



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS ANTIBACTERIANOS  
PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS ENDÓFITOS DE LA PLANTA  
*Amphipterygium adstringens*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Miriam Blanca Trenado Uribe

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química, UNAM

Dr. Edmundo Castillo Rosales

Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F. junio, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al programa de Ciencias Bioquímicas por la oportunidad de ser un miembro más de esta máxima casa de estudios de México.

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez por ser un tutor tan completo, que me ha brindado su apoyo, trabajo, conocimientos, atención y por si fuera poco su amistad.

Agradezco a la Dra. Beatriz Ruíz por su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo y su gran paciencia.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial; al Dr. Andrés Navarrete y al Dr. Edmundo Castillo, por su interés y las observaciones que enriquecieron este trabajo.

Agradezco a los miembros de mi jurado por la revisión y corrección del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Fausto Rivero Cruz por su magnífica colaboración en este proyecto, mostrándose siempre positivo y alentador.

Agradezco al personal de la USAI por los análisis químicos realizados y por supuesto a la Q. Georgina Duarte por su amable disposición.

Agradezco a la Dra. Mayra Silva Miranda por su gentil colaboración.

Agradezco al Dr. Sergio Romero por el apoyo y los consejos dados antes y durante la realización de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Blanca Estela García Almendárez por la donación de cepas.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada número 379795, durante el periodo de maestría.

Gracias al -Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado" (PAEP) este trabajo fue presentado en modalidad de poster en el congreso: "2<sup>nd</sup> International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf", Plovdiv; Bulgaria.

Parte de éste trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IN202216, DGAPA, UNAM.

## DEDICATORIA

- ✿ Esta tesis es dedicada con cariño a todas las personas que en algún momento estuvieron a mi alrededor, todos ustedes influenciaron en el presente proyecto, directa o indirectamente.
- ✿ Pero principalmente va dedicada a mis padres; por ponerme en el camino de la vida, darme lo mejor de ellos, creer en mí y darme la libertad de ser yo. De igual manera a mis hermanos (Jairo, Hugo e Iris) quienes han sido motivo de mi esfuerzo diario.
- ✿ A Ángel por ser mi guía, mi compañero, mi amigo, en pocas palabras; la magia de mi vida.
- ✿ A Liz, quien a su corta edad me ha tomado como un ejemplo a seguir.
- ✿ A la memoria de mi abuelo J. Carmen, fue una dicha haberlo conocido.
- ✿ A mis tíos Oralia y Enrique por adoptarme como un miembro más de su familia, por su cariño y comprensión que nunca me faltaron.
- ✿ A Allan por mostrarme la belleza de los endófitos. Y por sus consejos tan certeros.
- ✿ A Sara, por sus lecciones; por mostrarme la sinergia de Inteligencia-Coraje-Humildad.
- ✿ A la naturaleza misma, quien fue la proveedora de la materia prima, la inspiración y la protagonista de esta tesis.
- ✿ Al doctor Sergio Romero quien fue crucial en este camino.
- ✿ Y por supuesto, a los integrantes de mi segunda casa; el doctor Sergio Sánchez, Bety, Alba, Omar, Anita, Ivonne, Diana Rocha, Diana Bautista, Monce, Karol, Victor, Nidia, Melisa, Hugo, Sara, Allan, Silvia, Silvana, Alexis y Katerine.

***“No debemos dejar de explorar, porque al final de nuestra exploración  
llegaremos a nuestro punto de partida y conoceremos el lugar por  
primera vez.” T. S. Eliot***

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Metabolitos secundarios .....	3
2.1.1 Antibióticos.....	3
2.1.1.2 Clasificación química.....	4
2.2 Actinomicetos como productores de metabolitos secundarios .....	14
2.3 Endófitos .....	15
2.4 <i>Amphipterygium adstringens</i> .....	16
2.5 Aislamiento de actinomicetos de la planta <i>Amphipterygium adstringens</i> .....	17
2.6 Purificación e identificación de metabolitos secundarios con actividad antibiótica ..	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Conservación de los actinomicetos en estudio y cepas de referencia.....	23
6.2 Selección de un actinomiceto endófito y su medio de cultivo para la producción de antibiótico .....	23
6.3 Cinética de crecimiento-producción del actinomiceto seleccionado .....	25
6.4 Fermentación y obtención de extractos de diclorometano .....	26
6.5 Fraccionamiento de los componentes del extracto y purificación de compuestos antibióticos .....	26
6.6 Análisis químicos .....	27
6.7 Evaluación de capacidad antibiótica: Concentración mínima inhibitoria.....	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
7.1 Selección de la cepa de trabajo y de su medio de cultivo para la producción de antibióticos. ....	29
7.2 Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos bioactivos. ....	31
7.3 Obtención y rendimiento de los extractos crudos de la cepa NF3.....	33
7.4 Identificación de compuestos por cromatografía de gases acoplada a masas .....	34
7.5 Fraccionamiento y purificación de compuestos antibióticos del extracto de diclorometano.....	37
7.6 Caracterización química por RMN H <sup>1</sup> , C <sup>13</sup> y UV .....	39
7.7 Concentración mínima inhibitoria.....	41

8. CONCLUSIONES..... 43  
9. PROSPECTIVAS ..... 44  
10. BIBLIOGRAFÍA ..... 45  
11. ANEXO 1..... 50  
12. ANEXO 2..... 53  
13. ANEXO 3..... 54  
13. ANEXO 4..... 55

## RESUMEN

A lo largo de la historia los antibióticos han contribuido al incremento en la expectativa de vida de los seres humanos, sin embargo su desarrollo ha estado en declive desde los años 70s. Además, la creciente aparición y dispersión de microorganismos patógenos multirresistentes a los antibióticos sigue siendo un problema global por lo que la búsqueda de nuevos antibióticos sigue teniendo una gran importancia en la industria farmacéutica. Una de las alternativas emergentes para la búsqueda de nuevos antibióticos es el aislamiento de microorganismos endófitos (microorganismos residentes en el interior de las plantas), los cuales han sido poco estudiados a pesar de su gran potencial como productores de moléculas bioactivas. *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) es una planta de gran importancia en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversas enfermedades que incluyen el cáncer y cuyos endófitos no han sido estudiados hasta el momento. Es así que el objetivo del presente trabajo fue la búsqueda de compuestos antibacterianos de un actinomiceto endófito de la planta *A. adstringens*.

En el laboratorio se aislaron cuatro actinomicetos endófitos del árbol *A. adstringens*. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antibiótica de los cuatro actinomicetos y se seleccionó a la cepa NF3 para la caracterización de sus metabolitos bioactivos, ya que presentó un efecto inhibitorio contra *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*. De una caracterización del tipo de compuestos bioactivos que produce la cepa NF3 se identificaron los alcaloides ciclo (Leucil-prolil) y cis-ciclo (fenil-prolil) ya reportados como productos de microorganismos endófitos, mientras que otros compuestos no han sido reportados anteriormente y potencialmente podrían ser novedosos. Así mismo, se aisló el compuesto antitumoral y antibiótico esteffimicina B, que es una antraciclina activa contra bacterias Gram-positivas. Acorde con esta actividad ya reportada, se evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la esteffimicina B contra bacterias Gram-positivas: *Micrococcus luteus* (<0.6 µg/ml), *Listeria innocua* (16 µg/ml), *Listeria monocytogenes* (4 µg/ml), *Bacillus cereus* (4 µg/ml) y dos cepas de *Staphylococcus aureus* (4 y 8 µg/ml).

En conclusión, los resultados obtenidos de la caracterización química demuestran el potencial de la cepa NF3 como productora de compuestos antibióticos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La progresiva aparición y propagación de microorganismos patógenos multirresistentes a los antibióticos, sigue siendo un problema global (Shlaes y Spellberg, 2012). Desde la introducción de los antibióticos, éstos han sido la primera opción para el tratamiento de infecciones bacterianas; de hecho, los antibióticos son los fármacos que más vidas han salvado a lo largo de la historia humana (Dryden et al., 2009, WHO, 2011; Butler et. al., 2013; Holden, 2015). De acuerdo con lo anterior, es evidente la relevancia de la búsqueda de nuevos antibióticos.

La principal fuente de antibióticos siguen siendo los productos naturales (Genilloud, 2014), los cuales han proporcionado la mayor parte de las clases químicas de antibióticos hasta ahora conocidas. Si bien el mayor número de metabolitos secundarios ha sido descubierto en las plantas, los microorganismos son los principales productores de metabolitos bioactivos de interés comercial. Particularmente, en la producción de antibióticos destacan los actinomicetos, y siendo más específicos; el género *Streptomyces* (Genilloud, 2014).

Por otro lado, en el descubrimiento de nuevos antibióticos se busca que pertenezcan a nuevas clases o que tengan nuevos mecanismos de acción y así disminuya la probabilidad de ser susceptibles a los mecanismos de resistencia microbiana ya existentes. Sin embargo, para llegar a nuevos compuestos antibacterianos se requieren diversas estrategias, como la búsqueda de los microorganismos productores de estos compuestos en diversos ambientes (Genilloud, 2014).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Metabolitos secundarios**

Los metabolitos primarios son moléculas orgánicas que participan en las reacciones catabólicas y anabólicas esenciales para el crecimiento de la propia célula y que están altamente conservados entre los tres dominios de la vida (O'Brien y Wright, 2011). En cambio, los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos de bajo peso molecular (<3000), producidos por el organismo con fines adaptativos, es decir; cumplen con funciones no esenciales para la supervivencia del organismo, como pueden ser funciones de señalización o predatorias, por lo tanto, desde el punto de vista evolutivo no se encuentran conservados entre los tres reinos de la vida. La naturaleza química de dichos metabolitos varía, pudiendo ser péptidos, policétidos, carbohidratos, lípidos, terpenos, esteroides o alcaloides. Los metabolitos secundarios pueden ser sintetizados utilizando vías distintas a las usadas por el metabolismo primario, aunque en muchas ocasiones utilizan esqueletos carbonados provenientes de algunas vías primarias (O'Brien y Wright, 2011).

En general, los metabolitos secundarios han cambiado la historia humana, un claro ejemplo de metabolitos secundarios explotados con fines clínicos lo constituyen antibióticos, los cuales continúan salvando innumerables vidas (Dryden et al., 2009). Además, de acuerdo con Berdy (2005) todo metabolito secundario puede ser potencialmente un metabolito bioactivo, y es común que en un principio no se conozca su bioactividad, esto ha pasado con cientos de metabolitos secundarios reportados como inactivos y posteriormente son considerados bioactivos (O'Brien y Wright, 2011).

#### **2.1.1 Antibióticos**

Selman Waksman acuñó el término "antibiótico" en 1947, y lo definió como "una sustancia química, producida por microorganismos, la cual tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o matar bacterias y otros microorganismos". Pero dicha definición se ha ido modificando a través del tiempo. En la actualidad un antibiótico es sinónimo de un antibacteriano; es un agente químico de pequeño peso molecular que en bajas concentraciones es capaz de matar o inhibir el crecimiento bacteriano (WHO, 2011; Bennett, 2014).

### 2.1.1.2 Clasificación química

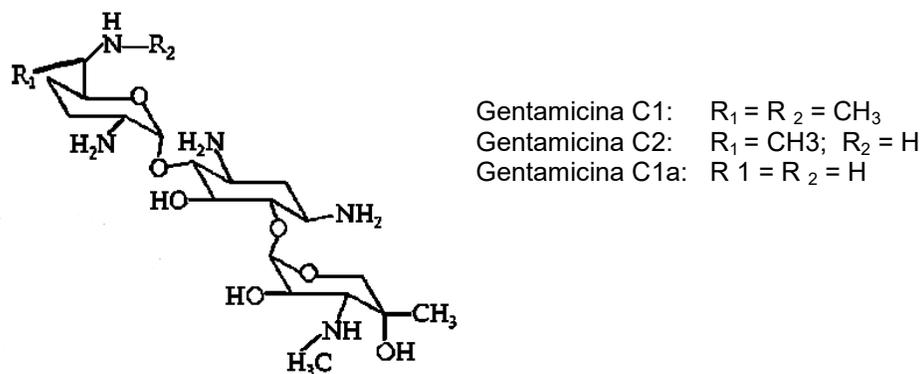
Existen diferentes criterios para clasificar a los antibióticos. Por ejemplo en su espectro de acción (amplio o reducido). Por su origen (natural, sintético o semisintético). Según el mecanismo de acción (por inhibición de la formación de la pared bacteriana, de la síntesis proteica, de la duplicación del DNA, de la síntesis de membrana citoplasmática o de vías metabólicas). O bien de acuerdo a la clase química a la cual pertenecen (Schwalbe et al., 2007). Aquí se describirá la clasificación por clases químicas.

#### Aminoglucósidos

La clase de los aminoagluósidos se constituyen de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol, algunos ejemplos de esta clase son kanamicina, estreptomicina, gentamicina (Fig. 1) y neomicina (Schwalbe et al., 2007; Singh et al., 2014).

De acuerdo a su mecanismo de acción, se unen directa e irreversiblemente al RNA ribosomal de la subunidad 30S. La penetración del antibiótico a la célula suele ser mejorada por la coadministración de inhibidores de la síntesis de la pared celular como son los betalactámicos o glicopéptidos. Esto es especialmente útil para evitar la resistencia a aminoglucósidos en el tratamiento de bacterias Gram-negativas de mayor importancia clínica (Schwalbe et al., 2007; Singh et al., 2014).

Los aminoglucósidos son activos contra la mayoría de especies de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y estafilococos, incluyendo *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina, pero son inactivos frente a bacterias anaerobias. Las resistencias bacterianas a estos antibióticos surgen debido a tres mecanismos principalmente; baja penetración a la pared celular bacteriana, una incapacidad para unirse al receptor en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano debido a mutaciones cromosómicas y la producción de enzimas que inactivan al antibiótico (Schwalbe et al., 2007).



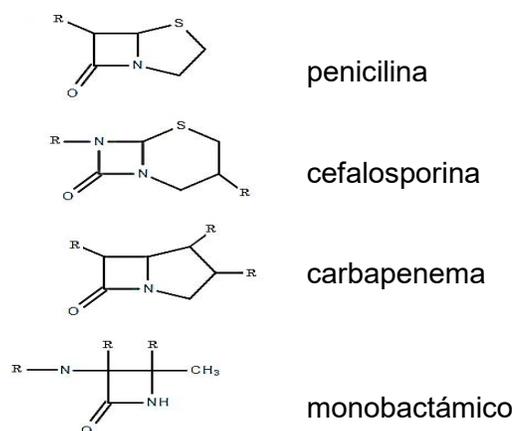
**Figura 1.** Estructura de la gentamicina

### $\beta$ -lactámicos

Como lo dice su nombre, son aquellos antibióticos que en su estructura poseen un anillo betalactámico. Constituyen la familia de antibióticos más empleada en la práctica clínica y además, presentan escasa toxicidad (Schwalbe et al., 2007).

Se clasifican en los siguientes cuatro grupos de acuerdo a los grupos funcionales unidos al anillo  $\beta$ -lactámico (Fig. 2). penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas (Guzmán et al., 2004).

Los  $\beta$ -lactámicos actúan inhibiendo la última etapa de la biosíntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico (Schwalbe et al., 2007).



