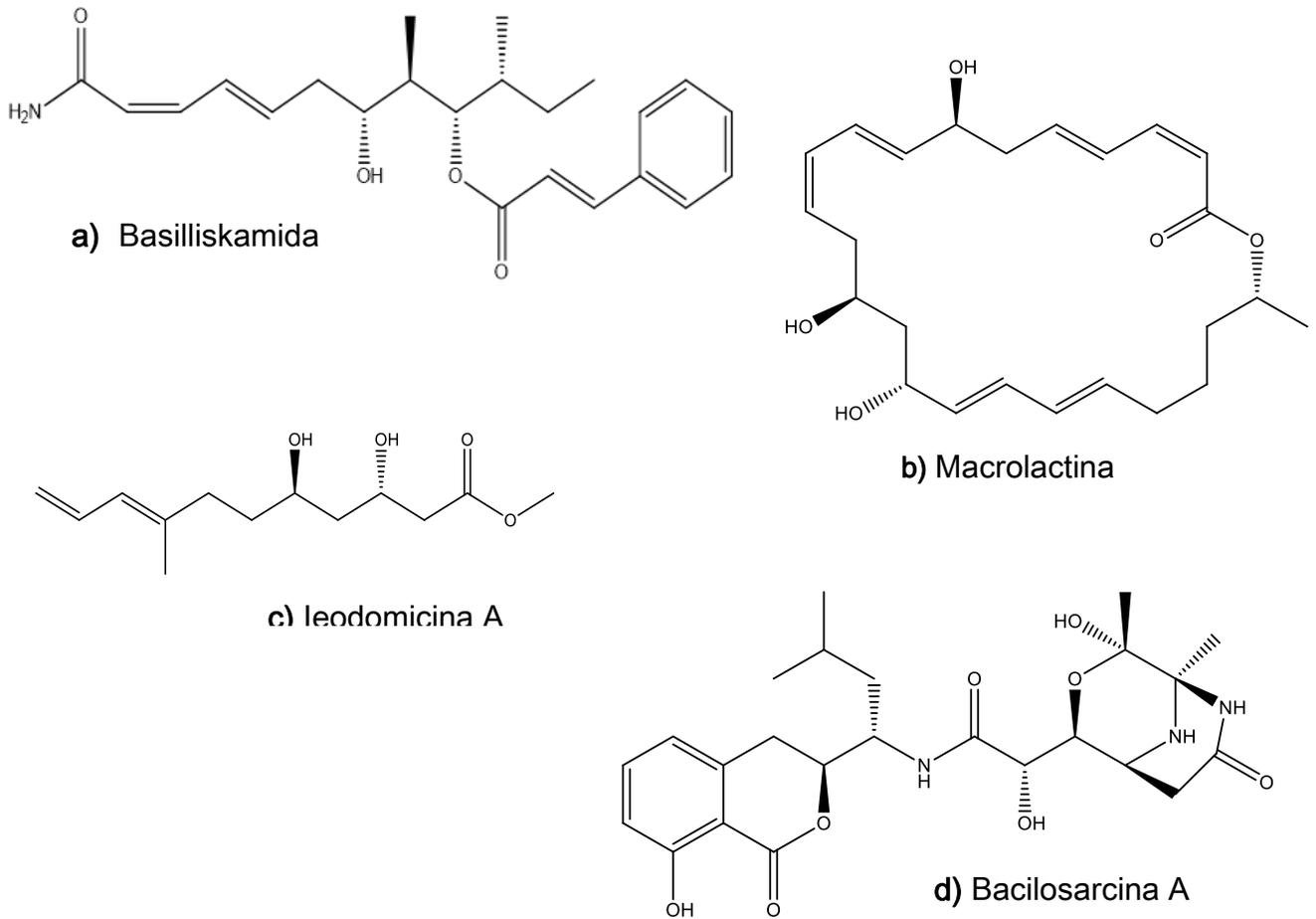


Figura 4. Antibióticos producidos *Bacillus sp. marinos*

a) lipoamida, **b)** macrolactina, **c)** ácido graso y **d)** isocumarina



2.4.2 *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*

En el caso particular de *Bacillus subtilis* se encuentra reportado que en promedio del 4-5% de su genoma se dedica a la producción de aproximadamente dos docenas de antibióticos con una increíble variedad de estructuras; siendo en su mayoría de naturaleza peptídica.³² **Figura 5**

Recientemente se identificó mediante análisis espectrométricos dos moléculas novedosas de tipo isocumarinas denominadas bacilosarcinas A y B y tres amicoumacinas A-C aisladas de *Bacillus subtilis* TP-B0611, mientras que de *Bacillus subtilis* B1779 cuatro lipoamicoumacinas A-D.³³ **Figura 6**

Para *Bacillus licheniformis* se han reportado los dos únicos policétidos llamados ieodoglucomidas A y B; aisladas de muestras de sedimentos colectadas en República de Corea; presentando actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas (MIC 8-32µg/mL) y la ieodoglucomida B que presenta actividad citotóxica contra células cancerosas de pulmón y estómago con una GI₅₀ de 25.18 y 17.78µg/mL, respectivamente.³⁴ **Figura 6**



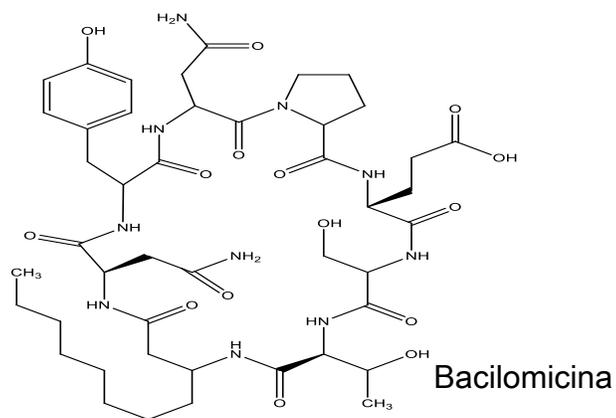
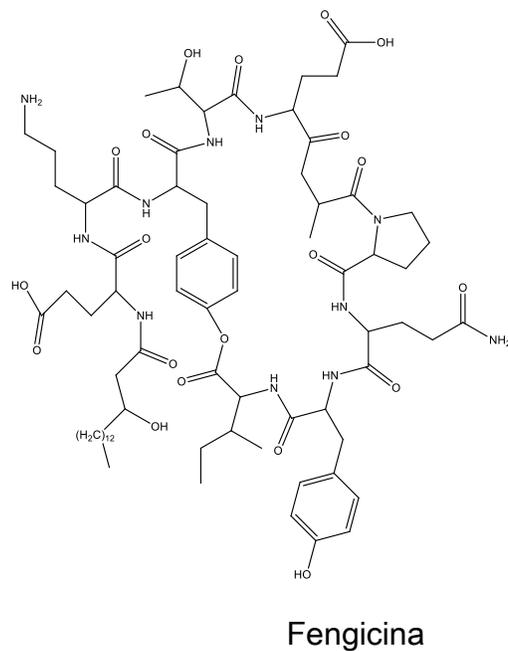
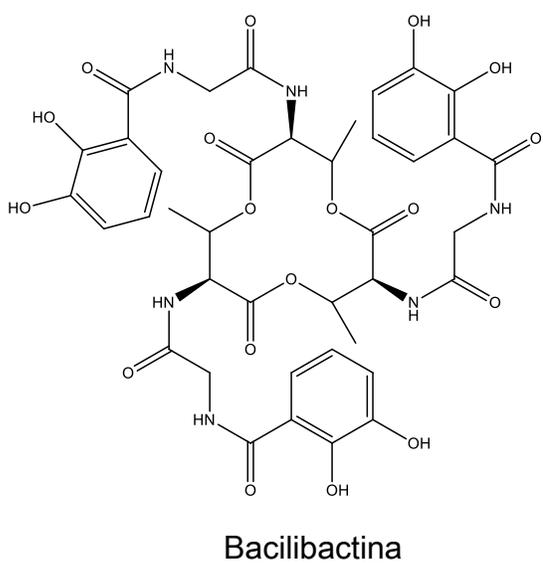
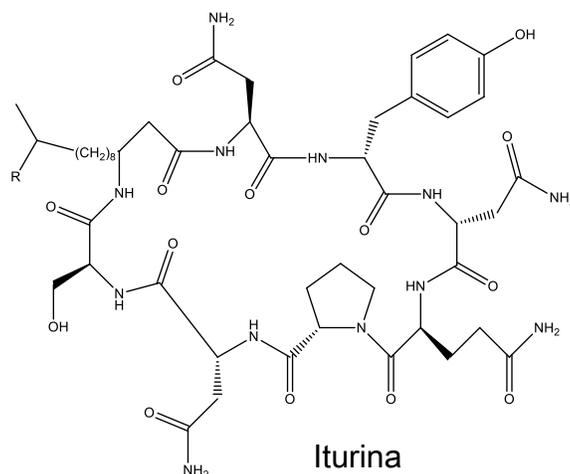
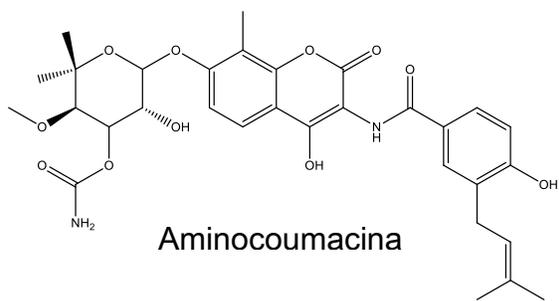
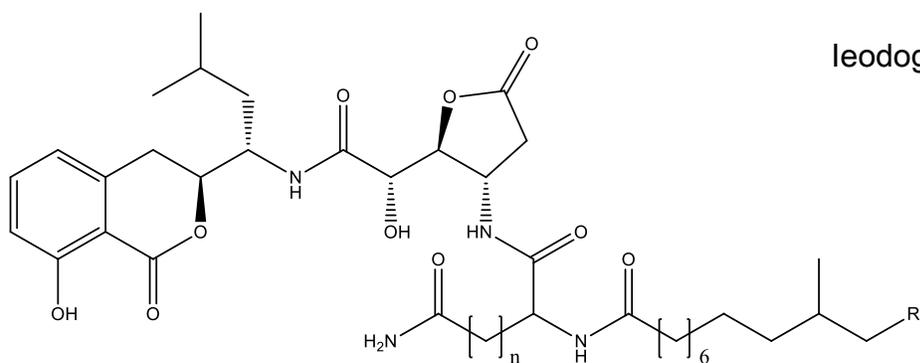
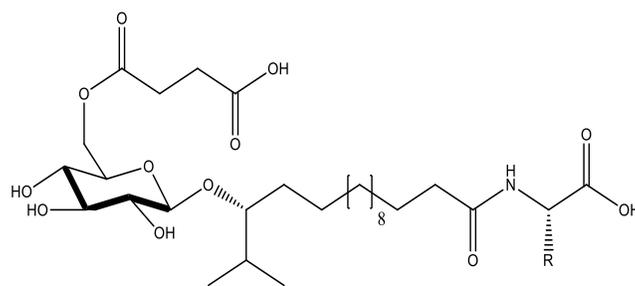
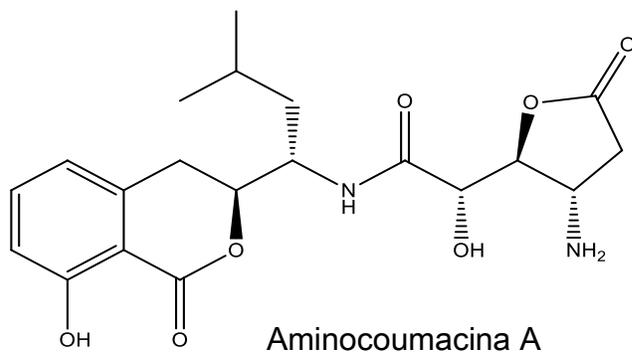
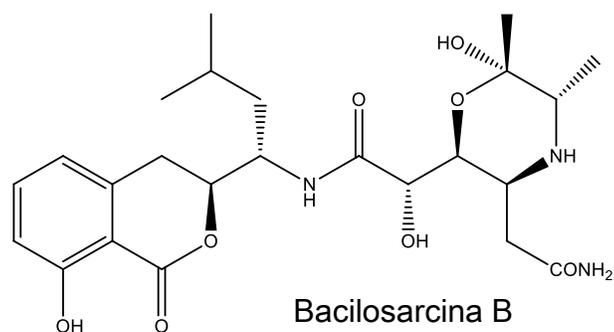
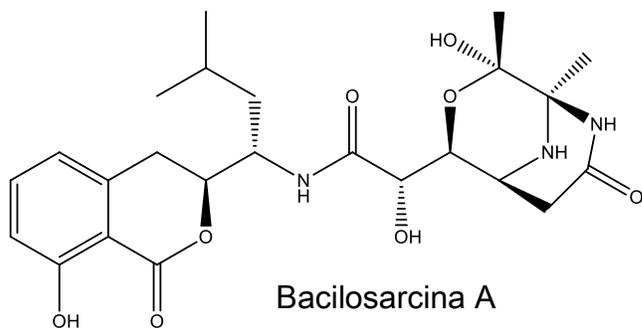


