



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOMICETOS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q.I. CARLOS DANIEL HERNÁNDEZ GRANILLO

DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, mayo 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOMICETOS DE LA PENÍNSULA DE
YUCATÁN**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

I.Q.I. CARLOS DANIEL HERNÁNDEZ GRANILLO



Ciudad de México, 2023

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
VOCAL: Dra. Martha Lydia Macias Rubalcava
VOCAL: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
VOCAL: Dra. Alejandra Prieto Davó
SECRETARIO: Dr. Rodolfo García Contreras

Lugar donde se desarrolló el proyecto de tesis: Laboratorio 125, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Presentación en congreso: Carlos D. Hernández-Granillo, Alejandra Prieto-Davó, Mario Figueroa. Bioprospección de actinobacterias de la Ciénaga de Sisal, Yucatán. VIII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomédicas y VI Simposio Nacional de Microbiología Aplicada 2022. UANL, N.L. (cartel).

Sustentante:



I.Q.I. Carlos Daniel Hernández Granillo

Tutor:



Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
Profesor Titular B, TC
Facultad de Química, UNAM

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química y al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (PCQ), UNAM, por permitirme continuar con mi formación profesional y de investigación

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la beca (No. CVU 1059306) para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN222220) de la UNAM y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9145) de la Facultad de Química, UNAM por los financiamientos otorgados para la realización de este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Mario A. Figueroa S. por todas sus enseñanzas y apoyos durante mi formación. Por inspirarme a mejorar cada día y por su consejo y guía durante mi formación.

A los Dres. Guillermo Delgado Lamas, Martha Lydia Macias Rubalcava, Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Alejandra Prieto Davó y Rodolfo García Contreras por sus observaciones y comentarios a la revisión del presente manuscrito. A la Dra. Alejandra Prieto Davó y su equipo, de la Unidad de Química en SISAL, Yucatán, por proporcionar los organismos estudiados en este trabajo y por sus comentarios y observaciones al manuscrito. A la Dra. Rachel Mata Essayag por su apoyo y enseñanzas; y por el acceso a los materiales y equipos de su laboratorio. Al la Dra. Anahí Martínez Cárdenas, por su apoyo con la extracción del ADN de las bacterias de este trabajo y al Dr. Oswaldo Pablo Martínez Rodríguez por su apoyo en los ensayos anti-biopelícula. A la Lic. Ninette García por su apoyo en la etapa de extracción y siembra de los microorganismos.

A todos mis compañeros del Laboratorio 125 de la Facultad de Química. Al Dr. Oswaldo Martínez y a la M. en C. Alejandra Arista por su apoyo incondicional y amistad sincera. A la M. en C. Rubí Yeverino por enseñarme y orientarme más de lo que ella se imaginó; a los Dres. Carlos Fajardo y Rodrigo Villanueva, por sus sabios consejos y por compartir conmigo su experiencia y conocimiento; y a todos los compañeros del laboratorio que hicieron de mi estadía un momento muy agradable.

Finalmente, a mi familia. A mis hermanas Mildred y Fernanda, por estar conmigo siempre y nunca soltarme. A mi tía Marisela porque su infinito amor me inspira a hacer cosas grandes. A mi padre, que, aunque esté lejos, siempre estará presente. Y a Ángel Alexis por su inmenso amor.

Dedicatoria

ÍNDICE

1. Antecedentes.....	1
1.1. La importancia de los productos naturales provenientes de microorganismos en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.....	1
1.2. Ecosistemas marinos inexplorados como fuentes potenciales de nuevos compuestos procedentes de actinobacterias.....	4
1.3. La península de Yucatán.....	5
1.4. El problema emergente de la resistencia antimicrobiana	7
1.5. Redes moleculares: una herramienta para el estudio de la diversidad química.....	8
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivos	11
4. Parte experimental.....	12
4.1. Aislamiento de microorganismos	12
4.2. Caracterización taxonómica de los organismos de estudio.....	13
4.3. Cultivo y preparación de extractos orgánicos	14
4.4. Procedimientos cromatográficos generales	16
4.5. Caracterización estructural	17
4.6. Evaluación biológica	18
4.6.1. Ensayo antimicrobiano.....	18
4.6.2. Evaluación de actividad anti-biopelículas en MRSA	19
4.7. Fraccionamientos primarios y de los extractos de <i>Glutamicibacter</i> sp.....	19
4.7.1. Purificación de los metabolitos 1-4	20
4.8. Fraccionamiento primario de los extractos de <i>Streptomyces</i> sp.	21
4.8.1. Purificación del metabolito 5	22
4.9. Fraccionamiento primario de los extractos de <i>Nocardiosis</i> sp.....	23
4.9.1. Purificación de los metabolitos 6–7	24
4.10. Procesamiento y análisis por Redes Moleculares y estudios de metabolómica.....	26
5. Resultados y discusión.....	27
5.1. Asignación taxonómica de organismos de estudio.....	27
5.2. Evaluación biológica de extractos de pequeña escala.....	27
5.3. Estudio químico de <i>Glutamicibacter</i> sp. NCA-315.....	30
5.4. Estudio químico de <i>Streptomyces</i> sp. NCA-145	43
5.5. Estudio químico de <i>Nocardiosis</i> sp. NCA-454.....	46

5.6. Actividad anti-biopelículas sobre MRSA	47
5.7. Estudios de metabolómica y redes moleculares	48
5.7.1. Estudio metabolómico de <i>Glutamicibacter</i> sp.	54
5.7.2. Estudios metabolómicos de <i>Streptomyces</i> sp.	58
5.7.3. Estudios metabolómicos de <i>Nocardiopsis</i> sp.	63
5.7.4. Estudios metabolómicos de NCA-305.....	66
6. Conclusiones	70
7. Referencias	71
8. Anexos	81

Lista de Figuras

Figura 1. Nuevos fármacos aprobados por la FDA desde 1981 al 2019 por categoría	1
Figura 2. Ejemplos de antimicrobianos de uso clínico obtenidos a partir de microorganismos	2
Figura 3. Clases de antibióticos más relevantes clínicamente provenientes de PN	3
Figura 4. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de las cepas de estudio.	12
Figura 5. Morfología general de las cepas objeto de estudio.	14
Figura 6. Procedimiento general para la obtención de los extractos bacterianos.....	15
Figura 7. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto G ₁ de <i>Glutamicibacter</i> sp. (NCA-315)	20
Figura 8. Cromatograma analítico de la separación por HPLC de la fracción F ₁₂ de G ₁ ; ELSD.	21
Figura 9. Cromatograma analítico de la separación por HPLC de la fracción F ₁₁ de G ₁ ; ELSD.	21
Figura 10. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto S ₁ de <i>Streptomyces</i> sp. (NCA-145)	22
Figura 11. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto Nc ₁ de <i>Nocardiopsis</i> sp. (NCA-454)	24
Figura 12. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de la fracción F ₁₃ del extracto Nc ₂	25

Figura 13. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de la fracción F ₁₄ del extracto Nc ₂	26
Figura 14. Recuento del número de extractos con actividad notable contra las cepas patógenas del grupo ESKAPE agrupados por bacteria de origen.	30
Figura 15. Espectros de HRESIMS del compuesto 1	32
Figura 16. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 500 MHz) del CA (1).	33
Figura 17. Espectro HSQC (CD ₃ OD) del CA (1)	33
Figura 18. Espectro HMBC (CD ₃ OD) del CA (1)	34
Figura 19. Espectro COSY (CD ₃ OD) del CA (1)	34
Figura 20. Espectro NOESY (CD ₃ OD) del CA (1)	35
Figura 21. Espectros de HRESIMS del compuesto 2	36
Figura 22. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 500 MHz) del 7OCA (2).	37
Figura 23. Espectros de HRESIMS del compuesto 3	38
Figura 24. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 500 MHz) del GCA (3)	39
Figura 25. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 500 MHz) del GDCA (4).	39
Figura 26. LR-DART-TOF-MS del TAG (18:0/18:2/16:0)- 5	44
Figura 27. Espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 600 MHz) del TAG-(5).	45
Figura 28. Resultados del ensayo de crecimiento y actividad anti-biopelícula contra MRSA de los compuestos 1–4	47
Figura 29. Visualización de la distribución de nodos en los extractos en función del origen geográfico	49
Figura 30. Algunos metabolitos anotados automáticamente en la RM general.	50
Figura 31. Red molecular de <i>Glutamicibacter</i> sp	56
Figura 32. Análisis de los clústeres de la RM de <i>Glutamicibacter</i> sp	57
Figura 33. Diagrama de Venn cuantitativo de la distribución de los datos de cada bacteria de estudio	60
Figura 34. Red molecular de <i>Streptomyces</i> sp.	61
Figura 35. Análisis de los clústeres de la RM de <i>Streptomyces</i> sp	62
Figura 36. Red molecular de <i>Nocardiosis</i> sp	65
Figura 37. Análisis de los clústeres de la RM de <i>Nocardiosis</i> sp	66
Figura 38. Red molecular de NCA-305	68
Figura 39. Análisis de los clústeres de la RM de NCA-305	69

Lista de Tablas

Tabla 1. Origen de las cepas de estudio.....	12
Tabla 2. Rendimientos de pequeña y mediana escala de los extractos de organismos selectos	16
Tabla 3. Fraccionamiento primario del extracto G ₁ de <i>Glutamicibacter sp.</i> (NCA-315)	20
Tabla 4. Fraccionamiento primario del extracto S ₁ de <i>Streptomyces sp.</i>	22
Tabla 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F ₈ del extracto S ₁ de <i>Streptomyces sp.</i>	23
Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto Nc ₂ de <i>Nocardiopsis sp.</i> (NCA-454).....	23
Tabla 7. Fraccionamiento secundario de las fracciones F ₁₃ y F ₁₄ provenientes del extracto Nc ₂ de <i>Nocardiopsis sp.</i> (NCA-454).....	25
Tabla 8. Asignación taxonómica de los organismos de estudio.	27
Tabla 9. Resultados completos de actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala	28
Tabla 10. Datos espectroscópicos de los compuestos 1–4 (CD ₃ OD; δ_C 125 MHz, δ_H 500 MHz).....	41
Tabla 11. Datos espectroscópicos del compuesto 5 (CDCl ₃ ; δ_C 150 MHz, δ_H 600 MHz) .	46
Tabla 12. <i>Hits</i> representativos de la RM general	52
Tabla 13. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de <i>Glutamicibacter sp.</i> (NCA-315).	55
Tabla 14. Metabolitos exclusivos de <i>Streptomyces sp.</i> encontrados en los estudios de metabolómica por GNPS.	59
Tabla 15. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de <i>Nocardiopsis sp.</i>	64
Tabla 16. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de NCA-305.	67
Tabla 17. Resultados de actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> de las fracciones obtenidas en este trabajo.....	81

Lista de Símbolos y Abreviaturas

°C	Grado Celsius	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
¹³C	Carbono 13	Fe	Hierro
¹H	Hidrogeno	FTP	Protocolo de transferencia de datos
7OCA	Ácido 7-oxo-3,12-dihidroxicólico	g	Gramo
Å	Armstrong	GCA	Ácido glicocólico
a.C.	Antes de Cristo	GDCA	Ácido glicodesoxicólico
A1	Medio marino	Gly	Residuo de glicina
AcOEt	Acetato de etilo	GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Gram(-)	Gram negativo
AHL	Acilhomoseril lactonasa	Gram(+)	Gram positivo
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal	h	hora
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	H₂CO₂	Ácido fórmico
ATP	Adenosín trifosfato	H₂O	Agua
BGC	<i>Biosynthetic gene cluster</i>	HMBC	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
CA	Ácido cólico	HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por ionización con electrospray
Ca²⁺	Ion calcio	HSQC	Coherencia heteronuclear cuántica simple
CCA	Cromatografía en columna abierta	Hx	Hexano
CD₃OD	Metanol deuterado	Hz	Hertz
CDCl₃	Cloroformo deuterado	ISP2	Medio del proyecto internacional del <i>Streptomyces</i> No. 2
CF	Cromatografía flash	K⁺	Ion potasio
cm	Centímetro	LB	Caldo de Lisogenia
CMI	Concentración mínima inhibitoria	LR-DART-TOF-MS	Espectrometría de Masas de Baja Resolución de análisis directo en tiempo real y analizador de tiempo de vuelo
CoA	Coenzima A	m	Metro
COSY	Espectroscopía de correlación	m/z	Relación masa-carga
CV	Volúmenes de columna	MeCN	Acetonitrilo
d	Señal doble	MeOH	Metanol
DBE	Equivalentes a dobles enlaces	mg	Miligramo
dd	Señal doble duplicada	MHz	Megahertz
ddd	Señal duplicada tres veces	min	Minuto
DMSO	Dimetil sulfóxido	mL	Mililitro
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm	mm	Milímetro
DSC-ASW	Medio de agua marina artificial		
dt	Señal triple duplicada		
dtd	Señal doble de una señal triple duplicada		
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativa		
ESI	Electrospray		
ESKAPE	Acrónimo de bacterias de interés clínico		

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina	PN	Producto natural
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a metilicina	ppm	Parte por millón
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem	RAM	Resistencia antimicrobiana
MS2LDA	Herramienta de descubrimiento no supervisado de subestructuras en metabolómica	REGAC	Reserva Estatal Geohidrológica "Anillo de Cenotes"
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	RM	Red molecular
μL	Microlitro	RMN	Resonancia magnética nuclear
μM	Micromolar	rpm	Revoluciones por minuto
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	s	Segundo
ng	nanogramo	SiO₂	Gel de sílice
NIH	<i>National Institutes of Health</i>	sp.	especie
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	SPE	Extracción en fase sólida
nm	Nanómetro	T	Señal triple
NOESY	Espectroscopía de mejoramiento nuclear de Overhauser	TLC	Cromatografía en capa delgada
NRPS	Sintasas de péptidos no ribosomales	t_R	Tiempo de retención
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	Tt	Señal triple de triples
PKS	Policétidos sintasas	uma	Unidad de masa atómica
		UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
		UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia
		UPLC-LRMS	UPLC acoplado a espectrometría de masas de baja resolución
		UV	Ultravioleta

RESUMEN

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinario que tiene como objetivo descubrir metabolitos bioactivos a partir de microorganismos de la biodiversidad de nuestro país. Así, en este trabajo se realizó el estudio químico, biológico y metabolómico preliminar de bacterias provenientes de cenotes y manglares de la península de Yucatán. Estos hábitats fueron seleccionados debido a sus características ambientales y biológicas únicas en el mundo, por lo que se espera que alberguen organismos singulares con capacidades metabólicas desconocidas.

En primer lugar, se acondicionaron e identificaron 9 bacterias aisladas de distintas zonas en la península de Yucatán. Los organismos se cultivaron y sus extractos orgánicos fueron probados contra una serie de patógenos del grupo ESKAPE. De éstas, se seleccionaron tres especies que pertenecen al filo de las actinobacterias para su estudio químico dirigido y metabolómico. Así, se logró el aislamiento de 5 compuestos puros (cuatro derivados de ácidos cólicos y uno de glicerol) y dos más que se encuentran en proceso de caracterización, mismos que se sometieron a un ensayo de actividad anti-biopelícula contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), dando resultados prometedores como moduladores de la producción de biopelículas, un importante factor de virulencia.

Finalmente, se realizó el estudio metabolómico no dirigido empleando la plataforma del GNPS, obteniéndose una serie de redes moleculares mejoradas con la herramienta MolNetNehancer. En éstas, se logró visualizar el repertorio químico y potencial biosintético de las cuatro especies bacterianas estudiadas más prometedoras (incluyendo la que no logramos crecer para su estudio químico), mediante la anotación de múltiples metabolitos de importancia medicinal y biotecnológica. Por otro lado, se analizó la relación que existe entre la expresión metabólica y el medio de cultivo en el que se desarrolló el organismo o su origen geográfico.

ABSTRACT

This work is part of a multidisciplinary research project that aims to discover bioactive metabolites from microorganisms of the biodiversity of our country. Thus, in this work, the preliminary chemical, biological, and metabolomic study of bacteria from cenotes and mangroves of the Yucatan peninsula was carried out. These habitats were selected due to their unique environmental characteristics and are expected to host unique organisms with unknown metabolic capacities.

First, nine bacteria isolated from different areas in the Yucatan peninsula were conditioned and identified. The organisms were cultured, and their organic extracts were tested against a series of pathogens from the ESKAPE group. From these, three species belonging to the actinobacteria phylum were selected for biodirected-guided chemical and metabolomic studies. Overall, the isolation of 5 pure compounds was achieved (four derivatives of cholic acids and one of glycerol) and two more that are in the characterization process. All compounds were subjected to an anti-biofilm activity test against *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin, giving promising results as modulators of biofilm production, an important virulence factor.

Finally, the bacterial extracts were subjected to an untargeted metabolomic study using the GNPS platform, obtaining a series of molecular networks that were improved using the MolNetNehancer tool. In these, it was possible to visualize the chemical repertoire and biosynthetic potential of the four most promising bacterial species studied (including the one we could not grow for its chemical study) by annotating multiple metabolites of medicinal and biotechnological importance. On the other hand, the relationship between metabolic expression and the culture medium in which the organism developed or its geographical origin was analyzed.

1. ANTECEDENTES

1.1. La importancia de los productos naturales provenientes de microorganismos en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos

Los productos naturales (PN) son compuestos químicos que han sido desarrollados y modificados por organismos vivos a lo largo de millones de años de evolución para fines adaptativos y/o de comunicación entre especies. Muchos PN de importancia medicinal son producidos por plantas terrestres, animales, organismos marinos, microorganismos y animales vertebrados e invertebrados. En una revisión hecha por Newman y Cragg en 2020 (**Figura 1**), se demostró que poco más del 40% de los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de América entre 1981 y 2019, tienen su origen a partir de un PN (macromoléculas, PN inalterados, mezclas botánicas y derivados de PN) y otro 25% adicional está inspirado en un PN (mímesis o imitando el farmacóforo de un PN). En la misma revisión se encontró que cerca de la mitad de los fármacos antimicrobianos (antibacterianos, antimicóticos y antiparasitarios) provienen directamente de una fuente natural¹.

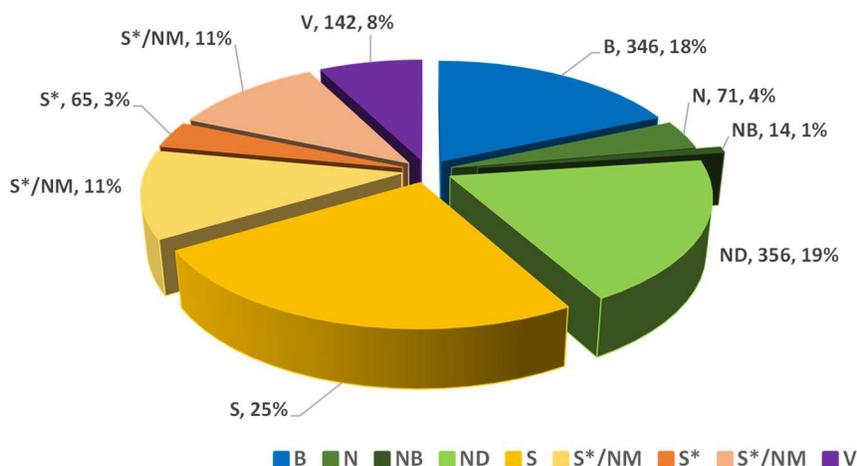


Figura 1. Nuevos fármacos aprobados por la FDA desde 1981 al 2019 por categoría; $n = 1881$. B: macromolécula biológica, N: PN inalterado, NB: mezcla botánica estandarizada, ND: derivado de PN, S: sintético, S*/NM: sintético que mimetiza a un PN, S*: sintético con farmacóforo de un PN, V: vacuna. Adaptado de Newman y Cragg¹.

Desde los inicios de la humanidad, las principales fuentes de PN con fines medicinales fueron las plantas. Así, se han evidenciado el uso de aceites esenciales del cedro, el pino ciprés, la mirra y la amapola, para tratar afecciones como la tos, la fiebre, inflamaciones e infecciones parasitarias y dolores, en descripciones mesopotámicas que datan del año 2,600 a.C. Estas sustancias eran usadas de forma regular hasta el siglo XX,

en el que gracias al descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming², el desarrollo de los PN vio un desplazamiento significativo, desde las plantas hacia los microorganismos. Desde entonces los compuestos obtenidos de microorganismos se han aplicado exitosamente en medicina y muchas otras industrias. En lo tocante a los antibióticos, en la década de los 40s se desarrollaron algunos fármacos como la estreptomina, el cloranfenicol y la clortetraciclina³⁻⁵ (**Figura 2**). Pronto, el descubrimiento de agentes antimicrobianos se disparó y comenzó la denominada “era de oro de los antibióticos” durante las décadas de los 50s y 60s, dando origen a los antimicrobianos más importantes hasta la fecha: la cefalosporina C, la eritromicina y la vancomicina^{6,7} (**Figura 2**). A partir de entonces, los PN han tenido una participación prominente como fuente de nuevos compuestos con diversas actividades que han llegado a la clínica. Solo hace falta mencionar el paclitaxel, la trabectedina y la vinblastina, empleados como agentes anticancerígenos; la caspofungina, la nistatina y la griseofulvina, como antimicóticos; y la actinomicina D, la rifampicina y la neomicina, como antibacterianos.