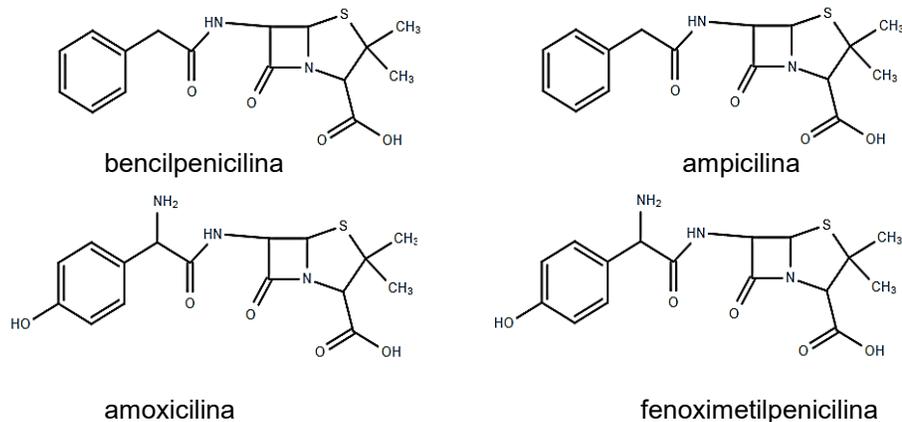
**Figura 2.** Estructuras químicas de las clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

El espectro de los  $\beta$ -lactámicos se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram-

negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso como antibiótico de primera opción y su eficacia en determinadas situaciones. Los mecanismos de resistencia ante los  $\beta$ -lactámicos son tres, destrucción del antibiótico por  $\beta$ -lactamasas, disminución del transporte a la célula, y baja afinidad de PBP (transglucosilasas y transpeptidasas conocidas como PBP de Penicilin Binding Protein) que se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática con su sitio activo hacia el espacio periplásmico (Schwalbe et al., 2007).

### Penicilinas

Este grupo de antibióticos contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico (que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico), el anillo de tiazolidina es el responsable de su actividad, por lo que la ruptura del anillo por  $\beta$ -lactamasas deja inactivo al compuesto. Sustituciones en la cadena lateral del anillo resulta en la formación de diferentes penicilinas (Fig. 3) con diferentes propiedades y diversos espectros de actividad. La penicilina G (descubierta por Alexander Fleming) fue el primer antibiótico empleado ampliamente en medicina. El espectro de la penicilina G abarca cocos Gram-positivos y Gram-negativos (ej. *Neisseria meningitidis*), bacilos Gram-positivos (aerobios facultativos y anaerobios), espiroquetas y algunos bacilos Gram-negativos anaerobios (Park y Strominger, 1957; Schwalbe et al., 2007).



**Figura 3.** Estructura molecular de algunas penicilinas.



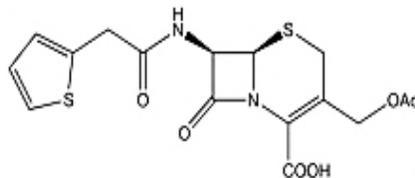
## Cefalosporinas

Las cefalosporinas poseen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino (de seis miembros). Las modificaciones en la posición 7 del ácido 7-aminocefalosporánico están asociadas con la alteración en su actividad antibacteriana (Schwalbe et al., 2007).

Las cefalosporinas son empleadas contra infecciones de Gram-positivos y Gram-negativos, especialmente *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella* sp.

Existen cuatro generaciones de cefalosporinas; las cefalosporinas de primera generación como la cefalotina (Fig. 6), son muy activas frente a los cocos Gram-positivos; sin embargo las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad (principalmente contra estafilococos y estreptococos) a cambio de una mayor actividad frente a bacilos Gram-negativos como bacterias nosocomiales multiresistentes como *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) y menor susceptibilidad a betalactamasas (Rivas et al., 2002; Schwalbe et al., 2007).

Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y *Listeria monocytogenes* (Schwalbe et al., 2007).

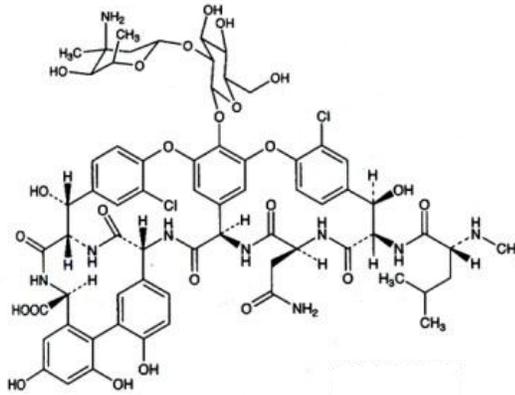


**Figura 6.** Estructura química de la cefalotina

## Macrólidos

Los macrólidos se caracterizan por tener un anillo de lactona que contiene de 12 a 16 átomos a los que están unidos uno o más azúcares a través de enlaces glicosídicos. Los macrólidos se clasifican de acuerdo al número de carbonos. Los macrólidos más empleados clínicamente son la eritromicina, claritromicina (14 carbonos) y azitromicina (Fig. 7) (15 carbonos) (Schwalbe et al., 2007; Singh et al., 2013).



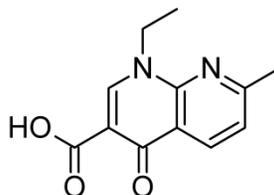


**Figura 8.** Estructura química de la vancomicina.

### Quinolonas

Las quinolonas contienen en común un bicyclo con un átomo de nitrógeno en la posición 1. A partir del ácido nalidíxico, diversas sustituciones han dado lugar a otras quinolonas (Singh et al., 2013). Las quinolonas de primera generación; como el ácido nalidíxico (Fig. 9) y el ácido pipemídico tienen actividad sobre enterobacterias, aunque son inactivas contra bacterias Gram-positivas y anaerobias Gram-negativas. Las siguientes generaciones aumentaron el espectro contra Gram-negativas y Gram-positivas. Así las de segunda generación (norfloxacina y ciprofloxacina) son llamadas fluoradas (fluoroquinolonas), ya que incorporan un átomo de flúor y presentan mucho mayor actividad sobre Gram-negativas, incluso han llegado a ser empleadas como antibiótico de primera opción en el uso clínico. Las de tercera generación (levofloxacina, gatifloxacina) retienen la actividad sobre Gram-negativas y mejoran la actividad sobre Gram-positivas (principalmente *S. aureus* y *Enterococcus*) y anaerobios (Bush, 2012; Singh, et al., 2013).

Las quinolonas actúan inhibiendo las DNA topoisomerasas, la topoisomerasa II es más sensible a la acción de las quinolonas en caso de bacterias Gram-negativas, mientras que en bacterias Gram-positivas la más sensible es la topoisomerasa IV (Singh et al., 2013).

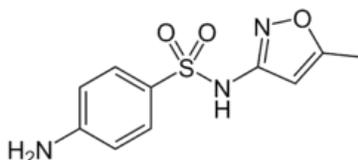


**Figura 9.** Estructura química del ácido nalidíxico.

## Sulfonamidas

Son amidas del ácido sulfónico o besílico. La estructura molecular es similar al ácido p-aminobenzoico (PABA), que en las bacterias sirve como sustrato para la enzima dihidropteroato sintetasa, que en la síntesis de ácido tetrahidrofólico (THF) es un paso esencial en la producción de las purinas y la síntesis de ácidos nucleicos. Ya que las sulfamidas son análogos estructurales del PABA e inhiben competitivamente a la enzima dihidropteroato sintasa, entonces inhiben el crecimiento y reproducción de las bacterias (Singh et al., 2013).

Son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro; por ejemplo el sulfametoxazol (Fig. 10) es empleado en tratamiento de infecciones de vías urinarias y respiratorias. En general las sulfonamidas son activas contra estreptococos, estafilococos, neumococos, *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *B. anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Chlamydia trachomatis*, enterobacterias, *Neisseria* spp. y patógenos respiratorios como *H. influenzae*, *Bordetella pertussis* o *L. pneumophila* y algunos protozoarios (Schwalbe et al., 2007). Pero las sulfonamidas son naturalmente inactivas frente a *Enterococcus* spp. *P. aeruginosa* y micobacterias (Vicente y Perez-Trallero, 2010).



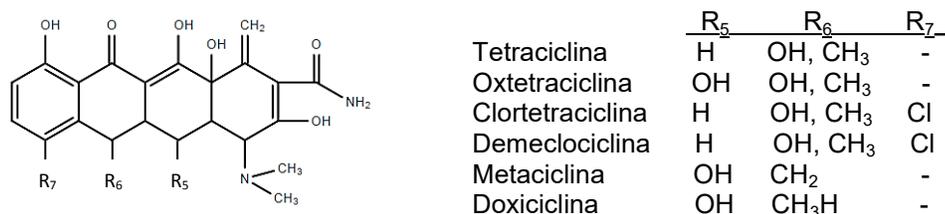
**Figura 10.** Estructura química de sulfonamidas.

## Tetraciclinas

Contienen un núcleo polihidronaftaceno, son moléculas conformadas por un esqueleto lineal de cuatro anillos fusionados, sustituidos generalmente con grupos hidroxilo (Vicente y Perez-Trallero, 2010), algunos ejemplos de esta clase de antibióticos se encuentran en la figura 11.

Son de amplio espectro, activos contra Gram-positivos y Gram-negativos, como espiroquetas, *Chlamydiae*, micoplasma, *Rickettsiae* y protozoarios. Presentan actividad bacteriostática, inhiben la biosíntesis de proteínas uniéndose reversiblemente a la subunidad 30S ribosomal de manera que impiden su unión con el sitio aminoacil del tRNA (Schwalbe et al., 2007).

Las resistencias bacterianas a estos antibióticos limitan su uso. Las más comunes dificultan la penetración de tetraciclinas mediante la expulsión del antibiótico al exterior de la célula por medio de bombas (eflujo) o impidiendo la unión del antibiótico al ribosoma (Schwalbe et al., 2007; Vicente y Perez-Trallero, 2010; Singh et al., 2013).

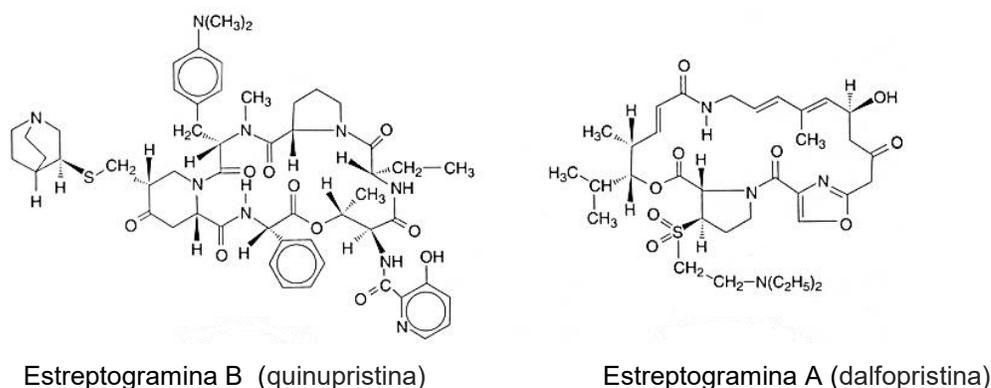


**Figura 11.** Estructura química de algunas tetraciclinas.

### Estreptograminas

Son péptidos cíclicos y cada miembro se conforma por dos grupos estructuralmente diferentes; A y B. El tipo A son macrolactonas cíclicas poliinsaturadas. El grupo B corresponde a hexadepsipéptidos cíclicos (Schwalbe et al., 2007).

Ejercen actividad a nivel del ribosoma bacteriano, el componente A se une al peptidil tRNA y bloquea la unión de nuevos aminoácidos. El componente B impide la elongación de la cadena peptídica. El componente A aumenta la afinidad del componente B por la subunidad 50 S. Por separado son bacteriostáticos, pero la combinación de A y B es bactericida (Schwalbe et al., 2007). La estreptogramina es usada en conjunto con dalfopristina. La primera es un hexadepsipéptido cíclico y la dalfopristina es una macrolactona cíclica poliinsaturada (Figura 12).



**Figura 12.** Conjunto de estreptograminas: quinupristina y dalfopristina.

### 2.1.1.3 Descubrimiento de antibióticos

Entre más común sea el uso de un antibiótico, habrá mayor probabilidad de generar resistencia microbiana al mismo. Los mecanismos de resistencia a antibióticos existen desde miles de años atrás. Las cepas silvestres son quienes mayormente presentan una gran gama de resistencias, incluso existen varios mecanismos de resistencia contra un mismo antibiótico. La existencia de varios mecanismos de resistencia a un antibiótico sugiere la presencia del mismo desde miles de años atrás (Wright y Poinar, 2012). Además, una misma cepa puede presentar varias resistencias a la vez, debido a la competencia constante en estos ambientes. Incluso las resistencias suelen pasar de una cepa a otra por transferencia horizontal, de manera que existe la transferencia de elementos de resistencia de bacterias no patógenas silvestres hacia cepas patógenas que eran naturalmente susceptibles, surgiendo así cepas patógenas resistentes o multirresistentes a antibióticos (Davis y Davis, 2010; O'Brien y Wright, 2011).

Debido a lo anterior, es indispensable la investigación de nuevos antibacterianos, esencialmente que pertenezcan a nuevas clases de antibióticos, para evitar resistencias cruzadas (las cuales suelen afectar a toda una clase de antibióticos) (Butler et al., 2013).

A pesar de su importancia, el descubrimiento de nuevos antibióticos ha estado en declive desde los 70s. Entre los años 2000 y 2015, solo 5 nuevas clases de antibióticos (linezolido, daptomicina, retapamulina, fidaxomicina y bedaquilina) han resultado de los 28 que han sido lanzados al mercado (Tabla 1) (Bassetti et. al.; Butler et. al, 2013; FDA, 2015).

**Tabla 1.** Antibióticos lanzados al mercado entre el 2000 y 2015

Año	Antibiótico	Clase	Actividad contra	Fuente	Organismo
2000	Linezolido	Oxazolidinona	G +	S	
2001	Telitromicina	Macrólido	G + / -	Derivado de PN	Actinomiceto
2002	Biapenem	Carbapenema	G + / -	Derivado de PN	Actinomiceto
2002	Ertapenem	Carbapenema	G + / -	Derivado de PN	Actinomiceto
2002	Prulifloxacin	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2002	Pazufloxacin	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2002	Balofloxacin	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2003	Daptomicina	Lipopeptido	G +	PN	Actinomiceto
2004	Gemifloxacin	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2005	Doripenem	Carbapenema	G + / -	Derivado de PN	Actinomiceto
2005	Tigeciclina	Tetraciclina	G + / -	Derivado de PN	Actinomiceto
2007	Retapamulina*	Pleuromutilina	G +	Derivado de PN	Actinomiceto
2007	Garenoxacin	Quinolona	G + / -	S	
2008	Ceftobiprol medocartil	Cefalosporina	G + / -	Derivado de PN	Hongo
2008	Sitafloxacin	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2009	Tebipenem pivoxil	Carbapenema	G + / -	Derivado de PN	Actinomiceto
2009	Telavacin	Glicopéptido	G +	Derivado de PN	Actinomiceto
2009	Antofloxacin	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2009	Besifloxacin*	Fluoroquinolona	G + / -	S	
2010	Ceftarolina fosamil	Cefalosporina	G + / -	Derivado de PN	Hongo
2011	Fidaxomicina	Tiacumicina	G +	PN	Actinomiceto
2012	Bedaquilina	Diarylquinolona	G + (TB)	S	
2014	Dalbavancina	Glicopéptido	G +	Derivado de PN	Actinomiceto
2014	Oritavancina	Glicopéptidos	G +	Derivado de PN	Actinomiceto
2014	Tedizolido	Oxazolidinone	G + / -	S	
2014	Ceftolozana	Cefalosporina	G + / -	S	
2015	Ceftazidima	Cefalosporina	G + / G -	S	
2015	Ceftobiprol	Cefalosporina		S	

PN, Producto Natural; S, sintético; TB, tuberculosis; Gram +, Gram positivos; G -, Gram negativo.