Figura 5. Antibióticos provenientes de *Bacillus subtilis*





leodoglucomidas A y B

A= R-CH₃

B=R-H

Lipoamicoumacina A-D

A= R-H,n1,

B=R-CH₃,n1,

C=R-H,n2,

D=R-CH₃, n2

Figura 6. Metabolitos aislados de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* marinos.



2.4.3 ACTINOBACTERIA

Generalmente los grupos más relevantes pertenecientes a este *phylum* son los microorganismos de las familias Streptomycetaceae, Micromonosporaceae, Rhodococcus y Nocardiosaceae, sin embargo existen aproximadamente 195 géneros validados pertenecientes a la familia Actinomycetaceae. Los actinomicetos como comúnmente son llamados, eran clasificados en el reino fungí debido a la característica de presentar filamentos, sin embargo gracias a los análisis moleculares se determinó que pertenecían al grupo de bacterias debido a su alto contenido en G + C; aunque en recientes estudios se ha indicado que algunos contienen una menor cantidad de dichos pares de bases.³⁵ Varían en morfología teniendo así distintas formas de crecimiento como cocoides y rodococoides; forman hifas o con distinto grado de formación de micelio.

Antiguamente se consideraba que los actinomicetos eran únicamente pertenecientes a los ambientes terrestres, sin embargo en 1969 Weyland y colaboradores sugirieron la presencia de estas especies en los ambientes marinos debido al arrastre de esporas desde la tierra hacia el mar; fue hasta 1984 que se caracterizó a la primer especie de actinomiceto proveniente del mar llamado *Rhodococcus marinonascens*³⁶ y dicha sugerencia ganó fuerza al momento de realizar diversos estudios que evidenciaron la presencia de actinomicetos marinos.

Antes del 2005 solo tres géneros de la clase Actinobacteria eran reportados como parte del ambiente marino: *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*.³⁷ Fue en el 2002 que Mincer y su equipo de trabajo aislaron por primera vez actinomicetos con requerimientos específicos de agua marina. Tal es el caso de la especie *Salinispora*, que tiene la capacidad de sintetizar un compuesto llamado salinosporamida A, que se encuentra en estudios clínicos como un potente anticancerígeno.³⁸ El hallazgo de este género abrió un panorama intrigante sobre la diversidad de actinomicetos marinos y aclaró de alguna forma que existen poblaciones específicas adaptadas a los ecosistemas marinos y que constituyen una población importante en una zona geográfica poco estudiada como lo es el mar, con una elevada probabilidad de encontrar moléculas innovadoras.



Los actinomicetos son los procariontes más relevantes para llevar a cabo su crecimiento y aislamiento en términos económicos y biotecnológicos debido a su capacidad interminable de producir compuestos con actividades biológicas como antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores, inhibidores enzimáticos y compuestos antiparasitarios entre otras. Son los productores de aproximadamente 45% de todos los productos naturales activos y el género *Streptomyces* con un porcentaje cercano al 80% es el mayor productor de compuestos, en su mayoría antibióticos. De aproximadamente 22,000 productos naturales de origen microbiano encontrados hasta ahora, cerca de 10,000 han sido aislados a partir de este género.³⁹ **Tabla 2**

COMPUESTO	ORIGEN	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Quinicomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Anticancerígeno
Glaciapirrol	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacteriano
Frigociclinona	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacteriano
Salinisporamida A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancerígeno
Esporolido A	<i>Salinispora tropica</i>	Desconocida
2-Aliloxi- fenol	<i>Streptomyces sp</i>	Conservador de alimentos
Saliniquetal	<i>Salinispora arenicola</i>	Anticancerígeno
Marinomicina A-D	<i>Marinispora</i>	Anticancerígeno
Lodopiridona	<i>Saccharomonospora sp.</i>	Anticancerígeno
Aremicina	<i>Salinispora arenicola</i>	Anticancerígeno
Resistoflavina	<i>Streptomyces sp</i>	Antioxidante
Sesquiterpenos	<i>Streptomyces sp</i>	Desconocido

Tabla 2. Metabolitos activos aislados a partir de actinomicetos



2.4.4 PRODUCTOS NATURALES AISLADOS EN MÉXICO

Jensen y colaboradores reportaron que el número de microorganismos aislados del género *Streptomyces* disminuye a partir de la costa hasta 450 m de profundidad. A la fecha se han aislado del ambiente marino alrededor de 50 géneros de actinomicetos. Todo esto ha generado nuevas búsquedas de actinomicetos en sedimentos que dan como resultado el descubrimiento de nuevas especies nunca antes reportadas en estos ambientes, por lo tanto México que ocupa el décimosegundo país más grande del mundo en términos de su extensión costera, se convierte en una excelente zona de investigación para la búsqueda de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas.⁴⁰

Los sedimentos marinos son un recurso importante para la obtención de microorganismos generadores de moléculas novedosas pertenecientes a dicho género; por ejemplo: la identificación de dos sustancias aisladas de *Streptomyces* sp. obtenidas a partir de sedimentos colectados de sedimentos en la profundidad del mar, designadas como Loboforminas H e I con mediana y alta actividad antimicrobiana.⁴¹

Se han realizado aislamientos de microorganismos principalmente en sedimentos; por ejemplo en Todos Santos Baja California, México, donde se han identificado taxonómicamente 300 cepas de actinomicetos obtenidas de sedimentos de dicho lugar. De tal número de microorganismos aislados, 26 cepas se encuentran relacionadas con el género *Streptomyces*. Se logró identificar mediante técnicas espectroscópicas un compuesto natural denominado Monactina a partir de una de estas cepas, mostrando actividad contra células cancerosas ($\leq 0.076 \mu\text{g/mL}$).⁴²

2.4.5 *Streptomyces rubrogriseus*

Recientemente se identificó la producción del antibiótico novobiocina generado por cadenas de *Streptomyces rubrogriseus* aislado de sedimentos marinos en Canada, presentado actividad antimicrobiana contra cepas de *S.aureus* ATCC35591.⁴³



2.5 PNMM CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

La industria de medicamentos antiparasitarios no es comparable con la desarrollada en otros campos, sin embargo aunque sigue presente la falta de incentivos económicos no se puede abandonar el interés en estos compuestos debido a la elevada incidencia de enfermedades causadas por protozoarios tanto en México como en todo el mundo.

Los medicamentos antiparasitarios existentes hoy en día como el Metronidazol, Tinidazol, Nitazoxanida, Paromicina y Anfotericina representan fármacos de primera generación, muchos descubiertos 35 años atrás, por lo tanto presentan resistencia por parte de los parásitos, efectos secundarios y en el caso de la Paromicina y Anfotericina mantienen un elevado costo. Además sólo el 31% de los fármacos utilizados como antiparasitarios han sido aislados de recursos naturales.

Por todo lo anterior ha surgido la necesidad de promover la búsqueda de moléculas novedosas con alta potencialidad contra protozoarios en los ambientes acuáticos. Recientemente se reconoció como antiparasitarios a las moléculas 3-alcoxi-1,2-dioxano y el axisonitrilo-3, ambos aislados de esponjas, *Plakortis* sp. y *Acanthella klethra* contra *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} = 50$ ng/mL).⁴⁴

Hasta el momento se han aislado tres compuestos antiparasitarios provenientes del género *Streptomyces* sp. endófitos de las esponjas del Mediterráneo: *Aplysina aerophoba*, *Axinella polypides*, *Tedania* sp., los cuales llevan por nombre Butenolido, Estaurosporina y Valinomicina, con alta efectividad contra *Leishmania major* y *Tripanosoma brucei*.⁴⁵ **Tabla 3**



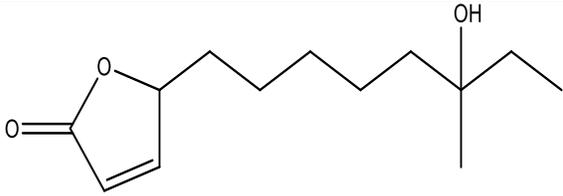
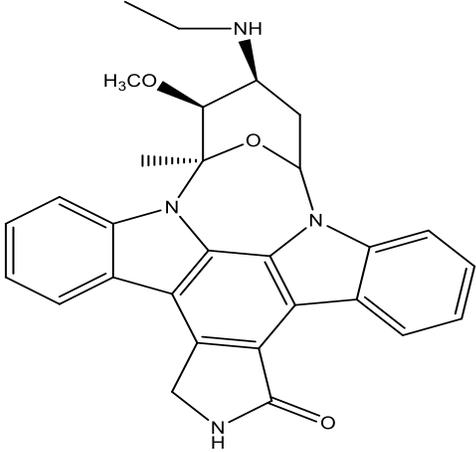
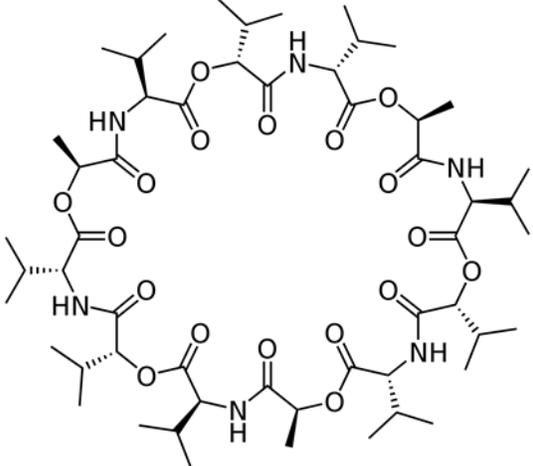
COMPUESTO	ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA
	<p><i>Leishmania major</i> (μM): >100</p> <p><i>Trypanosoma brucei</i> (μM): 31.77</p>
	<p><i>Leishmania major</i> (μM): 5.30</p> <p><i>Trypanosoma brucei</i> (μM): 0.022</p>
	<p><i>Leishmania major</i> (μM): < 0.11</p> <p><i>Trypanosoma brucei</i> (μM): 0.0032</p>

Tabla 3- Metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria aislados de *Streptomyces* sp



III.JUSTIFICACIÓN

Considerando que la elevada exposición a antibióticos, mantiene un aumento considerable en la resistencia a fármacos de primera línea, no sólo para enfermedades parasitarias sino para diversos padecimientos que causan grandes problemas de salud en las poblaciones; existe interés tanto académico como industrial en la búsqueda de compuestos con estructuras novedosas. Los microorganismos marinos ofrecen metabolitos secundarios con características únicas y con actividades biológicas sorprendentes debido a los mecanismos de adaptación que generan debido a las condiciones ambientales extremas en las que se encuentran, además de presentar la ventaja de una mayor obtención de biomasa en comparación con algunos organismos marinos superiores.