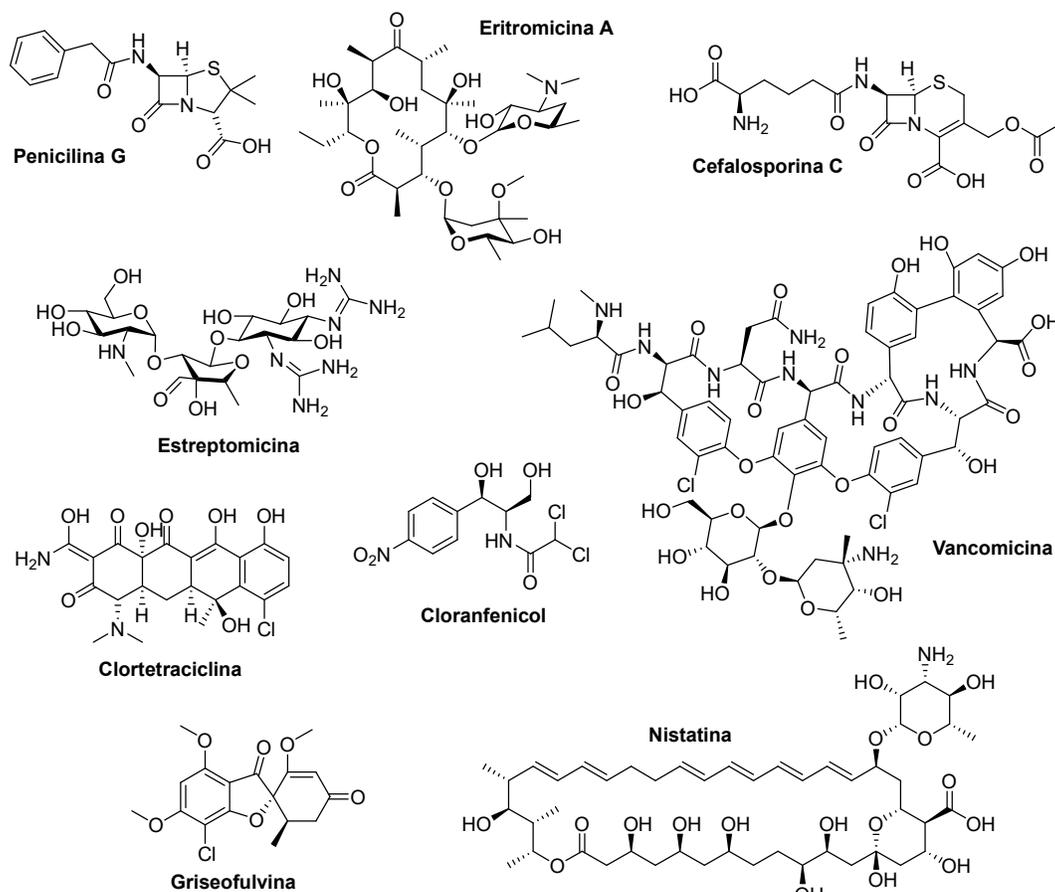


Figura 2. Ejemplos de antimicrobianos de uso clínico obtenidos a partir de microorganismos.

Sin duda, de entre los microorganismos productores de antibióticos, las actinobacterias (o actinomicetos *nom. alt.*) han sido históricamente los más prolíficos (cerca del 70% de todos los antibióticos conocidos hasta la fecha han sido aislados de este filo; **Figura 3**)⁸. Estas bacterias Gram (+) constituyen uno de los filos más grandes y se encuentran distribuidas en ecosistemas tanto terrestres como acuáticos; son protagonistas en los procesos de descomposición del suelo; algunas viven en íntima relación con otros organismos y tienen un metabolismo secundario muy extenso gracias a su alto contenido de *G+C* en su genoma y a su inmenso potencial biosintético. En consecuencia, estos organismos son de importancia central en biotecnología, medicina y agricultura. Dado que están presentes en prácticamente todos los ecosistemas del mundo, las actinobacterias han adoptado diferentes cualidades. Algunas se perfilan como patógenos (p. ej. *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* y *Tropheryderma*), como organismos edáficos (p. ej. *Micronomospora* y *Streptomyces*), y comensales de plantas (p. ej. *Frankia*) y del tracto gastrointestinal (p. ej. *Bifidobacterium*)⁹. Además de los antibióticos que producen, las actinobacterias han dado origen a fungicidas (p. ej. kasugamicina y polioxinas)^{10,11} insecticidas y antiparasitarios (p. ej. ivermectina y avermectina)¹², herbicidas (p. ej. mildiomicina y validamicina A)¹³ y a compuestos de una enorme diversidad estructural, como macrólidos, α -pironas, lactonas, indoles, terpenos, quinonas, y hasta compuestos de estructura única como la resistomicina¹⁴.

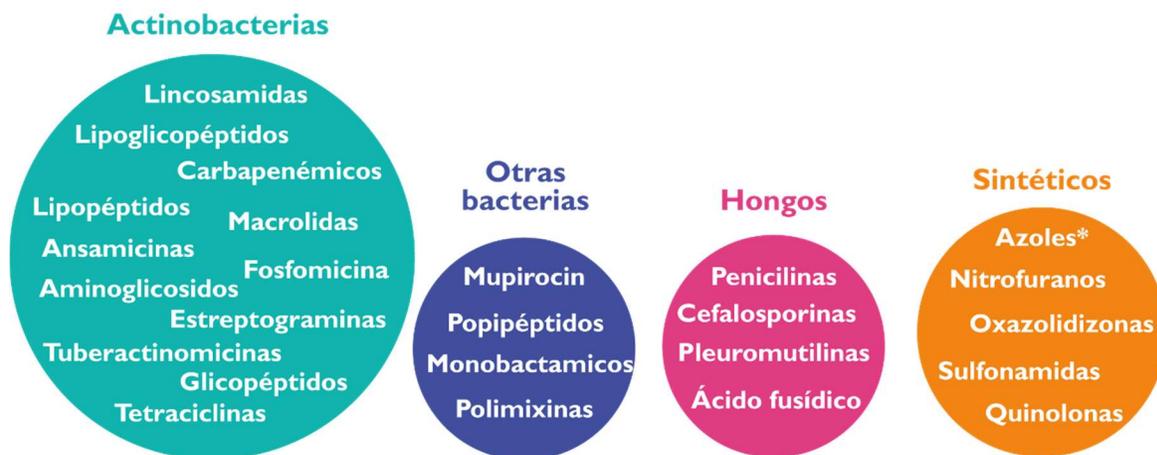


Figura 3. Clases de antibióticos más relevantes clínicamente provenientes de PN. Adaptado de Hutchings, Truman y Wilkinson⁸ *Inspirados en PN

1.2. Ecosistemas marinos inexplorados como fuentes potenciales de nuevos compuestos procedentes de actinobacterias

En años recientes y a pesar del desarrollo de técnicas novedosas para el descubrimiento de nuevos fármacos como la química combinatoria, los análisis *in silico* y la biología sintética, la atención sobre los estudios de bioprospección de actinobacterias no ha disminuido. En este sentido, dichos estudios se han centrado en la diversificación de estrategias para su mejor aprovechamiento, ya que se considera que los actinomicetos terrestres han sido exhaustivamente estudiados y se ha encontrado cierta redundancia en el redescubrimiento de sus metabolitos⁹. Así, gracias a los avances en las ciencias genómicas, a la fecha se han secuenciado miles de genomas de actinobacterias y se ha demostrado que este género tiene la capacidad de producir una multitud de PN no observados hasta ahora en laboratorio¹⁵. En este contexto, algunas de las estrategias para explorar este potencial son la manipulación fisiológica o genética y el aislamiento de especies nuevas de sitios inexplorados o con condiciones ambientales consideradas como extremas. Esta última propuesta es una de las más contempladas para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos utilizando sistemas tradicionales de bioprospección, ya que se infiere que las fuentes poco exploradas son nichos ecológicos intrincados con interacciones complejas que pueden estimular a los organismos a producir metabolitos con alta especialización¹⁶.

En ese sentido, en la última década se ha evidenciado un progreso muy significativo en la investigación de microorganismos marinos, incluidas las actinobacterias¹⁷⁻²³. La variedad estructural de sustancias activas impulsadas por la heterogeneidad de condiciones son el factor más relevante que ha atraído la atención de la comunidad científica a estos organismos. Las actinobacterias de origen marino se encuentran distribuidas a través de todo el océano, pero son frecuentemente halladas en las zonas intermareales, estuarios, sedimentos marinos (profundos o someros), arrecifes, playas, cavernas submarinas (cenotes) y cayos o en asociación simbiótica con animales marinos como peces, moluscos, esponjas, algas marinas o plantas de manglar^{24,25}. Estos microorganismos son integrantes activos de las comunidades microbianas marinas y forman ecosistemas estables y persistentes. Además, tienen un rol profundo en el medio ambiente ya que participan en la degradación y reciclaje de varios materiales y nutrientes de forma continua. Se ha reportado que los actinomicetos contribuyen a la degradación y al reciclaje de compuestos orgánicos, en la mineralización de materia orgánica, en la inmovilización de nutrientes minerales, la fijación de nitrógeno, en la mejora de los parámetros físicos y protección medioambiental²⁶.

En los últimos 20 años, se han reportado una gran cantidad de actinobacterias aisladas de sedimentos del fondo marino, en donde las condiciones ambientales extremas (alta presión, baja temperatura, escasa iluminación y concentraciones variables de salinidad y oxigenación) pueden favorecer la biosíntesis de metabolitos únicos. Algunos de los géneros encontrados en éstas fuentes naturales son *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinispora*, *Aeromicrobium*, *Salinibacterium*, *Verrucosispora*²⁴, etc. Asimismo, se han encontrado una gran variedad de taxones asociados a organismos marinos, como las esponjas y los corales, entre los que se encuentran los géneros *Micronomospora*, *Rubrobacter*, *Nocardiopsis* y *Streptomyces*^{27,28}. Finalmente, la exploración de especies asociadas a manglares también ha visto un aumento considerable, aislándose especies “raras” o “no convencionales” de los géneros *Actinomadura*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Isoptericola*, *Kytococcus*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Nesterenkonia*, *Micronomospora*, *Rothia*, *Jishengella*, etc.²⁹ Todas estas exploraciones han dado exitosos resultados, y ponen en evidencia el enorme potencial que representan las bacterias aisladas de ambientes marinos poco explorados y ecosistemas acuáticos complejos. No obstante, otros ecosistemas acuáticos quedan pendientes por explorar, como los estuarios, los cayos o los cenotes.

1.3. La península de Yucatán

La península de Yucatán es una de las dos penínsulas de México. Se encuentra en la parte septentrional de Mesoamérica y comprende los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche, además del país Belice y la parte norte de Guatemala. Cuenta con una extensión de 145,000 km² y alberga uno de los nichos ecológicos más diversos del mundo. En términos de geología, la mayoría del territorio está formado de tierra caliza dura. El terreno no presenta ninguna elevación importante y, por consecuencia, la zona carece de ríos, por lo que el agua al volver al mar rompe las brechas del subsuelo y forma cavidades subterráneas muy extensas. La actual geomorfología e hidrología de la zona es resultado de eventos violentos acaecidos cerca de la era Cretácea, principalmente por el impacto de un aerolito de cerca de 10 km de diámetro que formó el cráter *Chicxulub*. El resultado de este colosal impacto creó las condiciones para la formación de la placa kárstica y el anillo de cenotes en la parte norte de la región³⁰.

Debido a la ubicación geográfica de la península; entre el Mar Caribe y el Golfo de México; las características orográficas de la región, y los patrones climatológicos del Océano Atlántico norte y el Pacífico sur (huracanes, tormentas tropicales, El Niño y La Niña,

etc.), el clima de la región es extensamente heterogéneo. La costa norte y la zona este son las zonas más húmedas durante todo el año. Por otra parte, la temperatura media anual de la región ronda los 26 °C y alcanzan su máximo promedio de 36 °C en los meses de agosto y septiembre. Gracias a las características climatológicas, geográficas, geológicas, hidrológicas, pedológicas y químicas antes descritas, la Península de Yucatán es una región que genera un ecosistema con una biodiversidad colosal. Prueba de esto es que se han identificado 72 especies de árboles y 203 taxones de plantas endémicos y cerca de 2,000 especies de animales³¹.

En el centro de atención de estos ecosistemas tan variados de la Península de Yucatán se erige la red de ecosistemas subterráneos únicos en el mundo los Cenotes (del maya *ts'onot*; «caverna con agua»). Estas estructuras geológicas se forman por la disolución de la roca carbonada de la plataforma kárstica de la Península. Su morfología es muy variada, mientras unos permanecen cerrados, en otros, la cúpula superior de la cámara subterránea colapsa dejando al descubierto una porción de la intrincada red de agua fluvial del subsuelo. En algunos cenotes, particularmente en aquellos cercanos al mar, debajo del agua dulce se encuentra una capa de agua salada, en donde se manifiesta la estratificación meromíctica de las aguas³². En estas zonas en particular, donde el agua de mar se infiltra en el acuífero, se crea un hábitat para densos bosques de manglar³³. Estos dos ecosistemas representan un enorme nicho de diversidad biológica. Estudios de la diversidad microbiológica de ambos ecosistemas por separado han demostrado la inmensa varianza en los géneros de bacterias y hongos diferenciados profundamente por las condiciones medioambientales³⁴. Los géneros bacterianos más abundantes encontrados en los cenotes son las actinobacterias y las proteobacterias^{35,36}. Estas bacterias, junto con las arqueas y algunos hongos, han probado tener relevancia en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre dentro de los acuíferos, causando la disolución acelerada de la calcita e incrementando la alcalinidad del acuífero³⁷. Por su lado, los manglares han presentado una diversidad muy similar albergando filos como diversos ordenes de proteobacterias, bacteroidetes, cianobacterias, plactomicetos, entre otros³⁸. A pesar de esta enorme biodiversidad, los estudios químicos y metabólicos sobre las actinobacterias de la zona han sido muy escasos. Recientemente Fajardo-Hernández *et al.* realizaron el primer estudio de bioprospección sistemático sobre un grupo de hongos y bacterias de los cenotes en el centro de la península³⁹.

En resumen, los ecosistemas acuáticos de la península de Yucatán poseen una biodiversidad muy extensa, no solo en términos de animales y plantas, sino también en la diversidad microbiológica que juega un rol fundamental en las dinámicas ecológicas de la región. Esta biodiversidad representa un gran potencial para la obtención de actinobacterias que produzcan metabolitos novedosos.

1.4. El problema emergente de la resistencia antimicrobiana

El descubrimiento de los antibióticos fue un parteaguas en la historia que revolucionó la medicina para siempre y ha salvado incontables vidas. Desafortunadamente, el uso indiscriminado e inapropiado de los antimicrobianos en el sistema de salud y en la industria ganadera, además de las mutaciones intrínsecas, ha obligado a los microorganismos a desarrollar estrategias de resistencia a estos compuestos en un intento de evolucionar y adaptarse para sobrevivir⁸. Apenas una década después del descubrimiento de la Penicilina ya se había detectado resistencia a este compuesto en cepas de *E. coli*⁴⁰. A partir de entonces, nuevos antibióticos se desarrollaron haciendo modificaciones estructurales a los ya existentes, con el fin de mantener su eficacia contra las enfermedades infecciosas. Debido a esto, el uso y consumo de antibióticos alcanzó un máximo histórico en la década del 2000-2010, generando ganancias de cerca de \$40 mil millones de dólares al año en el mundo y se espera que esta cifra aumente un 36% en años venideros⁴¹. Por otra parte, se ha estimado que en el mundo mueren 1.27 millones de personas al año debido a infecciones relacionadas a patógenos con resistencia antimicrobiana (RAM), una tendencia que se estima pueda alcanzar los 10 millones para el año 2050⁴². Estos datos reflejan la importancia y la magnitud que ha alcanzado el uso y abuso de los antibióticos durante la edad moderna.

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó el primer listado de patógenos de alta importancia con resistencia a múltiples antibióticos. Entre ellos se encuentran *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y *Salmonella* spp.⁴³ Como se mencionó antes, esta problemática no se limita únicamente al uso clínico de los antibióticos, sino que su influencia se extiende a una preocupación ambiental. La falta de disposición correcta de los desechos químicos hospitalarios en donde las concentraciones de antibióticos son especialmente altas, el desecho de medicamentos no usados en vertederos y la filtración de principios activos a través de los efluentes de aguas residuales, significan una oportunidad para los patógenos

oportunistas del ambiente para desarrollar RAM^{41,44}. Debido a la dificultad que representa el control de estos fenómenos, el problema de la RAM es inminente e inevitable y se teme que estos patógenos se conviertan en un problema incontrolable de salud a nivel mundial. Ante este escenario, en los últimos años se ha incentivado y promovido el desarrollo y descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos que ayuden a frenar esta catástrofe venidera⁴³.

La RAM se manifiesta cuando los microorganismos expresan mecanismos para adaptarse a la presencia de fármacos que anteriormente impedían su desarrollo y proliferación. Existen numerosos mecanismos de resistencia y a la fecha se han reconocido 10 de ellos: **(i)** reducción en la absorción del fármaco por los poros de la membrana externa; **(ii)** degradación de los antibióticos mediada por enzimas (β -lactamasas y esterases); **(iii)** modificación de los antibióticos mediante enzimas; **(iv)** degradación y protección mediante peptidasas y proteasas; **(v)** expresión o adaptación de bombas de flujo que expulsan los fármacos del interior de la célula; **(vi)** reducción de la afinidad de las dianas moleculares; **(vii)** modificación de las dianas moleculares; **(viii)** protección de las dianas; **(ix)** protección ribosomal; y **(x)** producción de bio-películas⁴⁵. Hasta el 2017, se habían recabado cerca de 26 mil artículos relacionados al estudio de MRSA, seguido de *K. pneumoniae* con aproximadamente 4,000, los patógenos del filo *Enterobacteriaceae* y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina en tercer puesto, y finalmente de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina⁴³. Lo anterior revela la importancia en la investigación de agentes antimicrobianos novedosos par el control de los patógenos clínicos con RAM.

1.5. Redes moleculares: una herramienta para el estudio de la diversidad química

Las redes moleculares (RM) son un recurso de organización y visualización de los datos obtenidos por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) en tándem (MS/MS), que fue introducida en 2012 con el fin de analizar la producción de metabolitos de diversas colonias microbianas vivas⁴⁶. Desde entonces, los análisis por RM se han usado principalmente para explorar el metabolismo de los microorganismos en diversas condiciones de cultivo, de diversos ecosistemas o de organismos poco estudiados⁴⁷⁻⁴⁹; además para identificar toxinas de forma rápida⁵⁰ o como estrategia para acelerar el descubrimiento de fármacos potenciales⁵¹. Otros trabajos con RM combinan datos de minería genómica para encontrar los posibles clústeres de genes biosintéticos (BGC por sus siglas en ingles) de los metabolitos, y así explorar el potencial de los organismos para

producir metabolitos secundarios novedosos⁵². Sin embargo, esta técnica no logra predecir si los metabolitos serán producidos o no en cada condición. Las RM tienen la ventaja de ser como una fotografía instantánea de todos los metabolitos producidos por un organismo bajo cierta condición, lo que permite identificar y correlacionar las variables macroscópicas con la expresión de un metabolito⁵¹.

El fundamento de las RM es el apareamiento y alineamiento de los espectros de masas y los de fragmentación de los iones, seguido de su comparación masiva con aquellos contenidos en bases de datos y su análisis de similitud por coeficiente cosenoidal. En principio se espera que dos moléculas estructuralmente relacionadas compartan patrones de fragmentación cuando se someten a los métodos de fragmentación MS/MS. Con ayuda del coeficiente de similitud se pueden construir redes que agrupen espectros similares, representados por nodos, unidos a sus semejantes a través de vértices (o *edges*) y que, últimamente “condensan” en clústeres de espectros con características afines⁵³.

La *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) es una plataforma en línea que permite la comparación de datos espectrométricos experimentales contra aquellos contenidos en bases de datos públicas. Su objetivo es crear una plataforma de intercambio de información que apoye a la interpretación de los datos obtenidos por HRMS-MS/MS y la identificación de metabolitos previamente aislados (metabolómica dirigida) entre los grupos de investigación de PN. Además, permite generar RM con separación de datos en grupos por variable categórica nominal, hacer minería de los datos en busca de patrones de pérdidas neutras y picos diagnósticos (MS2LDA), anotar posibles metabolitos desconocidos usando algoritmos de derreplicación *in silico* (*Dereplicator+*) y clasificar los metabolitos encontrados en familias químicas (*ClassyFire* en *MolNetEnhancer*). Estas herramientas permiten describir, interpretar y explicar con mayor detalle los datos obtenidos y explorar la diversidad y el espacio químico de los metabolitos de diversos organismos. Hasta la fecha, el GNPS cuenta con 44 bibliotecas espectrales disponibles, entre las que se encuentran MassBank, Metlin, mzCloud, ReSpect, NIH y librerías de la FDA, de Sigma, NIST14, propias de metabolitos, de lípidos, entre otras, y con casi 10 mil usuarios quienes comparten sus descubrimientos con la comunidad, creando una red de cooperación científica. En resumen, es una herramienta muy versátil para los análisis metabolómicos de microorganismos y otras fuentes naturales⁵⁴.

Cabe señalar que las RM tienen ciertas limitaciones. En primer lugar, están las variables experimentales que impactan en la reproducibilidad de los estudios metabolómicos por RM,

tales como la eficiencia en los procesos de extracción de los metabolitos secundarios, la variabilidad en la ionización de los metabolitos, la pobre resolución de picos cromatográficos, la posible degradación de metabolitos y la generación de artefactos durante el proceso de extracción o de análisis. En segundo lugar, se encuentran las limitaciones referentes al procesamiento de los datos. Por ejemplo, se sabe *de facto* que las RM solo arrojan información cualitativa, ya que solo los espectros de MS² son usados durante el procesamiento de datos. Por otra parte, para lograr una mejor alineación entre los espectros de MS¹ y MS², se requieren de otros programas para el procesamiento de datos los cuales también tienen limitaciones y retos. En tercer lugar, están las limitaciones referentes a bibliotecas. Los datos disponibles en las bibliotecas del GNPS difieren entre sí en términos de intensidad de señal de los fragmentos y en condiciones experimentales, así como en el tipo de analizadores de masas y detectores. Esto hace que se puedan anotar muchos metabolitos de forma “probable” ya que no han sido confirmados con estándares químicos, por lo que estas comparaciones deben ser consideradas con atención y reserva. Es recomendable realizar comparaciones más profundas para verificar la identidad de los metabolitos. Finalmente, hasta el año 2018, solo del 5% al 6% de los metabolitos detectados por RM logran ser anotados automáticamente, esto significa que una enorme cantidad de datos son totalmente desconocidos, por lo que se les ha denominado la “materia oscura” de la metabolómica. Para sobrellevar esta limitación se han desarrollado herramientas computacionales que permiten describir, categorizar y dar más definición a los datos “oscuros”. Tal es el caso de MetFrag, MetFusion, SIRIUS, Network-Annotation-Propagation (NAP), Derreplicator, y herramientas de minería de datos como el MS2LDA y clasificadores de metadatos como el MolNetEnhancer⁵³.