\* Para uso tópico solamente. Modificado de Butler et al., 2013.

## 2.2 Actinomicetos como productores de metabolitos secundarios

Los microorganismos son los mayores productores de antibióticos, entre los cuales el grupo bacteriano más atractivo son los actinomicetos (actinobacterias), ya que de ellos provienen dos terceras partes de los antibióticos hasta ahora descubiertos. Además, muchos de los principios naturales que se han aislados de los actinomicetos han servido también como precursores de otros antibióticos comerciales (Peláez, 2006).

Los actinomicetos son bacterias filamentosas Gram-positivas con alto contenido de GC en su DNA (Sengupta et al., 2015). Modelos matemáticos estiman que aún hay muchos

antibióticos por descubrir a partir de los actinomicetos (aproximadamente  $10^5$  especies), y los compuestos caracterizados a la fecha solo representan el 5% del total (Watve, 2001).

Dentro de los actinomicetos, el género *Streptomyces* posee especial importancia en la producción de metabolitos bioactivos, especialmente antibióticos, entre otros. Hoy en día aproximadamente el 80% de los antibióticos conocidos provienen de este género cuyas cepas productoras se han aislado principalmente de suelo (Lima et al., 2012). Cabe resaltar que el estudio de metabolitos secundarios de cepas de *Streptomyces* aisladas de suelo inició casi un siglo atrás; en contraste, la búsqueda de metabolitos secundarios de endófitos (incluyendo estreptomicetos) tiene aproximadamente 20 años (Davis, 2013). Actualmente, es indispensable la búsqueda de nuevos metabolitos a partir de microorganismos que habitan en lugares poco explorados, para así aumentar la probabilidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos. Es así, que en la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas resulta prometedor el estudio de actinomicetos endófitos (Demain y Sánchez, 2009).

### **2.3 Endófitos**

El término endófito se define como hongos o bacterias que colonizan el interior de los órganos de las plantas sin causar algún daño aparente. Son pocas las especies de bacterias reportadas como endófitas, ya que es más común el hallazgo de hongos endófitos (Gutiérrez et al., 2012). Durante la colonización, existe una asociación simbiótica entre planta-endófito, en la cual la hospedera protege y alimenta al endófito y este a su vez, retribuye produciendo metabolitos bioactivos para proteger a la planta de herbívoros y fitopatógenos y así promover la supervivencia de la hospedera. Existen varios ejemplos de este mutualismo, uno de ellos es el caso de los endófitos de maíz, quienes producen alcaloides macroclicos (pirrinocidina A y B) que protegen a su hospedera contra patógenos y micotoxinas de *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides* (Davis, 2013).

Esta relación entre endófito-planta se remota probablemente a cientos de millones de años atrás (ya que existen tejidos de hojas y tallos fosilizados, que muestran la asociación de planta-microorganismo). Como resultado de esta asociación antigua, algunos endófitos pudieron haber coevolucionado junto con su hospedera y adaptarse gradualmente a ese microambiente mediante el intercambio de material genético entre ambos (se ha

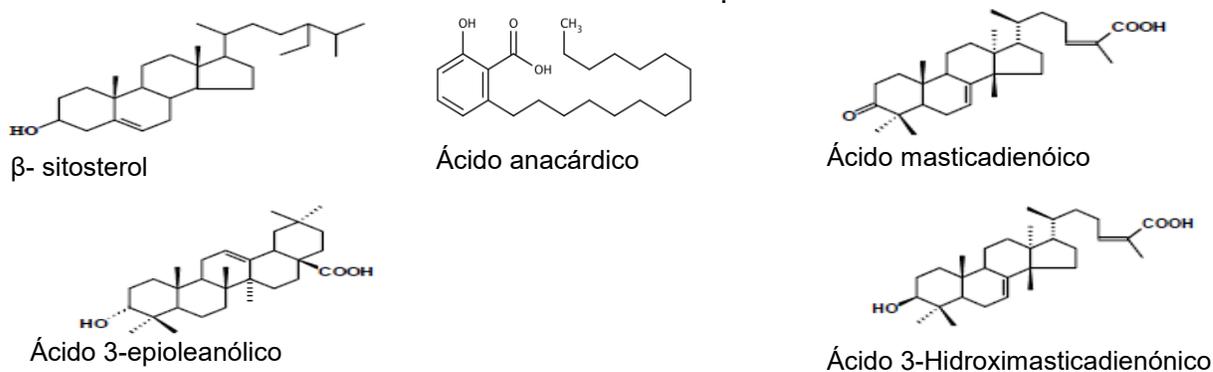
encontrado en plantas inserción de DNA bacteriano y viceversa). Así, el endófito podría producir más rápido mecanismos para enfrentar cambios ambientales y tener mayor compatibilidad con la hospedera, incluso estimular el desarrollo de la hospedera mediante la producción de fitohormonas (como auxinas, abscisinas, etileno, giberelinas y cinetinas). Este intercambio podría haber dejado a los endófitos la capacidad de biosintetizar algunos fitoquímicos originarios de la planta hospedera, y a esto se debería la capacidad de algunos endófitos de producir el mismo, raro e importante, compuesto bioactivo que su hospedera (Zhao et al., 2010; Davis, 2013).

En general, los endófitos se caracterizan principalmente por la producción de alcaloides bioactivos (citotóxicos principalmente) (Gutiérrez et al., 2012). Pero también se han aislado compuestos con actividad antimicrobiana, insecticida, anticancerígena, etc. Por lo tanto, el metabolismo secundario de los endófitos ha resultado de gran importancia farmacológica, permitiendo obtener nuevos compuestos o incluso los mismos compuestos bioactivos que produce su hospedera, como el caso del taxol que es producido por endófitos de árboles del género *Taxus*. De igual manera, *Aspergillus niger* aislado de *Rosa damascena* produce 2-feniletanol, un importante constituyente bioactivo del aceite de rosas, o bien la captotecina, producida por *Camptotheca acuminata* y algunos de sus endófitos (Davis 2013). También es posible encontrar intermediarios, utilizados por la planta para sintetizan el metabolito bioactivo, todo esto gracias a la interacción evolutiva y ecológica entre planta-endófito (Zhao et al., 2010). Por tales antecedentes, ha aumentado el interés por aislar endófitos de plantas medicinales (Strobel y Daisy, 2003).

#### **2.4 *Amphipterygium adstringens***

Uno de los árboles medicinales mexicanos más utilizados en nuestra herbolaria tradicional es el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) (Cuevas, 2005). Se ha utilizado en México por generaciones para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los que destacan: enfermedades bucales, de la piel, hepatobiliares y gastrointestinales como el cáncer de estómago, problemas circulatorios, de vías urinarias, vías respiratorias y músculo-esqueléticos y diversas infecciones incluyendo al paludismo, entre otras (Navarrete et al., 2005). En cuanto a los principios activos se refiere, el efecto gastoprotector ha sido atribuido a los ácidos 3-Hidroximasticadienónico, 3-epioleanólico y al  $\beta$ -sitosterol. La capacidad anti-inflamatoria y citotóxica ha sido atribuida a los ácidos 3-hidroximasticadienónico, masticadienónico y ácidos anacárdicos, y la actividad antibiótica

contra *H. pylori* a la mezcla de ácidos anacárdicos (Castillo-Juárez et al., 2007; Wu et al., 2011).



**Figura 13.** Compuestos bioactivos del árbol *Amphipterygium adstringens*.

## 2.5 Aislamiento de actinomicetos de la planta *Amphipterygium adstringens*

Tomando en cuenta la importancia de la planta *A. adstringens* dentro de la medicina tradicional, ésta fue elegida por nuestro grupo para realizar un estudio de sus microorganismos endófitos (Rodríguez-Peña et al., 2016). Se recolectaron muestras del árbol masculino y del femenino en el poblado de Barranca Honda en Tlaltzapán, Yautepec; Morelos, (coordenadas +18°48'36.00", -99°7'12.00) para los aislamientos y para su depósito en el Herbario Nacional de la UNAM con números de registro 1366483 y 1366484, respectivamente. De las muestras tomadas, se aislaron cuatro actinomicetos, nombrados NF3, TMC5, TFC3 y YF4, cuya identificación probable corresponde a *Streptomyces scabrissporus*, dos *Actinoplanes* sp. y *Pseudosporangium ferrugineum*, respectivamente. Estos actinomicetos aislados del cuachalalate fueron el objeto de estudio de este proyecto.

## 2.6 Purificación e identificación de metabolitos secundarios con actividad antibiótica

Como se ha mencionado anteriormente, los metabolitos secundarios pueden ser de diversas clases químicas, por lo que no existe un protocolo general para la purificación y caracterización de estos compuestos. A continuación se muestran algunas de las técnicas empleadas en el presente trabajo.

En los primeros pasos de separación, una de las técnicas que puede ayudar a conocer la complejidad de la muestra, es la cromatografía en capa fina (CCF), la cual es simple, rápida y de bajo costo, además es útil como análisis previo para determinar el sistema de elución antes de escalar a otro sistema de separación (Sasidharan et al., 2011).

En general, la CCF se constituye de una placa cubierta de una fase estacionaria, generalmente sílica, en la cual se coloca la muestra en la parte inferior, posteriormente en contacto con una fase móvil (usualmente mezcla de disolventes) se separan los compuestos de la muestra por elución. Para la selección de la fase móvil apropiada se debe de tomar en cuenta principalmente la naturaleza química de la muestra a separar, por ejemplo entre más polares sean los compuestos, estos se adsorberán mayormente en fases estacionarias polares y para lograr la elución la fase móvil debe ser aún más polar.

Una vez establecido el mejor sistema de elución, con una CCF se puede determinar si existen compuestos con actividad antibiótica, la técnica más eficaz para la detección de este tipo de compuestos es la llamada bioautografía, la cual consiste en aplicar directamente (en condiciones estériles) agar previamente inoculado con alguna cepa de referencia sobre una placa de CCF, después de incubarse un día el sistema, se observan zonas de inhibición producidas sobre la TLC que indican la posición ( $R_f$ ; razón de la distancia recorrida de la muestra desde el origen/distancia recorrida del eluyente) de los compuestos con actividad antibacteriana (Sasidharan et al., 2011).

Una vez identificado algún compuesto con bioactividad, se prosigue a aislar el compuesto, la ventaja de conocer el  $R_f$  del compuesto de interés es que se puede emplear una cromatografía en capa preparativa (CCP), la única diferencia con CPF radica en el grosor de la fase estacionaria, lo que permite colocar mayor cantidad de muestra y posteriormente recolectar el compuesto del  $R_f$  deseado (Sasidharan et al., 2011).

En caso de que una CCP no sea suficiente, se puede escalar la separación a cromatografía en columna, que aplica el mismo principio que la CCF y permite emplear la misma fase estacionaria. Con este sistema es posible coleccionar y monitorear los diferentes componentes de la mezcla conforme eluyen mediante CPF o bioautografía. Los componentes se separan de acuerdo a su tamaño y a su capacidad de interaccionar con la fase estacionaria y la fase móvil.

También se pueden emplear otras técnicas de separación como cromatografía líquida, cromatografía flash, HPLC, etc. Todo depende de las necesidades y disponibilidad de equipos con los que se cuenten (Pereira et al., 2010).

Cuanto a la identificación de metabolitos secundarios, los datos obtenidos por espectroscopia de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) suelen ser complementarios, por tanto ambas técnicas constituyen las más extendidas y prometedoras para la elucidación estructural. Es decir ambas técnicas deberían ser utilizadas cuando sea posible (Pereira et al., 2010).

Por su parte la EM es una técnica de alta sensibilidad que sin lugar a dudas resulta esencial para la identificación de metabolitos, puesto que permite conocer con alta precisión la masa y la fórmula molecular gracias a la interpretación de los patrones de fragmentación, los cuales refleja la forma en la que se disocia una molécula ionizada. Este es un proceso único para estructuras químicas individuales, por lo que se le conoce como "huella química" de cada compuesto, esta serie de iones fragmentados dependen en gran medida de la estructura molecular (naturaleza de los átomos unidos, fuerza de adhesión, tensión del anillo, etc.), disposición espacial, potenciales de ionización y energía interna. Los patrones de fragmentación pueden ser comparados con espectros ya reportados o con muestras estándar. Además es evidente que existen diferencias discernibles en los patrones de fragmentación de isómeros (Sasidharan et al., 2011).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una potente combinación como resultado de la unión de la capacidad de alta resolución de la cromatografía de gases con las capacidades de identificación de espectrometría de masas. Permitiendo la separación de mezclas complejas en sus componentes individuales con sus respectivas masas moleculares y tiempos de retención. Es decir, a partir de un cromatógrafo de gases, se separan los diversos compuestos de la mezcla y posteriormente se realiza la introducción (al espectrómetro) de los compuestos en fase gaseosa. La técnica de ionización más utilizada es la de impacto electrónico (ionización de la molécula por bombardeo con un haz de electrones de alta energía, los cuales puede arrancar un electrón de un enlace, creando un ion positivo), especialmente para moléculas de polaridad baja o media de hasta un peso molecular de 500 (Sasidharan et al., 2011).

La EM también se suele acoplar a HPLC, lo que facilita la separación e identificación, en especial si se cuenta con un estándar, sin embargo en cualquier tipo de EM, cuando solamente se compara el patrón de fragmentación contra bases de datos no es una identificación absoluta, a menos que se compare contra un estándar. Aunque, cuando se trata de compuestos desconocidos y no existe este estándar, se requiere someter el compuesto puro a técnicas espectroscópicas como espectrofotometría de UV, espectroscopia de infrarrojo, o RMN (Sasidharan et al., 2011).

La RMN es probablemente el método analítico que proporciona la información estructural más completa, incluyendo los detalles estereoquímicos (Pereira et al., 2010). La técnica de RMN se basa en el momento angular de los núcleos (llamado spin), los núcleos con número impar de protones o neutrones son los que pueden experimentar este fenómeno, entre los isótopos que poseen spin están  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ , y  $^{33}\text{S}$  (Lampman et al., 2010).