Es por ello que en el laboratorio de Bioprospección Costera de la Unidad Académica Sisal, se participa en un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial terapéutico, principalmente con actividad antiparasitaria, de las diferentes cepas bacterianas provenientes de sedimentos marinos en su mayoría pertenecientes a la familia Actinobacteriaceae para el enriquecimiento de nuevas oportunidades en el descubrimiento y desarrollo de productos naturales de origen marino. Además de que las bacterias marinas han sido poco estudiadas; en el caso particular de las costas de Yucatán no han sido estudiadas sistemáticamente como una fuente potencial de compuestos antiparasitarios.

IV. HIPOTESIS

Las tres cepas de microorganismos aislados de sedimentos marinos presentarán actividad antiparasitaria.



V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antiparasitario de tres microorganismos aislados de sedimentos marinos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Streptomyces rubrogriseus*, determinando la naturaleza química de los compuestos causantes de la actividad biológica.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Confirmar la pureza e identidad de las tres cepas.
- Obtener cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos seleccionados.
- Preparar los cultivos en pequeña y mediana escala de las especies aisladas con la finalidad de obtener los extractos correspondientes mediante las técnicas de maceración y partición líquido-líquido
- Determinar el perfil farmacológico mediante bioensayos rápidos: Letalidad en *Artemia salina*, Susceptibilidad microbiana por el método de microdilución, Toxicidad en embriones de pez cebra y finalmente por el método de subcultivos.
- Realizar el fraccionamiento preliminar del extracto más promisorio en función de su perfil farmacológico y cromatográfico (CLAR).
- Identificar la naturaleza química de los metabolitos secundarios mayoritarios por medio de estudios de dereplicación en LC-MS.



VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

Se utilizaron reactivos grado analítico y para el caso de CLAR fueron grado HPLC. Para los estudios de CL-EM se utilizaron disolventes grado LC-MS.

Para el análisis cromatográfico en CCF, se utilizaron placas de aluminio con cubierta de sílice como fase estacionaria (Whatman) y como fase móvil CHCl₃/MeOH/H₂O en diferentes proporciones. Los reveladores cromatográficos fueron:

- ❖ Lámpara de luz U.V. marca UVP de longitud de onda a 254 y 365nm.
- ❖ Revelador de ninhidrina
- ❖ Revelador ácido fosfomolibdico

6.2 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS OBJETO DE ESTUDIO

El procedimiento descrito en esta sección fue realizado previamente por el grupo de colaboradores de la Dra. Alejandra Prieto; para la obtención de las cepas se procesaron 5g de sedimento marino que fueron secados en cajas Petri, bajo una campana de flujo laminar. Una vez secos se tomó con una esponja circular la cual fue “estampada” alrededor del medio de cultivo. Una vez observado crecimiento, las cepas fueron analizadas bajo microscopio estereoscópico y seleccionadas con base en la morfología; aquellas con apariencia “aterciopelada” con formas plegadas y filamentos ramificados con o sin hifa aérea, fueron considerados como actinomicetos de acuerdo a lo sugerido en la literatura.⁴⁶ La identificación taxonómica se realizó mediante ADNr 16S. **Tabla 4**

Microorganismo	# Número de identificación	Localidad
<i>Bacillus subtilis</i>	6	Chelém
<i>Bacillus licheniformis</i>	29	Río Lagartos
<i>Streptomyces rubrogriseus</i>	13	Chelém

Tabla 4. Resultados obtenidos en la identificación de las cepas mediante ADNr 16S.



6.2.1 CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD BACTERIANA

Todas las cepas caracterizadas bajo el procedimiento anterior fueron preservadas en glicerol a una concentración final de 20% y guardadas a -80°C. Por lo tanto para realizar la confirmación de su identidad, se llevó a cabo la reactivación de estas en 100mL de caldo nutritivo, una vez que mostraron crecimiento se realizó el aislamiento en placas con Agar 1 (2g de Peptona, 10 g de Almidón y 4 g de extracto de levadura en 1L de agua de mar). Posteriormente se realizó tinción de Gram para las tres cepas bacterianas otorgadas para este trabajo.

6.3 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS EN PEQUEÑA Y MEDIANA ESCALA

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de las diferentes muestras se realizó la preparación de los cultivos en pequeña escala. Para ello, cada microorganismo fue sembrado en 100 mL de medio A1 líquido en agitación constante (100 rpm) por tres días para las dos cepas pertenecientes al género *Bacillus* y dos semanas en el caso de *Streptomyces*; para favorecer el incremento de la biomasa, y proceder al escalamiento en un volumen de 2 L de caldo A1.

6.4 GENERACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Posterior al crecimiento microbiano, se colocó resina amberlita XAD-4 (20g/L) en agitación durante 3 horas a cada uno de los cultivos bacterianos, pasado este tiempo se colocó la mezcla en tubos Falcón para centrifuga (5000 rpm) durante 30 min, después se realizó la separación del sobrenadante y del pellet celular mediante filtración rápida. Previo a la generación del extracto crudo del pellet celular se lavó 4 veces con agua destilada (aproximadamente 10 mL), a fin de eliminar sales y componentes hidrosolubles del medio de cultivo.

Se realizó una partición líquido- líquido para el sobrenadante con 300 mL de AcOEt con ayuda de un embudo de separación. La fase orgánica fue colectada y se le adicionó Na₂SO₄ anhidro.



A todo el pellet celular se realizó una maceración durante dos días con 20 mL de Acetona y durante un día con 20 mL de MeOH (2x). En el caso de los extractos obtenidos por maceración se mezclaron posteriormente. **Figura 7.**

Para cada una de las cepas se obtuvieron tres extractos crudos los cuales se concentraron hasta sequedad a presión reducida con ayuda de un Rotavapor BUCHI 2-215 a temperatura de 23° C, las muestras se mantuvieron en refrigeración y alejadas de la incidencia de la luz. Dichos extractos crudos se sometieron a pruebas de actividad tóxica en nauplios de *Artemia salina*.

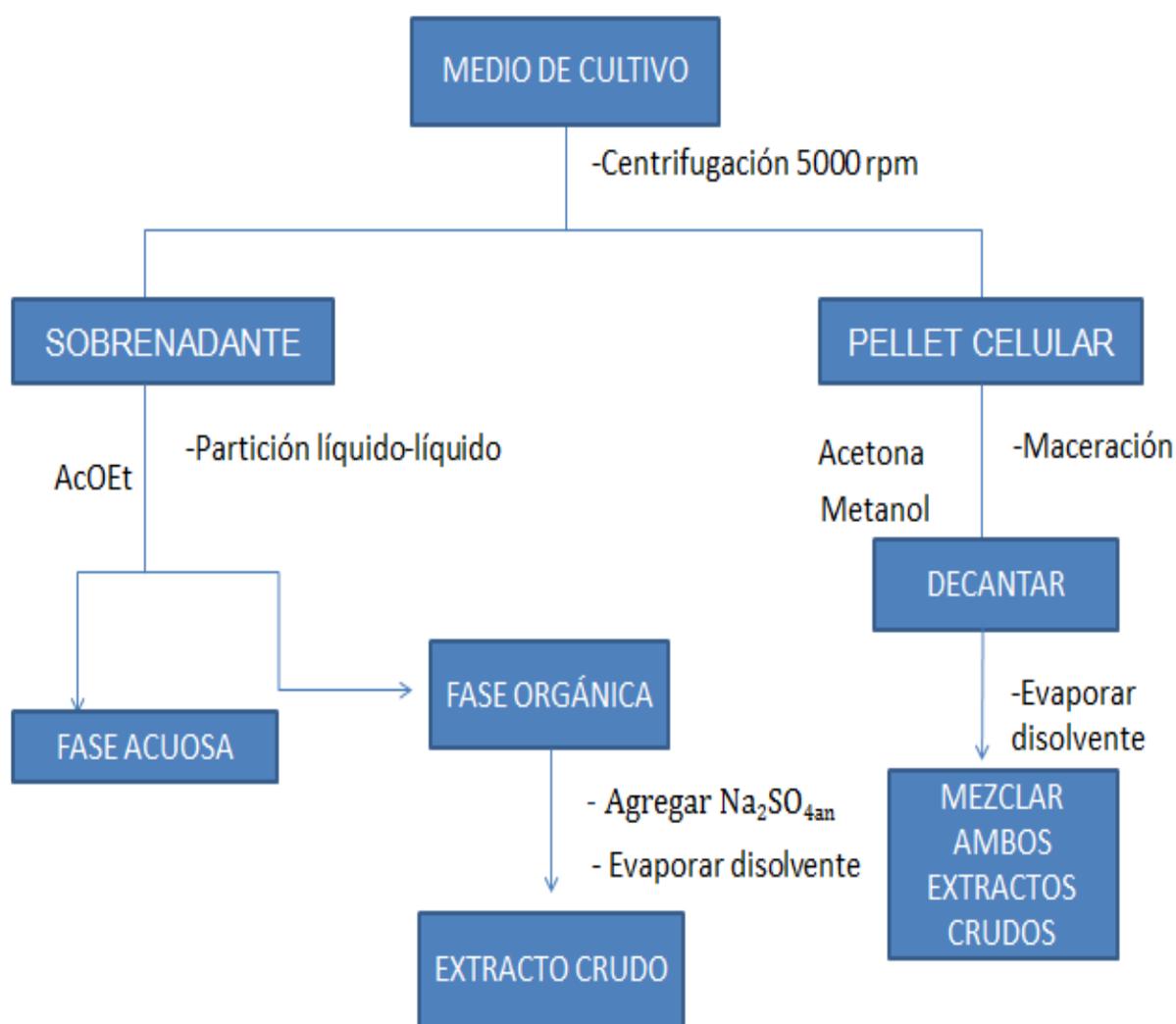


Figura 7. Esquema general para la obtención de los extractos crudos



6.5 DETERMINACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS Y ESTUDIOS DE DEREPLICACIÓN

Todos los extractos crudos obtenidos fueron disueltos en una mínima cantidad de agua para la evaluación rápida de su complejidad mediante cromatografía en capa fina (CCF) en fase normal, revelando con ácido fosfomolibdico y ninhidrina.

6.5.1 SEPARACIÓN BIODIRIGIDA DE LOS EXTRACTOS BIOACTIVOS

Aquellos extractos que presentaron actividad en el ensayo de *Artemia salina* fueron seleccionados para el siguiente procedimiento. Adicionalmente, con base en la naturaleza polar que revelaron las cromatoplasmas, fueron sometidos a un fraccionamiento mediante Separación por Extracción en Fase Sólida (SEFS o SPE por sus siglas en inglés). Se utilizaron cartuchos comerciales que contienen como fase estacionaria C18 (fase reversa Strata C18U 100 x 4.6mm, 70 Å de partícula Phenomex, INC, USA).