2. HIPÓTESIS

El estudio químico de actinobacterias obtenidas de distintas fuentes naturales de la península de Yucatán, y seleccionadas con base en los estudios biológicos y de metabolómica preliminares, permitirá el descubrimiento de metabolitos secundarios con una diversidad química estructural inusual y con posible aplicación en la terapéutica como agentes antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto de investigación consiste en descubrir nuevos productos naturales biodinámicos a partir de actinobacterias de la Ciénaga de Sisal, Yucatán. Para el cumplimiento de éste, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Acondicionar y cultivar de una serie de actinobacterias obtenidas de muestras de sedimentos de distintas locaciones de la Península de Yucatán, en distintos medios de crecimiento y obtener sus correspondientes extractos orgánicos.
2. Realizar los estudios biológicos de los extractos obtenidos y seleccionar a las especies idóneas para la obtención de moléculas bioactivas.
3. Cultivar en mediana escala a las especies seleccionadas, obtener los extractos orgánicos y realizar el fraccionamiento, la separación y la purificación de los metabolitos secundarios de interés mediante técnicas de cromatográficas de vanguardia.
4. Evaluar el efecto anti-biopelícula de los compuestos puros obtenidos contra cepas de *MRSA*.

En conjunto, los resultados de esta investigación permitirán la identificación de especies bacterianas de utilidad para el desarrollo sustentable de procesos biotecnológicos encaminados a la obtención de compuestos con posible utilidad terapéutica, además de contribuir a la generación de un banco de germoplasma y de moléculas prototipo aisladas a partir de estas nuevas fuentes naturales.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Aislamiento de microorganismos

Las cepas bacterianas empleadas en esta investigación fueron proporcionadas por la Dra. Alejandra Prieto Davó, investigadora de la Unidad de Química-Sisal, FQ, UNAM. Las cepas provienen de sedimentos marinos de cuatro locaciones en la Península de Yucatán: 1) el Cenote Noh-Mozón ($20^{\circ}37'24.40''$ N, $89^{\circ}23'2.44''$ W), 2) el cenote Tzá-Itza ($20^{\circ}43'50.27''$ N, $89^{\circ}27'56.82''$ W), ambos el interior de la Reserva Estatal Geohidrológica “Anillo de Cenotes” (REGAC) en el estado de Yucatán, 3) el manglar de la Reserva Ecológica Estatal “El Palmar” ($21^{\circ}07'16.5''$ N, $90^{\circ}04'28.09''$ W) y 4) el cenote Xcalak en “Bajo cayo de Judas” ($18^{\circ}12'10.7''$ N, $87^{\circ}53'09.9''$ W), en el este del estado de Yucatán (**Figura 4**). Con el objetivo de explorar una diversidad amplia de organismos, se eligieron 9 cepas de distinto sitio de colecta (**Tabla 1**). Los organismos se transfirieron en condiciones de esterilidad a cajas Petri con medio sólido A1 adicionado con agua marina artificial y se mantuvieron en incubación a 37°C durante 48 h hasta observar el crecimiento de colonias.



Figura 4. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de las cepas de estudio.

Tabla 1. Origen de las cepas de estudio.

Código interno	Origen	Zona
NCA-119	Manglar Sisal	Exterior
NCA-145	Manglar Sisal	Canal
NCA-265	Tza-Itzá	Cueva, 19 m
NCA-284	Tza-Itzá	Caverna, 15 m
NCA-291	Noh-Mozón	Caverna, 16 m
NCA-305	Noh-Mozón	Cueva, 36 m
NCA-315	Tza-Itzá	Espejo, 3.4 m
NCA-454 (BE)	Xcalak	Esponjas
NCA-455 (19E)	Xcalak	Esponjas

4.2. Caracterización taxonómica de los organismos de estudio

La caracterización taxonómica de los organismos se efectuó mediante la secuenciación de la región 16S ARNr. La extracción del ADN se realizó a partir de cultivos axénicos en medio líquido A1 adicionado con sales marinas y sin almidón a temperatura ambiente con fotoperiodos luz/oscuridad 12/12 h. Después de 3 días de crecimiento, la biomasa se separó por centrifugación y el ADN se extrajo empleando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, Orange, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones de fabricante. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL empleando el kit PureTaq™ Ready-to-go™ (General Electric, Fairfield, CT, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando los iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') y 1472R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') a 2 µM y al menos 2 ng/µL de ADN genómico. La amplificación se llevó cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) de acuerdo con el siguiente programa: 95°C por 5 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos (95°C por 40 s, 60°C por 40 s, 72°C por 90 s) y 72°C por 10 min para el paso de elongación final. Los amplicones se secuenciaron usando el iniciador 357F (5'-CTC CTACGGGAGGCAGCAG-3') en la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los electroferogramas obtenidos se leyeron con ayuda del software FinchTV (versión 1.4.0) y las secuencias se usaron para realizar un análisis comparativo de la homología empleando la herramienta BLAST de la página de internet del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), la cual compara las secuencias con aquellas descritas en la base de datos GenBank.

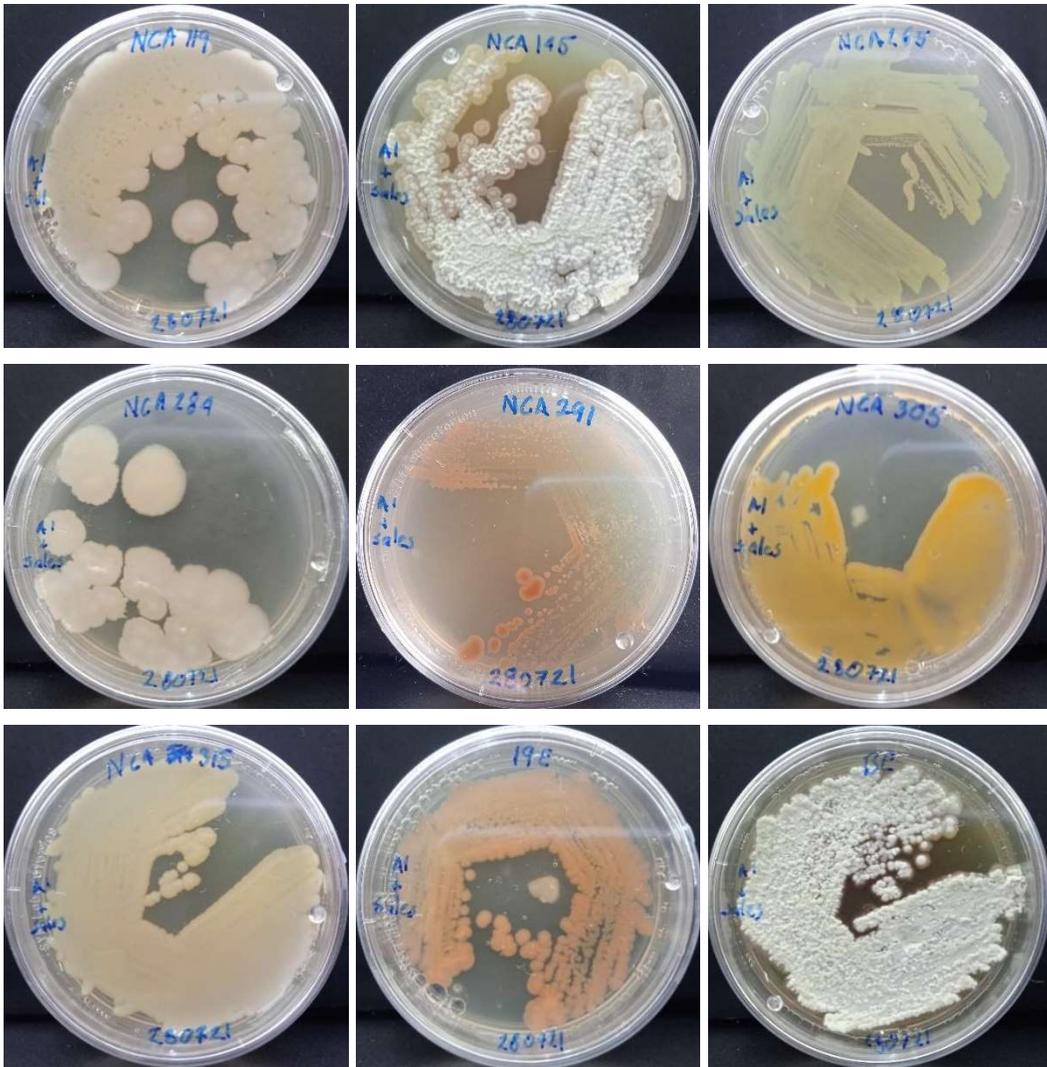


Figura 5. Morfología general de las cepas objeto de estudio.

4.3. Cultivo y preparación de extractos orgánicos

Las cepas se cultivaron en dos medios líquidos distintos: Medio DSC-ASW (5 g almidón, 10 g glucosa, 5 g peptona, 5 g extracto de levadura, 32 g de sal marina artificial en 1L de agua) y medio ISP2 (4 g extracto de levadura, 4 g dextrosa y 10 g extracto de malta). Cada cultivo (500 mL de cada medio) se inoculó agregando un fragmento del cultivo bacteriano en agar sólido y los matraces se dejaron en agitación a 120 rpm durante 10 días a temperatura ambiente y ciclos de luz-oscuridad 12/12 h.

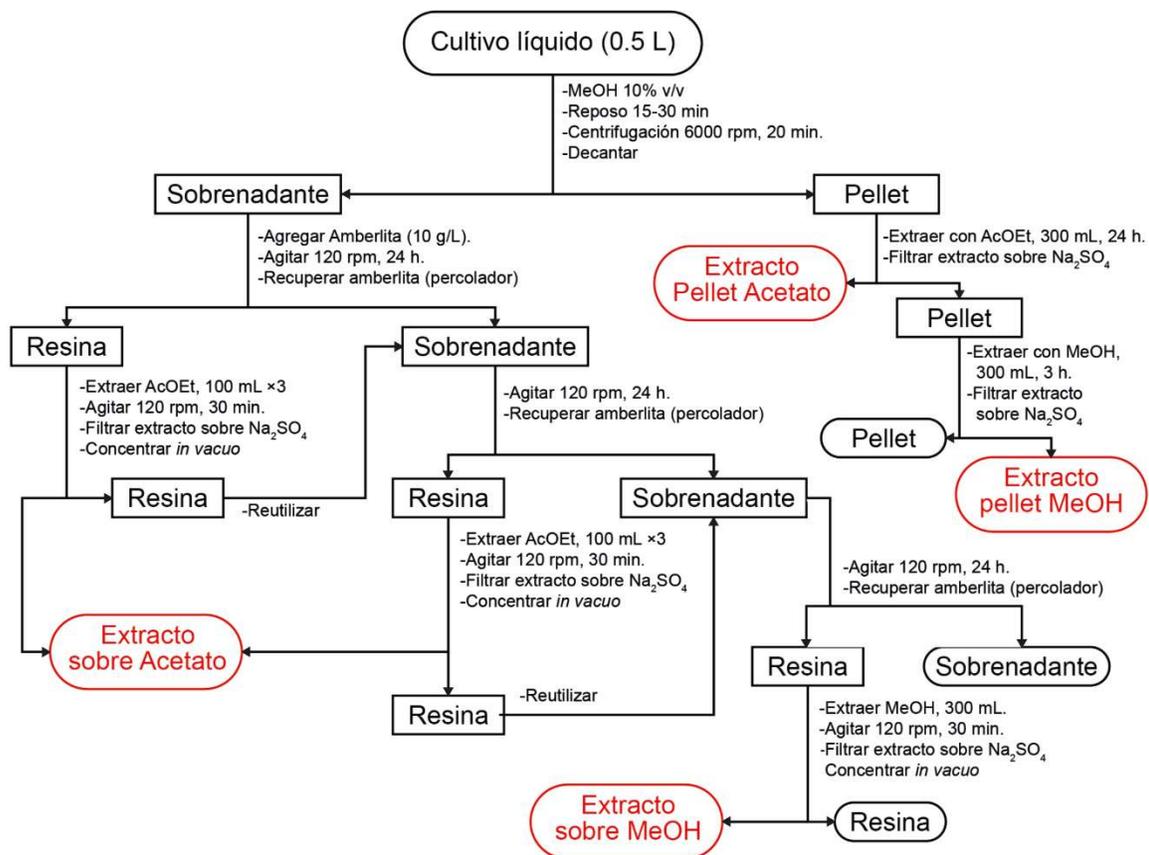


Figura 6. Procedimiento general para la obtención de los extractos bacterianos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se detuvo la actividad metabólica de los cultivos adicionando 50 mL de MeOH, posteriormente se centrifugaron a 6,000 rpm durante 20 minutos y se recolectó la biomasa (o Pellet) y el sobrenadante por separado. La biomasa se sometió directamente a un proceso de extracción exhaustiva con AcOEt y subsecuentemente con MeOH. En el caso del sobrenadante se empleó la resina Amberlita XAD7HP para capturar los metabolitos del medio líquido y esta resina se eluyó de manera homologa a la biomasa. Esta metodología se repitió varias veces con el fin de incrementar el rendimiento de los extractos. Los detalles de la estrategia de extracción se resumen en la **Figura 6**. De esta manera se logró la obtención de 60 extractos de las 9 cepas de estudio en pequeña escala con un rendimiento variable entre 10 mg y 800 mg. Las cepas NCA-291, NCA-454 y NCA-455 crecieron exclusivamente en medio con almidón y sales marinas, por lo que solo se obtuvieron cuatro extractos de cada una de ellas. La misma metodología de extracción se empleó para la obtención de extractos de mediana escala (20×) de organismos selectos, cuyos rendimientos se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Rendimientos de pequeña y mediana escala de los extractos de organismos selectos

Cepa	Medio de cultivo	Sustrato	Disolvente	Clave	Rendimiento 1× (mg)	Rendimiento 20× (mg)
NCA-315	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt	G ₁	28.7	564.5
			MeOH	G ₂	121.9	3,879.0
		Pellet	AcOEt	G ₃	18.0	215.3
			MeOH	G ₄	54.2	5,090.1
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt	G ₅	32.0	387.3
			MeOH	G ₆	89.9	1,553.1
		Pellet	AcOEt	G ₇	10.5	45.2
			MeOH	G ₈	600.8	725.3
NCA-145	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt	S ₁	23.8	544.6
			MeOH	S ₂	65.2	3,339.1
		Pellet	AcOEt	S ₃	16.1	128.1
			MeOH	S ₄	600.0	5,973.5
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt	S ₅	33.5	382.9
			MeOH	S ₆	62.7	1,395.3
		Pellet	AcOEt	S ₇	17.5	250.4
			MeOH	S ₈	416.0	2,293.9
NCA-454	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt	Nc ₁	40.4	297.6
			MeOH	Nc ₂	303.8	3,510.1
		Pellet	AcOEt	Nc ₃	11.2	53.3
			MeOH	Nc ₄	951.3	3,172.7

4.4. Procedimientos cromatográficos generales

Los extractos bacterianos se sometieron a un fraccionamiento primario por cromatografía tipo flash (CF) o mediante extracción en fase sólida (SPE) usando como criterio la solubilidad del extracto en los disolventes disponibles. Para el fraccionamiento secundario y purificación se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC), Cromatografía por Columna Abierta (CCA) o cromatografía de placa delgada (TLC).

Los extractos solubles en disolventes como MeOH o dioxano_s (o mezcla de éstos) se separaron mediante CF de fase reversa en una columna C₁₈, empleando mezclas ternarias de H₂O-MeOH-acetona en polaridad decreciente en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen System equipado con detector de arreglo de diodos (PDA; barrido de 190-500 nm) y detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Por otro lado, los extractos que requerían la presencia de agua para lograr la solubilización completa se separaron mediante SPE, en cartuchos de C₁₈ de 500 mg/4 mL, Alltech Extract-Clean y con volúmenes

de elución de 4 volúmenes de columna (CV), o mediante CF C₁₈ de inyección directa, empleando la misma mezcla en todos los casos.

Para la HPLC de tipo analítica y preparativa se utilizaron como fases estacionarias columnas Gemini C₁₈ (5µm, 110 Å, 250 × 4.6 mm y 5 µm, 110 Å, 250 × 21.2 mm, Phenomenex) mientras que la fase móvil consistió en mezclas binarias de MeCN con H₂O acidulada con H₂CO₂ al 0.1% empleando diferentes gradientes de elución a medida. El flujo de la fase móvil se estableció 1 mL/min a nivel analítico y 21.24 mL/min a nivel preparativo. El instrumento fue marca Waters conformado por una bomba cuaternaria modelo 2535, un inyector automático modelo 2707, y los detectores PDA modelo 2998 y ELSD modelo 2424. La adquisición y manejo de datos se realizó con el software Empower 3, proporcionado por la misma marca.

Para la CCA se utilizó como fase estacionaria gel de sílice desactivado al 10% w/w y gradientes decrecientes de hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH creados a medida. Mientras que para la separación por TLC se utilizaron placas de vidrio de 20x20 cm (F₂₅₄, 210 - 270 µm, 60 Å, 1.4 µm, Supelco) y diversas mezclas de disolventes de hexano-CHCl₃-acetona.

4.5. Caracterización estructural

La caracterización estructural de los productos obtenidos se realizó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) mono- y bidimensionales (1D y 2D) se registraron en los equipos de 600, 500 y 400 MHz (JEOL ECS-600, Varian VNMRS-400 o Bruker Avance III). Los datos de espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS-MS/MS) se obtuvieron en el equipo *Q-Exactive* Plus (modos positivo y negativo) mientras que los de baja resolución se obtuvieron en un equipo Waters SQD2 (modos positivo y negativo), todos equipados con una fuente de ionización por *Electrospray* (ESI) y acoplados a un sistema de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia Acquity UPLC system (Waters). En todos los sistemas cromatográficos se utilizó una columna BEH C₁₈ (1.7 µm, 130 Å, 50 × 2.1 mm), empleando una mezcla binaria constituida por MeCN (A) y agua con H₂CO₂ (0.1%; B), en un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% A hasta 100% A en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min, utilizando un flujo de 0.3 mL/min.

4.6. Evaluación biológica

4.6.1. Ensayo antimicrobiano

Los extractos, las fracciones y los compuestos puros obtenidos se evaluaron en un ensayo *in vitro* de potencial antimicrobiano empleando el método de microdilución en placas de 96 pozos contra bacterias Gram(+) y Gram(-) pertenecientes al grupo ESKAPE: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina, MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 y *A. baumannii* cepa 564 (resistente a antibióticos). Para este fin las bacterias se cultivaron en medio Müller Hinton o medio LB (en el caso de *A. baumannii*), a 37°C durante 24 h anteriores a cada evaluación. Se realizó una suspensión del cultivo en agua destilada estéril ajustando la turbidez con ayuda de una referencia de 0.5 en la escala de McFarland. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los controles positivos se realizó mediante diluciones seriadas de los antibióticos vancomicina (para *E. faecallis* y MRSA), ampicilina (para MSSA) y gentamicina (para las bacterias Gram(-)). Cada pozo de la curva contenía 50 µL del antibiótico respectivo a la concentración calculada, 100 µL de medio de cultivo y 100 µL de suspensión del microorganismo a evaluar. Las evaluaciones de cada extracto y fracción se realizaron por duplicado a 200 mg/mL y 20 mg/mL, a partir de un *stock* disuelto en DMSO a 10 mg/mL. Adicionalmente, se realizaron los controles de crecimiento, de esterilidad y de DMSO al 2%. Este último para coincidir con la concentración máxima de DMSO en pozo de cada evaluación. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h antes de su revelación con 10 µL de solución a 5mg/mL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en metanol. Posteriormente, la placa se incubó 30 minutos más a 37°C para llevar a término la reacción del agente revelador y se leyó la absorbancia a las longitudes de onda de 490 nm y 608 nm en un espectrofotómetro BioRad® modelo iMark (Hercules, CA, EE. UU.) con ayuda del software Microplate Manager® 6 (versión 6.3, BioRad®, Hercules, CA, EE. UU.). El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó empleando la siguiente fórmula:

$$\%inhibición = 100 - \left[\left(\frac{\lambda_{n\text{muestra}} - \lambda_{n\text{bco esterilidad}}}{\lambda_{n\text{control crecimiento}} - \lambda_{n\text{bco esterilidad}}} \right) \cdot 100 \right] \dots\dots\dots (1)$$

Para ambos casos, extractos y fracciones, el resultado del cálculo se utilizó para catalogar los extractos en una escala discreta cualitativa de actividad: Total (% Inhibición > 80%), Parcial (% Inhibición entre 80% y 50%) y Nula (% Inhibición < 50%). De esta manera

se eligieron los organismos potenciales para el cultivo en mediana escala y posteriormente como criterio de selección para el fraccionamiento y purificación de fracciones activas.

4.6.2. Evaluación de actividad anti-biopelículas en MRSA

La inhibición de la formación de las biopelículas de MRSA se realizó de acuerdo con García-Lara *et al.*⁵⁵ con ligeras modificaciones. En resumen, la cepa usada fue la MRSA ATCC 43300, que se encontraba conservada en glicerol al 50% v/v a -70°C. La cepa fue sembrada en medio agar manitol salado por estría cruzada e incubada a 37°C durante 24 h. A continuación, a partir de colonias individuales, se inocularon precultivos en 5 mL de medio líquido LB a 37°C y 200 rpm 24 h antes del ensayo. Una vez concluida la incubación, el crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de una dilución 1:10 v/v del pre-cultivo en agua destilada estéril. Luego, el ensayo de formación de las biopelículas se llevó a cabo en microplacas de 48 pozos bajo un ambiente de esterilidad. En un volumen final de 1,000 µL de medio LB se sembró la cepa MRSA a una DO₆₀₀ inicial de 0.05. En seguida, se agregaron los compuestos de interés a 16 y 64 µg/mL y los cultivos se mantuvieron en incubación por 24 h a 37°C. Se utilizó DMSO como vehículo para la disolución de los compuestos y diclofenaco sódico a 60 µg/mL como control positivo⁵⁶.