En conclusión, es de vital importancia elegir las técnicas más adecuadas de purificación, e identificación de compuestos bioactivos. La selección de las técnicas más adecuadas estarán ligadas a la velocidad, selectividad y sensibilidad. Como ejemplo de la complejidad de metabolitos secundarios producidos por endófitos, se debe tomar en cuenta que existen más de 20000 especies de plantas medicinales en el mundo, y cada planta podría albergar al menos una especie de endófito y hasta más de cien especies, y cada cepa puede tener potencial para producir una gran gama de compuestos con solo unos cuantos con actividad antibiótica (Sasidharan et al., 2011; Kusari et al., 2012; Alvin et al., 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El número de bacterias patógenas que han desarrollado resistencia a los antibióticos se incrementa cada año, por lo que es necesario retomar la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con actividad antibiótica, hasta el momento la principal fuente de antibióticos han sido los actinomicetos, es por ello que es nuestro interés estudiar este tipo de bacterias aisladas de ambientes poco comunes, uno de estos ambientes poco explorados son el interior de las plantas, estos microorganismos residentes de las plantas son llamados endófitos, lo cuales han demostrado un gran potencial para producir metabolitos bioactivos, especialmente de plantas medicinales. La co-evolución existente entre planta-endófito les ha permitido a estos últimos producir el mismo metabolito bioactivo que sintetiza la planta, o bien algún precursor útil para la planta. De esta forma, resulta de gran interés el estudio de endófitos de árboles medicinales.

Por su parte, el árbol *Amphiterygium adstringens* es ampliamente conocido por su utilidad en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos incluyendo infecciones microbianas. Y hasta el momento, no hemos encontrado reportes sobre sus endófitos. De este modo, los microorganismos aislados de este árbol brindan una alternativa como fuente de actinomicetos productores de compuestos bioactivos.

#### 4. HIPÓTESIS

Siendo *Amphiterygium adstringens* una planta medicinal con propiedades antimicrobianas, es predecible que alguno de sus endófitos será capaz de sintetizar compuestos con actividad antibiótica.

#### 5. OBJETIVOS

##### General

Aislar al menos uno de los compuestos bioactivos producido por el endófito con mayor capacidad antibiótica y caracterizar su estructura química.

##### Particulares

- ❖ Seleccionar un actinomiceto endófito del árbol *Amphiterygium adstringens* con base en su capacidad de producción antibiótica.
- ❖ Seleccionar un medio de cultivo para su crecimiento y producción de antibióticos.
- ❖ Evaluar la actividad antibiótica de extractos crudos contra bacterias de referencia.
- ❖ Fraccionar los extractos crudos para posteriormente purificar los metabolitos antibacterianos.
- ❖ Aislar y caracterizar al menos un compuesto con actividad antibiótica.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Conservación de los actinomicetos en estudio y cepas de referencia

Los actinomicetos en estudio son endófitos del árbol *A. adstringens*: cepas NF3, YF4, TMC5 y TFC3. Las cepas de referencia son aquellas empleadas para evaluar su susceptibilidad ante compuestos con potencial antibiótico, como lo son; *Listeria innocua* (colección Dr. Scott Martin), *Listeria monocytogenes* Scott A, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 8855 (las cepas anteriores fueron gentilmente donadas por la Dra. Blanca García Almendáres; UAQ), *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus subtilis* NCIMB 08565, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (cepario del Dr. Sergio Sánchez Esquivel, UNAM).

Cada cepa liofilizada se reactivó en 50 ml de medio (YMG para actinomicetos, YPD para levadura y agar nutritivo, para el resto de las bacterias unicelulares, para ver composición de medios ir a anexo 1) incubándose de 4-6 días a 29 °C y 180 rpm. Se separó la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Se lavó la biomasa con solución salina isotónica (0.85% NaCl), se repitieron los lavados dos veces más y finalmente se resuspendieron las células en 2 ml de glicerol al 20%. Las células se almacenaron en alícuotas a -20 °C, al final se verificó la pureza y viabilidad de cada cepa. Estos gliceroles fueron el inóculo de cada cultivo mencionado en el presente trabajo.

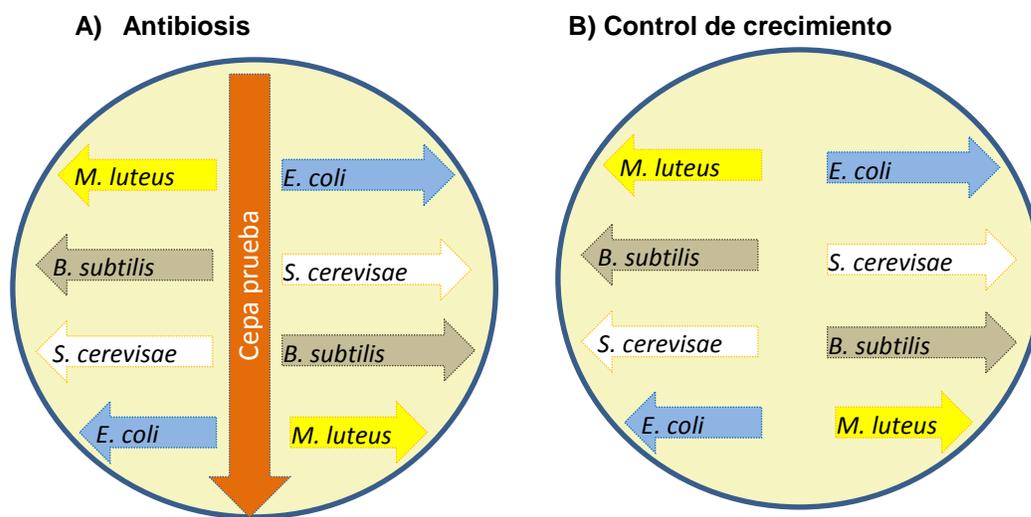
### 6.2 Selección de un actinomiceto endófito y su medio de cultivo para la producción de antibiótico

Se evaluó la actividad antibiótica de los cuatro actinomiceto endófito aislado del árbol *Amphipterygium adstringens* contra las cepas de referencia mediante la técnica de antibiosis por estría, en diferentes medios de cultivo (ver composición de los medios de cultivo en anexo 1).

Primeramente, las cepas en estudio almacenadas en glicerol se activaron, cultivándose en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio YMG (extracto de levadura 0.4%, extracto de malta 1%, glucosa 0.4%) en agitación orbital de 180 rpm a 29 °C durante 3 días (momento en el cual se encuentran al final de la fase de crecimiento exponencial). La biomasa de los cultivos se recuperó por centrifugación a 10,000 rpm, se lavó con solución salina isotónica y se empleó como inóculo para las siguientes antibiosis por estría (en

fermentaciones posteriores de esta forma se obtienen los preinóculos de las cepas prueba).

La antibiosis por estría consiste en inocular en agar nutritivo la cepa productora de antibióticos a lo largo del diámetro e incubar para permitir la producción de los antibióticos. Posteriormente, se inoculan a cada costado, las cepas de referencias en orden inverso (Fig. 14). La actividad antibiótica se mide por la falta de crecimiento de cada cepa de referencia sobre la línea inoculada.



**Figura 14.** Esquema de inoculación de actinomiceto en estudio y cepas prueba. Cada círculo representa una caja Petri con agar, en la imagen **A** la línea central corresponde al actinomiceto inoculado. Imagen **B**) como control de crecimiento en el medio de cultivo, solo se inoculan las cepas de referencia. Las flechas a los costados señalan el lugar y la dirección en que se inocula cada cepa.

La antibiosis por estría se evaluó en cada uno de los diferentes medios de cultivo con cada uno de los endófitos. Se dio oportunidad a los actinomicetos en estudio de crecer aproximadamente una semana a 29 °C para asegurar que se produzcan los compuestos antibióticos que difunden en el agar y posteriormente se inocularon las cepas de referencia. Después de 24 h, se evaluó la inhibición de crecimiento de cada cepa de referencia.

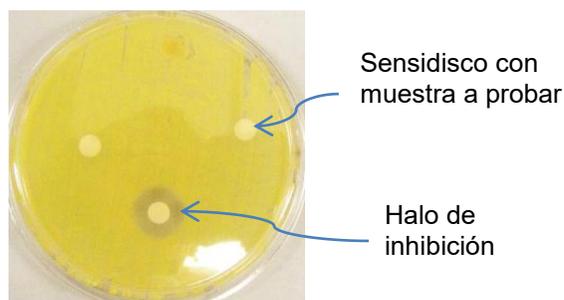
Así se obtuvieron los patrones de inhibición por parte de cada actinomiceto en cada uno de los distintos medios de cultivo.

Como control de crecimiento, las cepas de referencia (*B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli* y *S. cerevisiae*) se inocularon en cada medio de cultivo (Fig. 14b) y se verificó que crecieran adecuadamente.

### 6.3 Cinética de crecimiento-producción del actinomiceto seleccionado

El actinomiceto con mejor patrón de antibiosis contra las cepas de referencia fue seleccionado para ser sometidos a una cinética de crecimiento y de producción de antibióticos para describir su curva de crecimiento y observar el tiempo de inicio de la producción de los antibióticos, para así poder determinar el mejor tiempo de cultivo para la extracción de los compuestos antibióticos.

Dicha cinética se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio YMG+CaCO<sub>3</sub> (Anexo 1). Cada matraz fue inoculado con 100 µl del pre-inóculo (cuya preparación fue mencionada anteriormente e incubado en agitación orbital de 180 rpm a 29 °C, se tomaron muestras por triplicado, por sacrificio de matraz, cada 48 h durante 21 días. De las muestras tomadas, se cuantificó la biomasa de 5 ml del medio de cultivo, el resto se filtró por membranas de celulosa Millipore, del filtrado obtenido se midió pH y se realizaron las pruebas de antibiosis por difusión en agar, también llamada antibiosis de Kirby-Bauer (Fig. 15).



**Figura 15.** Antibiosis de Kirby-Bauer (difusión en agar). Se muestra una caja Petri con agar nutritivo, cultivada con una cepa de referencia. El halo de inhibición señalado es resultado de la actividad antibiótica del extracto agregado a ese sensidisco.

Para determinar la producción de antibióticos, se realizó la determinación de actividad por el método de Kirby-Bauer. La antibiosis por difusión en agar de Kirby-Bauer se realizó de acuerdo al protocolo de NCCLS (2006). A partir de colonias aisladas de 24 h de cultivo en

agar, se preparó una suspensión bacteriana con solución salina estéril, ajustando la densidad óptica de la suspensión del cultivo por comparación de su turbidez con un estándar de 0.5 unidades Mc Farland de BaSO<sub>4</sub> (aprox. 2×10<sup>8</sup> UCF/ml), esta suspensión fue empleada en una concentración final del 1%. La suspensión bacteriana se embebió en el agar antes de solidificar.

Para colocar las muestras se utilizaron sensidiscos de papel filtro, a cada sensidisco se le agregaron 25 µl de las muestras a probar, se pusieron a secar a temperatura ambiente, una vez secos, se colocaron en la superficie del agar ya solidificado. Las cajas se incubaron a 29 °C por 24 h y se midieron los halos de inhibición.

#### **6.4 Fermentación y obtención de extractos de diclorometano**

Se inocularon 100 µl de pre-inóculo del actinomiceto seleccionado por cada 100 ml de medio YMG+CaCO<sub>3</sub> en matraces Erlenmeyer de 1-L estériles, y se dejaron incubar a 29 °C y 180 rpm por 21 días. En la primera fermentación se realizaron extracciones exhaustivas (siete veces) con diclorometano (DCM), el extracto obtenido fue empleado para análisis de CG-EM.

En la segunda fermentación, con la finalidad de separar los compuestos no polares como los lípidos, se realizó la extracción de manera secuencial, iniciando con hexano y posteriormente con diclorometano (siete veces cada uno), los extractos se llevaron a sequedad en un rotavapor, el extracto obtenido fue empleado para análisis de CG-EM, purificación de compuestos bioactivos y pruebas de actividad antibacteriana.

#### **6.5 Fraccionamiento de los componentes del extracto y purificación de compuestos antibióticos**

Fraccionamiento primario

Se empacó una columna abierta de 50 x 2.5 cm con gel de sílice 60 (0.063-200 µm), tamaño de malla 70-230. Se colocó la muestra previamente adsorbida en sílica gel y se eluyó con un gradiente de polaridad creciente con diclorometano/metanol. Se recolectaron fracciones de 50 ml que fueron monitoreadas por cromatografía en placa fina (CPF) sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, tamaño de partícula 0.063 – 0.2 µm) de 8 cm de altura. Como fase móvil se usó diclorometano-metanol 95:5 (v/v). Las placas resultantes se observaron bajo luz UV a λ=254 nm y 315 nm.

De las fracciones obtenidas, se determinó juntar aquellas que presentaron similitud cromatográfica.

#### Fraccionamiento secundario

Para la separación y purificación de compuestos, las fracciones anteriores se sometieron a placas preparativas de sílica Gel 60 Merck F<sub>254</sub> de 10x20 cm altura y como fase móvil se usó diclorometano-metanol 95:5. Se recolectaron las bandas que estuvieran más separadas y que mediante bioautografía indicaban tener actividad antibiótica. Estas fueron enviadas a análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de masas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI-UNAM).

### 6.6 Análisis químicos

Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, fueron registrados por un equipo Varian™ a una radiofrecuencia de 400 MHz. Las muestras se disolvieron en CDCl<sub>3</sub>, empleando tetrametilsilano (TMS) como control interno.

Los espectros de masas se generaron en un equipo Agilent 6890L por impacto electrónico (IE) a 70 EV y el analizador másico de tiempo de vuelo (TOF).

Los espectro de absorción UV-VIS, se obtuvieron en el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis v4.006 2L5T079209 y la lectura se realizó de 200 a 600 nm, con intervalos de 1 nm.

### 6.7 Evaluación de capacidad antibiótica: Concentración mínima inhibitoria

Por muchos años la susceptibilidad bacteriana se ha medido a través de pruebas *in vitro*, como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). En este trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placas de 96 pozos, contra bacterias Gram-positivas usando el medio de cultivo Mueller-Hinton (peptona de caseína 1.75%, infusión de carne 0.2%, almidón 2%) de acuerdo con el protocolo establecido por la CLSI (por sus siglas en inglés de The Clinical and Laboratory Standards Institute). El valor CMI fue definido como la concentración mínima de la muestra a la cual se reduce el crecimiento bacteriano en un 90% o más. El ensayo se llevó a cabo por triplicado, mediante dilución seriada con medio Mueller-Hinton (de los compuestos disueltos en DMSO y empleando DMSO puro como control de disolvente). Como control de crecimiento se empleó medio de cultivo inoculado con la cepa sensible, como control de sensibilidad se utilizó penicilina y gentamicina y para el control de

esterilidad caldo Mueller-Hinton y SSI. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h y se leyó la absorbancia de los pozos en un lector de placas a 595 nm.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Selección de la cepa de trabajo y de su medio de cultivo para la producción de antibióticos.

Con el fin de conocer la capacidad antibiótica de cada actinomiceto endófito y seleccionar el de mayor actividad, se probaron diversos medios de cultivo incluyendo medios mínimos (NMMP y MM) y medios ricos en nutrientes, ya que es conocido que la síntesis de antibióticos suele ser influenciada positiva o negativamente por algunos nutrientes del medio de cultivo, por ejemplo; nitrógeno, fosforo, carbono, etc. (Sánchez et al., 2010). Entre los medios ricos se encuentran algunos que de acuerdo a la literatura se han empleado para mejorar el crecimiento de actinomicetos o la producción de antibióticos. Por ejemplo, el medio YMG (ISP-2) es recomendado por el ISP (The International Streptomyces Project) para el crecimiento de *Streptomyces* (Shirling y Gottlieb; 1966). También se probó el medio YMG con la adición de  $\text{CaCO}_3$ , el cual promueve el desarrollo de actinomicetos, y evita la fragmentación del micelio, esta fragmentación se relaciona con baja producción de antibióticos. La forma en la que actúa el  $\text{CaCO}_3$  se desconoce, pero es posible que el efecto pueda ser atribuido al incremento de pH o la estimulación de la formación del micelio aéreo por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Shomura et al., 1979; Yi y Amsaveni, 2012).