Se pesaron 150 mg de muestra a evaluar disuelta en aproximadamente 5 mL, y se aplicaron en el cartucho, el cual previamente fue lavado y acondicionado (MeOH y Agua, 5mL, respectivamente). El cartucho con la muestra se lavó con agua (5 mL, 2X) y luego se realizó la elución con H₂O: AcCN en distintas proporciones. **Tabla 5**

FASE MÓVIL	PROPORCIÓN	VOLUMEN
F1:H ₂ O	100	5mL
F2:H ₂ O:AcCN	95:5	5mL
F3: H ₂ O: AcCN	90:10	5mL
F4: H ₂ O: AcCN	80:20	5mL
F5: H ₂ O:AcCN	50:50	5mL

Tabla 5- Sistema de elución en SEFS



Todas las fracciones fueron colectadas en viales y concentradas a presión reducida, las cuales nuevamente se analizaron por cromatografía en capa fina y se sometieron a pruebas de actividad en nauplios de *A. salina*.

6.5.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La fracción que resultó activa en SEFS, fue analizada para determinar su complejidad química mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés). El análisis fue realizado en un equipo CLAR Varian Inc. Polaris 211 con dos bombas, Inyector automático 311, Detector de UV 335 y un detector de Difracción de Luz Evaporative (DELD, ELSD en inglés, Evaporative Light Scattering Detector) Polymer ICE.

La separación se realizó en una columna de fase reversa (columna LUNA, C18, 250 X 4.5mm, 4.5 μ m de partícula Phenomex INC, USA) en condiciones analíticas empleando dos detectores: el UV/Vis a 205 nm y el detector DELD (condiciones del detector: Temperatura de nebulización de 40° C, temperatura de evaporación de 70 ° C y flujo de nitrógeno de 1.0 mL/min). Se inyectaron 20 μ L de muestra a una concentración de 34.2 μ g/mL. Para la separación se empleó como fase móvil Agua (A, 0.1% TFA) y Acetonitrilo (B) en un gradiente de 0-20%B en 20 minutos, luego de 20 a100%B en 25, para regresar a la condición original en el minuto 30.

6.5.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Con el fin de conocer la naturaleza química de los posibles compuestos causantes de la actividad antiparasitaria, mediante estudios de dereplicación se procedió a realizar Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de masas (CL-EM, LC-MS en inglés) que permitió conocer los pesos moleculares de las señales principales del cromatograma y así poder compararlos con la base de datos Diccionario de Productos Naturales Marinos.



Los análisis por espectrometría de masas se realizaron por la técnica de electrospray (ESI) en modo de iones positivos en un espectrómetro de masas marca WATERS modelo Synapt G2-S. Las condiciones del equipo se indican en la **Tabla 6**

La separación cromatográfica se realizó sobre una columna de fase reversa C18 (ACQUITY UPLC BEH, 2.1x100mm, 1.7µm), a 35°C. La fase móvil (0.45 mL/min) constituida por agua con 0.1% de ácido fórmico (disolvente A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (disolvente B), en un gradiente de: 3-60% de B en 40 min, 60-97%B en 50 min, para regresar a la condición original en 55 minutos.

CONDICIONES DE ANÁLISIS	
Cámara de ionización	Electrospray (ESI)
Temperatura de la cámara de ionización	100° C
Voltaje de capilar	3.00 Kv
Intervalo de masas	50-2,500 µ
Lock Spray	Fibrinopéptido B, Marca WATERS
Masa de referencia de Lock Spray	785.4026 Da (especie doble carga)
Voltaje de capilar de Lock Spray	2.4 kV aproximadamente
Detección de iones	Positivos
Resolución	20,000

Tabla 6 Características de equipo y condiciones de análisis para espectrometría de masas



VII. DETERMINACIÓN DEL PÉRFIL FARMACOLÓGICO

Ya que es un estudio biodirigido, se realizaron bioensayos rápidos a todos los extractos crudos y fracciones generadas en cada fase, que por un lado fueron implementados en el laboratorio de Productos Naturales, Unidad Sisal y por el otro funcionaron como un indicador biológico para proseguir con el fraccionamiento de aquellas fracciones que presentaron una mayor actividad.

7.1 LETALIDAD EN *Artemia salina*.

El potencial citotóxico se determinó de acuerdo al procedimiento establecido por primera vez en 1982 por Meyer *et al.*⁴⁷ un método rápido, fiable y conveniente para la relación positiva entre los compuestos que muestran un efecto tóxico frente a nauplios de *A. salina* y diferentes actividades, principalmente antitumoral y antiparasitario. Adicional en el laboratorio de Productos Naturales Marinos se ha observado una alta correlación con la actividad antiparasitaria mediante el método de subcultivos.⁴⁸

Obtención de los organismos. Para evitar la descomposición y contaminación de las muestras previamente se mantenían los nauplios de *A. salina* proporcionados bajo condiciones de aereación y luz artificial hasta la generación de una suspensión ajustada de nauplios en la que por cada 100 μ L del inóculo se contabilizarán de 15 a 20 nauplios de 24 hrs. Nauplios otorgados por la responsable del área de Alimento vivo de la Unidad Sisal, Gabriela Ivette Palomino.

Preparación de las muestras. Para cada extracto o fracción fue necesario determinar su solubilidad antes de empezar el bioensayo, afortunadamente todos se disolvieron en agua. Se pesaron 10 mg del extracto o fracción a evaluar y se disolvieron en 1 mL de agua bidestilada para generar una solución stock con concentración de 10,000 μ g/ mL. A partir de esta solución, se realizaron 5 diluciones logarítmicas tomando 100 μ L y diluyendo en 900 μ L de agua de mar para generar



las soluciones de trabajo con un intervalo de concentración de 1000 µg/mL a 0.1 µg/mL. Como control positivo se utilizó MeOH y agua de mar como control negativo.

Bioensayo. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron a cada pozo 100 µL de agua de mar y 100 µL de la suspensión ajustada con nauplios. Enseguida se adicionó 100 µL del extracto crudo o fracción a evaluar en las distintas concentraciones (muestras a ensayar), o bien agua de mar (control negativo) ó MeOH. La microplaca fue incubada durante 24 horas bajo condiciones de aeración constante y luz artificial con una temperatura de 27 a 29 °C en agitación a una velocidad de 150 rpm. Una vez concluido el tiempo, se cuantificó el número de nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio Nikon SMZ800 y los resultados se analizaron mediante el programa estadístico computarizado PROBIT (software suministrado por la US Environmental Protection Agency EPA) con límites de confianza del 95%.

7.2BIOENSAYO DE SUCEPTIBILIDAD MICROBIANA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

Es una técnica en la que se prueba la capacidad inhibitoria de una sustancia o medicamento frente a bacterias, en la cual se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI o MIC en inglés) sobre una suspensión normalizada de bacterias expuestas a diversas concentraciones del agente antibacteriano (control positivo) y extractos crudos mediante la valoración de la turbidez del medio. El protocolo a seguir se basó en el método estandarizado del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)⁴⁹. Todo se manejó en condiciones de asepsia.

Las cepas utilizadas para efectuar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana fueron *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa, ATCC 11775) y *Enterococcus faecalis* (*Gram positiva*, ATCC 24212). Las cepas ATCC, presentan patrones de sensibilidad conocidos, por lo que al montar la prueba, los valores de CMI deberán encontrarse dentro de los límites descritos en el protocolo.



Estandarización del Inóculo. Para la activación de cada cepa ATCC se sembraron tres asadas de cada microorganismo en 100 mL de caldo nutritivo, una vez obtenido el crecimiento, se procedió al aislamiento en medio agar EMB mediante la técnica de estriado.

Después de 24 horas, se tomó una colonia aislada característica de cada cepa, y se inoculó en 100 mL de caldo Mueller-Hinton (MHB), el cual se encubó a 37 °C por 24 h, tiempo en el cual el inóculo bacteriano fue ajustado a 0.5 °Mc Farland por comparación visual contra una solución preparada al 1% de BaCl₂, lo que se encuentra reportado que es el equivalente de aproximadamente 1 x 10⁸ unidades formadoras de colonias, UFC/mL. Adicionalmente, como método de confirmación se midió la absorbancia de cada inóculo a 625 nm, y verificando que la absorbancia estuviera en un rango de 0.08 -0.1 en un espectrómetro Lambda 25 UV/Vis Perkin Elmer.

Preparación de las muestras. Se pesaron 10.24 mg de cada extracto crudo o fracción y se disolvieron en agua. En seguida, de esta solución madre se realizó una dilución tomando 100 µL + 900 µL MHB para la obtención de una concentración final de 1.024 mg/mL.

- ❖ *Control positivo.* Se tomaron 10.24 mg de antimicrobianos de referencia (Gentamicina y Kanamicina) disueltos en 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO), de esta solución madre se tomaron 100 µL + 900 µL MHB, para obtener la misma concentración de las muestras a probar. Este tratamiento se realizó en base a la concentración inicial de los antibióticos de referencia y a la concentración final requerida en cada pozo por medio de diluciones dobles seriadas.
- ❖ *Control negativo.* Crecimiento de la cepa.

Bioensayo Para realizar este procedimiento se agregó en todos los pozos 100 µL de caldo MHB estéril y 100 µL del antibiótico o de la muestra a probar. Esta distribución de antibióticos o de extracto a evaluar se depositó en cada uno de los pocillos de la columna 1 (A-D). Una vez obtenido el volumen final de 200 µL de todos los pozos de la columna 1 con la ayuda de una micropipeta multicanal se transfieren



100 µl sucesivamente a los siguientes pozos para obtener una serie decreciente de concentraciones para cada pozo con mayor precisión y reproducibilidad. Una vez realizado este paso se agregaron a todos los pozos 100 µL de la solución bacteriana ajustada. El volumen final de cada pozo es de 200 µL.

Una vez estandarizada la técnica, se determinó la CMI de los extractos crudos activos. Para ello se realizó el mismo tratamiento anteriormente descrito.

Las placas se mantuvieron en un cuarto de incubación a 37°C para su conservación por un tiempo de 24 horas, una vez ocurrido este tiempo se realizó la lectura de los resultados. De manera visual se observó el crecimiento microbiano en cada pozo, y se comparó con las tablas establecidas en el protocolo CLSI.

7.3 ENSAYO DE TOXICIDAD EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA

La evaluación in vivo de la citotoxicidad de los metabolitos secundarios en embriones de un organismo modelo como lo es el pez cebra (*Danio rerio*), es de gran importancia para estudios preclínicos. Este bioensayo presenta distintas ventajas como es el corto periodo de su ciclo reproductivo, además de ser una especie que no requiere de mantenimiento exigente, y mantiene una densidad alta de producción de embriones lo que facilita el acceso a la sencilla administración de diversos compuestos. Además de proveer datos estadísticamente significativos. Adicionalmente debido a que los embriones son transparentes permiten de manera visual evaluar todo el proceso de manipulación y el desarrollo en cada etapa de crecimiento del mismo.⁵⁰ Los 4 puntos indicadores para poder observar el efecto letal son **a)** coagulación de los embriones fertilizados **b)** falta de formación de la somita **c)** falta de desprendimiento de la cola desde el saco vitelino **d)** pérdida del ritmo cardíaco.