Transcurrido el tiempo de incubación, se leyó la DO₆₀₀ de cada pozo con el fin de medir el crecimiento bacteriano planctónico. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y los pozos fueron lavados con 1 mL de agua destilada y después, las biopelículas fueron estabilizadas con 1 mL de MeOH absoluto por 20 min en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, el MeOH se desechó y las biopelículas se dejaron secar para luego ser teñidas con 1 mL solución de cristal violeta al 1% w/w en agua, dejando en incubación por 40 min. Se eliminó el colorante y los pozos se lavaron con agua destilada. El colorante fijo en las biopelículas fue eluido con 1 mL de etanol absoluto, incubando la placa durante 20 minutos a 37°C, y posteriormente se midió la absorbancia de una alícuota 1:10 en agua, a 630 nm en un lector de microplaca. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

4.7. Fraccionamientos primarios y de los extractos de *Glutamicibacter* sp.

El extracto orgánico G₁ de *Glutamicibacter* sp. (Clave NCA-315, 564.5 mg) se sometió a un fraccionamiento primario empleando CF de fase reversa. Como fase estacionaria se utilizó una columna C₁₈ de 50 g, empleando un gradiente continuo de polaridad decreciente de H₂O-MeOH-acetona. Se recolectaron fracciones de 15 mL, que, reunidas en función de las señales cromatográficas (**Figura 7**), resultaron en 20 fracciones (**Tabla 3**).

Tabla 3. Fraccionamiento primario del extracto G₁ de *Glutamicibacter* sp. (NCA-315)

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-2	F ₁	0.3	20-24	F ₁₁	92.1
3-4	F ₂	22.7	25-26	F ₁₂	23.1
5-6	F ₃	14.3	27-30	F ₁₃	33.3
7-9	F ₄	33.9	31-33	F ₁₄	16.5
10	F ₅	8.8	34-42	F ₁₅	14.3
1-12	F ₆	39.1	43-47	F ₁₆	7.1
13-14	F ₇	33.9	48-62	F ₁₇	38.6
15-16	F ₈	28.8	63-68	F ₁₈	8.3
17-18	F ₉	15.9	69-97	F ₁₉	12.6
19	F ₁₀	8.4	98-End	F ₂₀	3.7
Peso inicial					493.1
Total recuperado					455.7
%Recuperado					92.42%

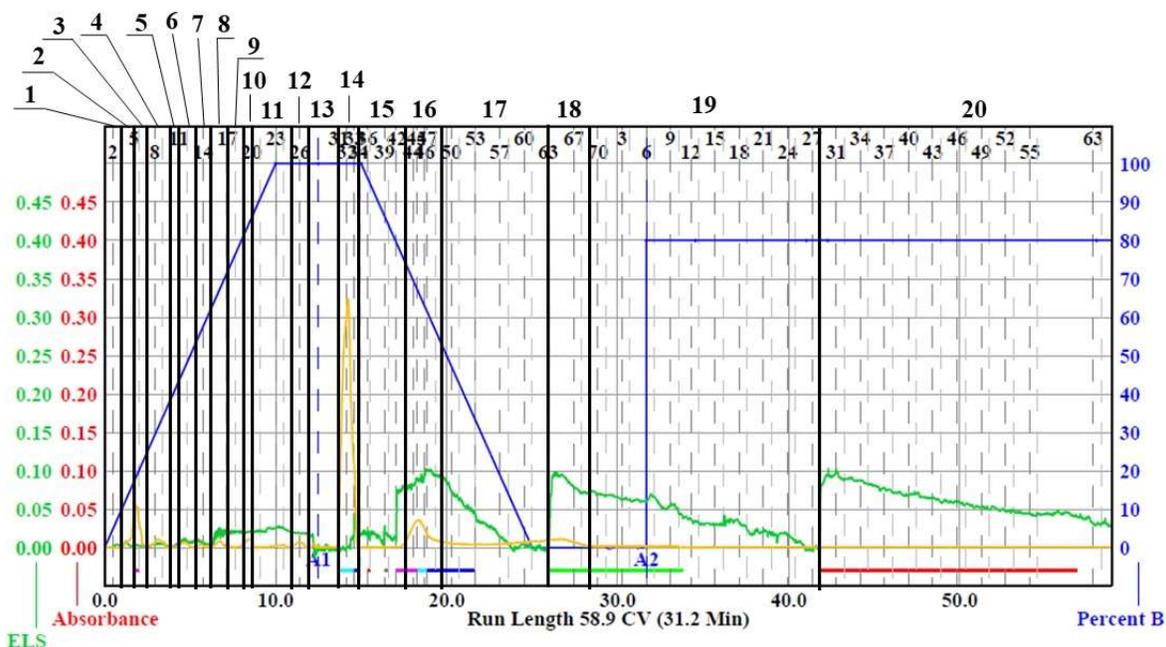


Figura 7. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto G₁ de *Glutamicibacter* sp. (NCA-315). En amarillo el máximo de la señal de PDA y en verde la señal del detector ELSD.

4.7.1. Purificación de los metabolitos 1-4

La fracción F₁₂ (23.1 mg) se purificó por HPLC preparativo empleando un sistema de elución en gradiente modelado por una curva abierta rectificable del tipo 9 (radio de curvatura ≈ 0.5), que va desde una proporción en volumen 50:50 hasta 100:0 de MeCN–H₂O acidulada con H₂CO₂ (0.1% v/v) en 15 min (**Figura 8**). Debido a la carencia de señales en el detector de PDA, la purificación se concretó analizando el contenido de cada tubo mediante UPLC-LRMS y reuniendo los tubos con perfiles de espectros de masas idénticos. De esta manera se logró obtener el producto 1 (0.7 mg, $t_R = 7.50$ min).

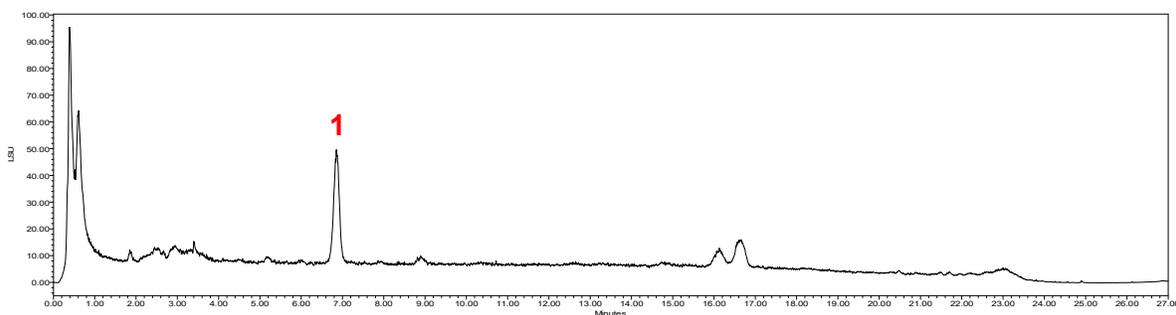


Figura 8. Cromatograma analítico de la separación por HPLC de la fracción F₁₂ de G₁; ELSD.

En vista del bajo rendimiento del compuesto **1** en la purificación de la F₁₂, se procedió a purificar la F₁₁ (92.1 mg) en condiciones cromatográficas idénticas a las mencionadas antes y de igual forma se usó UPLC-LRMS para la identificación de los compuestos. De esta forma se obtuvo cantidades extra del compuesto **1** (total de 14.1 mg) y se aislaron los compuestos **2–4** (1.9 mg, 1.1 mg y 1.8 mg; t_R = 4.70 min, 9.45 min, 5.50 min; respectivamente)

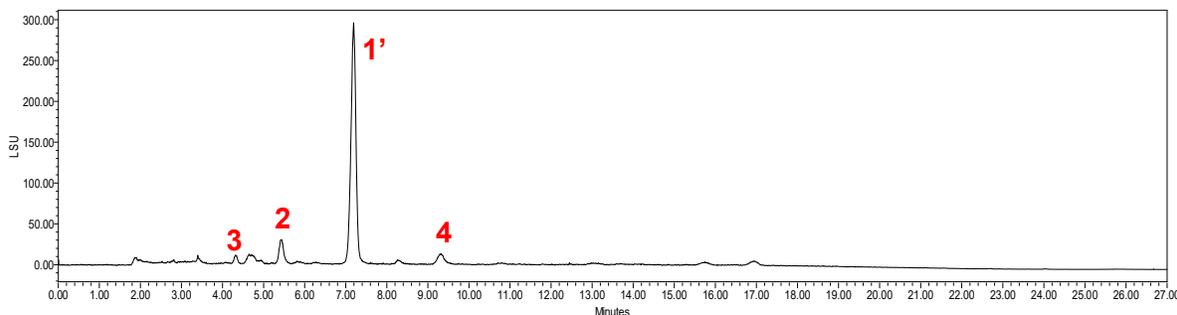


Figura 9. Cromatograma analítico de la separación por HPLC de la fracción F₁₁ de G₁; ELSD.

4.8. Fraccionamiento primario de los extractos de *Streptomyces* sp.

El extracto orgánico S₁ de *Streptomyces* sp. (Clave NCA-145, 544.6 mg) se sometió a un fraccionamiento primario por CF de fase reversa. Como fase estacionaria se utilizó una columna C₁₈ de 50 g, empleando un gradiente continuo de polaridad decreciente de H₂O-MeOH-Acetona. Se recolectaron fracciones de 15 mL, que, reunidas en función de las señales cromatográficas (**Figura 10**), resultaron en 9 fracciones (**Tabla 4**)

Tabla 4. Fraccionamiento primario del extracto S₁ de *Streptomyces* sp.

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-6	F ₁	26.8	19-26	F ₅	119.7
7-10	F ₂	36.2	27-37	F ₆	40.6
11-15	F ₃	75.3	38-48	F ₇	42.0
16-18	F ₄	38.4	49-66	F₈	121.4
			67-76	F ₉	5.1
			Peso inicial		510.0
			Total recuperado		505.5
			%Recuperado		99.12%

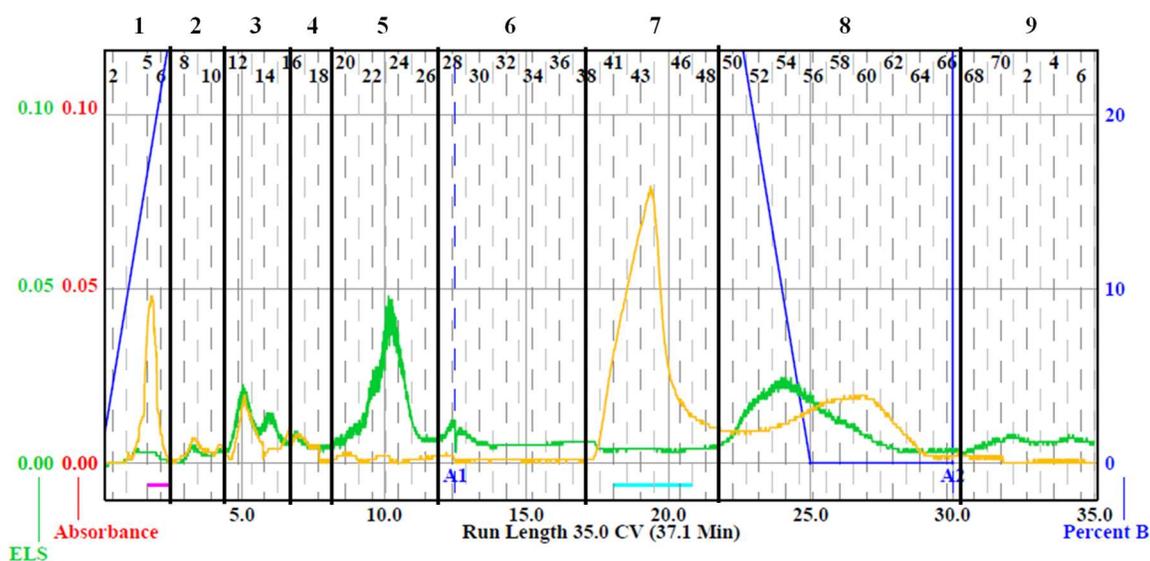


Figura 10. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto S₁ de *Streptomyces* sp. (NCA-145). En amarillo el máximo de la señal de PDA y en verde la señal del detector ELS.

4.8.1. Purificación del metabolito 5

La fracción F₈ (121.4 mg) se intentó purificar a través de HPLC, sin embargo, se observó que el producto no era soluble en MeCN, MeOH ni H₂O, por lo que se procedió a purificarla mediante un fraccionamiento secundario por Cromatografía de Columna Abierta en fase normal. Para esto se montó una columna de vidrio de 1.5 cm de diámetro interno, empacada con 30 g de SiO₂ desactivado al 10% w/w con agua destilada. La fase móvil estuvo compuesta de pasos consecutivos de hexano-CHCl₃-AcOEt-MeOH en pasos de gradiente de 5%. Se comenzó con una mezcla 1:1 v/v de Hx-CHCl₃ y se llevó a 100% de hexano, posteriormente se pasó a 100% de AcOEt y luego a una mezcla AcOEt-MeOH 80:20 v/v como paso de terminación. El volumen de los eluatos se estableció en 15 mL, que se reunieron con base en la similitud cromatográfica de las fracciones, la cual se monitoreó mediante cromatografía analítica en placa fina. De esta manera se obtuvieron 12

subfracciones (**Tabla 5**), de los cuales se encontró la SF₅ como un compuesto puro (**5**), el cual se envió a RMN para su caracterización.

Tabla 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F₈ del extracto S₁ de *Streptomyces* sp.

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-4	SF ₁	19.0	21-27	SF ₇	8.0
5-6	SF ₂	7.0	28-31	SF ₈	11.9
7-8	SF ₃	2.0	32-42	SF ₉	3.5
9-11	SF ₄	1.7	43-45	SF ₁₀	1.1
12-15	SF₅	17.9	46-62	SF ₁₁	15.6
16-20	SF ₆	1.6	63-End	SF ₁₂	31.7
Peso inicial					121.4
Total recuperado					121.0
%Recuperado					99.67%

Por otro lado, las subfracciones SF₁₁ y SF₁₂ se purificaron por separado mediante Cromatografía en placa preparativa y se obtuvieron cantidades extra del compuesto **5**.

4.9. Fraccionamiento primario de los extractos de *Nocardiosis* sp.

El extracto orgánico Nc₂ de *Nocardiosis* sp. (Clave NCA-454, 3,510.1 mg) se sometió a un fraccionamiento primario empleando CF de fase reversa con inyección directa. El extracto completo se disolvió en una mezcla 1:2:2 v/v/v de dioxano-MeOH-H₂O y se inyectó directamente a una columna C₁₈ de 150 g, empleando un gradiente de elución continuo de polaridad decreciente de H₂O-MeOH-acetona. Se recolectaron fracciones de 15 mL, que, reunidas en función de las señales cromatográficas (**Figura 11**), resultaron en 15 fracciones (**Tabla 6**).

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto Nc₂ de *Nocardiosis* sp. (NCA-454).

Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
1-14	F ₁	112.4	59-61	F ₈	29.8
15-19	F ₂	148.1	62-75	F ₉	393.3
20-23	F ₃	61.2	76-81	F ₁₀	145.5
24-29	F ₄	84.4	82-95	F₁₁	412.0
30-42	F ₅	143.9	96-139	F ₁₂	962.9
43-55	F ₆	190.4	140-156	F₁₃	105.8
56-58	F ₇	27.8	157-172	F₁₄	82.4
173-End				F ₁₅	32.6
Peso inicial					3,008.3
Total recuperado					2,932.5
%Recuperado					97.48%

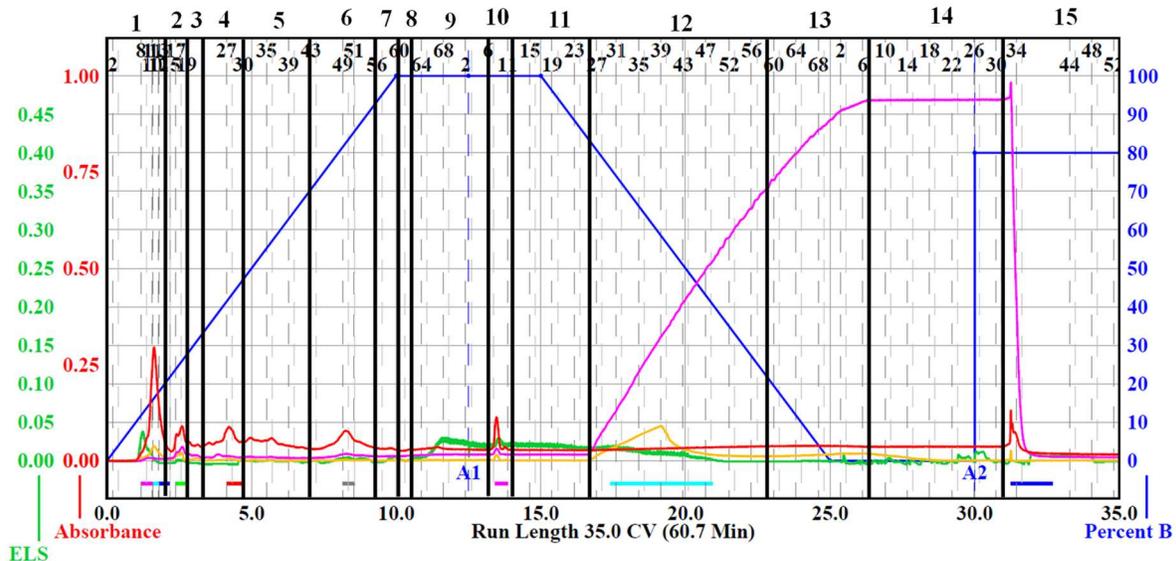


Figura 11. Cromatograma por CF del fraccionamiento primario del extracto Nc₁ de *Nocardiopsis* sp. (NCA-454). En amarillo el máximo de la señal de PDA, en rojo señal de PDA a 254 nm, en magenta la señal a 280 nm y en verde la señal del detector ELSD.

4.9.1. Purificación de los metabolitos 6–7

La fracción F₁₁ (412.0 mg) se obtuvo directamente como un compuesto puro. La pureza se confirmó mediante UPLC-LRMS y se envió directamente a análisis por RMN, resultando en el compuesto **6**.

Por otro lado, la fracción F₁₃ y F₁₄ se purificaron por separado usando el mismo método en CF de fase normal, empleando una columna de 24 g de SiO₂ y un sistema de elución hexano-acetona. El método comenzó en Hx 100% y descendió de forma sostenida hasta una mezcla 1:1 Hx:acetona, durante un periodo de 50 CV. El flujo se estableció a 35mL/min y el volumen máximo de fracción en 15 mL.

La reunión de las fracciones de la separación de la F₁₃ se realizó sirviéndose de las señales cromatográficas, principalmente de la señal de ELSD (**Figura 12**). De esta manera se obtuvieron 7 subfracciones (**Tabla 7**). La SF₁ se identificó como un compuesto puro (**7**) y se envió a elucidación estructural. Mientras, la F₁₄ se separó con el mismo método (**Figura 13**), resultando en 9 subfracciones (**Tabla 7**), y de la misma manera, la SF₁ resultó en cantidades extra del compuesto **7**.

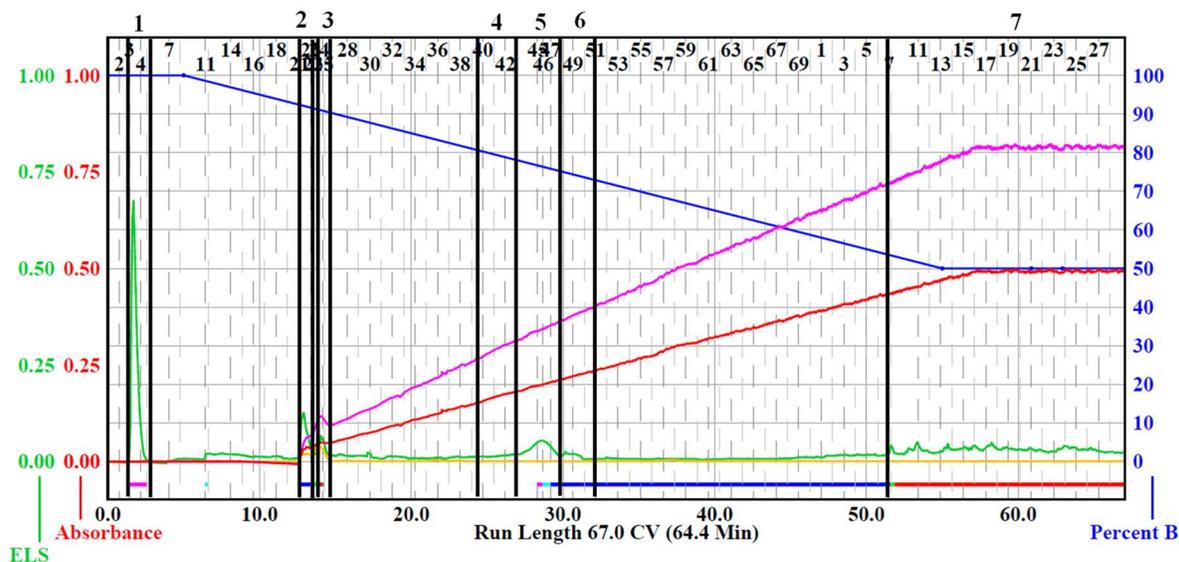


Figura 12. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de la fracción F₁₃ del extracto Nc₂. En amarillo el máximo de la señal de PDA, en rojo señal a 254 nm, en magenta la señal a 280 nm y en verde la señal del detector ELSD.

Tabla 7. Fraccionamiento secundario de las fracciones F₁₃ y F₁₄ provenientes del extracto Nc₂ de *Nocardopsis* sp. (NCA-454).