En resumen, como resultado de las antibiosis realizadas en los diversos medios de cultivo, como ya se esperaba, se observó un patrón de antibiosis muy diferente respecto a cada actinomiceto (Tabla 2). De los cuatro actinomicetos, la cepa *S. scabrisporus* NF3 fue la que mostró mejor perfil antibiótico en casi cualquier medio de cultivo probado (específicamente contra *M. luteus* y *B. subtilis*). Comparando la actividad de la cepa NF3 con la TFC3, ésta última no fue capaz de inhibir a *Bs*, pero inhibió un poco más a *Sc*. En contraste, las cepas TMC5 y YF4 básicamente sólo presentan una ligera actividad contra *Ml*. En general se obtuvo mayor inhibición en medios ricos, en especial los medios YMG, YMG+ $\text{CaCO}_3$ , IMA-2 y seino.

Cabe mencionar, que fue considerada la ligera falta de crecimiento de *Sc* en algunos medios del control de crecimiento y de *Ml* en el medio MM.

Al ser la cepa NF3 la que presentó mayor actividad antibiótica, ésta fue seleccionada para los siguientes análisis. Una ventaja adicional de la cepa seleccionada es que pertenece al género de los *Streptomyces* que se ha considerado por excelencia, uno de los mayores

productores de antibióticos hasta ahora descubiertos y comercializados (Berdy, 2005), lo que aumenta la probabilidad de encontrar antibióticos con potencial clínico.

Además, se seleccionó el medio de cultivo YMG + CaCO<sub>3</sub> como medio de producción, en el cual la cepa NF3 presenta mayor crecimiento de micelio y mayor actividad antibiótica, incluso mayor que en medio YMG sin CaCO<sub>3</sub>, ya que efectivamente como lo sugiere Yi y Amsaveni (2012), parece ser que la adición de CaCO<sub>3</sub> mejora el crecimiento y producción de antibióticos, incluso los demás medios de cultivo que contienen CaCO<sub>3</sub> (IMA-2 y Seino) también mostraron resultados similares al YMG + CaCO<sub>3</sub>.

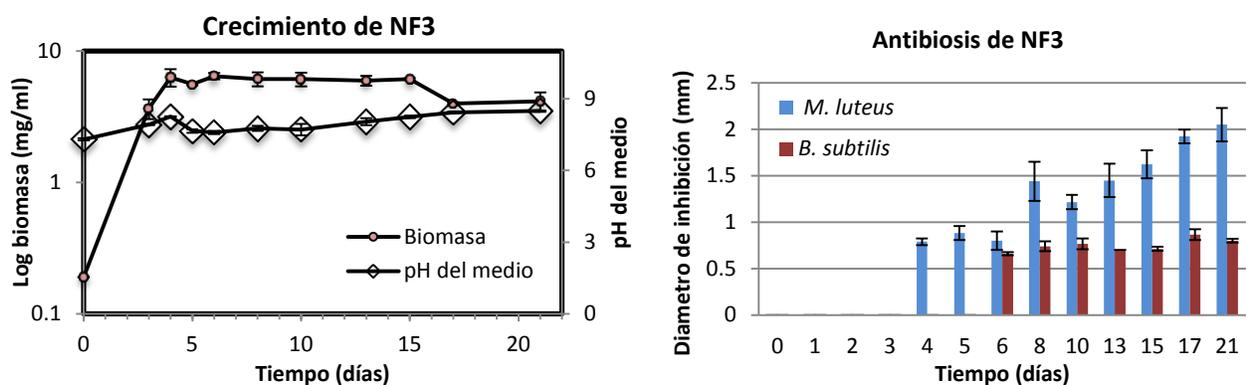
**Tabla 2.** Antibiosis de actinomicetos endófitos del árbol *Amphipterygium adstringens*, en diferentes medios de cultivo.

Cepas	Control +				TMC5				YF4				NF3				TFC3			
	Ml	Bs	Ec	Sc	Ml	Bs	Ec	Sc	Ml	Bs	Ec	Sc	Ml	Bs	Ec	Sc	Ml	Bs	Ec	Sc
YMG	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	4	-	-	-
YMG+ CaCO <sub>3</sub>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	4	3	-	1	4	-	-	-
IMA-2	-	-	-	-	1	-	-	-	4	-	-	-	4	1	-	-	2	-	-	-
TSB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	-	-	2	-	-	4
NMMP glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
NMMP manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R5	-	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	1	-	-	-
JCM	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	-	1	2	-	-	-
LB	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	-	1	1	-	-	-
Seino	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	4	3	-	1	3	-	-	4
GAE	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	2	-	-	-
MM	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	3	-	-	-
GY	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	1

Los números representan el grado de inhibición para cada actinomiceto en estudio. 4: inhibición total o casi total, 3: buena inhibición, 2: inhibición moderada, 1: inhibición apenas detectable, —: no hay inhibición. TMC5; *Actinoplanes* sp., YF4; *Actinoplanes* sp, NF3; *Streptomyces scabrisporus*, TFC3; *Actinoplanes* sp. Ml; *Micrococcus luteus*, Bs; *Bacillus subtilis*, Ec; *Escherichia coli* y Sc; *Saccharomyces cerevisiae*.

## 7.2 Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos bioactivos.

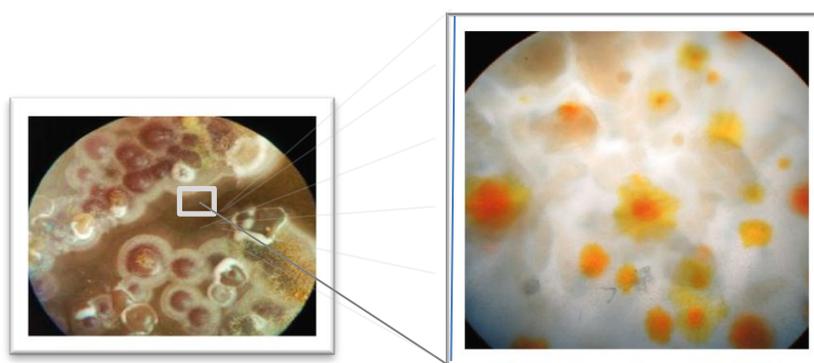
Una vez seleccionada una cepa de trabajo (NF3) para la identificación de sus metabolitos bioactivos, esta cepa se sometió a una cinética de crecimiento y producción de antibiótico en el medio de cultivo YMG+CaCO<sub>3</sub> por 21 días para conocer el mejor tiempo de fermentación que resultara en mayor producción del metabolito bioactivo (Fig. 16). En la figura 16 se observa que la fase logarítmica de crecimiento de la cepa *Streptomyces* NF3 concluyó en el cuarto día, y prosiguió con la fase estacionaria (idiofase), momento en el cual se detectó efecto antibiótico contra *M. luteus* (Fig. 16), congruente con el concepto conocido de que los antibióticos son metabolitos secundarios producidos en la idiofase (Gramajo et al., 1993). Posteriormente, al sexto día se observó efecto inhibitorio contra *B. subtilis*. El hecho de que ambos efectos inhibitorios se encuentren en diferentes días, indicaría que probablemente se trate de la sensibilidad diferente de cada cepa Gram-positiva probada (*M. luteus* y *B. subtilis*). De hecho, en el caso de *B. subtilis* el efecto fue apenas detectable del sexto día y hasta el día veintiuno (menos susceptibilidad que con *M. luteus*), mientras que en el caso de *M. luteus* el efecto incrementó conforme avanzaba el tiempo de fermentación. Este resultado coincide con el reportado por Meera y colaboradores (2013), donde el filtrado del cultivo de *Streptomyces* sp. mostró un máximo de producción del antibiótico a los 30 días de cultivo en medio SCB (caseína-almidón, a 35 °C y pH 7), aumentando constantemente la producción durante la fase estacionaria.



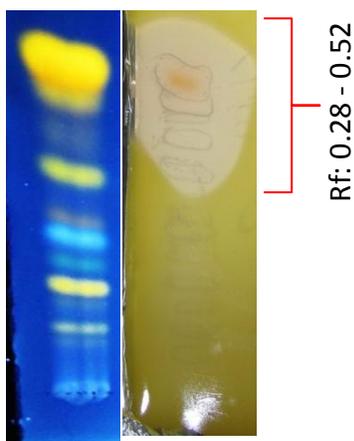
**Figura 16.** Cinética de crecimiento y actividad antibiótica de la cepa NF3 determinada por difusión en agar. En la curva de crecimiento (imagen de la izquierda) se muestra el pH a lo largo de la fermentación, así como la biomasa en peso seco correspondiente a cada punto de muestreo. En la imagen derecha, se muestra la antibiosis por sensibilizadores en *Micrococcus luteus* (azul) y *Bacillus subtilis* (rojo). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, usando como medio de cultivo YMG+CaCO<sub>3</sub>.

Como se observa en la imagen 17A, los mayores compuestos que se acumulan tanto en fermentación líquida como en agar son compuestos amarillos y naranjas. Al realizar una bioautografía, como se observa en la figura 17B los compuestos amarillos en el Rf de 0.28 a 0.52 (diclorometano/metanol 95:5 como fase móvil) son los que presentan mayor actividad antibiótica. El rendimiento de estos compuestos facilitó su purificación. Sin embargo, a los 8 días de fermentación estos compuestos amarillos-naranjas no predominaban al inicio del cultivo, solo conforme avanzó el tiempo de fermentación se acumularon con mayor rapidez que el resto de compuestos.

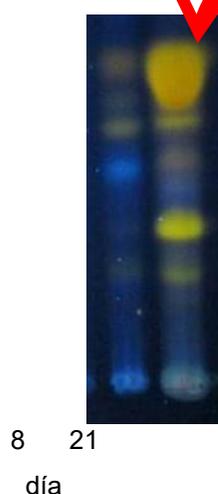
**a) Producción de compuestos coloridos en agar a los 21 días de cultivo**



**b) CPF y bioautografía**



**c) CPF de diferentes días de cultivo**



**Figura 17.** Producción de metabolitos secundarios por la cepa NF3. **a)** Producción de compuestos amarillo-naranjas del cultivo de la cepa NF3 en agar a los 21 días de cultivo, visto al Microscopio 10x. **b)** Comparación de una placa de CPF (expuesta a luz UV,  $\lambda=366$  nm) y su correspondiente bioautografía, en la que se muestra un halo de inhibición entre Rf 0.28 y 0.52 (imagen recortada) con DCM/MetOH 95:5 como fase móvil. **c)** comparación de CPF de extracto crudo de DCM a los 8 días y 21 días de cultivo (expuesta a luz UV,  $\lambda=366$  nm).

Como se muestra en la figura 17C, a los 8 días de la fermentación se observaron con mayor facilidad algunos compuestos que a los 21 días de la fermentación ya no eran visibles (compuestos azules en luz UV a  $\lambda=366$  nm), puesto que se ocultaban por otros compuestos coloridos. Por lo tanto el tiempo de las fermentaciones se realizó a los 21 días, buscando extractos con altos rendimientos de los compuestos con mayor actividad.

### 7.3 Obtención y rendimiento de los extractos crudos de la cepa NF3

Se hizo una fermentación en matraz Erlenmeyer de 1-L con 240 ml de medio de cultivo durante 21 días. La obtención del extracto crudo se llevó a cabo de una extracción con DCM. Este extracto color naranja intenso pesó 15.6 mg; es decir se obtuvo un rendimiento de 65 mg/L (Figura 18). Este extracto se empleó para las pruebas antibióticas y posterior análisis por CG-EM (sección 7.7 y Tabla 3 respectivamente).



**Figura 18. Proceso de obtención de extractos crudos de diclorometano.** Se muestran las etapas para la obtención de extracto de diclorometano. DCM: diclorometano.

Se realizó una fermentación de 21 días en cuatro matraces Erlenmeyer de 1-L con 240 ml de medio. En la extracción secuencial con hexano se obtuvieron 7.25 mg y con

diclorometano 200 mg. Los extractos obtenidos se emplearon para los siguientes pasos de purificación de compuestos antibacterianos (Fig. 20).

#### **7.4 Identificación de compuestos por cromatografía de gases acoplada a masas**

En general, en este trabajo el primer análisis químico que se realizó fue  $^1\text{H}$  RMN de la zona bioactiva de una CPF (RF= 0.44) empleando el extracto obtenido directamente con DCM de la primera fermentación. Buscando el primer acercamiento a la naturaleza química de los compuestos bioactivos y de la pureza de esa fracción, se obtuvo un espectro típico de ácidos grasos, por lo que se prosiguió a derivatizar por duplicado (anexo 2) los triglicéridos y analizarlos por CG-EM. Como era de esperar, mayormente se obtuvieron lípidos metilados (Tabla 3), algunos de los cuales ya se han reportado que poseen actividad antibiótica (Belakhdar et al., 2015), sin embargo, la actividad antibiótica reportada para los compuestos identificados no era tan buena como la observada (además los compuestos identificados suelen ser incoloros y no cristalizan) (Belakhdar et al., 2015). Con base en lo anterior, se infirió que el principal metabolito con efecto antibiótico podría estar siendo enmascarado por la abundancia de los lípidos o bien debido a su peso (mayor a 500 g/mol) no lograba volatilizar. De éste modo, fue necesario la eliminación de los lípidos, de tal forma que se realizó una segunda fermentación que se extrajo con hexano para separar los lípidos de la muestra y secuencialmente con DCM. Del extracto total de DCM se lograron identificar distintos metabolitos por la técnica CG-EM (Tabla 4 y Figura 19).

Entre los compuestos identificados, se encuentran dos dipéptidos cíclicos (ver espectros en Anexo 3); los compuestos pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-dione,hexahidro-3-(2-metilpropil)-, también llamado ciclo(Leucil-prolil), y pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-dione,hexahidro-3-(fenilmetil)- también llamado cis-ciclo (fenil-prolil). Ambos alcaloides, han sido reportados en varias ocasiones como productos de un mismo endófito; por ejemplo el hongo *Penicillium* sp. endófito de la planta *Camellia sinesis* (Nirjanta y Wahab, 2012). Incluso, ambos dipéptidos han sido propuestos como parte de los metabolitos que ayudan a proteger a las plantas hospederas (Melo, et al., 2014). En general, el papel natural de los péptidos cíclicos para la bacteria no ha quedado claro, aunque pueden ser importantes en la evolución de la estructura celular bacteriana (metabolismo, diferenciación y señalización). Por otra parte, desde el punto de vista aplicado poseen actividad

antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, inmunosupresora, neurológica, etc. (Davis, 2013).

Particularmente el compuesto ciclo(Leucil-prolil), inhibe la producción de aflatoxinas a nivel transcripcional de *Aspergillus* (Yan et al., 2004). Y en el caso de cis-ciclo (fenil-prolil), se le atribuyen propiedades antifúngicas y antibacterianas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *V. vulnificus* (bacteria causal de las enfermedades transmitidas por los alimentos marinos, como la septicemia potencialmente mortal) (Li et al., 2008; Melo, et al., 2014).