Generación de embriones de pez cebra Los embriones para la realización del ensayo fueron proporcionados por el grupo de trabajo de la Dra. Fuentes Rodríguez Gabriela, a partir de peces cebras wild type. Durante todo el periodo de trabajo se alimentó con *Artemia salina* a los progenitores para aumentar la masa corporal principalmente de la madre y así inducir el procedimiento de apareamiento el cual



se realizó una noche previa para la obtención aproximada de 300 embriones; para su colecta se realizó un procedimiento de absorción con la ayuda de un sifón; posteriormente se lleva a cabo la selección de los embriones con posibilidad de ser fecundados mediante la observación macroscópica, todos aquellos que presentan una coloración blanquecina fueron excluidos.

Preparación de las muestras Para la evaluación de los extractos crudos o fracciones obtenidas primero se estableció la solubilidad en agua de los compuestos. Para ello se pesó 5 mg/0.5mL de agua, para la obtención de la solución stock con una concentración de 10 mg/mL, de esta solución se realizaron 5 diluciones seriadas tomando 200µL de cada una con medio E1 con un rango de trabajo de 10-0.001 mg/mL.

- ❖ *Control positivo:* 100 µL de Colchicina en un rango de concentraciones de 10-0.001 mg/mL
- ❖ *Control negativo:* 100 µL de medio E1

Bioensayo Para la dispensación de la placa del ensayo de toxicidad en embriones de pez (FET en inglés) se procedió a colocar 96 embriones transparentes en cada uno de los pozos de la microplaca de fondo plano. Adicionando 100 µL de medio E1, 100 µL de cada solución a evaluar. En tres pozos se colocó la concentración máxima de cada extracto crudo a probar.

Las placas fueron colocadas en el cuarto de incubación perteneciente al departamento de eco toxicología que mantiene la temperatura a 28 °C con recirculación de aire.

Determinación de la concentración Letal (DL₅₀) Se determinó mediante el programa estadístico computarizado PROBIT (software suministrado por la US Environmental Protection Agency EPA) con límites de confianza del 95%.

Cada microplaca se evaluó cada 24 horas hasta cumplirse las 72 horas, tomando en cuenta la mortalidad, edemas y/o deformidades.



7.4 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA POR EL MÉTODO DE SUBCULTIVOS.

Para el análisis de la actividad antiparasitaria de los extractos o fracciones activas se siguió el método de subcultivos siguiendo la técnica propuesta por Cedillo *et al.*⁵¹

Preparación de la muestra: Se tomaron 10 mg de cada fracción a analizar y a cada una se adicionó 1mL de agua destilada nombrada como solución madre, de esta se realizaron diluciones hasta obtener cuatro concentraciones con rango de trabajo de 10-0.5µg/mL.

- ❖ *Control positivo:* nitazoxanida, diluido en DMSO
- ❖ *Control negativo:* Trofozoitos en medio libre y control del solvente DMSO

Preparación de los trofozoitos los trofozoitos de *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se emplearon para determinar la actividad antiparasitaria de los extractos de los microorganismos. Las cepas se mantuvieron en condiciones axénicas a 37°C en medio TY1-S-33 suplementado con suero de ternera y bilis bovina al 10%

Bioensayo Se incubaron los trofozoitos de cada una de las cepas en tubos Eppendorf (4×10^4 de la cepa de *G.intestinalis*, 6×10^3 de *E. histolytica* y finalmente 6×10^3 de *T. vaginalis*) 37°C por 48 horas con los extractos a evaluar. Una vez pasadas las 48h se inocularon 50 µL de los trofozoitos tratados en medio fresco (sin extracto) e incubaron en las mismas condiciones. Finalizado este periodo se determinó el número de organismos que presentaron resistencia a la muestra empleando la cámara Neubauer. Se calculó la concentración letal del 50% de la población (CL₅₀) mediante el software Probit versión 1.5



VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El seguimiento de la estrategia metodológica antes descrita se discutirá en dos partes para una mejor comprensión: la primera abarca el aislamiento de los microorganismos, y la evaluación con las distintas pruebas biológicas. En la segunda parte se describen todos los aspectos relacionados con los estudios espectrométricos y espectroscópicos (estudios de dereplicación).

PRIMER PARTE

8.1 IDENTIDAD BACTERIANA

A partir de las 16 cepas identificadas por el grupo de colaboradores de la Dra. Alejandra Prieto Davó se eligieron tres cepas identificadas como **(6, 29,13)** debido a que estas presentaron actividad inhibitoria frente a otras cepas de microorganismos **Tabla 7**; por lo tanto fue un indicador de que los extractos orgánicos serían posibles mezclas de compuestos bioactivos.

Esta premisa permitió realizar la confirmación de su identidad de manera rápida mediante la realización de Tinción de Gram.

Todas las bacterias otorgadas presentaron las características microscópicas necesarias para clasificarlos como bacterias Gram positivas, además en el caso del Actinomiceto **(13)** que fue sembrado en caja Petri con medio A1 creció con características macroscópicas de hongo.

8.2 ESCALAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO

El crecimiento que presentaron las cepas pertenecientes al género *Bacillus*: *Bacillus subtilis* **(6)** y *Bacillus licheniformis* **(29)**, únicamente presentaron turbidez en el medio de fermentación tanto a pequeña como a gran escala, en cambio en el medio de cultivo perteneciente a *Streptomyces rubrogriseus* **13** se formaron agregados esféricos a los tres días en el caldo nutritivo; conservando dichas estructuras con una gran cantidad de biomasa, debido al tiempo determinado de acuerdo a la metodología **inciso 6.3**.



Las tres cepas mostraron morfología y coloración uniforme al realizar nuevamente la tinción de Gram de cada uno de los medios de fermentación, tomando la asada del medio de cultivo en escala mayor

CEPA INHIBITORIA	CEPA INHIBIDA
<i>Bacillus subtilis</i> (6)	<i>Streptomyces griseorubens</i>
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptomyces piloviolofuscus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> (29)	<i>Streptomyces</i> sp
	<i>Dietzia timorensis</i>
	<i>Streptomyces acrimycini</i>
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>
<i>Streptomyces rubrogriseus</i> (13)	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Streptomyces griseorubens</i>
	<i>Streptomyces</i> sp.

Tabla 7. Microorganismos seleccionados de la base de datos del laboratorio de productos naturales debido a sus propiedades inhibitorias.



8.3 GENERACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación de todas las especies bacterianas aisladas y presentando características de un medio axénico, se obtuvieron los 9 extractos orgánicos correspondientes mediante un proceso de partición líquido-líquido y maceración de acuerdo al procedimiento que se indica en el proceso **inciso 6.4**. Dichos extractos fueron llevados a sequedad de los cuales se obtuvieron los pesos indicados en la **Tabla 8**. Enseguida cada extracto crudo fue evaluado mediante el ensayo de letalidad en *A. salina* para determinar su potencial citotóxico, así como de las fracciones obtenidas del fraccionamiento en fase sólida. **Tabla 8**

Los resultados que se muestran en la **Tabla 8** permiten analizar lo siguiente:

En el caso de los extractos obtenidos a partir de *Bacillus subtilis* no se sometieron a ninguna otra prueba debido a que perdieron actividad a través del tiempo en un segundo bioensayo realizado.

Los extractos crudos obtenidos con **AcOEt (SG1 a, b, c)** correspondientes a cada una de las cepas mantienen en todos los casos un bajo rendimiento lo que no permitió llevar a cabo las siguientes pruebas biológicas pero fueron activos en el ensayo de letalidad.

En el caso de la cepa **29** el extracto **SG1 b** presentó una mejor actividad contra los nauplios de *A. salina* en comparación con el extracto obtenido por maceración **SG2 b** sin embargo debido a que la cantidad obtenida del extracto proveniente de dicho procedimiento fue mayor se decidió llevar a cabo su fraccionamiento en extracción de fase sólida y en cada una de las fracciones obtenidas de acuerdo al inciso **6.4.1**, posteriormente este extracto perdió la actividad. Adicionalmente en todas las cepas se obtuvieron altos rendimientos de los extractos crudos obtenidos con **Acetona/MeOH (SG2 a, b, c, c1p)**

Durante la formación del pellet celular proveniente de la cepa **13** y al momento de filtrar se formaron capas con diferente textura y tonalidad por lo que se decidió separar en: **(SG2 c, SG2 c1p)**, en ambos casos se obtuvo una excelente cantidad de muestra para trabajarla en las siguientes pruebas biológicas.



En el caso de **SG2 c1p** fue la fase precipitante que presentó una excelente actividad en el ensayo de letalidad en *A. salina*, [0.758 µg/mL del extracto crudo y 244.521 µg/mL de la fracción 80:20] incluso se mantuvo hasta el fraccionamiento por EFS; siendo la fracción **F4** candidata para la determinación e identificación de metabolitos bioactivos aunque en el segundo bioensayo de letalidad mostró una disminución significativa de la actividad, debido a que es común en los PNMM encontrar mecanismos sinérgicos o que alguno de los compuestos activos sean inactivados por contaminación o degradación por la presencia de otras comunidades bacterianas.



EXTRACTO CRUDO	PESO SECO (mg)	CL ₅₀ en <i>A. salina</i> (µg/mL)	PESO SECO SEFS (mg)	CL ₅₀ en <i>A. salina</i> (µg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>				
SG1 a	14.7	201.36		
SG2 a	27.6	195.044		
<i>Bacillus licheniformis</i>				
SG1 b	13.7	135.914		
SG2 b	95.7	228.324	F1 3.2	>10000
			F2 2.4	>10000
			F3 2.9	>10000
			F4 3.7	>10000
			F5 1.8	>10000
<i>Streptomyces rubrogriseus</i>				
SG2 c	6.4	> 10000		
SG2 c	82.5	> 10000		
SG2 c1p	440.2	0.758	F1 40.4	>10000
			F2 32.4	793.264
			F3 22.4	>10000
			F4 26.9	244.521
			F5 27	>10000

Tabla 8. Resultados de la evaluación biológica en *A. salina* y rendimientos de extractos crudo y fracciones obtenidas por EFS



8.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Al realizar esta prueba se realizó en primera instancia la estandarización de la metodología la cual correspondió adecuadamente con lo descrito en el protocolo CLSI.

Para el ajuste de la microdilución en caldo, se utilizaron 12 concentraciones de los antibióticos de referencia teniendo un rango de trabajo de 256-0.125 µg/mL, procedimiento realizado bajo condiciones de asepsia **inciso 7.2**. Con respecto a la concentración del inóculo bacteriano utilizado se contaron 16-18 colonias. No se observó contaminación. La interpretación se basó en la observación de la microplaca y se comparó con tablas del protocolo (**Tabla 9**) obteniendo los resultados que se especifican en la estandarización del método.

CMI de la Kanamicina (µg/mL)			
Microorganismo	ATCC	Valor Real	Valor Observado
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	16-64	64
<i>Escherichia coli</i>	11775	1-4	2
CMI de la Gentamicina (µg/mL)			
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	4-16	8
<i>Escherichia coli</i>	11775	1-0.25	1

Tabla 9. CMI de antibióticos de referencia frente a cepas ATCC

El extracto crudo **SG2 c1p**, y sus fracciones correspondientes (**F1-F5**) fueron sometidos a la prueba de susceptibilidad microbiana, presentando únicamente transparencia en la concentración de 256 µg/mL, para *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*.



8.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA

Se colocó el mismo extracto crudo y sus respectivas fracciones de acuerdo al procedimiento indicado en el **inciso 7.3**. Una vez transcurridas 72 horas se determinó CL₅₀ obteniendo los resultados de la **Tabla 10**, además se llevó a cabo la toma de fotografías en una cámara Fisher Scientific acoplada a un microscopio Micromaster® a un aumento de 40x.