Fracción 13			Fracción 14		
Fracciones	Clave	Peso (mg)	Fracciones	Clave	Peso (mg)
3-4	SF₁	52.5	3	SF₁	39.6
20-21	SF ₂	9.1	13	SF ₂	0.5
23-25	SF ₃	10.7	17	SF ₃	0.1
39-43	SF ₄	5.8	19	SF ₄	2.4
44-47	SF ₅	1.2	26-30	SF ₅	3.5
48-50	SF ₆	1.5	38	SF ₆	2.0
77-End	SF ₇	8.8	81-82	SF ₇	0.4
Peso inicial		90.2	83-84	SF ₈	0.4
Total recuperado		89.6	85	SF ₉	0.2
%Recuperado		99.33%	Peso inicial		70.3
			Total recuperado		49.1
			%Recuperado		69.84%

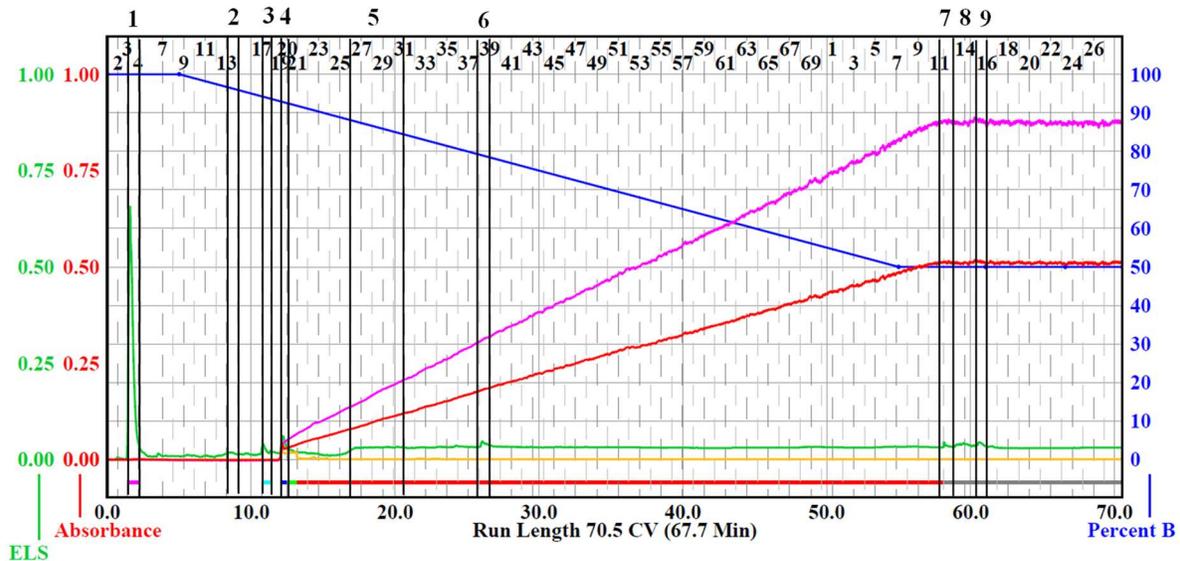


Figura 13. Cromatograma por CF del fraccionamiento secundario de la fracción F₁₄ del extracto Nc₂. En amarillo el máximo de la señal de PDA, en rojo señal a 254 nm, en magenta la señal a 280 nm y en verde la señal del detector ELSD.

4.10. Procesamiento y análisis por Redes Moleculares y estudios de metabolómica

Los archivos obtenidos de espectrometría de masas de alta resolución en tandem (HRESIMS-MS/MS) de cada extracto se transformaron al formato de texto mzML usando la herramienta *Conversion Drag and Drop* implementada en la plataforma de la *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). Los archivos convertidos se cargaron al servidor web de la GNPS (gnps.ucsd.edu) usando la aplicación de código abierto de Protocolo de Transferencia de Archivos (FTP por sus siglas en inglés) WinSCP en su versión 5.21 (Microsoft Windows 10) y se procesaron empleando el flujo de trabajo publicado por Aron *et al.*⁵³ En resumen, se configuró la tolerancia de los iones precursores y los iones fragmentados MS/MS en 0.01 y 0.02 Da, respectivamente; el umbral de correlación cosenoidal se fijó en 0.7 y con un mínimo de 4 picos alineados; la correlación entre dos nodos se conservó sí y solo si ésta estaba en el *TopK* 10 de similitud entre ambos nodos; y finalmente, el número mínimo de coincidencias entre los datos y la colección de espectros de la GNPS se fijó en 6 picos.

Adicionalmente, empleando como base el estudio de metabolómica inicial, se utilizaron las herramientas de descubrimiento no supervisado de subestructuras en metabolómica MS2LDA⁵⁷ y de anotación *in silico* Derreplicator⁺⁵⁸. Finalmente, los datos generados de los tres análisis se reunieron y organizaron con la herramienta

MolNetEnhancer⁵⁹. Todos los procesamientos de datos se llevaron a cabo dentro de la plataforma de la GNPS.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Asignación taxonómica de organismos de estudio

Las identidades de los organismos estudiados se determinaron con base en los resultados arrojados por la plataforma BLAST. En todos los casos los resultados de cada organismo convergieron en el mismo género, por lo que se concluyó asignar las identidades como especies no identificadas (sp.). Los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Conviene señalar que la cepa con la clave NCA-305 perdió viabilidad y no pudo ser resembrada para experimentos posteriores, por lo que no se presentan sus resultados.

Tabla 8. Asignación taxonómica de los organismos de estudio.

Clave	Filo	Clase	Familia	Especie	%Similitud ID	%Cobertura
NCA-119	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> sp.	98.66%	98%
NCA-145	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	98.95%	98%
NCA-265	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micobacterium</i> sp.	99.53%	99%
NCA-284	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> sp.	98.55%	98%
NCA-291	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Halobacillus</i> sp.	99.23%	98%
NCA-315	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Glutamicibacter</i> sp.	99.02%	97%
NCA-454 (BE)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptosporangiales</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i> sp.	99.04%	98%
NCA-455 (19E)	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> sp.	99.32%	98%

5.2. Evaluación biológica de extractos de pequeña escala

Los 60 extractos de pequeña escala de las 9 bacterias de estudio (**Anexo 1**) se evaluaron contra las nueve bacterias patógenas que se mencionan en el apartado 4.6. De estos 60 extractos, 39 presentaron signos de actividad parcial contra *E. faecalis* ATCC 29212, MRSA y/o MSSA. De estos últimos extractos se seleccionaron 18 (**Tabla 2**) que presentaron actividad notable, es decir, un mínimo de actividad parcial a las dos concentraciones de prueba; y con ayuda del recuento presentado en la **Figura 14**, se eligieron las cepas *Streptomyces* sp. (NCA-145), *Glutamicibacter* sp. (NCA-315) y *Nocardiopsis* sp. (NCA-454) para continuar con su estudio químico. Cabe mencionar que la cepa NCA-305, la cual presentó una excelente actividad contra MRSA y MSSA, no fue elegida debido a que el cultivo perdió viabilidad en los pasos de resiembra y no fue posible continuar con su escalamiento y estudio químico. Sin embargo, sí fue posible realizar

estudios de metabolómica, los cuales se presentan en la sección **5.7.4** más adelante. Finalmente, los resultados completos de actividad antimicrobiana de todos los extractos se presentan en la **Tabla 16**.

Tabla 9. Resultados completos de actividad antimicrobiana de los extractos de pequeña escala

Cepa	Medio de cultivo	Sustrato	Disolvente	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	MSSA ^a	MRSA ^b
NCA-119	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	
		Pellet	AcOEt MeOH		■	■
NCA-145 (S)	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	■
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt MeOH	■	■	■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
NCA-265	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	
		Pellet	AcOEt MeOH			
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt MeOH			
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
NCA-284	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt MeOH			■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
NCA-291	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	
		Pellet	AcOEt MeOH		■	

^a CMI = 2.5 µg/mL Vancomicina, ^b CIM = 0.2 µg/mL Ampicilina

Tabla 16. (continuación)

Cepa	Medio de cultivo	Sustrato	Disolvente	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	MSSA	MRSA
NCA-305	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	■
NCA-315 (G)	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH	■		■
		Pellet	AcOEt MeOH	■		■
	ISP2	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	■
NCA-454 (N)	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH		■	
		Pellet	AcOEt MeOH		■	
NCA-455	DSC-ASW	Sobrenadante	AcOEt MeOH			■
		Pellet	AcOEt MeOH		■	■

^a CMI = 2.5 µg/mL Vancomicina, ^b CIM = 0.2 µg/mL Ampicilina

Escala de inhibición	
■	Total a 200 y a 20 µg/mL
■	Total a 200, parcial a 20 µg /mL
■	Total a 200 µg /ml
■	Parcial a 200 y a 20 µg /mL
■	Parcial a 200 µg /mL
■	Sin actividad

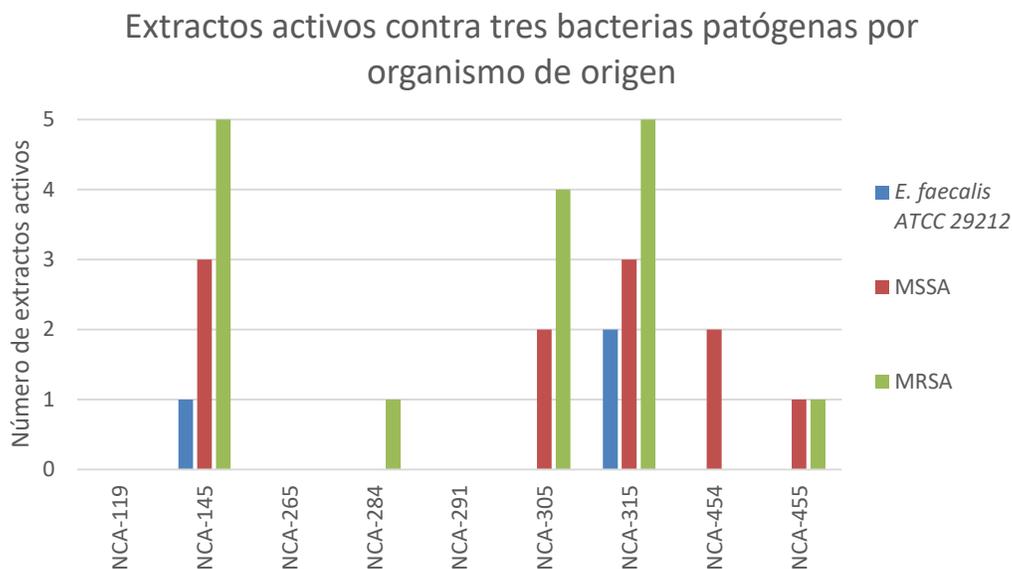


Figura 14. Recuento del número de extractos con actividad notable contra las cepas patógenas del grupo ESKAPE agrupados por bacteria de origen.

5.3. Estudio químico de *Glutamicibacter* sp. NCA-315

A partir del extracto G₁ se obtuvieron los productos 1–4. Estos compuestos se clasifican dentro de la familia química de los ácidos biliares, los cuales son ácidos esteroidales con diversos grados de oxigenación. La asignación y elucidación de estas estructuras se logró gracias a la interpretación de los espectros de RMN ¹H, ¹³C, espectros de correlación bidimensional, HRESIMS y a la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con referencias publicadas con anterioridad a este trabajo de investigación. La descripción de estos compuestos en géneros de actinobacterias fue hecha por Pheiffer *et al.*, recientemente. En dicho estudio se encontró la presencia de diversos ácidos cólicos en la bacteria *Thalassomonas*. Los autores de ese trabajo concluyeron que la presencia de estos compuestos se debía a la metabolización parcial de ingredientes del medio de cultivo, ya que no fueron capaces de encontrar los grupos de genes metabólicos (BGC's por sus siglas en inglés) responsables de la síntesis de escualeno, el precursor obligado de los metabolitos de núcleo esteroideal⁶⁰. El caso presente podría ser similar al descrito, mas, la metabolización de ácidos biliares conjugados a derivados con oxidaciones o reducciones en la posición 7, como en el caso de los compuestos 2 o 4, es inusual y solo se ha reportado en bacterias del género *Clostridium*⁶¹.

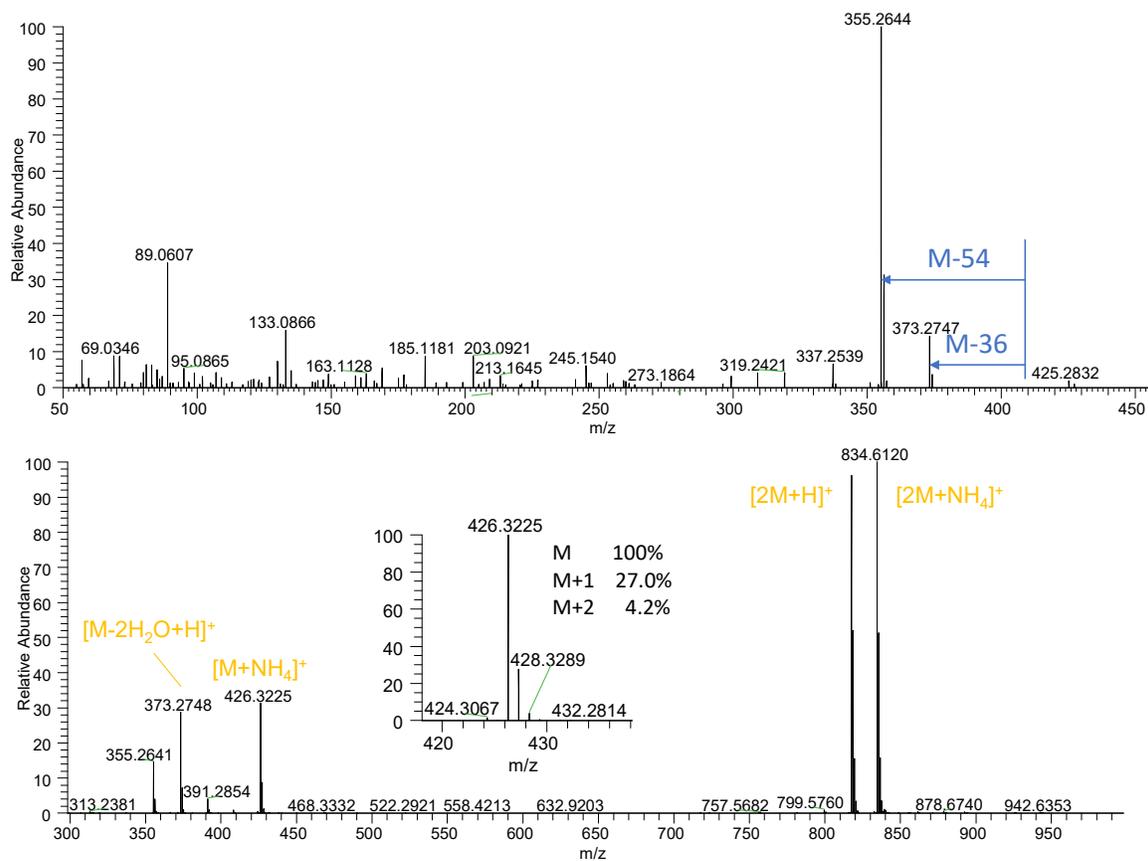


Figura 15. Espectros de HRESIMS del compuesto **1**. (superior) Espectro de fragmentación del $[M+NH_4]^+$ 426.3235 donde se observan los iones M-36 y M-54. (inferior) Corriente total de iones con diferentes aductos y la distribución isotópica del ion pseudomolecular.

El análisis detallado de los espectros HSQC, HMBC y COSY (**Figura 17**, **Figura 18**, **Figura 19**) de este producto, así como la comparación de las señales antes descritas con lo reportado en la literatura especializada⁶², permitió caracterizar al compuesto **1** como el ácido cólico (CA). Finalmente, la configuración relativa de este producto se estableció mediante el análisis de las correlaciones H–H observadas en el espectro NOESY (**Figura 20**), en donde resalta el acoplamiento entre los H-19 y H-5, lo que se interpreta como una fusión *cis* entre los anillos A y B. El resumen de las constantes de acoplamiento de los productos **1–4** se muestran en la **Tabla 10**.

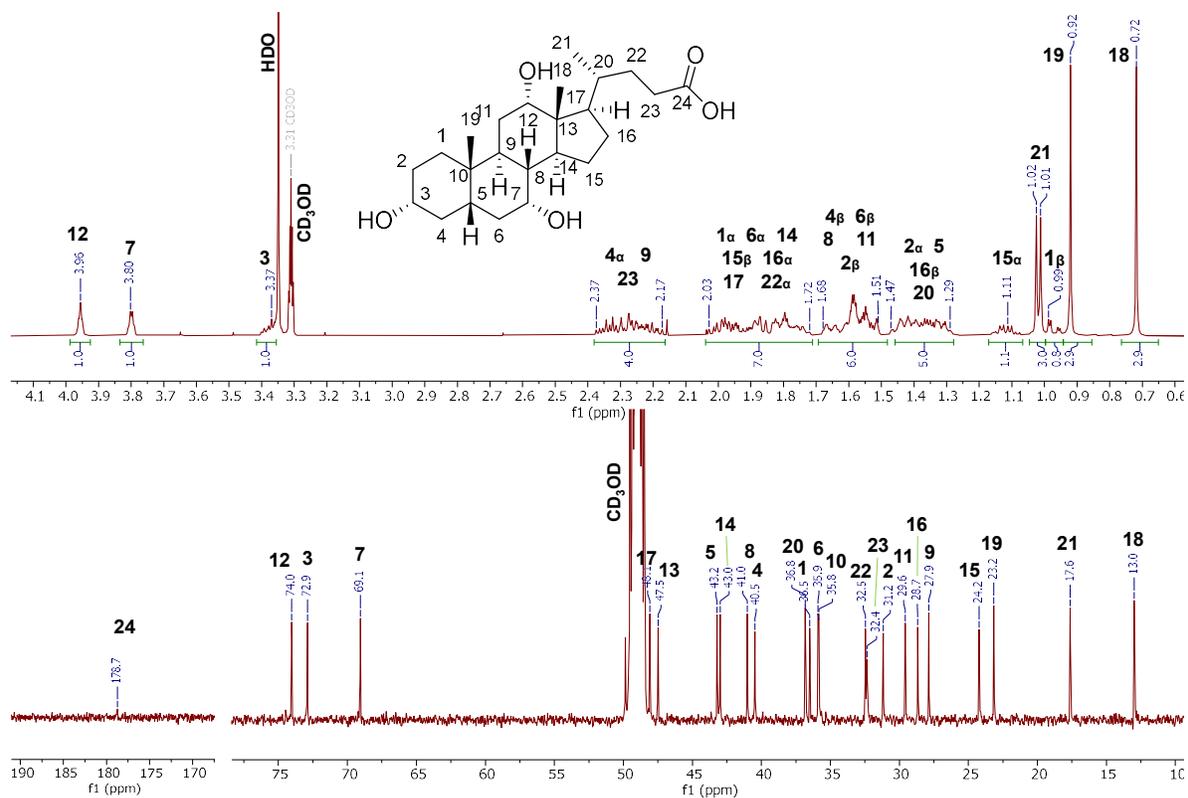


Figura 16. Espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) del CA (1).