También se identificó al compuesto ácido 3-pirrolidin-2-il-propiónico, el cual es un precursor usado en la síntesis del anticancerígeno dolastatina. Este compuesto fue aislado del molusco *Dolabella auricularia*. Sin embargo, de forma semisintética y usando como precursor los derivados del ácido 3-pirrolidin-2-il-propionico, se ha logrado obtener buenos rendimientos del anticancerígeno. Estudios preclínicos con dolastatina demuestran actividad contra varios tipos de tumores murinos y humanos en cultivo celular y modelos animales (inhibe la polimerización de tubulina) (Hoffman- La Roche, 2007).

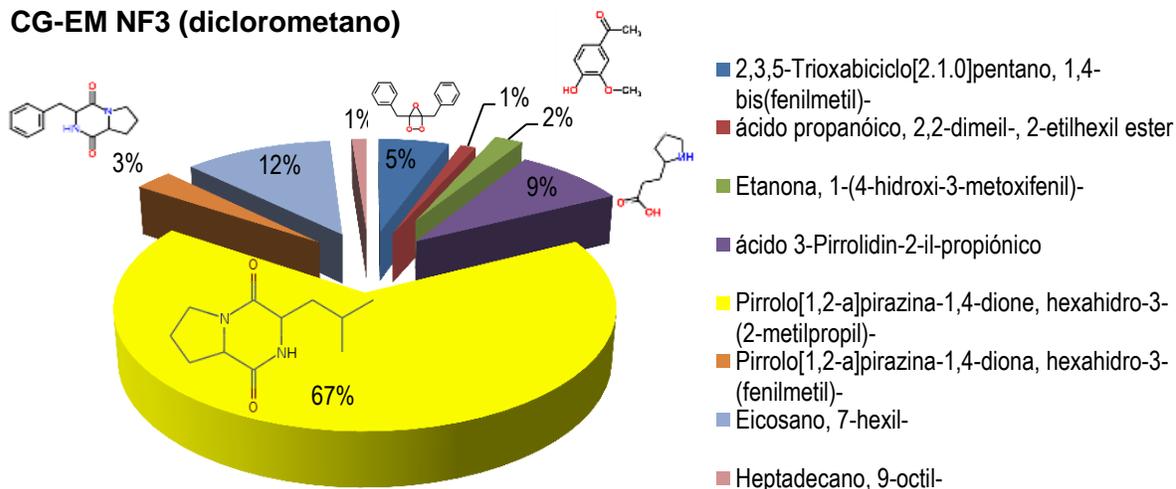
**Tabla 3.** Compuestos no polares (derivatizados) identificados por CG-EM.

Compuesto	Fórmula	Peso	1° Derivatización Área %	2° Derivatización Área %
Ácido nonanodióico, monometil éster	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	202	1.17827	-
Ácido hexadecanoico, metil éster	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	16.6325	8.736724
Ácido n-hexadecanoico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	1.51873	0.541472
Ácido 7-hexadecanoico, metil éster, (Z)-	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268	0.77924	3.629165
Ácido ciclopropano pentanoico, 2-undecil-, metil éster, trans-	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	310	2.21654	-
Ácido octadecanoico, metil éster	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	6.50432	-
Ácido tridecanoico, metil éster	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228	1.64564	6.549767
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, 2,3-bis(acetiloxi)propil éster, (Z,Z,Z)-	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>	436	0.52593	12.23451
Ácido 9-octadecenoico, 13-hidroxi-12-metoxi-, metil éster	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	342	1.27397	-
Ácido octadecanoico, 9,10-dihidroxi-, metil éster, (R*,R*)-	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	330	26.0662	29.70838
Ácido 8-(2-octanoilciclopropil) octanóico, metil éster	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	298	-	2.778915
E-8-metil-9-tetradecen-1-ol acetato	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>	388	28.2971	17.47387
Metil 12-oxo-9-dodecenoato	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	226	3.7961	-
Metil 2-hidroxidodecanoato	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	230	-	17.47387
Ácido oxiraneoctanoico, 3-octil-, metil éster, cis-	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	312	5.04808	-
Triciclo[20.8.0.0(7,16)]triacontano, 1(22),7(16)-diepoxi-	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	444	4.51744	-

**Tabla 4.** Compuestos medianamente polares identificados por CG-EM

Compuesto	Fórmula	Peso	Tiempo de retención (s)	Área %	Reportes en la literatura	
					Actividad	Autor
2,3,5-Trioxabicyclo[2.1.0]pentano, 1,4-bis(fenilmetil)-	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	254	382.45	5.5	--	-
ácido propanoico, 2,2-dimeil-, 2-etilhexil éster	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	214	473.4	1.2	--	-
Etanona, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166	485.8	2.2	Anti-inflamatoria	Stefanska y Pawliczak, 2008.
ácido 3-Pirrolidin-2-il-propiónico	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	143	540.75	8.7	Precursor de anticancerígeno	Blis et al., 2006.
Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	210	608.25	66.8	Anti-aflatoxina Antibacteriana	Yan et al., 2004; Nirjanta y Wahab, 2012;
Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)-	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	244	735.1	3	Antibacteriana Antifúngica	Hamza et al., 2013; Melo, et al., 2014.
Eicosano, 7-hexil-	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	366	791.85	11.5	--	-
Heptadecano, 9-octil-	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	352	845.3	1.8	--	-

**CG-EM NF3 (diclorometano)**



**Figura 19.** Resultados de la espectroscopia de masas del extracto crudo extraído con diclorometano procedente de una extracción secuencial con hexano y diclorometano.

Otro compuesto identificado fue la etanona 1-(4-Hidroxi-3-metoxifenil) (comúnmente llamado apocinina), el cual ha sido también reportado en plantas con actividad anti-inflamatoria (Stefanska y Pawliczak, 2008).

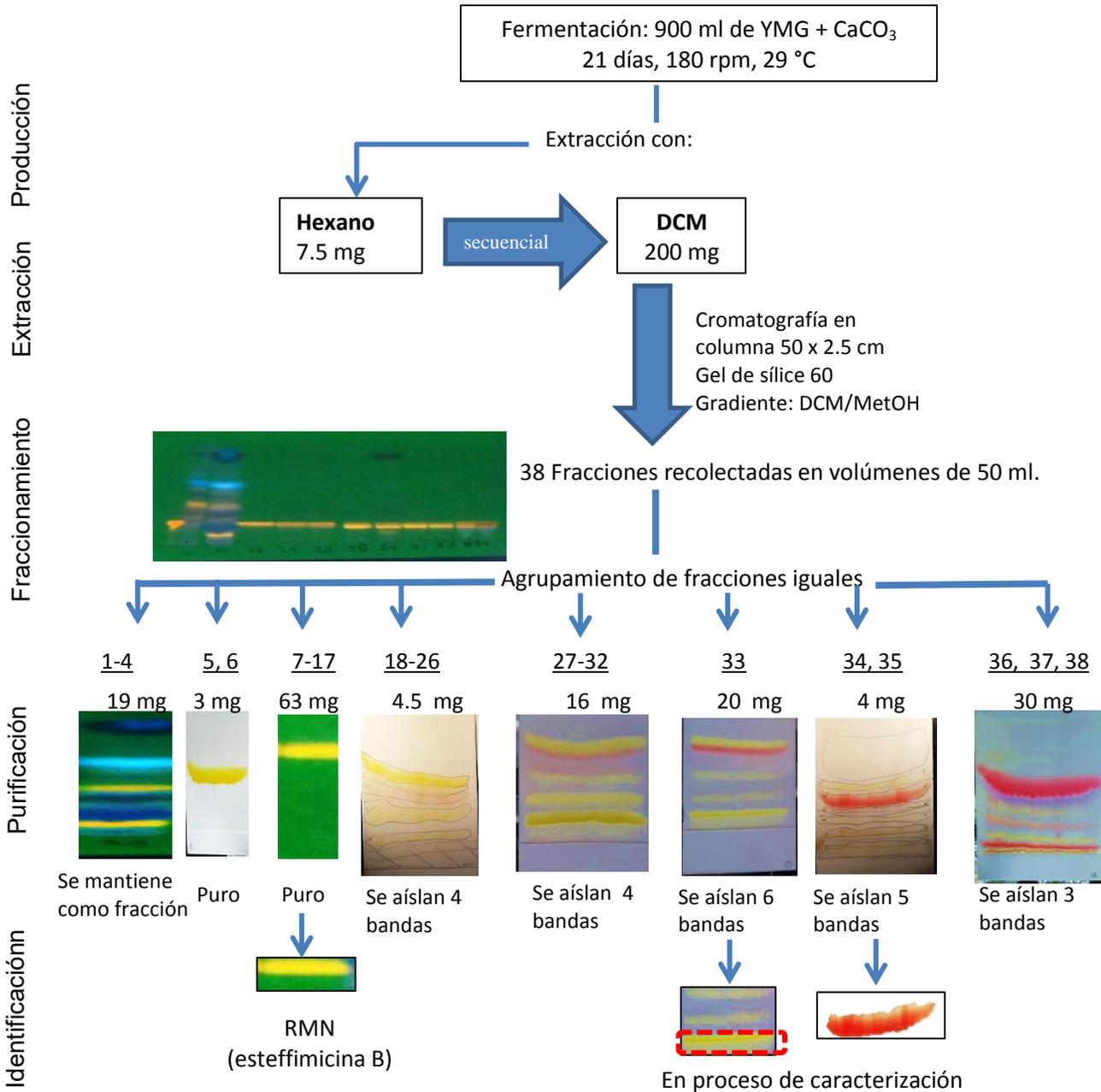
Sin embargo, a pesar de separar los lípidos de la muestra con hexano, una fracción obtenida de CPP que contenía la zona mayormente bioactiva (Figura 17) no volatilizó en la cromatografía de gases, por lo que se prosiguió a purificar los compuestos del extracto de DCM, para su caracterización por RMN de los compuestos bioactivos.

### **7.5 Fraccionamiento y purificación de compuestos antibióticos del extracto de diclorometano**

El extracto de DCM se fraccionó mediante columna de Sílica Gel 60 y CPP como se muestra en la figura 19. Se recolectaron 38 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud en el perfil cromatográfico, resultando en un total de 8 fracciones.

En general, en las CPFs de las fracciones obtenidas; se observan 22 bandas diferentes, de las cuales se purificaron 7 que presentaban actividad antibiótica y que se encontraban mejor separadas, pero solo cuatro de ellas se recuperaron en cantidad suficiente para los análisis químicos posteriores.

## Fraccionamiento y Purificación



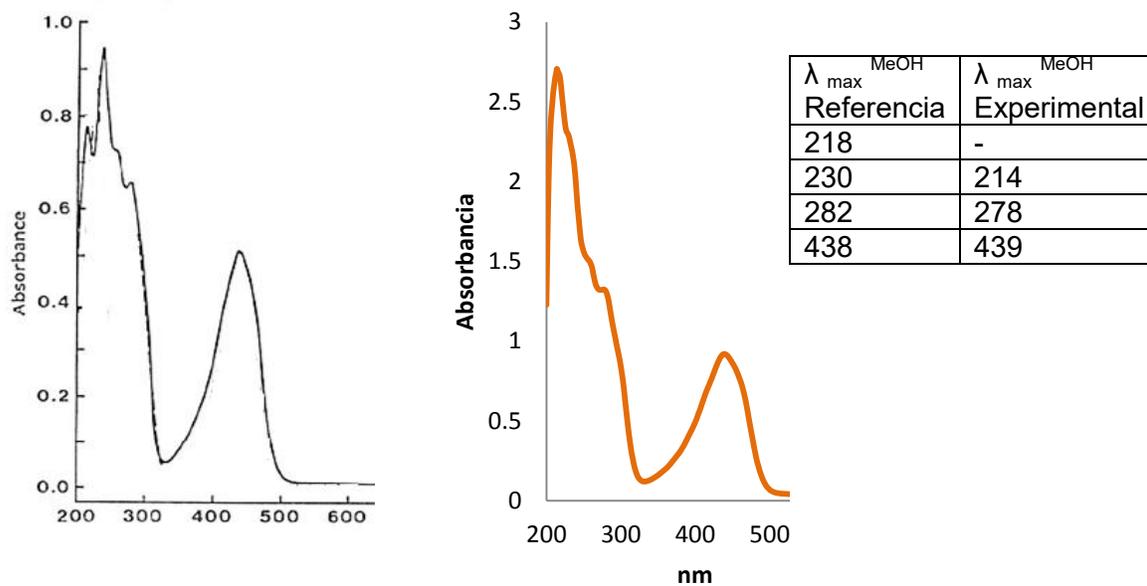
**Figura 20.** Etapas de la purificación de metabolitos de la cepa *Streptomyces* NF3. En el agrupamiento de las fracciones similares se muestra la cantidad en mg que se obtuvieron. Finalmente se muestran las bandas purificadas para los análisis químicos posteriores. RMN: resonancia magnética nuclear, DCM: diclorometano, MetOH; metanol.

## 7.6 Caracterización química por RMN $H^1$ , $C^{13}$ y UV

El compuesto con mayor actividad antibacteriana y a su vez el mayoritario (color amarillo) se purificó del agrupamiento de fracciones 7-11, pero también se observa de forma pura en las fracciones 4-6 y probablemente en menor grado en el resto de las fracciones, excepto en el agrupamiento de 1-4.

Con base a los análisis químicos de éste compuesto y los (Tabla 5 y Figura 21, para ver espectros de RMN ir al Anexo 4), se determinó que se trataba de una antraciclina ya reportada como esteffimicina B por Brodasky y Reusser (1974). La esteffimicina B fue aislada de *Streptomyces elgreteus*, con la fórmula molecular  $C_{29}H_{32}O_{13}$  y peso molecular de 588. Ésta tiende a formar cristales de coloración amarilla-naranja y presenta alta solubilidad en DCM, pero no en agua (Brodasky y Reusser, 1974).

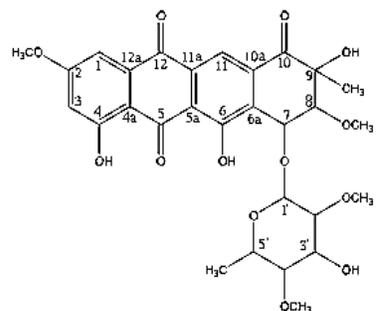
La comparación de espectros de RMN y absorbancia publicados para esteffimicina B y los obtenidos en este trabajo se muestran en Figura 21 y Tabla 3.



**Figura 21.** Espectro UV-VIS de esteffimicina B reportada (negro) y el obtenido de la aislada de la cepa NF3 (naranja), espectro de referencia modificado de Brodasky y Mizsak (1985).