EXTRACTO CRUDO	CL ₅₀
SG2 c1p	0.439 mg/mL
F1	>10
F2	>10
F3	>10
F4	>10
F5	>10

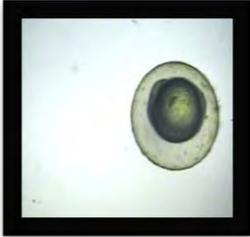
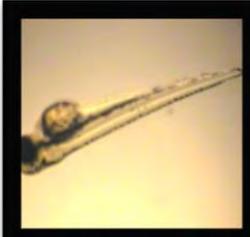
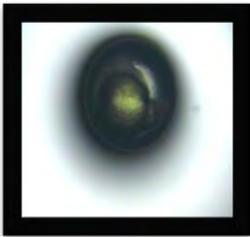
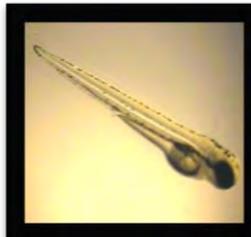
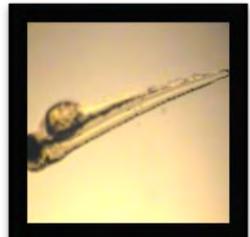
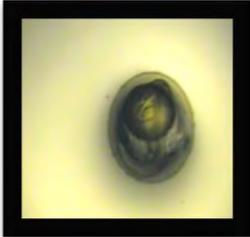
Tabla 10. CL₅₀ del extracto **SG 2 c1p** de *Streptomyces rubrogriseus* y sus fracciones.

De acuerdo a Schulte y Nagel ^{52,53} el siguiente cuadro muestra los puntos clave a observar para evaluar toxicidad y teratogenicidad que puedan presentar las sustancias a probar a través del tiempo.

Puntos toxicológicos	tiempo de exposición		
	8 hrs	24 hrs	72 hrs
Coagulación	•	•	•
Sin separación de la cola		•	•
Sin somita		•	•
Sin latido			•



En el caso de los controles positivos a las 8 horas presentaron el color blanquecino característico de embriones no viables. A pesar de que no se observó un efecto letal en alguna de las concentraciones de trabajo, se presentó una buena actividad del extracto crudo [0.439 mg/ml]. Adicional a esto, en varios embriones se logró observar cierto retraso en el desarrollo o defectos en algunos de ellos. **Tabla 11**

Control +	1.0(mg/mL)	0.1(mg/mL)	0.01(mg/mL)
			
			
			
			



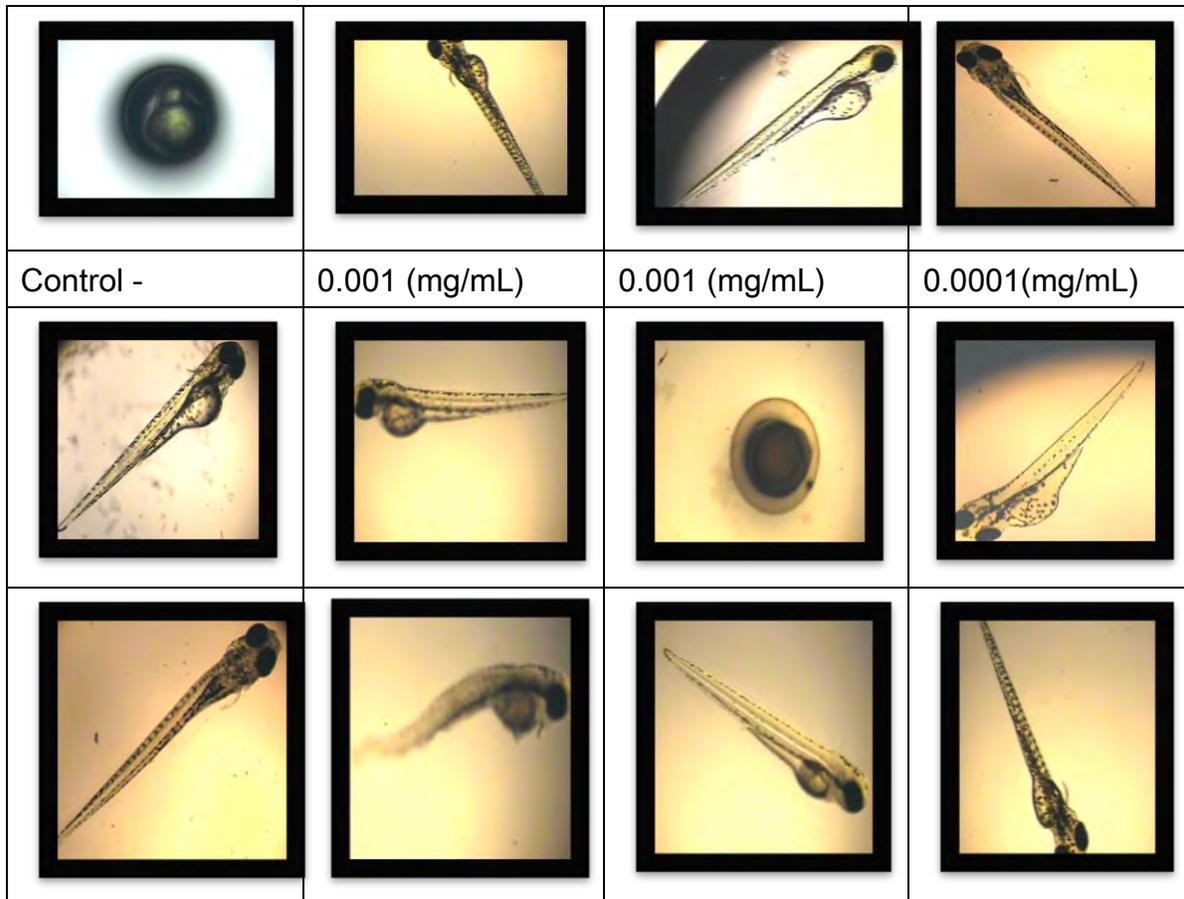


Tabla 11. Fotografías de embriones observados a las 72 hrs.

8.6 PRUEBA DE SUBCULTIVOS DE LA FRACCIÓN SG 2 c1p F4 80:20

Todas las fracciones activas en el bioensayo de Letalidad en *A. salina* resultaron inactivas a la concentración más alta probada (10 µg/mL). Por lo anterior, las tres bacterias evaluadas no presentan actividad antiparasitaria contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.



SEGUNDA PARTE

8.7 DETERMINACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y FRACCIONES

El análisis de los extractos crudos y fracciones por CCF (**Figura 8**) reveló que los extractos tienen perfiles muy complejos. Los compuestos que se lograron extraer a partir de los tres medios de cultivo; realizando tanto la maceración como para partición líquido-líquido, son altamente polares y por dicha característica la separación en placas de fase normal fue muy complicada. El color violeta dado por la ninhidrina da un indicio de las características químicas de los compuestos allí presentes, siendo la mayoría de naturaleza peptídica o bien con un grupo amino primario.

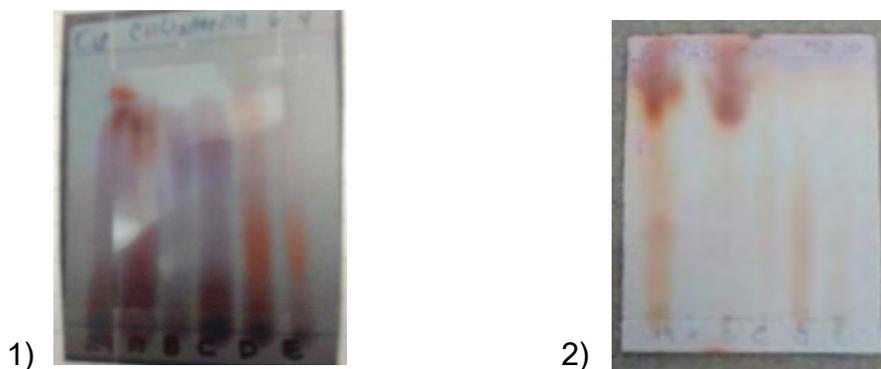


Figura 8. 1) Cromatoplaque de extracto crudo y fracciones de *Bacillus licheniformis* CHCl_3 :MeOH 6:4 2) Cromatoplaques del extracto crudo y fracciones de *Streptomyces rubrogriseus* CHCl_3 :MEOH:H₂O 6:4:2, usando como revelador ninhidrina.



8.8 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La fracción 4 80:20 H₂O:AcCN (**SG2 c1p**) obtenida por EFS con cartucho C18 fue llevada a análisis por CLAR por ser la que presentó mayor letalidad contra *A. salina* en una concentración de 244.521 µg/mL.

En la **Figura 9** se muestra una buena separación de los compuestos debido al lavado previo con H₂O del extracto crudo, eliminando las sales, que constituyen el mayor porcentaje de moléculas presentes en los extractos obtenidos de fuentes marinas. En la fase estacionaria que se encuentra empacada en la columna de fase reversa, quedan retenidos aquellos analitos no polares o de baja polaridad, lo que hace que los compuestos de mayor polaridad tengan una mayor afinidad por la fase móvil. Por ende, son detectados a tiempo de retención menor, lo que indica que los analitos presentes en esta muestra presentan una baja polaridad que se corrobora con lo observado en la CCF.

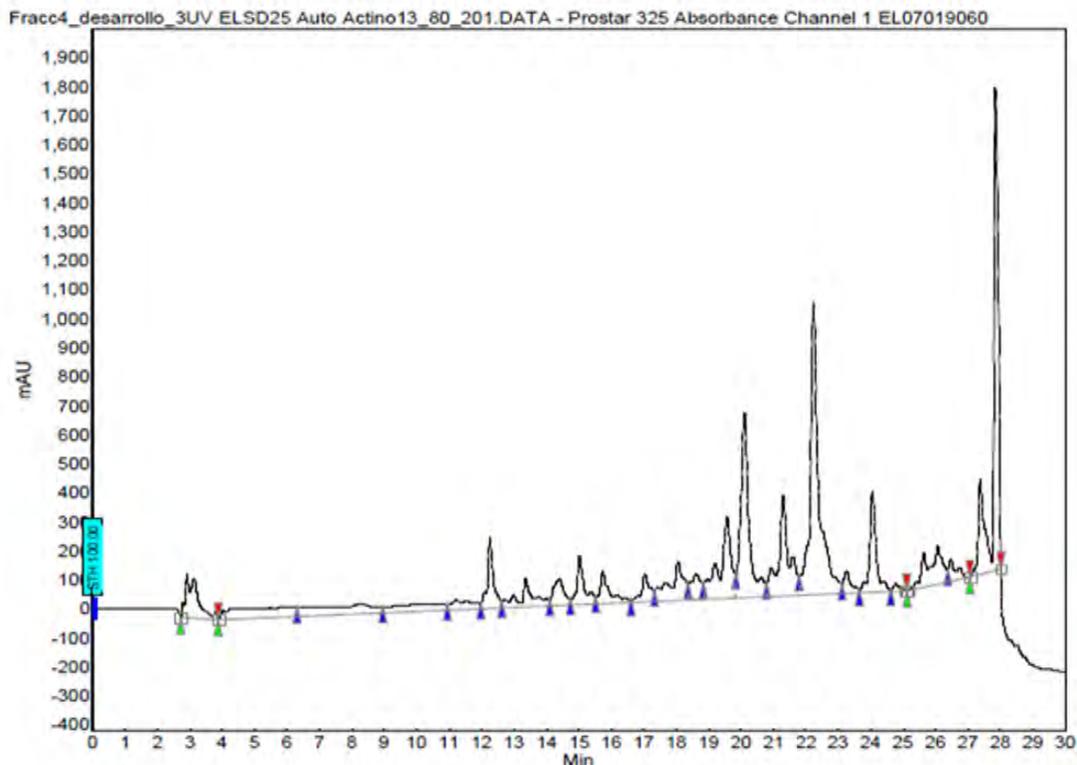


Figura 9- Cromatograma de la fracción **SG2 c1p F4**



8.9 ESTUDIOS DE DEREPLICACIÓN

A fin de determinar si la actividad biológica de la fracción activa (**SG2 c1p F4**) era causada por la presencia de compuestos ya reportados, se procedió a inyectar esta fracción en el sistema Synap G2 de Waters (CL-EMAR). El cromatograma obtenido se presenta en la **Figura 10**.