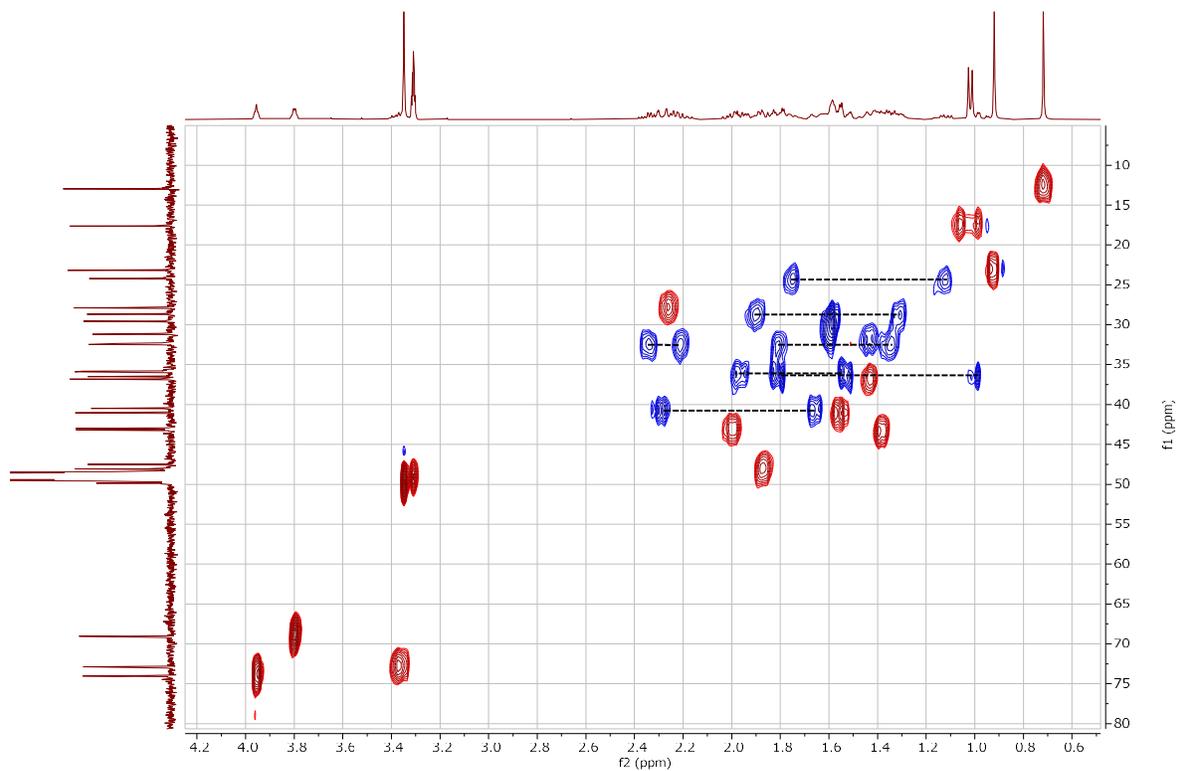


Figura 17. Espectro HSQC (CD_3OD) del CA (1)

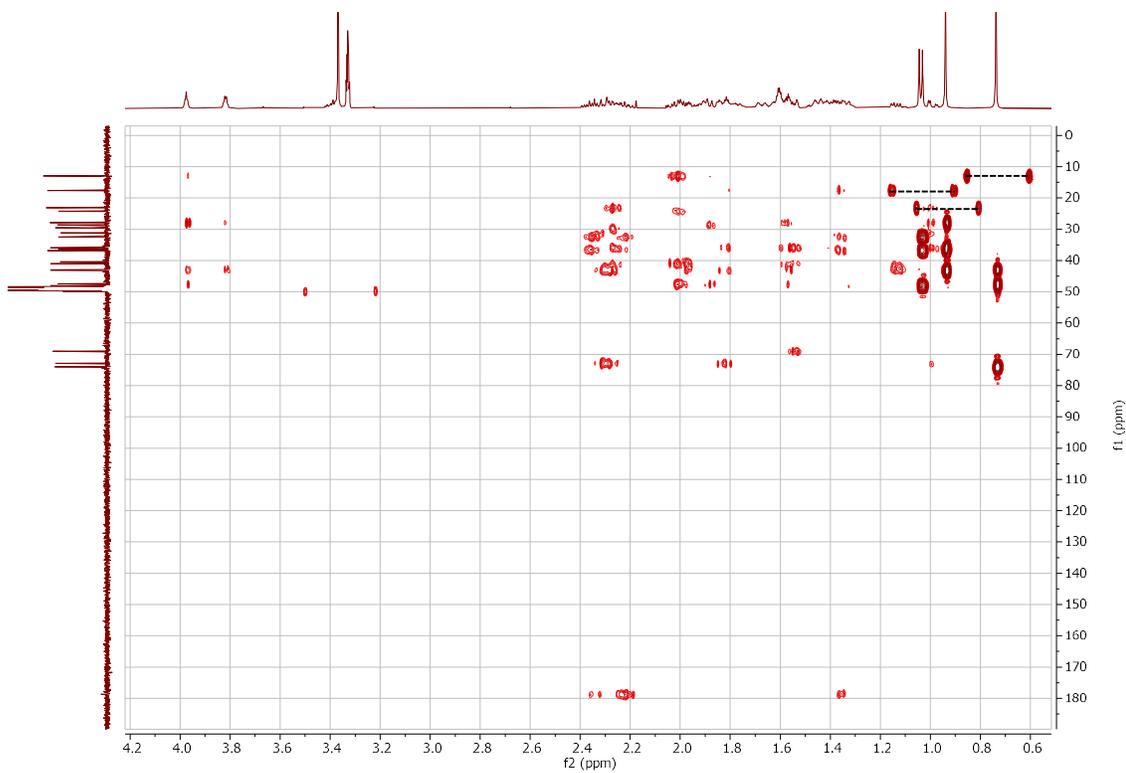


Figura 18. Espectro HMBC (CD₃OD) del CA (1)

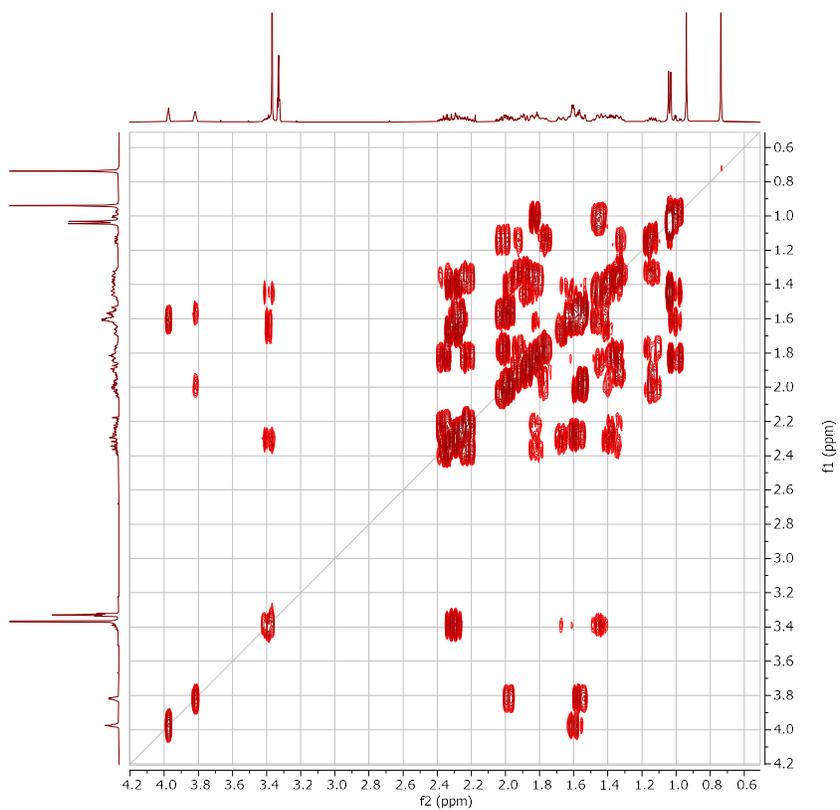


Figura 19. Espectro COSY (CD₃OD) del CA (1)

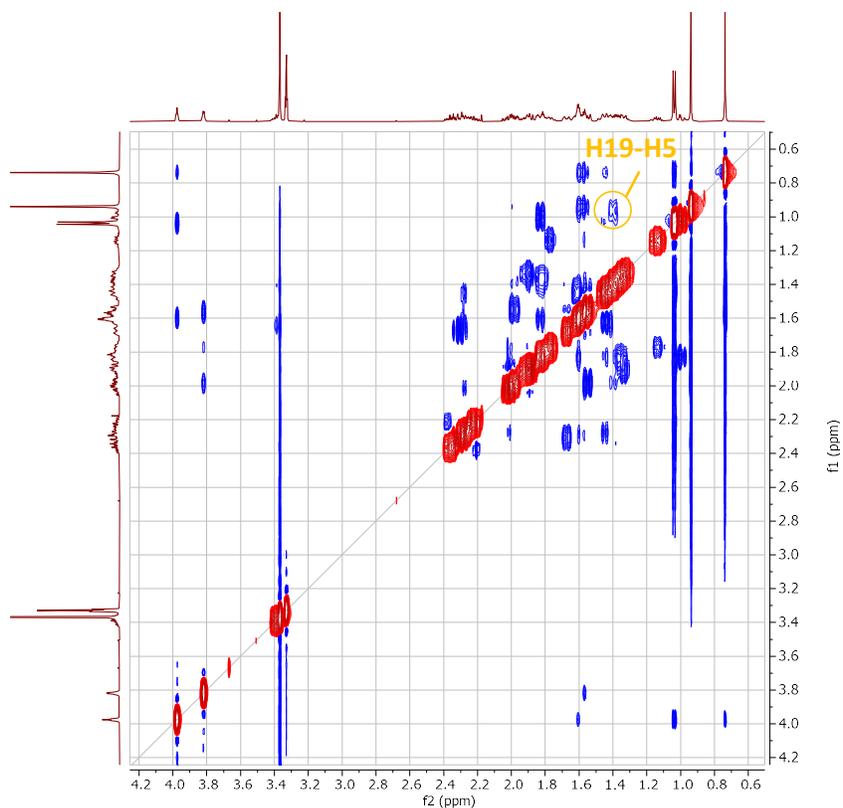


Figura 20. Espectro NOESY (CD₃OD) del CA (1)

A continuación, en el espectro de HRESIMS del compuesto **2** se observaron los iones moleculares en una relación m/z de 407.2817 [M+H]⁺ y 405.2661 [M-H]⁻, lo que permitió establecer la fórmula molecular como C₂₄H₃₈O₅ (DBE = 6, calculado para C₂₄H₃₈O₅, Δ= +6.1ppm). Además de estos iones, se identificaron los aductos pseudomoleculares m/z 813.5555 [2M+H]⁺, 811.5396 [2M-H]⁻ y sus contrapartes de ionización en modo negativo; y cuatro fragmentos correspondientes a pérdidas consecutivas de H₂O en modo positivo correspondientes al M-18, M-36, M-54 y M-72 (**Figura 21**).

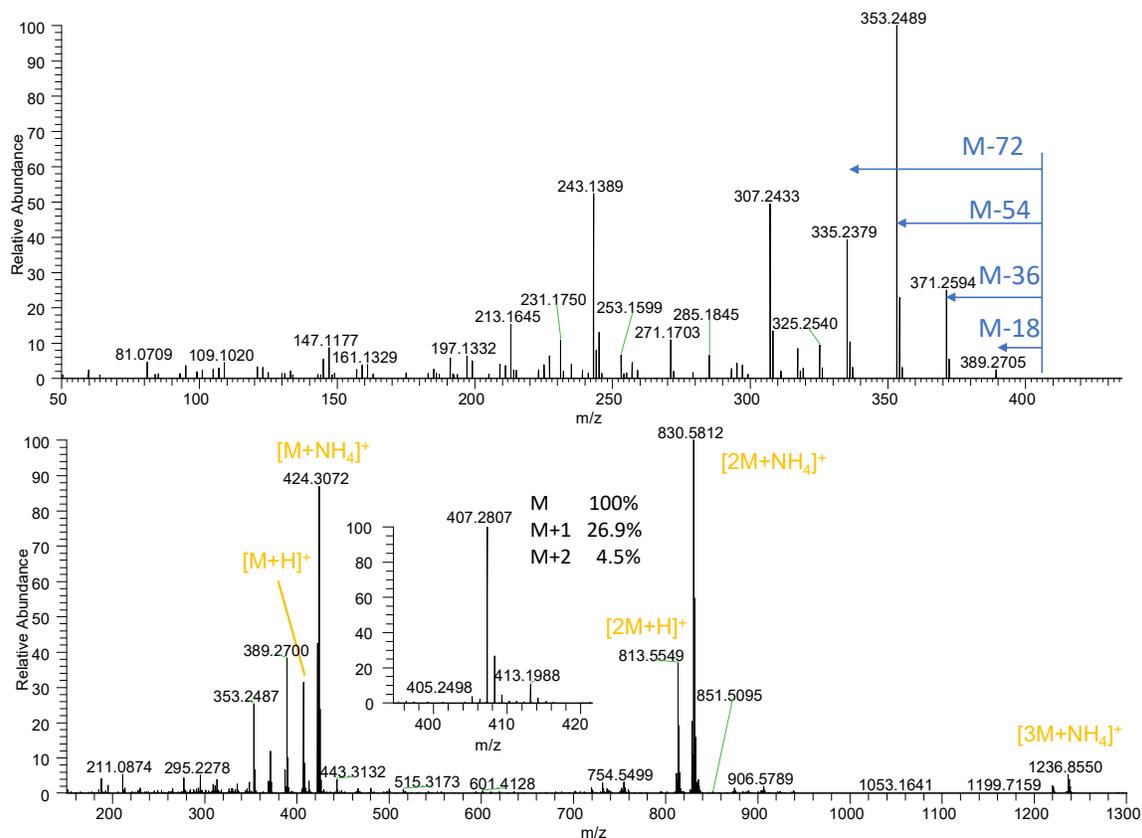


Figura 21. Espectros de HRESIMS del compuesto **2**. (superior) Espectro de fragmentación del $[M+H]^+$ 407.2807 donde se observan los iones M-18, M-36, M-54 y M-72. (inferior) Corriente total de iones con diferentes aductos y la distribución isotópica del ion molecular.

Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) (**Figura 22**) del compuesto **2** se observaron las siguientes señales: tres señales correspondientes a tres metilos δ_{H} 1.22 (s, Me-19), δ_{H} 1.02 (d, $J = 6.5$ Hz, Me-21) y δ_{H} 0.72 (s, Me-18); dos señales de metinos base de oxígeno δ_{H} 3.98 (t, $J = 3.0$ Hz, H-12), δ_{H} 3.51 (tt, $J = 11.2, 4.5$ Hz, H-3); una señal de metileno desplazada a campos bajos debido a la presencia de la cetona δ_{H} 2.97 (dd, $J = 12.6, 6.0$ Hz, H $_{\alpha}$ -6) y un metino adyacente del otro lado del carbonilo δ_{H} 2.56 (t, $J = 11.5$ Hz, H-8) y finalmente una señal δ_{H} 2.28 (td, $J = 12.2, 4.2$ Hz, H-9). El espectro de RMN ^{13}C presentó la siguientes señales : Una señal a campo bajo correspondiente a un carbonilo de cetona δ_{C} 215.0 (C-7) y una correspondiente a un carbonilo de ácido δ_{C} 179.2 (C-24); dos señales de carbonos base de oxígeno δ_{C} 72.9 (C-12), δ_{C} 71.6 (C-3); una señal de metileno adyacente a un carbonilo δ_{C} 46.4 (C-6) y un metino del lado opuesto δ_{C} 50.8 (C-8); tres señales de metilos δ_{C} 23.3 (Me-19), δ_{C} 17.7 (Me-21) y δ_{C} 13.3 (Me-18); ocho señales de metilenos δ_{C} 38.3 (C-4), δ_{C} 35.9 (C-2), δ_{C} 35.1 (C-16), δ_{C} 32.6 (C-23), δ_{C} 30.6 (C-22), δ_{C} 30.5 (C-11), δ_{C} 28.7 (C-1) y δ_{C} 25.4 (C-15); cinco señales de metinos δ_{C} 47.6 (C-17), δ_{C} 47.5

(C-5), δ_c 41.9 (C-14), δ_c 37.5 (C-9) y δ_c 36.7 (C-20); y dos señales de carbonos cuaternarios δ_c 47.3 (C-13) y δ_c 32.8 (C-10). El análisis detallado de los espectros COSY, HSQC y HMBC de este producto, así como la comparación parcial de las señales antes descritas con lo reportado en la literatura especializada⁶³, permitió caracterizar al compuesto **2** como el ácido 7-oxo-3,12-dihidroxícólico (7OCA). Con ayuda del experimento NOESY se determinó la configuración estereogénica de la molécula idéntica a la del compuesto **1**. El resumen de las constantes de acoplamiento de los productos **1–4** se muestran en la **Tabla 9**.

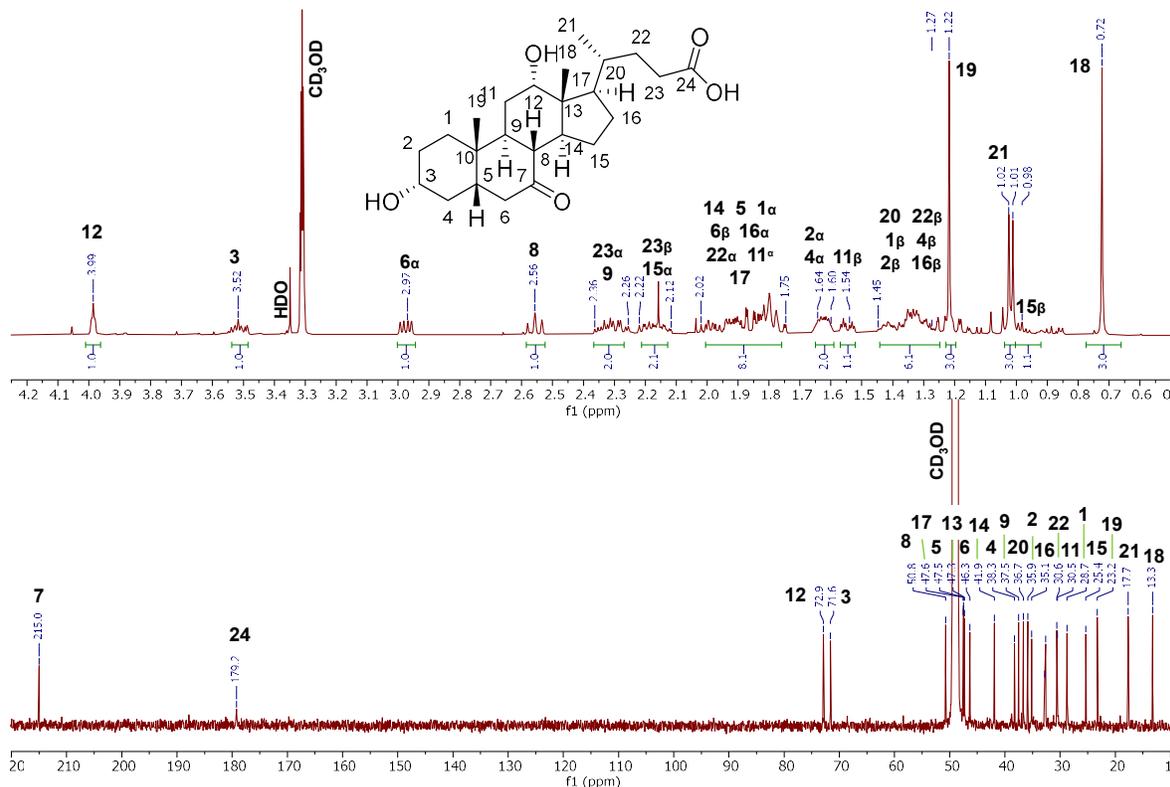


Figura 22. Espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) del 7OCA (**2**).

Continuando, en el espectro de HRESIMS del compuesto **3** se observaron los iones moleculares en una relación m/z 466.3184 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 464.3034 $[\text{M}-\text{H}]^-$, lo que permitió determinar la fórmula molecular como $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NO}_6$ (DBE = 6, calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NO}_6$, $\Delta = +4.5$ ppm). Además, de estos iones se identificaron los aductos pseudomoleculares mostrados en la **Figura 23** y los fragmentos m/z 76.0404 $[\text{C}_2\text{H}_6\text{NO}_2]^+$ y 74.0234 $[\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_2]^-$, estos últimos correspondientes al residuo de glicina producto de una escisión α al carbonilo C-24; adicionalmente se observaron fragmentos M-36 y M-54, correspondientes a eliminaciones sucesivas de H_2O y una pérdida de 75 uma, propio de la pérdida del residuo de Gly, así como una pérdida adicional de agua.

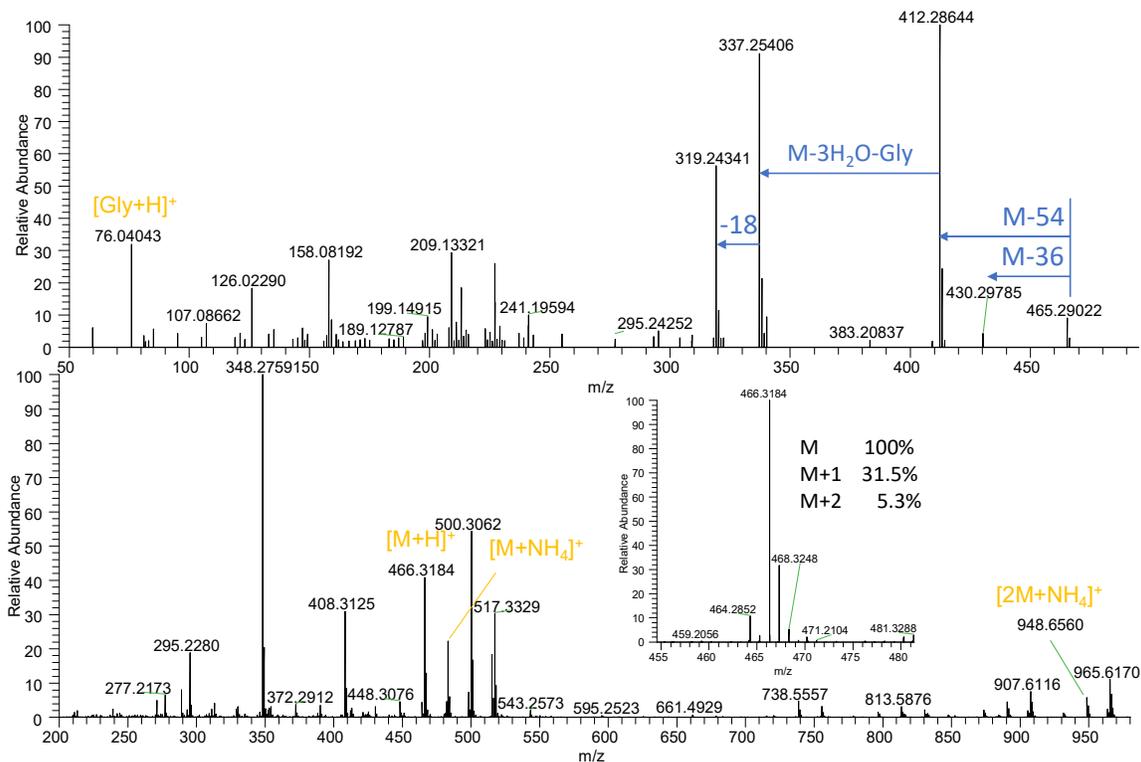


Figura 23. Espectros de HRESIMS del compuesto **3**. (superior) Espectro de fragmentación del $[M+H]^+$ 466.3184 donde se observan los fragmentos M-36, M- 54, M-3H₂O-Gly. (inferior) Corriente total de iones con diferentes aductos y la distribución isotópica del ion molecular.

Por otro lado, el espectro de RMN ¹H del compuesto **3** (CD₃OD, 500 MHz) exhibió las siguientes señales: tres señales correspondientes a metilos δ_H 1.04 (d, J = 6.5, Me-21), δ_H 0.90 (s, Me-19) y δ_H 0.72 (s, Me-18); tres señales de metinos base de oxígeno δ_H 3.96 (t, J = 3.2 Hz, H-12), δ_H 3.80 (dt, J = 3.2, 2.4 Hz, H-6) y δ_H 3.48 (m, H-3); una señal de un metileno δ_H 3.76 (s, H-25) y una señal de amina en δ_H 8.53 (s, H-27, N-H). La RMN ¹³C presentó las siguientes señales: Una señal a campo bajo correspondiente a un carbonilo de amida δ_C 179.6 (C-24) y una correspondiente a un carbonilo de ácido δ_C 176.2 (C-26); tres señales de carbonos base de oxígeno δ_C 75.8 (C-3), δ_C 74.0 (C-12) y δ_C 69.1 (C-7); una señal del metileno perteneciente a la glicina δ_C C 43.2 (C-25) y tres señales de metilos δ_C 23.2 (Me-19), δ_C 19.4 (Me-21), y δ_C 13.0 (Me-18). Con base en lo anterior, y a pesar de que en los espectros de HRESIMS y RMN de este producto se observó la presencia de señales adicionales pertenecientes a grasas oxigenadas, se logró establecer su identidad como ácido glicólico (GCA). Esto con base en las señales diagnósticas que coinciden a la perfección con las reportadas en la literatura⁶².