**Tabla 5.** Comparación de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de la esteffimicina B

Posición	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	
	Referencia*	Experimental	Referencia**	Experimental
1	108.1	109.3	7.47 (d, 2.5)	7.35 (d, 2.5)
2	166.6	167.5	-	-
3	106.6	107.0	6.77 (d, 2.5)	6.65 (d, 2.5)
4	164.7	165.9	-	-
4 a	110	110.2	-	-
5	189.5	190.7	-	-
5 a	118.4	118.8	-	-
6	161.2	162.2	-	-
6 a	132.9	133.5	-	-
7	71.6	72.0	5.12 (d, 2.0)	5.12 d, 2.2)
8	85.9	85.7	3.71 (d,2.0)	3.69 (d, 2.2)
9	76.1	76.8	-	-
10	198.4	199.0	-	-
10 a	135.3	135.5	-	-
11	115.3	117.6	8.03 (s)	8.3 (s)
11 a	134.6	135.1	-	-
12	180	180.5	-	-
12 a	133.1	133.5	-	-
1'	100.7	100.6	5.57 (s)	5.54 (s)
2'	80.9	80.5	3.52 (dd, 3.6, 1.4)	3.47 (dd, 3.6, 1.4)
3'	70.2	71.3	3.66 (m)	3.6 (
4'	82.3	83.3	3.07 (m)	3.01 (m)
5'	68.7	69.0	3.77 (m)	3.72 (m)
2'-OCH <sub>3</sub>	59.9	61.0	3.58 (s)	3.89 (s)
4'-OCH <sub>3</sub>	58.5	58.9	3.59 (s)	3.53 (s)
5'-CH <sub>3</sub>	17.8	18.0	1.39 (s)	1.34 (s)
2-OCH <sub>3</sub>	56.4	56.3	-	-
8-OCH <sub>3</sub>	59.7	60.0	3.56 (s)	3.53 (s)
9-CH <sub>3</sub>	23.3	22.9	-	-
4-OH			12.14 (s)	11.92 (s)
8-OH			12.81 (s)	12.93 (s)



Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz. \* Brodasky y Mizensak, 1985; \*\*Intaraudom et al., 2015.

## 7.7 Concentración mínima inhibitoria

Para conocer la actividad antibiótica del compuesto identificado como esteffimicina B y del extracto crudo de DCM obtenidos de la cepa NF3, se realizó la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra bacterias Gram-positivas, ya que la esteffimicina B solo ha sido reportada como inhibidora de Gram-positivas (Brodasky y Reusser, 1974).

Tanto el compuesto como el extracto mostraron inhibición de crecimiento de *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus aureus* 8855 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La concentración mínima inhibitoria puede observarse en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Cepa de referencia Gram-positivos	CMI Extracto DCM µg/mL	CMI esteffimicina B µg/mL	Penicilina µg/mL	Gentamicina µg/mL
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	5	<0.06	<0.03	<0.03
<i>Listeria innocua</i> *	50	16	<0.03	<0.03
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	<1	4	<0.03	<0.03
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	25	4	>32	<0.03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50	8	<0.03	<0.03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 8855	50	4	<0.03	<0.03

En resumen, las CMIs fueron del rango de <1 a 50 µg/mL para el extracto de DCM y de <0.06 a 16 µg/mL para la esteffimicina B, en todos los casos ésta última presentó mayor inhibición, por lo que puede inferirse que al ser la esteffimicina B el compuesto mayoritario en el extracto la actividad antibiótica del mismo en gran parte es atribuible a este compuesto. Sin embargo, existen otros compuestos de la cepa NF3 con potencial antibiótico y además no se descarta la posibilidad de que existan más compuestos en el extracto de DCM con efecto antibiótico pero en cantidades tan pequeñas que no hayan

sido detectadas en los experimentos aquí presentados e incluso es posible que algún compuesto del extracto de NF3 pueda inhibir alguna bacteria Gram-negativa.

Por otro lado, ha sido previamente reportado que la esteffimicina B posee actividad contra *S. hemolyticus* (8 µg/mL), *E. faecalis* (8 µg/mL), *D. pneumoniae* (1 µg/mL), *S. pneumoniae*, (1 µg/mL), *B. cereus* (1.56 µg/mL), *M. tuberculosis* (0.0052 µg/mL) y *S. aureus* UC 80 con CMI de 4 µg/mL (Brodasky y Reusser, 1974; Brodasky y Mizsak, 1985; Intaraudom et al., 2015), resultado comparable con el obtenido en esta tesis (*S. aureus* ATCC 25923 y 8855 fueron de 4 y 8 µg/mL respectivamente).

También se ha evaluado la CMI contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. schottmuelleri*, *P. aeruginosa* y *P. vulgaris*, resultando la esteffimicina B inactiva para estas bacterias Gram-negativas (Brodasky y Reusser, 1974; Brosasky y Mizsak, 1985).

Sin embargo, no fueron encontrados en la literatura más reportes de la actividad antibacteriana de la esteffimicina B, el último reporte fue en el año 2015, dónde se reportó la actividad contra *B. cereus* y *M. tuberculosis*, por lo tanto esta es la primera vez que se reporta la actividad inhibitoria de la esteffimicina B contra *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*.

Por otro lado, extractos etanólicos de la planta *A. adstringens* también muestran actividad contra algunas bacterias Gram-positivas como *B. cereus* (CMI 150 µg/mL) y *S. aureus* (CMI 1380 µg/mL), *E. faecalis* (660 µg/mL) (López et al., 2015) pero en menor grado que la esteffimicina aislada del endófito NF3 (4 y 4-8 µg/mL respectivamente), sin embargo en el presente trabajo no se identificaron los compuestos bioactivos de la planta como productos del endófito NF3, ni los metabolitos de la cepa NF3 han sido descritos como productos de la planta *A. adstringens*, pero si se encontró muy buena actividad antibiótica en el endófito NF3 de ésta planta medicinal.

## 8. CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en el que se reportan metabolitos secundarios de endófitos del árbol *Amphipterygium adstringens*. En el presente trabajo se evaluaron cuatro actinomicetos endófitos de la planta *Amphipterygium adstringens*, de los cuatro; la cepa *Streptomyces* NF3 fue la que presentó mayor actividad antibiótica. El principal compuesto bioactivo producido por la cepa NF3 fue identificado como esteffimicina B, siendo ésta la primera vez que se describe la producción de la esteffimicina B por un endófito y la actividad inhibitoria de esta antraciclina contra *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*.

Adicionalmente, en este trabajo de tesis se detectó la producción de alcaloides, característicos de los endófitos y de otros compuestos que podrían ser novedosos. Es así que los resultados anteriores indican que el endófito *Streptomyces* NF3 es una fuente potencial de compuestos con interés farmacológico.

## 9. PROSPECTIVAS

1. Concluir con la identificación de otros miembros y derivados de la familia de esteffimicinas.
2. Algunos compuestos bioactivos quedaron sin ser identificados, pero con ayuda de la minería genómica puede ser posible ampliar el conocimiento de estos metabolitos secundarios y mejor aún, desarrollar nuevas moléculas a partir de modificaciones genéticas en sus respectivos clusters biosintéticos. Cabe mencionar que hasta el momento solo se conoce el cluster biosintético de la esteffimicina A (Gullon et al., 2006).
3. Identificar los metabolitos producidos en otros medios de cultivo, en los cuales se producen principalmente compuestos no cromóforos con actividad antibiótica.
4. Concluir la evaluación de los extractos de DCM contra otras bacterias como *Mycobacterium* sp.
5. Explorar otras bioactividades de la esteffimicina B.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvin, A., Miller, K. I., Neilan, B. A. (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol. Res.* 169 483–495.
- Bassetti, M, Merelli, M, Temperoni, C., Astilean, A. (2013) New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12(22), 1-15.
- Belakhdar, G, Benjouad, A., Abdennebi, E. H., (2015) Determination of some bioactive chemical constituents from *Thesium humile* Vahl. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (10), 2778-2783.
- Bennett, J. W. (2014) What is an antibiotic?. Sanchez S, Demain AL. (Eds.), *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press, 2015, pp. 1-18. ISBN: 978-1-908230-54-6.
- Bérdy, J. J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *Antibiot.* 58(1), 1–26,
- Bertoli, A., Ruffoni, B., Pistelli, L., Pistelli, L., (2010) Analytical methods for the extraction and identification of secondary metabolite production in in vitro plant cell cultures. Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. Landes Bioscience and Springer Science*. Pp. 250-266.
- Brodasky, T. F., Reusser, F. (1974) Steffimycin b, a new member of the steffimycin family. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* 27, 809-813.
- Brodasky, T. F., Mizesak, S., Hoffstetter, J. R. (1985) Steffimycin C, a new member of the steffimycin anthracyclines. Isolation and structural characterization, *J. Antibiot.* 38, 849-855.
- Bush, K (2012) Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 527–534
- Butler, M. S., Blaskovich, M. A., Cooper, M. (2013) Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.* 66, 1–21.
- Castillo-Juárez, I., García-Contreras, R., Velázquez-Guadarrama, N., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. (2013) Anacardic acid MIXTURE from *Amphypterygium adstringens* inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Med. Res.* 4(7), 488-94.

- Cuevas, X. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). Ibugana, *Bol. Inst. Biol.* 13(1), 27-48.
- Davis, J., Davis, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417-433.
- Demain A. L., Sánchez S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* 62, 5–16.
- Dryden, M. S., Cooke, J., Peter Davey (2009) Antibiotic stewardship—more education and regulation not more availability? *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 885–888.
- Genilloud, O. (2014) The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Ant. van Leeuwen* 106, 173–188.
- Gramajo, H. C., Takano, E. Bibb, M. J. (1993) Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Molecular Microbiology*, 7(6), 837–845.
- Gullon, S., Olano, C., Abdelfattah, M. S., Brana, A. F., Rohr, J., Mendez, C., Salas, J. A. (2006) Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4172-4183.
- Gutierrez, R. M. P., Gonzalez, A. M. N., Ramirez, A. M. (2012) Compounds derived from endophytes: A review of phytochemistry and pharmacology. *Curr. Med. Chem.* 19, 2992-3030.
- Guzmán, M. A., Salinas, J, Toche, P., Afani, A. (2004) Alergia a  $\beta$ -lactámicos. *Rev. Chil. Infect.* 21(4), 285-298
- Hamza, A. A., Ali, H. A., Clark, B. R., Murphy, C. D., Elobied, E. A., (2013) Cyclo (L-phenyl, L-prolyl). Diketopiperazines from a newly isolated *Streptomyces sudanensis*. A4.4 E3. *J. Biotechnol. Pharm. Res.* 4(1), 1-7.
- Hoffman-Roche, A. G. (2006) Novel process for the manufacture of 3-pyrrolidin-2-yl-propionic acid derivatives. WO2006063706 A1.
- Holden, W. (2015) Antibiotic resistance. *Science* 347, 30–32.
- Intaraudom, C., Bunbamrun, N., Dramaee, A., Danwisetkanjana, K., Rachtawee, P., Pittayahajonwut, P. (2015) Antimalarial and antimycobacterial agents from *Streptomyces* sp. BCC27095. *Tetr. lett.* 56, 6875-6877.
- Kelly, R. C. (1976) Steffimycinone, 7-deoxysteffimycinone and derivatives. Upjohn Co., USA . 5 pp.

- Kelly, R. C., Schletter, I., Koert, J. M., MacKellar, F. A., Wiley, P. F. (1977) Structures of steffimycin and steffimycin B. *J. Org. Chem.* 42, 3591-3596.
- Lampman, G. M., Pavia, D. L., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R., (2010) Spectroscopy. *International edition*, pp 105-176
- Li, H., Lee B. C., Kim, T. S., Bae, K. S., Hong, J., Choi, S. H, Bao, B., Jung, J. H . (2008) Bioactive cyclic dipeptides from a marine sponge-associated bacterium, *Psychrobacter* sp. *Biomol. Therap*, 16, 356-363.
- Meera, K., Bat-Erdene, M., Birendra, P., Madhusudan, C. (2013) Identification and characterization of antibiotic-producing actinomycetes isolates *AJM* 4(1), 24-31.
- Melo, I. S., Santos, S. N., Rosa, L. H., Parma, M. M., Silva, L. J., Queiroz, S. C. N., Pellizari, V. H. (2014) Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles* 18, 15–23.
- Mueller, W. E. G., et al. (1976) Potentiation of the effectiveness of bleomycin by A.T-specific DNA ligands in vitro as well as in vivo. *Cancer Lett.* 1(3), 127-132.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCL). (2006) Document: M2-A9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Navarrete, A., Oliva, I., Sánchez-Mendoza, M., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L. Castañeda-Hernández, G. (2005) Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenaco in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1629-1636.
- Nirjanta, D., Wahab F. (2012) Antimicrobial properties of endophytic fungi isolated from medicinal plant *camellia sinesis* *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 3(3), (P) 420 - 427.
- O'Brien, J., Wright, G. D. (2011) An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 552–558.
- Pei-Ji, Z., Li-Ming, F., Guo-Hong, L., Zhu, N., Yue-Mao, S. (2005). Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. *Arch. Pharm. Res.* 28(11), 1228-1232.
- Peláez, F. (2006) The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat? *Biochem. Pharm.* 71, 981–990.
- Rodríguez-Peña, K., Macías-Rubalcava, M. I., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S. (2016) Endophytic actinomycetes from the medicinal plant *Amphipterygium adstringens* as producers of secondary metabolites with potential pharmaceutical applications. *Sometido a J. Appl. Microbiol.*

- Reusser, F. (1975) Steffimycin B, a DNA binding agent. *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synt.* 383(3), 266-273.
- Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Ávalos, M., Guzmaán-Trampe, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., Ruiz, B. (2010) Carbon source regulation of antibiotic production *J. Antibio.* 63, 442–459.
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species *International journal of systematic bacteriology.* 16(3), 313-340.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Yoga Latha, L. (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 8(1), 1-10.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. (2007) Antimicrobial susceptibility testing protocols. *CRC Press.* 1-414. ISBN-13: 978-0-8247-4100-6.
- Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., A., Bhattacharyya M. (2015) Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiology* 15(170), 1-16.
- Shlaes, D. M., Spellberg, B. (2012) Overcoming the challenges to developing new antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 522–526.
- Shomura, T., Yoshida, J., Amano, S., Kojima, M., Inouye, S., Niida, T. (1979) Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture I. screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J. Antibio.* 32(5), 427-435.
- Singh, R., Debnath, A., Masram, D. T., Rathore, D. (2013). Synthesis and biological activities of selected quinolone-metal complexes. *Res. J. Chem. Sci.* 3(6), 83-94.
- Singh, R. P., Jain, S., Singh, P., Gupta, N. (2014). Development of antibiotic resistance in Gram negative bacilli: An eye opener. *Med J DY Patil Univ,* 7, 332-337.
- Stefanska, J., Pawliczak, R. (2008) Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008, 1-10.
- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science.* 260(5105), 214-216.
- Strobel, G., Daisy, B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* 67, 491–502.
- Vicente, E., Perez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc Microbiol Clin.* 28(2), 122-130.

- Watve M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176(5), 386-390.
- World Health Organization (WHO) (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- Wright, G. D., Hendrik, P. (2012). Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends Microbiol.* 20(4), 157-158.
- Wu, Y., He, L., Zhang, L., Chen, J., Yi, Z., Zhang, J., Liu, M., Pang X. () Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. *JPET.* 339(2), 403-411.
- Yan, P. S., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., Yabe, K. (2004). Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12), 7466-73.
- Yi, N. Z., Amsaveni, S. (2012) Isolation, screening and producing actinomycetes from rhizosphere region of different plants from a farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia. *Journal of Advanced Biomedical and Pathobiology* 2(3), 96-107.
- Yim, G., Thaker, M. N., Koteva, K., Wright G. (2014) Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *J. Antibiot.* 67, 31-41.
- Zhao J. Zhou L., Wang J., Shan Y., Zhong L., Liu X., Gao X. (2010) Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr. Res. Technol. Ed.. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 1, 567-576.