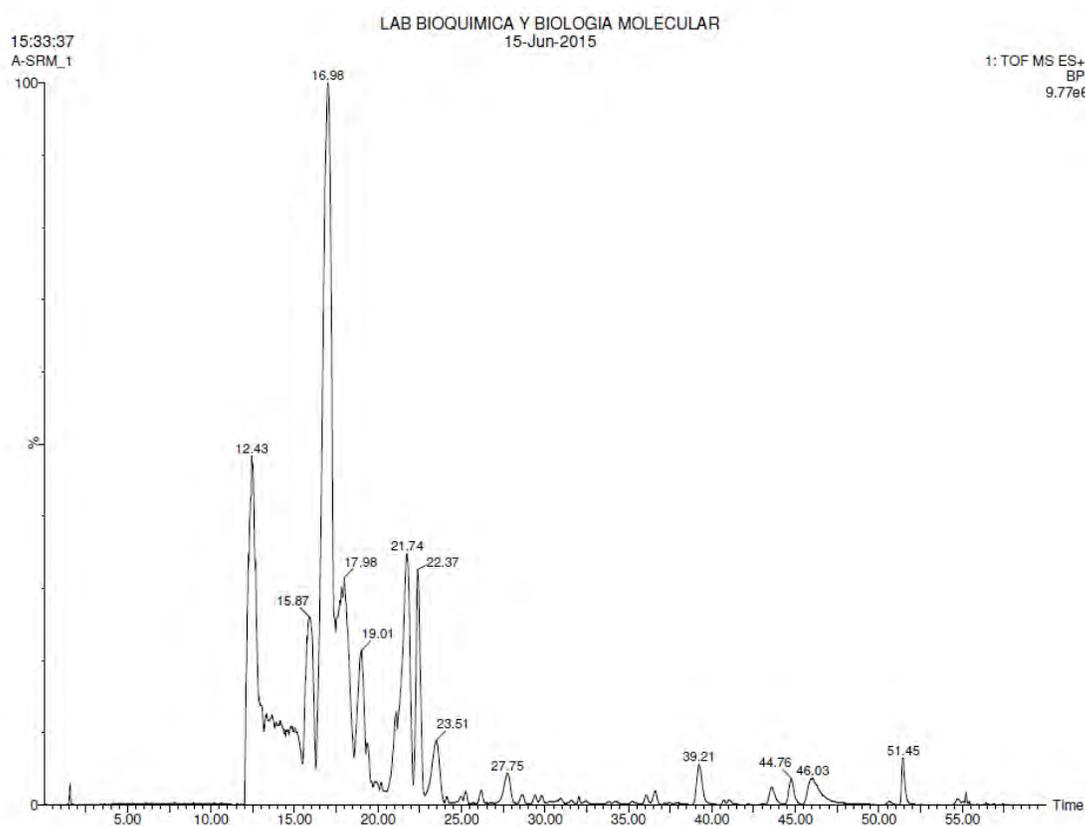


Figura 10- Cromatograma de la fracción **SG2 c1p F4** analizada mediante CL-EM en fase reversa.

Cada señal obtenida fue caracterizada por el detector de masas de alta resolución **Figura 11**, de tal forma que cada Ión Molecular $[M^+]$ de cada señal se buscó en el Diccionario de Productos Naturales Marinos. La búsqueda realizada reveló que la actividad biológica es ejercida por la Piericidina A1 (415.2795 $[M^+]$ experimental; mientras que se obtuvo un valor calculado de 415.2527 la cual eluye con un tr de 17.3min) y cuyo espectro de masas se presenta en la **Figura 12**. La confirmación de la estructura se realizó mediante los fragmentos presentes en el espectro de masas, y que concuerda con lo reportado.⁵⁴



En el espectro de masas aparecen más fragmentos, pero es importante recordar que es una mezcla de compuestos, y que se encuentran otros compuestos con la misma polaridad.

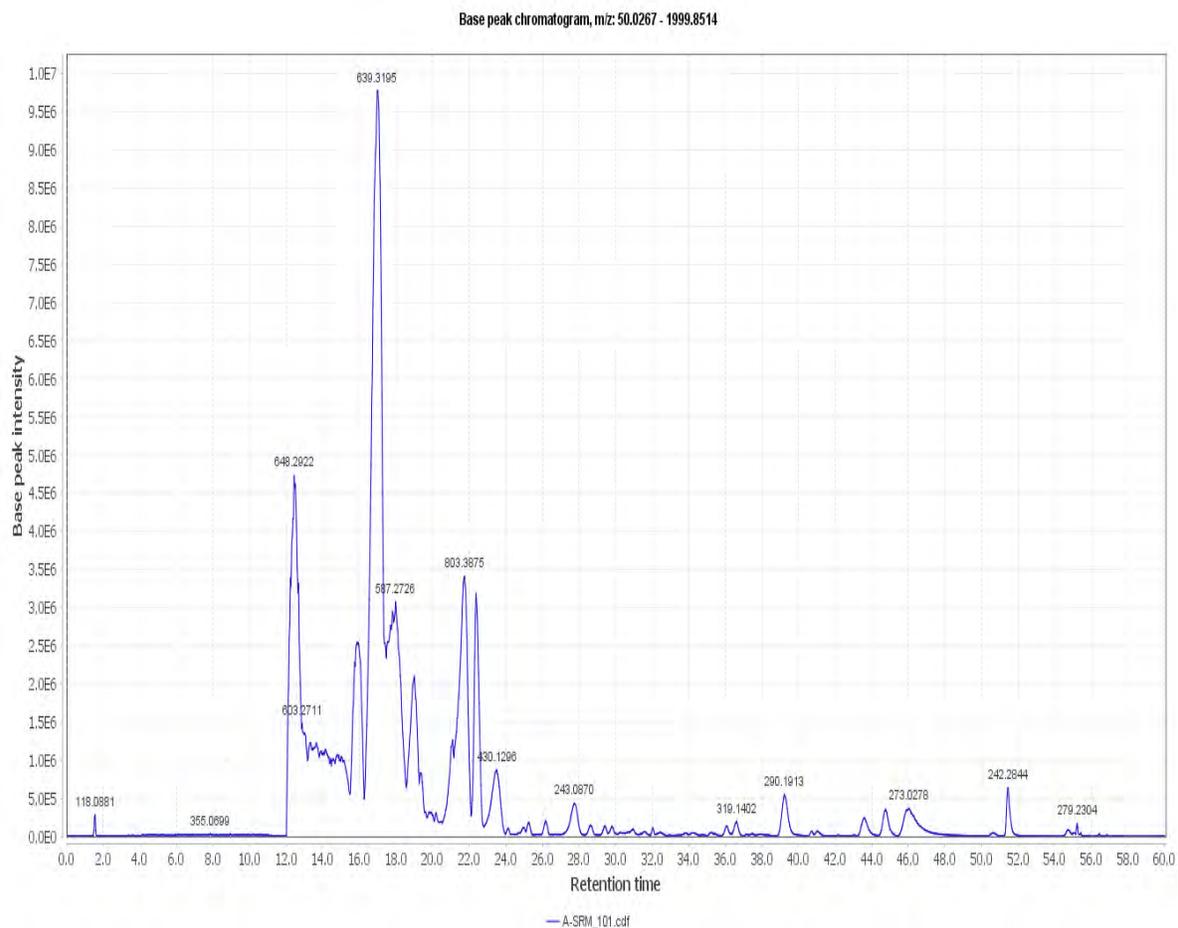


Figura 11. Cromatograma con los pesos moleculares identificados mediante el programa Masslynx



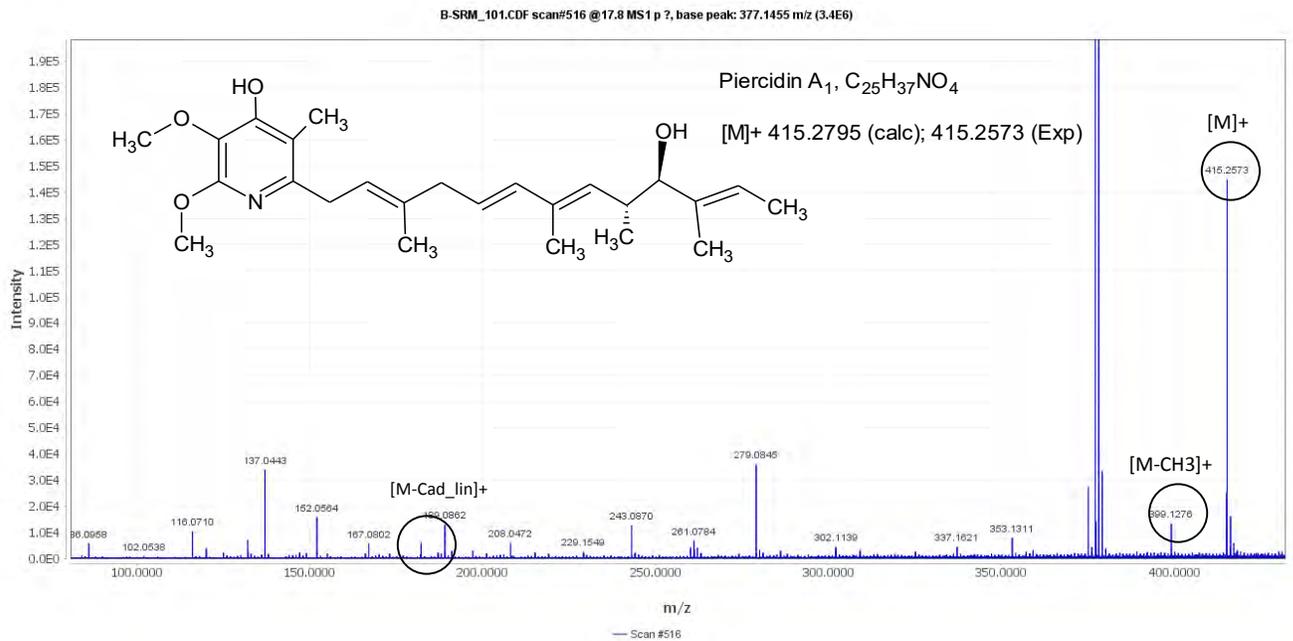


Figura 12. Espectro de Masas de la Piericidina A1 (2-(10-hydroxy-3,7,9,11-tetramethyl-2,4,7,11-tridecatetraenyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-4-pyridinol) encontrada en el extracto bioactivo. El espectro fue generado con el programa Maxent3, dentro del software Masslynx. [M-cad_linear] y corresponde al fragmento de la α -piridinona sin la cadena lineal.