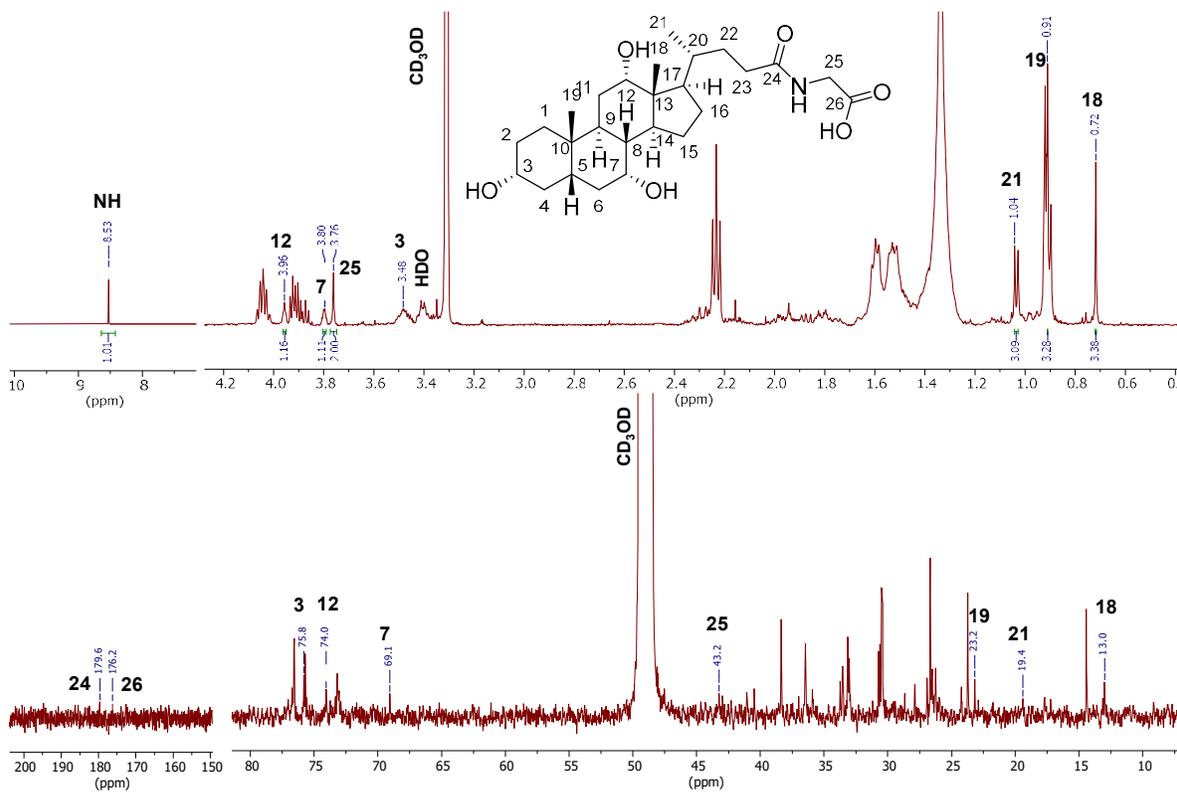


Figura 24. Espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) del GCA (3)

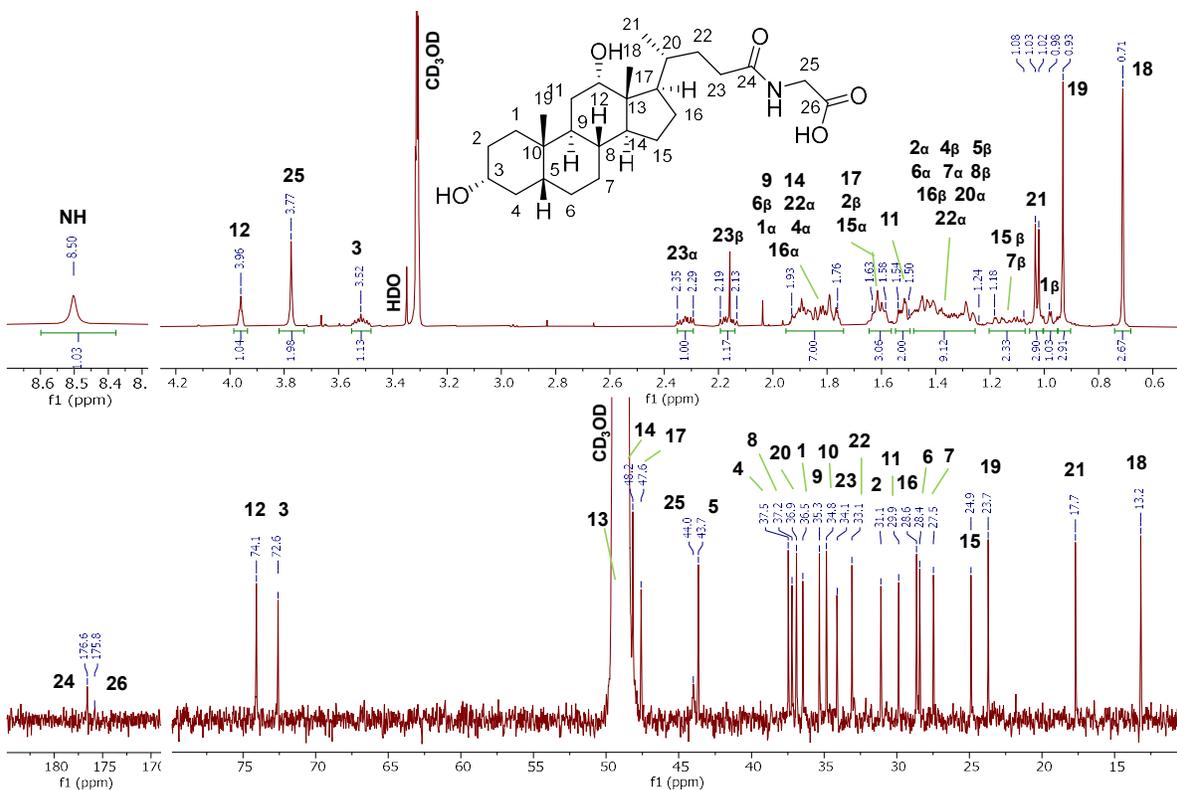


Figura 25. Espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (CD_3OD , 500 MHz) del GDCA (4).

Finalmente, en el espectro de HRESIMS del compuesto **4** se observaron los iones moleculares en una relación m/z 450.3234 $[M+H]^+$ y 448.3085 $[M-H]^-$, lo que permitió determinar la fórmula molecular como $C_{26}H_{43}NO_5$ (DBE = 6, calculado para $C_{24}H_{38}O_5$, $\Delta = +4.4$ ppm). El patrón de fragmentación y los iones pseudomoleculares fueron análogos a los del compuesto **3**, con la evidente diferencia de masa debido a la carencia de un átomo de oxígeno y la carencia de aductos con amoníaco. Por otro lado, el espectro de RMN 1H (CD_3OD , 500 MHz) (**Figura 25**) exhibió las siguientes señales: tres señales correspondientes a metilos δ_H 1.03 (d, $J = 6.5$ Hz, Me-21), δ_H 0.93 (s, Me-19) y δ_H 0.71 (s, Me-18); dos señales de metinos base de oxígeno δ_H 3.96 (t, $J = 3.0$ Hz, H-12) y δ_H 3.52 (tt, $J = 11.0, 4.6$ Hz, H-3); cuatro señales de metilenos δ_H 2.32 y 2.16 (ddd, $J = 14.0, 10.2, 4.9/6.3$ Hz, H-23 (2)), δ_H 3.77 (s, H-25), δ_H 0.98 (td, $J = 14.1, 3.4$, $H_{\alpha-1}$) y una señal de amina en δ_H 8.50 (s, H-27, N-H). La RMN ^{13}C presentó las siguientes señales: Una señal a campo bajo correspondiente a un carbonilo de amida δ_C 176.6 (C-24) y una correspondiente a un carbonilo de ácido δ_C 175.8 (C-26); dos señales de carbonos base de oxígeno δ_C 74.1 (C-12) y δ_C 72.6 (C-3); tres señales de metilos δ_C 23.7 (Me-19), δ_C 17.7 (Me-21) y δ_C 13.2 (Me-18); una señal del metileno de la glicina δ_C 44.0 (C-25) y nueve señales de metilenos δ_C 37.5 (C-4), δ_C 36.5 (C-1), δ_C 33.0 (C-22), δ_C 31.1 (C-2), δ_C 29.9 (C-11), δ_C 28.6 (C-16), δ_C 28.4 (C-6), δ_C 27.5 (C-7) y δ_C 24.9 (C-15); seis señales de metinos δ_C 48.2 (C-14), δ_C 47.6 (C-17), δ_C 43.7 (C-5), δ_C 37.2 (C-8), δ_C 36.9 (C-20) y δ_C 35.3 (C-9); y dos señales de carbonos cuaternarios δ_C 49.4 (C-13) y δ_C 34.8 (C-10). El análisis detallado de los espectros COSY, HSQC y HMBC de este producto, así como la comparación de las señales antes descritas con lo reportado en la literatura especializada⁶⁴, permitió caracterizar al compuesto **4** como el ácido glicodesoxicólico (GDCA).

Tabla 10. Datos espectroscópicos de los compuestos **1–4** (CD₃OD; δ_C 125 MHz, δ_H 500 MHz).

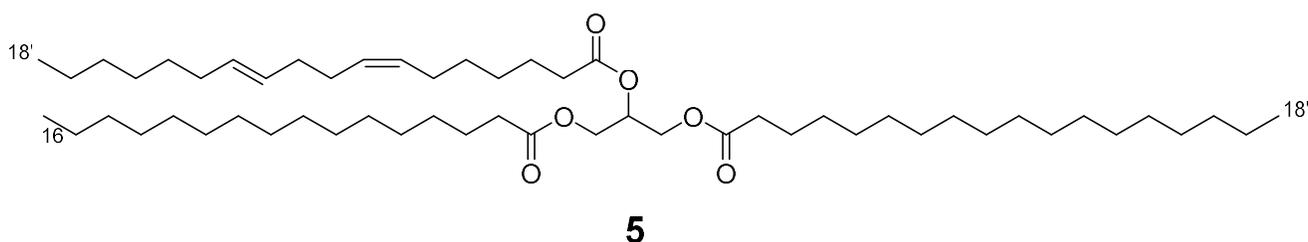
Posición	1			2		
	δ_C	δ_H , m (J en Hz)		δ_C	δ_H , m (J en Hz)	
		α	β		α	β
1	36.5	1.70-2.05, m	0.97, td (14.2, 3.5)	28.7	1.72-2.03, m	1.14-1.46, m
2	31.2	1.22-1.48, m	1.48-1.7, m	35.9	1.58-1.66, m	1.14-1.46, m
3	72.9	-	3.37, tt (11.2, 4.5)	71.6	3.51, tt (11.2, 4.5)	-
4	40.5	2.15-2.38, m	1.48-1.70, m	38.3	1.58-1.66, m	1.14-1.46, m
5	43.2	-	1.22-1.48, m	47.5	1.72-2.03, m	-
6	35.9	1.70-2.05, m	1.48-1.70, m	46.4	2.97, dd (12.6, 6.0)	1.72-2.03, m
7	69.1	-	3.80, dt (3.2, 2.9)	215.0	-	-
8	41.0	-	1.48-1.70, m	50.8	2.56, t (11.5)	-
9	27.9	2.15-2.38, m	-	37.5	2.28, td (12.2, 4.2)	-
10	35.8	-	-	32.8	-	-
11	29.6	1.48-1.70, m	1.48-1.70, m	30.5	1.72-2.03, m	1.54, ddd (14.0, 4.2, 3.6)
12	74.0	-	3.96, t (3.0)	72.9	3.98, t (3.0)	-
13	47.5	-	-	47.3	-	-
14	43.0	1.70-2.05, m	-	41.9	1.72-2.03, m	-
15	24.2	1.12, dtd (12.4, 12.0, 5.9)	1.70-2.05, m	25.4	2.10-2.23, m	0.94-1.00, m
16	28.7	1.70-2.05, m	1.22-1.48, m	35.1	1.72-2.03, m	1.14-1.46, m
17	48.1	1.70-2.05, m	-	47.6	1.72-2.03, m	-
18	13.0		0.72, s	13.2		0.72, s
19	23.2		0.92, s	23.2		1.22, s
20	36.8	1.22-1.48, m	-	36.7	1.14-1.46, m	-
21	17.6		1.02, d (6.5)	17.7		1.02, d (6.5)
22	32.5	1.70-2.05, m	1.22-1.48, m	30.6	1.72-2.03, m	1.14-1.46, m
23	32.4	2.15-2.38, m	2.15-2.38, m	32.6	2.23-2.37, m	2.10-2.23, m
24	178.7	-	-	179.2	-	-
25						
26						
NH						

Tabla 10. (Continuación)

Posición	3			4		
	δ_c	δ_H , m (J en Hz)		δ_c	δ_H , m (J en Hz)	
		α	β		α	β
1				36.5	1.74-1.95, m	0.98, td (14.1, 3.4)
2				31.1	1.22-1.48, m	1.55-1.65, m
3	75.8	-	3.48, tt (11.0, 4.6)	72.6	-	3.52, tt (11.0, 4.6)
4				37.5	1.74-1.95, m	1.22-1.48, m
5				43.7	-	1.22-1.48, m
6				28.4	1.22-1.48, m	1.74-1.95, m
7	69.1	-	3.80, dt (3.2, 2.4)	27.5	1.22-1.48, m	1.05-1.22, m
8				37.2	-	1.22-1.48, m
9				35.3	1.74-1.95, m	-
10				34.8	-	-
11				29.9	1.49-1.55, m	1.49-1.55, m
12	74.0	-	3.96, t (3.2)	74.1	-	3.96, t (3.0)
13				49.4	-	-
14				48.2	1.74-1.95, m	-
15				24.9	1.55-1.65, m	1.05-1.22, m
16				28.6	1.74-1.95, m	1.22-1.48, m
17				47.6	1.55-1.65, m	-
18	13.0		0.72, s	13.2		0.71, s
19	23.2		0.90, s	23.7		0.93, s
20				36.9	1.22-1.48, m	-
21	19.4		1.04, d (6.5)	17.7		1.03, d (6.5)
22				33.0	1.22-1.48, m	1.74-1.95, m
23				34.1	2.32, ddd (14.0, 10.2, 4.9)	2.16, ddd (14.0, 10.2, 6.3)
24	179.6	-	-	176.6	-	-
25	43.2		3.76, s	44.0		3.77, s
26	176.2	-	-	175.8	-	-
NH	-		8.53, s	-		8.50, s

5.4. Estudio químico de *Streptomyces* sp. NCA-145

A partir del extracto S₁ se obtuvo el producto **5**. Este compuesto pertenece a la familia de los triglicéridos de cadena larga. Estos compuestos son comúnmente sintetizados como componentes de la membrana celular bacteriana. La asignación y elucidación de estas estructuras se logró gracias a la interpretación de los espectros de RMN ¹H, ¹³C, espectros de correlación bidimensional, LR-DART-TOF-MS y a la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con referencias publicadas con anterioridad a este trabajo.



En el espectro de LR-DART-TOF-MS del compuesto **5** se observaron los iones moleculares en una relación m/z de 858, lo que permitió establecer la fórmula molecular como C₅₅H₁₀₂O₆ (DBE = 5, calculado para C₅₅H₁₀₂O₆) Por otra parte, en el espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz) se observaron las siguientes señales: dos señales superpuestas correspondientes a dos protones olefínicos con morfología típica de posición *cis* δ_H 5.35 (m, H-7' y H-8')⁶⁵; dos señales superpuestas de protones olefínicos en posición *trans* δ_H 5.26 (m, H11' y H-12'); tres señales de metinos base de oxígeno correspondientes al grupo glicerilo, δ_H 5.25 (m, H-S_{N2}), δ_H 4.28 (dd, $J = 11.9, 4.3$ Hz, H-S_{N1}) y δ_H 4.14 (dd, $J = 12.1, 5.8$ Hz, H-S_{N3}); una señal de metileno *alfa* a un carbonilo δ_H 2.31 (t, $J = 7.6$ Hz, H-2', H-2'', H-2'/2''); una señal de cuatro metilos solapados en posición *alfa* a un doble enlace δ_H 2.01 (m, H-6', H-9', H-10', H-13'), una señal de tres metilos en posición beta al carbonilo δ_H 1.60 (m, H-3'/3'/3''), una señal ancha de un grupo de metilos δ_H 1.33-1.25 (m, H-4→15, H-4', H-5', H14'→17', H-4''→17'') y finalmente una señal correspondiente a tres metilenos terminales δ_H 0.88 (t, $J = 7.1$, H-16/18'/18''). El espectro de RMN ¹³C presentó la siguientes señales: una señal correspondiente a tres carbonilos de éster en δ_C 173.5 (C-1/1/1''); dos señales de carbonos con hibridación sp² correspondientes a los carbonos oleofínicos δ_C 130.2 (C-7' y C-8') y δ_C 129.8 (C-11' y C-12'), una señal de carbono base de oxígeno δ_C 69.0 (C-S_{N2}) y una señal doble δ_C 62.2 (C-S_{N1}, C-S_{N3}); seis señales de metilenos correspondientes a las cadenas alifáticas δ_C 34.2-22.8 (C-2→14, C-2'→6', C-9'→10', C-13'→14', C-4''-C-15''), finalmente una señal correspondiente a tres metilos terminales δ_C

14.3 (Me-16, Me-18', Me-18'') (**Figura 27**). La evidencia de la RMN ^1H indica que existe una cadena alifática con dos insaturaciones no conjugadas con dos metilenos entre ellas; pues de lo contrario existiría una señal cerca de δ_{H} 2.8 ppm correspondiente a un metileno vinílico conjugado. Por otro lado, la multiplicidad y la integración de la señal en δ_{H} 5.35 indica la presencia de un solo enlace doble en arreglo *cis*, mientras los otros dos protones olefínicos (H-11' y H12') se solapan con la señal correspondiente al $\text{S}_{\text{N}2}$ de la posición de glicerol.

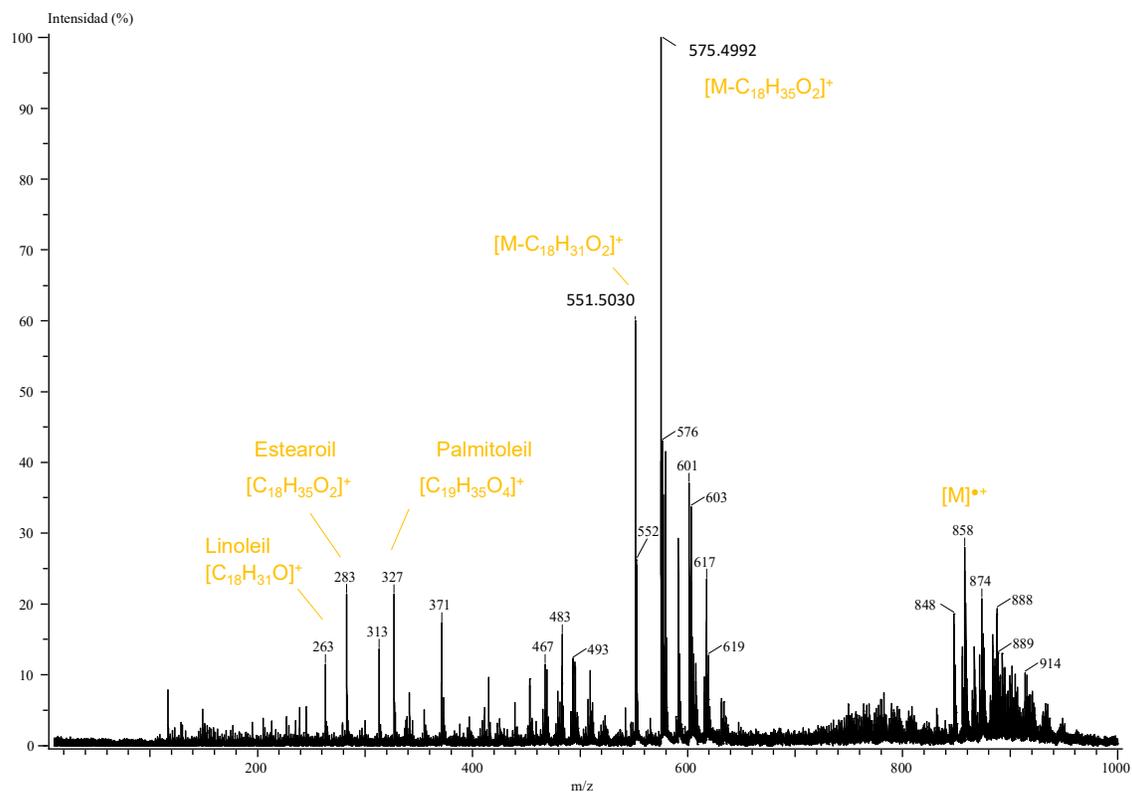


Figura 26. LR-DART-TOF-MS del TAG (18:0/18:2/16:0)-5.