## 11. ANEXO 1

### Medios de cultivo

---

<b>Agar Nutritivo</b>	
Reactivo	Cantidad g/L
Extracto de res	3.0
Peptona	5.0
Agar	15.0
pH final: 6.8	

---

---

<b>YMG + CaCO<sub>3</sub></b>	
Reactivo	Cantidad g/L
Glucosa	4.0
Extracto de levadura	4.0
Extracto de malta	10.0
CaCO <sub>3</sub>	2.0
Agar	12.0
pH final = 7.2 ± 0.2	

---

---

<b>MM</b>	
Reactivo	Cantidad g/L
L-asparagina	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2
Glucosa	0.01
Agar	15.0
pH final = 6.8 ± 0.2	
La glucosa se añade después de esterilizar.	

---

---

<b>GY</b>	
Reactivo	Cantidad g/L
Extracto de res	3.0
Glucosa	10.0
Extracto de levadura	10.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
pH final = 7.2 ± 0.2	

---

---

<b>GAE</b>	
Reactivo	Cantidad g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
Glucosa	10.0
Asparagina	1.0
Extracto de levadura	0.5
Agar	17.0
pH final = 6.8 ± 0.2	

---

---

**LB**

---

Reactivo	Cantidad g/L
Extracto de levadura	5.0
Peptona de caseína	10.0
NaCl	5.0

pH final = 7.2 ± 0.2

---

---

**NMMP**

---

Reactivo	Cantidad g/L
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	2.0
Casaminácidos	5.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.6
PEG 6000	50.0
Elementos traza	1.0 ml
buffer NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1M pH= 6.8	150.0 ml
Glucosa o manitol (Stock 20%)	2.5 ml

pH final = 6.8 ± 0.2

---

---

Elementos traza:	100 ml
	g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0
MnCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub>	1.0

---

---

**TSB**

---

Reactivo	Cantidad g/L
Glucosa	2.5
Triptona	15.0
Peptona de soya	5.0
NaCl	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5

pH final = 7.2 ± 0.2

---

---

**IMA-2**

---

Reactivo	Cantidad g/L
Glucosa	5.0
Almidón	5.0
Extracto de carne	1.0
Extracto de levadura	1.0
Caseína	2.0
NaCl	2.0
CaCO <sub>3</sub>	1.0

pH final = 6.8 ± 0.2

---

---

**R5 modificado**

---

Reactivo	Cantidad g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	10.0
Glucosa	10.0
Caseína	0.1
Extracto de levadura	5.0
Buffer MOPS	21.0 ml
Elementos Traza	2.0 ml
pH final = 6.8 ± 0.2	

---

---

Elementos traza	100 ml
	mg
Traza ZnCl <sub>2</sub>	40.0
FeCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	20.0
CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	10.0
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> . 10H <sub>2</sub> O	10.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4H <sub>2</sub> O	10.0

---

---

**Seino**

---

Reactivo	Cantidad g/L
Almidón	10.0
N-z amino tipo A	3.0
Extracto de Carne	1.0
Extracto de levadura	40.0
CaCO <sub>3</sub>	3.0
Agar	12.0
pH final = 6.8 ± 0.2	

---

---

**JCM 61**

---

Reactivo	Cantidad g/L
Almidón	15.0
Extracto de levadura	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.5
Agar	15.0
pH final = 7.2 ± 0.2	

---

---

**YPD**

---

Reactivo	Cantidad g/L
Extracto de levadura	10.0
Peptona	20.0
Glucosa	20.0
Agar	17.0
pH final = 6.5 ± 0.2	

---

## 12. ANEXO 2

### Derivatización

En la derivatización de triglicéridos del extracto de DCM de la cepa NF3, se empleó el reactivo BF<sub>3</sub>-Methanol Kit SUPELCO<sup>MR</sup>, el cual contiene trifluoruro de boro en metanol al 10 % v/ v.

El Trifluoruro de boro es un reactivo que se ha popularizado para reacciones de esterificación o transesterificación, ya que no presenta riesgos de carcinogénesis como en su momento lo hicieron el diezometano y los diazoalcanos. El Trifluoruro de boro en presencia de metanol forma fácilmente ésteres de ácidos alifáticos y aromáticos, sin alterar relativamente las estructuras lábiles y sin producir reacciones secundarias. Generalmente la reacción es casi instantánea. Al estar el reactivo en presencia de ácidos grasos y calentarse un corto tiempo, los ácidos grasos son combinados con el alcohol anhidro (metanol) en presencia del catalizador ácido (BF<sub>3</sub>). En la reacción, el ácido graso y alcohol molecular se unen con una pérdida de agua. Los derivados pueden ser rápidos y fáciles de recuperar.

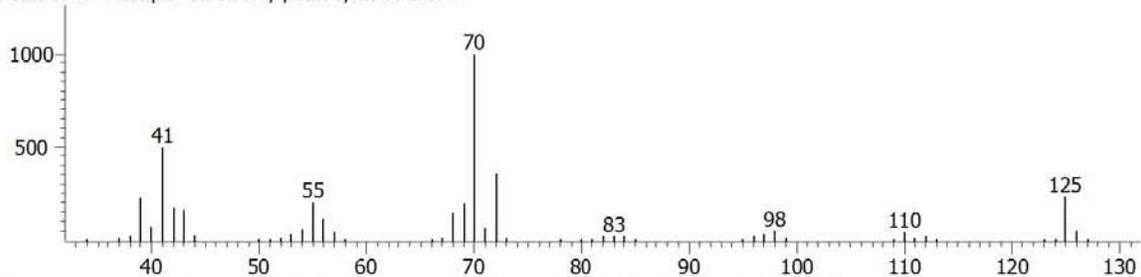
#### **Procedimiento seguido de acuerdo al protocolo de SUPELCO<sup>®</sup> de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (1998).**

1. Preparar un blanco de reactivo (todos los componentes, disolventes, etc., excepto de la muestra), siguiendo el mismo procedimiento usado para la muestra.
2. Pesarse 3 mg de muestra (ácido) en un recipiente de reacción de 5 ml.
3. Añadir 2 ml BF<sub>3</sub>-metanol 10% v/v. Un captador de agua (por ejemplo, 2,2-dimetoxipropano) se puede añadir en este punto (el agua puede prevenir la reacción de ir a la terminación, produciendo bajos rendimientos).
4. Se calienta a 70 °C durante 30 min. A continuación, añadir 1 ml de agua y 1 ml de hexano. Agitar el recipiente de reacción es fundamental para obtener los ésteres en el disolvente no polar.
5. Retirar cuidadosamente la capa superior (orgánica) y secar sobre sulfato de sodio anhidro. Si no se derivatiza completamente, utilizar metanol en exceso, en relación con el ácido o reevaluar la temperatura y el tiempo de reacción. La estequiometría de la reacción requiere de 3 moles de alcohol por cada mol de triglicérido. La tasa de conversión también se ve influida por la temperatura de reacción (la reacción generalmente se lleva a cabo cerca del punto de ebullición del alcohol).

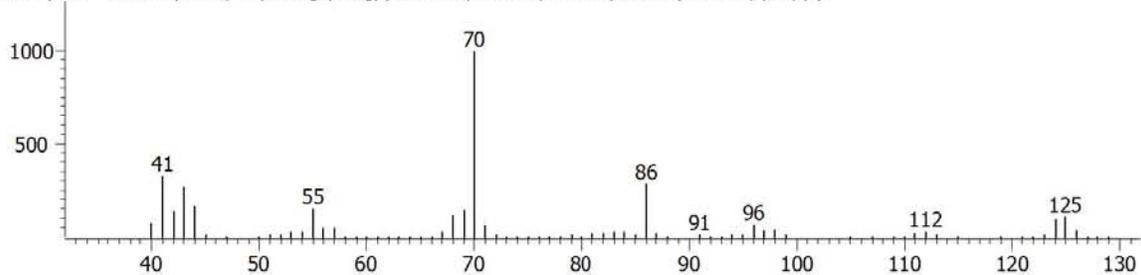
### 13. ANEXO 3

#### Espectros de CG-EM

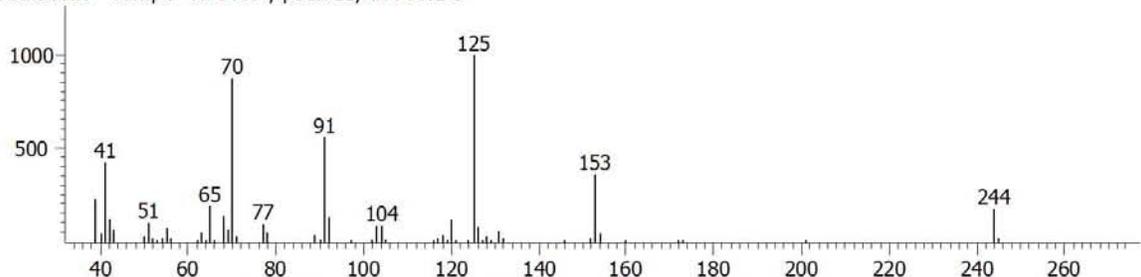
Peak True - sample "NF3T:3", peak 6, at 571.45 s



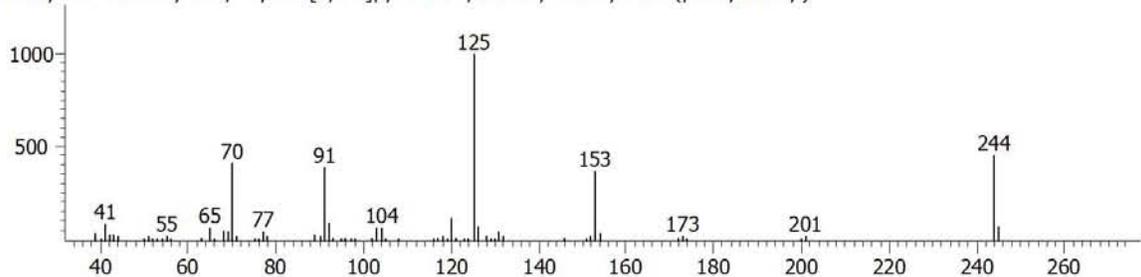
Library Hit - similarity 719, "Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-"



Peak True - sample "NF3T:3", peak 11, at 735.1 s



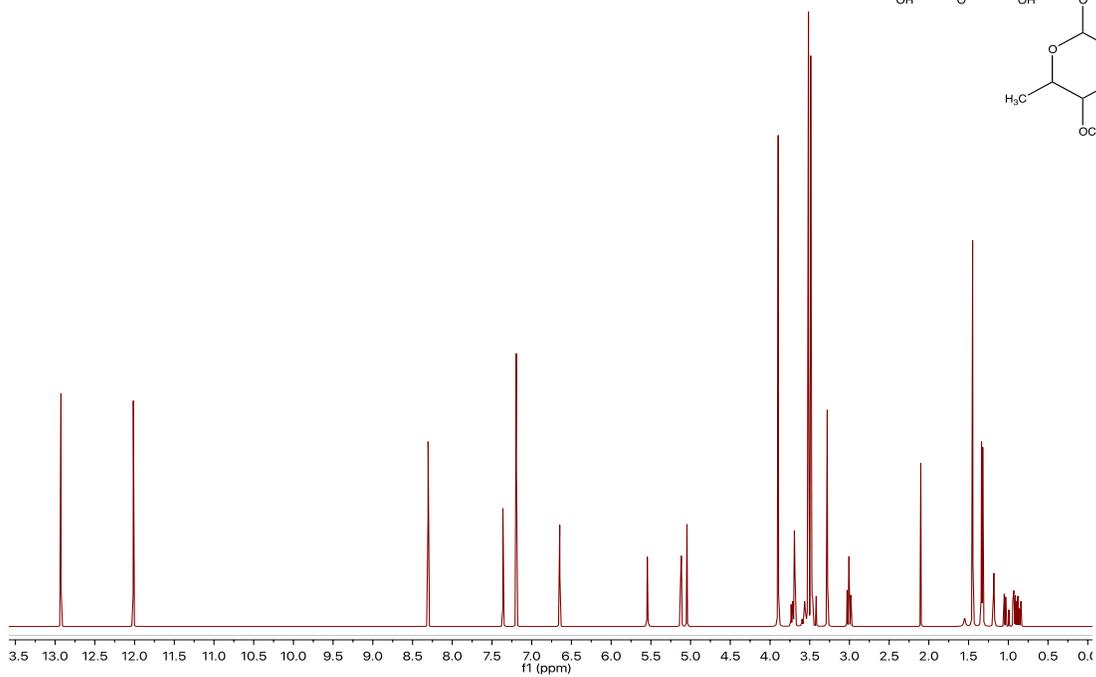
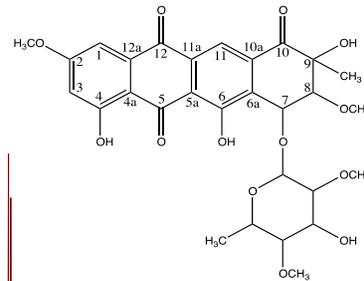
Library Hit - similarity 878, "Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-"



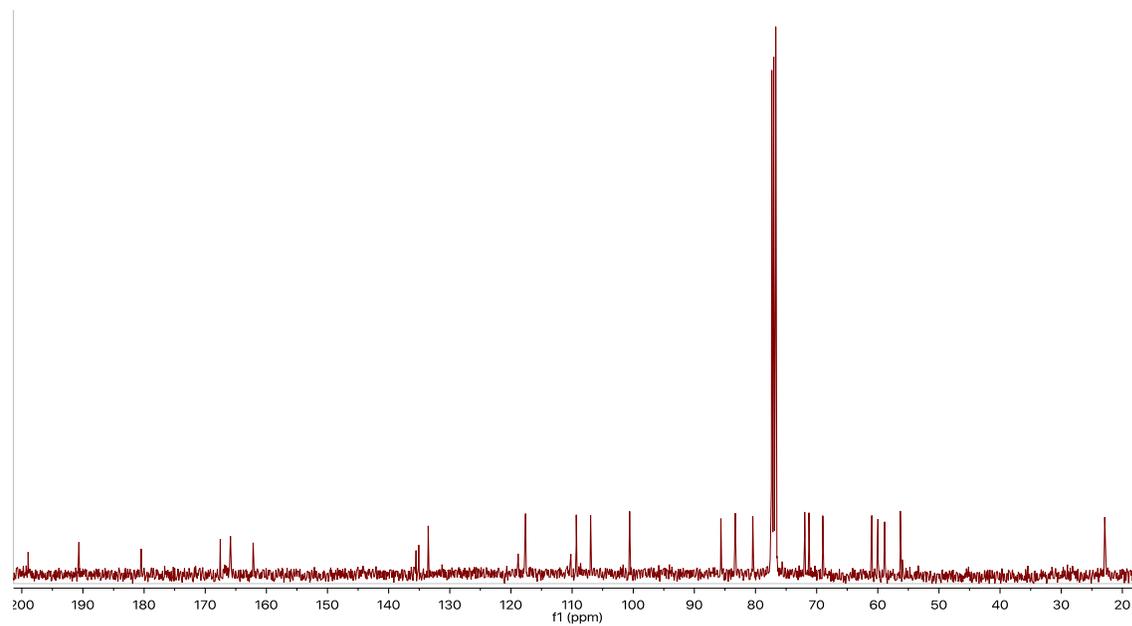
### 13. ANEXO 4

#### Espectros de RMN

##### <sup>1</sup>H RMN de esteffimicina B



##### <sup>13</sup>C RMN



# HSQC RMN