La Piericidina A1 pertenece a una familia de antibióticos derivados de la α -piridinona que se han aislado de varias especies de *Streptomyces* tanto terrestres como marinas. Debido a su alta similitud con la ubiquinona, la piericidina A1 es un potente inhibidor del Complejo NADH-Ubiquinona oxidoreductasa. Además de la actividad antibiótica e insecticida, se ha descrito que presenta actividad anti-cancerígena. Inclusive se ha aislado de una cepa de *Streptomyces* de aguas profundas (*Streptomyces* sp. SCSIO 03032) de la cual se aisló todo el complejo enzimático.⁵⁴



IX. CONCLUSIONES

- ❖ Se confirmó la pureza e identidad bacteriana de las tres cepas, siendo éstas pertenecientes al grupo de bacterias Gram positivas.
- ❖ La evaluación biológica de los extractos orgánicos preparados a partir de los diferentes aislamientos utilizando como monitoreo primordial el ensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*, permitió la selección de una cepa bacteriana como posible productora de moléculas con actividad antiparasitaria.
- ❖ Tanto las fracciones como el extracto crudo SG2 c1p presentaron actividad a la concentración de 256 µg/mL, como concentración mínima inhibitoria.
- ❖ El extracto crudo de *Streptomyces rubrogriseus* presentó citotoxicidad en embriones de pez cebra [DL50=0.439 mg/mL], probablemente sea un efecto sinérgico, dado que la separación de esta fracción por C18 llevó a fracciones no activas en el bioensayo.
- ❖ La separación por SEFS en fase reversa llevó a la fracción F4 (H₂O:AcCN 80:20) que resultó activa en la evaluación con *A.salina* y con efecto antimicrobiano, sin embargo, no fue activa en el ensayo de actividad antiparasitaria por el método de subcultivos.
- ❖ El fraccionamiento del extracto total obtenido a partir de la especie *Streptomyces rubrogriseus* permitió la identificación de la Piericidina A1 (2-(10-hydroxy-3,7,9,11-tetramethyl-2,4,7,11-tridecatetraenyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-4-pyridinol) como la probable molécula responsable de la actividad.



X.PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar muestreos a mayor profundidad tanto de sedimentos como de la columna de agua, con el fin de comparar la cantidad y tipo de metabolitos secundarios que puedan generar los microorganismos marinos.
- ❖ Realizar la investigación química para la elucidación estructural de las α -piridinonas detectadas en *Streptomyces*, generando mayor cantidad de biomasa.
- ❖ Preparar derivados de los compuestos obtenidos con la finalidad de mejorar la actividad antiparasitaria.



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Rashidul, H. Human Intestinal Parasites. J Health Popul. Nutr. **2007**, 25(4):387-391.
2. Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O. Marine Natural Products Active Against Protozoan Parasites. Handbook of Marine Natural Products. **2012**, 1075-1110.
3. WHO. Intestinal parasites control: burden and trends. World Health Organization. **1998**.
4. Upcroft, P.; Upcroft, J.A.; Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clin, Microbio. Rev. **2001**, 14(1):300
5. Aparicio, P.; Rodríguez, E.; Gárate, T.; Molina, R.; Soto, A.; Alvar, J. **2003**. Terapéutica antiparasitaria. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **2003**, 21 (10): 579-585
6. Espinosa-Cantellano, M.; Martínez, P.A. The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics. Biol. Cell. **1991**, 72:189-200.
7. Haque, R.; Huston, C.D.; Hughes, M.; Houpt, E.; Petri, W.A. Amebiasis. N. Engl. Journal Med. **2003**, 348:1565-1573.
8. Ravdin, J.I.; Guerrant, R.L. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. Journal. Clin. Invest. **1981**, 68:1305-1313
9. Upcroft, P.; Upcroft, J.A.; Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clin, Microbio. Rev. **2001**, 14(1):300
10. WHO/PAHO/UNESCO report A. Consultation with experts on amoebiasis. México City, México 28-29 J. Epidemiol Bull. 18:13-14
11. Bouré, P. Infecciones parasitarias del intestino. Tratado de medicina. **2002** – E4-0550
12. Becerril, M.A. Parasitología Médica. 2da ed. McGrawHill. **2013**



13. Rada, J.; Aranda, E. **2002**. Parasitosis intestinal. 120-130
14. Upcroft, P.; Upcroft, J.A.; Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clin, Microbio. Rev. **2001**, 14(1):300
15. Manchaca, C. "Frecuencia de Giardia lamblia en niños menores de 15 años" Tesis Licenciatura en Bioquímica. **2008**
16. López Olmos, J.; Gasull, J. Infección vaginal por tricomonas (e infecciones mixtas) y atipias celulares, en la citología cervicovaginal. Clin, Invest, Gin. Obst. 2011;38(4):120-127
17. Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. Clinical and Microbiological Aspects of Trichomonas vaginalis. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11(2):300
18. Pérez-Molina, J.A.; Díaz-Menéndez, M.; Pérez-Ayala, A.; Ferrere, F.; Monje, B.; Norman, F.; López- Vélez, R. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. **2010**, 28(1):44-59
19. Johnston, V. J. & Mabey, D. C. Global epidemiology and control of Trichomonas vaginalis. Curr. Opin. Infect. Dis. **2008**, 21: 56-64.
20. Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. Natural Products in Drug Discovery and Development. J. Nat. Prod. **1997**, 67, 52-60.
21. Blunt, J.; Buckingham, J.; Munro, M. Taxonomy and Marine Natural Products Research. Handbook of Marine Natural Products. **2014**, 1: 11-18.
22. Gerwick, W.H. Marine Natural Products into the future. Handbook of Marine Natural products. **2012**, 30: 1421-1425
23. Gerwick, W.H.; Moore, B.S. Lessons from the Past and Charting the Futures of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. Chemistry & Biology. **2012**, 85-98
24. Houssen, W.E. & Jaspars Marcel. Isolation of Marine Natural Products. Eds. Sarker, S.D.; Nahar, L. Natural products isolation. Methods Biotech. **2006**. 14. 367-362



25. Blunt, J.; Buckingham, J.; Munro, M. 2014. Taxonomy and Marine Natural Products Research. Handbook of Marine Natural Products. **2014**, 1: 11-18.
26. Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. **2003**, 323-358
27. Ward, A.C. & Bora, N. Diversity and biogeography of marine Actinobacteria. Curr. Opin. Microbiol. **2006**, 9,1-8.
28. Kennish, J.M. Practical Handbook of marine science. CRC. **2001**, 441-444.
29. Murphy, B.T.; Jensen, P.R.; Fenical, W. The chemistry of Marine Bacteria. Handbook of Marine Natural Products. **2012**, 3: 164:166
30. Mojid, M.M.A.; Jae, S.H.; Tofazzal, I.M. Divesity of secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: Chemistry and Biological Activity. Mar. Drugs. **2013**, 11:2846-2872
31. Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, A.M; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, M.G.; Berssières, P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; *et al.* The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. **1997**, 390: 249-256.
32. Sogin, M.L.; Morrison H. G.; Huber J. A.; Welch D. M.; Huse S.M.; Neal P.R.; Arrieta J.M. & Herndl G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proc. Natl. Acad. Sci USA. **2006**, 32,12115-12120.
33. Azumi, M.; Ogawa, K.; Fujita, T.; Takeshita, M.; Yoshida, R.; Furumai, T.; Igarashi, Y. Bacilosarcins A and B, novel bioactive isocoumarins with unusual heterocyclic cores from the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. Tetrahedron Elsevier. **2008**, 64, 6420-6425.
34. Shahidullah, T. F.; Hye, K.J.; Ah, L.M.; Seung, L.H.; Seok, L.J.; Jae, S.H. leodoglucomides A and B from a Marine-Derived Bacterium *Bacillus licheniformis*. Org. Lett. **2012**. 4, 6,1464-1467.



35. Ghai, R.; McMahon, K.D.; Rodríguez, V.F. Breaking a paradigm: Cosmopolitan and abundant freshwater Actinobacteria are low GC. *Environ. Microbiol.* **2012**, 4:29
36. Helmke, T.; and Weyland; H. *Rhodococcus marinonascens* sp. an Actinomycete from the Sea. *Int. J.Syst. Bacteriol.* 1984 34:127-138.
37. Goodfellow M. & Haynes J. A. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L.; Bojalil, L.F. & Yakoleff, V. Academic Press, Orlando, 453-472.
38. Bull, T.A.; Statch, J.E. Marine Actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TIM*, **2007**. 15, 11, 491-497.
39. Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., and Kim, S.-K. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol. Res.* **2013**, 168, 311-332.
40. Maldonado, L.A.; Statch J.E.; Pathomaree W.; Ward A.C.; Bull A.T. & Goodfellow M. Diversity of cultivable Actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek.* **2005**, 87,11-18.
41. Pan, H.Q.; Zhang, S.Y.; Wang, N.; Li, Z.L.; Hua, H.M.; Hu, J.C.; Wang, S.J. New Spirotetronate Antibiotics, Lobophorins H and I, from a South China Sea-Derived *Streptomyces* sp. 12A35. *Mar. Drugs.* **2013**, 11, 3891-3901.
42. Espinosa, B.A.; Rivas, G.G.; Sánchez, A.N.; Mercado, S.I.E. Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, México. *Rev.biol.mar.oceanogr.* **2012**, 2,317-325.
43. Dalisay, D.S.; Williams,D.E.; Wang, X.L.; Centko, R.; Chen, J.; Andersen, R.J. Marine Sediments-Derived *Streptomyces* Bacteria from British Columbia, Canada Are a promising Microbiota Resource from the Discovery of Atimicrobial. *Nat. Prod.* **2013** 8, 10, e77078
44. Fattorusso, E.; Taglialatela, S.O. Marine Natural Products Active Against Protozoan Parasites. *Handbook of Natural Products* **2012**, 21: 1076-1078.



45. Pimentel-Elardo, S.M.; Kozytska, S; Bugni, T.S; Ireland, C.M.; Moll, H; Hentschel Ute. Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Mar Drugs*. **2010**, 8: 373-380.
46. Jensen, P.; Lauro, F. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*.2008, 94:61-62
47. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putman, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J. Med. Plant. Res*, **1982**, 45, 31-34.
48. Muñoz, R.A. “Estudio Químico y biológico preliminar de dos especies de pepino de mar de la familia Stichopodidae de las costas de Yucatán como fuente potencial de compuestos”. **2011**. Tesis de Licenciatura en Q.F.B. Fac. Química UNAM.
49. CLSI Handbook. M100-S26: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th Edition, 2015
50. Mandreak, N.; Thakur, N.L. Significance of the zebrafish model in the discovery of bioactive molecules from nature. *Biotechnol Lett*. **2009**, 31, 171-179
51. Cedillo- Rivera, R,; Chávez, B.; González-Robles. A.; Yépez-Mulia, L. In vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol*. **2002**, 49, 201-208.
52. Schulte, C.; Nagel, R. Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test- preliminary results. **1994**, 22, 12-19.
53. Nagel, R. DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*)- a general model in ecotoxicology and toxicology. **2002**. 19, 38-48.
54. Yaolong Chen, Wenjun Zhang, Yiguang Zhu, Qingbo Zhang; Xinpeng Tian, Si Zhang, Changsheng Zhang. Elucidating Hydroxylation and Methylation Steps Tailoring Piericidin A1 Biosynthesis. *Org. Lett*. **2014**, 16, 736–739. [dx.doi.org/10.1021/ol4034176](https://doi.org/10.1021/ol4034176)