El espectro de masas (**Figura 26**) confirma la presencia de una cadena con dos insaturaciones con un peso de m/z 263 ($\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}$, DBE = 3.5), que es un fragmento generado a partir de una escisión *alfa* al carbonilo del extremo oxigenado de la cadena análoga al ácido linoleico. En este espectro de fragmentación también se observan los iones estearoil m/z 283 ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2$, DBE = 1.5) y un conjugado del palmitoil producto de la pérdida de las otras dos cadenas m/z 327 ($\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{O}_4$, DBE = 2.5). Además, con apoyo de literatura especializada⁶⁶, se ha definido la posición de sustitución de las cadenas al esqueleto de glicerol. Los picos en m/z 575 y m/z 551 corresponden a estructuras cíclicas formadas por la pérdida de las cadenas de la posición $\text{S}_{\text{N}1}/\text{S}_{\text{N}3}$ y la $\text{S}_{\text{N}2}$ respectivamente. El pico base en m/z 575 ($\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{O}_4^+$, DBE = 3.5) se forma por la pérdida de la cadena de estearoil [M-

$C_{18}H_{35}O_2]^+$ de la posición S_{N3} , resultando en un intermediario cíclico de seis miembros que se forman con los tres carbonos de la porción de glicerol y el grupo carbonilo de alguna de las dos cadenas restantes. Mientras, el pico en m/z 551 ($C_{35}H_{67}O_4$, DBE = 2.5) se forma por la pérdida de la cadena del análogo de linoleil y un C_2H_4 producto de un rearrreglo de McLafferty con el doble enlace más exterior de la cadena. Se ha propuesto que este intermediario posee un anillo de 5 miembros causado por la pérdida de la cadena en posición S_{N2} . Este intermediario es menos estable que el de 6 miembros, por lo que su intensidad en el espectro de fragmentación será menor. Con esta información se logró descifrar la posición de la cadena del análogo linoleil en S_{N2} . Por otro lado, la posición de S_{N1} y S_{N3} no se puede determinar de esta manera, por lo que el centro estereogénico de la molécula no ha podido ser definido.

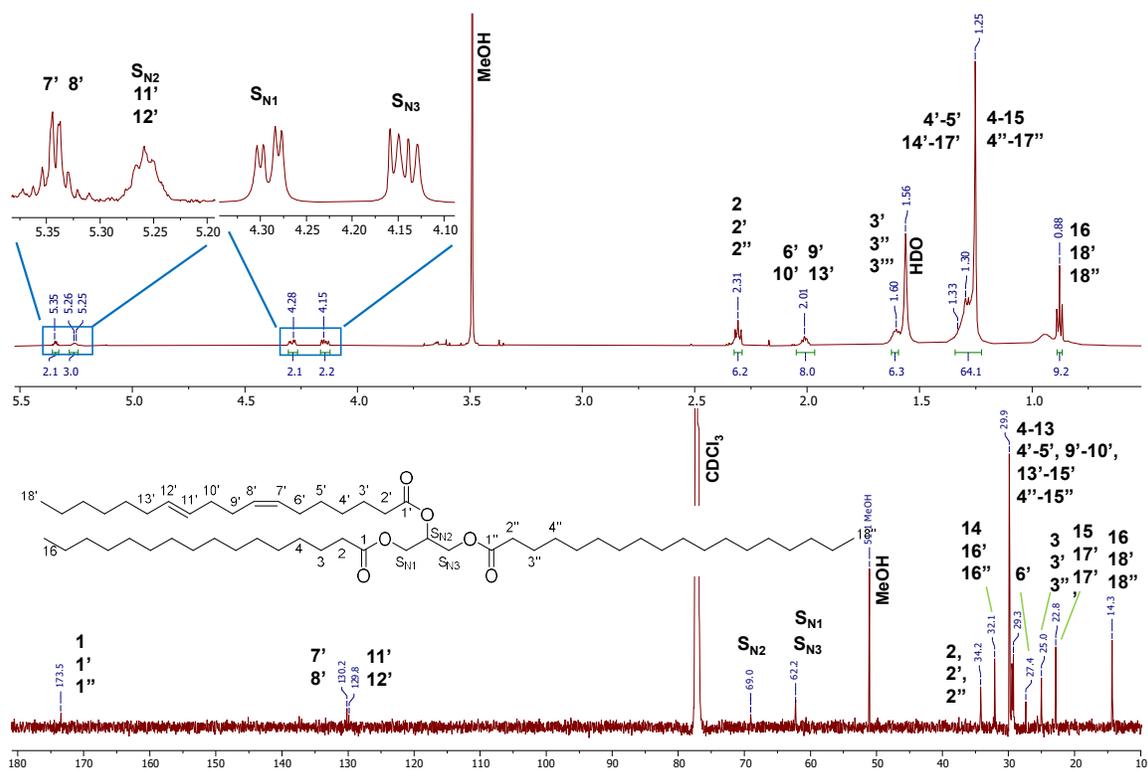


Figura 27. Espectros de RMN 1H y RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 600 MHz) del TAG (18:0/18:2/16:0) (**5**).

El análisis detallado de los espectros HSQC, HMBC y COSY de este producto, así como la comparación de las señales antes descritas con lo reportado en la literatura especializada^{65,67}, permitió caracterizar al compuesto **5** como un derivado del 1-estearoil, -2-linoleil, 3-palmitoil-glicerol, abreviado como TAG (18:0/18:2/16:0). El resumen de las constantes de acoplamiento de del producto **5** se muestra en la **Tabla 11**. Los datos se han separado en la parte de la glicina (S_{N1} , S_{N2} y S_{N3}) y los desplazamientos de las cadenas de

ácidos grasos. La cadena insaturada se codifica por convención como 18:2 (7,11t) que indican el número de carbonos de la cadena alifática y las insaturaciones en el C-7 en forma *cis* y en el C-11 en forma *trans*, mientras que las cadenas insaturadas se codifican como 18:0 y 16:0.

Tabla 11. Datos espectroscópicos del compuesto **5** (CDCl₃; δ_C 150 MHz, δ_H 600 MHz).

Posición	5					
	δ_C			δ_H , m (J en Hz)		
S _{N1}	62.2			4.28, dd (12.0, 4.3)		
S _{N2}	69.0			5.26 (m)		
S _{N3}	62.2			4.15, dd (12.0, 5.8)		
Ác. graso	16:0	18:2	18:0	16:0	18:2	18:0
1	173.5	173.5	173.5	-	-	-
2	34.2	34.2	34.2	2.31, t (7.6)	2.31, t (7.6)	2.31, t (7.6)
3	25.0	25.0	25.0	1.60, m	1.60, m	1.60, m
4,5	29.9	29.9	29.9	1.33-1.25, m	1.33-1.25, m	1.33-1.25, m
6		27.4			2.01, m	
7,8		130.2			5.35, m	
9, 10		29.9			2.01, m	
11,12		129.8			5.25, m	
13		29.9			2.01, m	
14		32.1			29.9	
15	22.8	29.9	1.33-1.25, m			
16	14.3	32.1	32.1	0.88, (7.0)	1.33-1.25, m	0.88, t (7.0)
17	-	22.8	22.8	-	1.33-1.25, m	
18	-	14.3	14.3	-	0.88, t (7.0)	

5.5. Estudio químico de *Nocardiosis* sp. NCA-454

La caracterización de los compuestos **6** y **7** no ha podido lograrse debido a la baja solubilidad de éstos para los análisis de RMN, y pobre ionización mediante las técnicas de HRESI-MS y DART-TOF-MS.

5.6. Actividad anti-biopelículas sobre MRSA

Con ayuda del Dr. Oswaldo P. Martínez Rodríguez, los compuestos **1–4** se evaluaron para medir su potencial como agentes reguladores de la formación de biopelículas en cepas multirresistentes de *S. aureus*. Para este efecto, los compuestos puros se probaron en un cultivo de MRSA a 24 h y, posteriormente se cuantificó el crecimiento de las células planctónicas y la producción de biopelículas, a través de la tinción con el colorante cristal violeta mediante espectrofotometría de UV-Vis. Como controles negativos se utilizaron medio LB y medio con 2% v/v de DMSO, mientras que como control positivo se empleó Diclofenaco sódico a 60 µg/mL ⁵⁶.

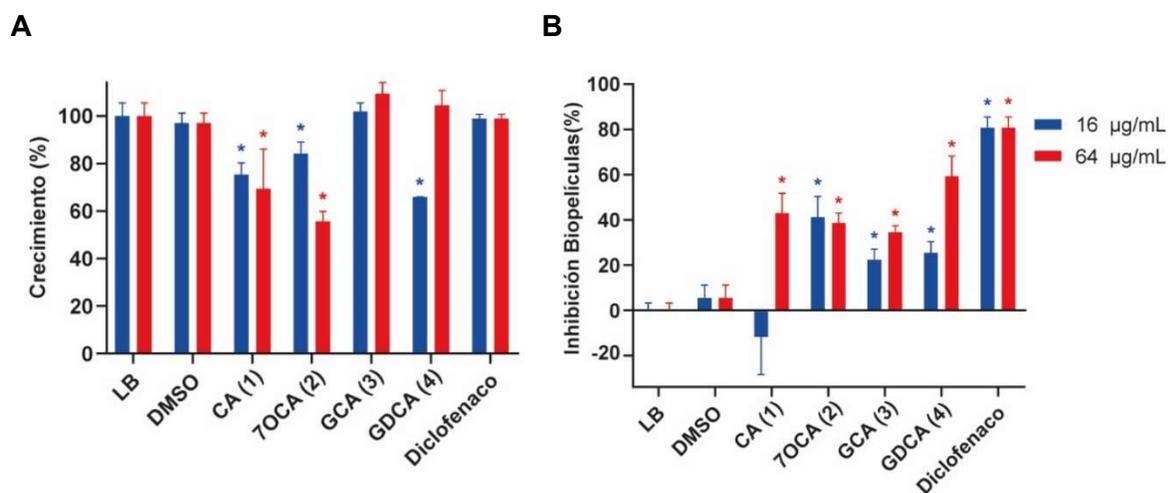


Figura 28. Resultados del ensayo de crecimiento y actividad anti-biopelícula contra MRSA de los compuestos **1–4**.

En general, los compuestos **1** y **2** presentaron una ligera inhibición en el crecimiento bacteriano, mientras que el compuesto **3** no presentó ninguna diferencia significativa en el crecimiento con respecto a los controles. Por otro lado, el compuesto **4** presentó un comportamiento singular al inhibir ligeramente el crecimiento bacteriano a la concentración más baja (16 µg/mL) sin afectarlo a la concentración más alta (64 µg/mL) (**Figura 28A**). En cuanto a las biopelículas, el compuesto **4** también destacó, pues a 64 µg/mL inhibió notablemente la formación de éstas, casi equiparándose con el diclofenaco sódico (control positivo). Un efecto semejante a ambas concentraciones se observó en el compuesto **3** (**Figura 28B**). Por lo anterior, se identificó al compuesto **4** (GDCA) y al compuesto **3** (GCA) como los compuestos con la mejor actividad anti-biopelículas en MRSA. Es importante destacar que, hasta la fecha, este es el primer trabajo que reporta la actividad anti-biopelícula de una serie de ácidos biliares en MRSA.

La actividad biológica de los ácidos biliares se ha descrito ampliamente, tal como bactericidas y antisépticas. Además, se ha encontrado que el CA (1) altera fuertemente la viabilidad celular de *S. aureus*, incluso a bajas concentraciones, causando la reducción del pH intracelular, la disipación del potencial eléctrico transmembranal, la reducción de los niveles intracelulares de potasio y pérdida de la integridad de la membrana, lo que conduce a una fuga del contenido intracelular, principalmente de proteínas y sales nucleicas. Estos efectos bactericidas relacionados al pH intracelular se observan prominentemente con las especies no conjugadas, como el CA (1) y el 7OCA (2), cuyo alto pK_a lleva a la disipación de la diferencia de potencial transmembranal y, por tanto, de la viabilidad celular. Por otro lado, las sales secundarias, como el GCA (3) y el GDCA (4), los cuales poseen un pK_a más bajo, logran ionizarse totalmente y no son capaces de atravesar la membrana, por este motivo, su actividad bactericida se reduce considerablemente⁶⁸. Lo anterior puede relacionarse para el caso del GCA (3), el cual no demostró diferencia significativa en el crecimiento a ninguna de las concentraciones de prueba, sin embargo, no logra explicar el comportamiento del GDCA (4) a 16 $\mu\text{g/mL}$, el cual inhibió el crecimiento en cerca 35%.

En cuanto a la actividad anti-biopelícula de GCA (3) y GDCA (4) en MRSA, a la fecha y, como se mencionó anteriormente, no hay reportes en la literatura, aunque, hay poca evidencia de que las sales biliares tienen un rol importante en el *quorum sensing* (QS). Una de las vías de señalización más estudiadas en este tema involucra las hidrolasas de sales biliares (BSH) y las acil-homoserina lactonasas (AHL); dos enzimas con alta similitud filogenética y fisiológica; que participan en la expresión de factores de virulencia en bacterias Gram(-) y confieren resistencia antibacteriana ante los β -lactámicos, como a las penicilinas y cefalosporinas⁶⁹⁻⁷¹. Otra evidencia apunta a que el rol de los ácidos biliares en el QS involucra las bombas de flujo AdeBC y AcrB⁷²⁻⁷⁴ o los transportadores homólogos a la glicoproteína-P expresados en bacterias Gram(+)⁷⁵. No obstante, ninguna de esta evidencia ha sido concluyente sobre este tema aplicado a *Staphylococcus* spp..

5.7. Estudios de metabolómica y redes moleculares

Con el objetivo de explorar la diversidad metabólica que ofrecen las especies de estudio, se construyeron y analizaron 5 redes moleculares usando el flujo de trabajo descrito en el apartado 4.10. La primera red consistió en una que incluye todos los extractos obtenidos mapeados categóricamente en función del origen geográfico de la bacteria que los generó (Red Molecular General). De esta manera se logró visualizar el repertorio global y las familias de los metabolitos globales y su relación con su ecosistema. La red global se

formó de 8,000 nodos, 4,144 agrupados en 463 clústeres de al menos dos nodos y 3,856 nodos aislados o *singletons*. Los nodos se distribuyeron por categoría como se muestra en la **Figura 29**. La mayor cantidad de nodos se encontró en los extractos de las bacterias del cenote Tzá-Itzá, seguido del manglar de la reserva “El Palmar”. La intersección entre estos dos grupos acumuló casi el 29% de los metabolitos, mientras que la intersección de todos los grupos reunió a cerca del 11%. Los resultados de dereplicación automática revelaron que una gran cantidad de los datos espectrométricos de esta última intersección correspondían a grasas de alto peso molecular, como derivados de ácido linoleico, glicerolípidos y forfometilcolinas; residuos de purinas y ácidos nucleicos; residuos sueltos de aminoácidos y dipeptidos; y azúcares y carbohidratos en general como la sucralosa, maltosa y la isopaltulosa. Posteriormente, los resultados se curaron de forma manual para omitir redundancias y corroborar la correspondencia de metabolitos identificados y se lograron encontrar 20 metabolitos significativos, de los cuales se presentan 17 (**Tabla 12**); el resto de los hits se presentan en la sección **5.7.2** junto con los demás metabolitos exclusivos de la bacteria *Streptomyces* sp.

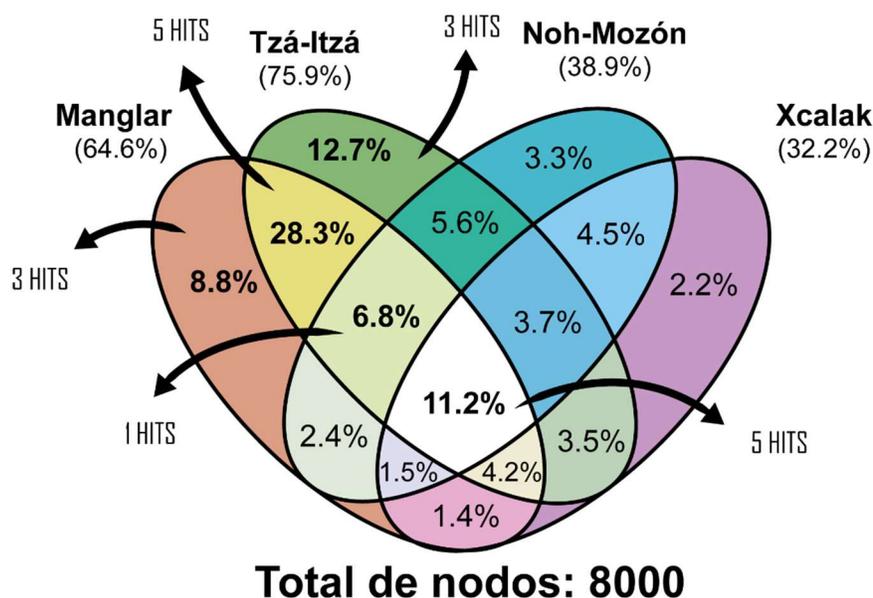


Figura 29. Visualización de la distribución de nodos en los extractos en función del origen geográfico de las cepas de estudio, y número de *hits* significativos de las regiones de interés.

Entre los resultados de la **Tabla 12** destacan la Bafilomicina A₁, un potente antibiótico⁷⁶, antimicótico⁷⁷, antiparasitario, citotóxico⁷⁸, inmunosupresor, inhibidor de la síntesis del éster de colesterilo⁷⁹ y agente anti-osteoporosis⁸⁰. Fue aislado por primera vez en 1983 de *Streptomyces griseus*⁸¹ y posteriormente en otras bacterias del género *Streptomyces*^{82,83}. La Bafilomicina A₁ (**Figura 30**) forma parte de un grupo de antibióticos

macrólidos compuesto por una lactona cíclica de 16 miembros. Es extensamente estudiado como inhibidor de la autofagia a través de la prevención de la maduración de las vacuolas autofágicas o por la inhibición de la acidificación del lisosoma^{84,85}. Además, se ha explorado su acción como agente antitumoral y como aclarador de agregados proteicos en enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Párkinson y Huntington⁸⁶. A pesar del amplio repertorio de actividades biológicas que presenta ese metabolito, su uso clínico ha sido detenido debido a serios problemas de toxicidad, principalmente porque su presencia en organismos eucariotas produce un transporte anormal de K⁺ a través de la membrana mitocondrial, lo que inhibe la fosforilación oxidativa y en consecuencia la producción de ATP, causando finalmente la muerte celular⁸⁷.

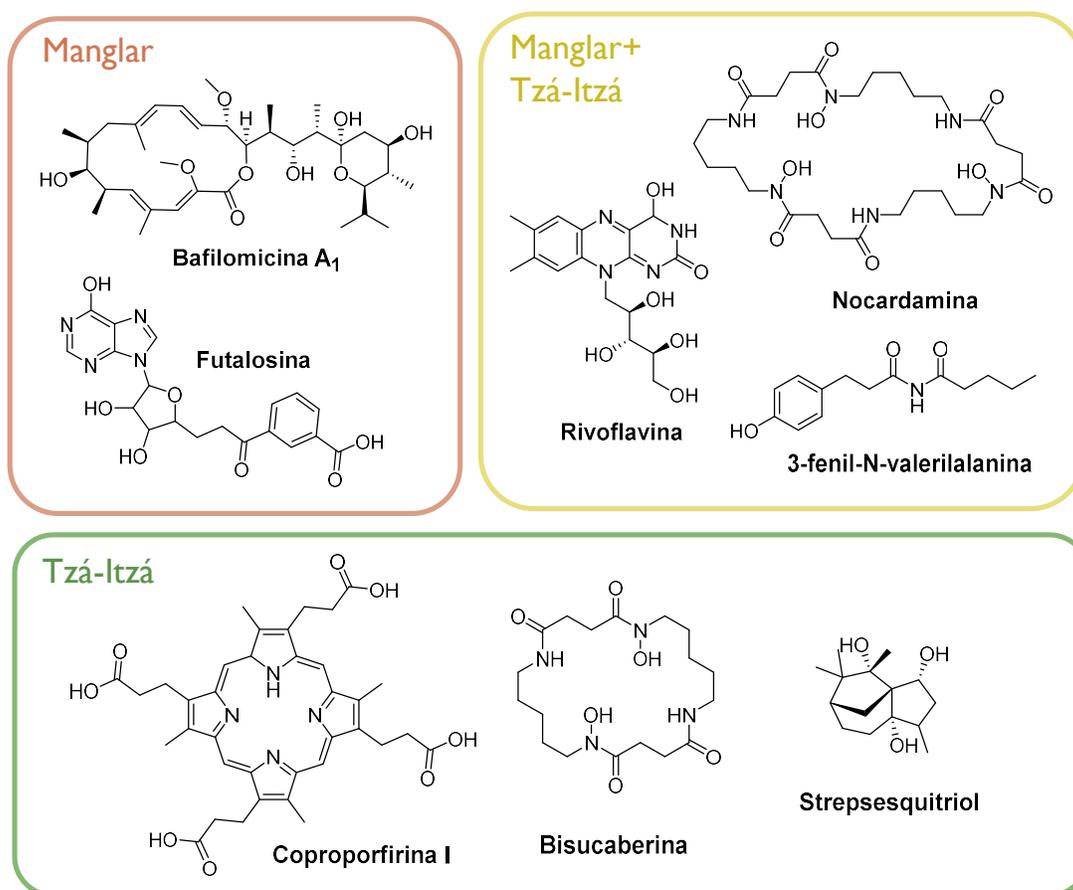


Figura 30. Algunos metabolitos anotados automáticamente en la RM general.

En segundo lugar, resalta la desferroxamina E o nocardamina (**Figura 30**), un sideróforo con ligera actividad antibacteriana descrita⁸⁸ que se presentó exclusivamente en organismos halotolerantes. Otro compuesto muy semejante anotado automáticamente fue la bisucaberina, un sideróforo análogo a la nocardamina. Ambos compuestos se componen de unidades alternadas de ácido succínico y N-hidroxicadaverina, unidas por enlaces

amida. No obstante, la bisucaberina se compone de dos pares de cada unidad, mientras que la nocardamina posee tres de ellas⁸⁹. Los sideróforos, en general, son productos bacterianos que facilitan la adquisición de iones de hierro y otros metales, y que se ha sugerido que contribuyen a comunicaciones complejas entre diferentes microorganismos en un mismo ambiente⁹⁰. Entre sus actividades biológicas destacadas está la inhibición de la formación de biopelículas en *Micobacterium* spp. y mejoramiento en la lisis de células cancerígenas mediadas por macrófagos^{91,92}. Además, recientemente se ha expuesto que varios sideróforos provocan la producción de superóxidos extracelulares en ambientes con niveles variables de nutrientes. Se ha sugerido que este comportamiento se relaciona con mecanismos de supervivencia en ambientes con concentraciones limitantes de Fe y de competencia con otros organismos. Las bacterias aerobias incrementan la solubilidad del Fe por dos mecanismos principales, 1) a través de la formación de complejos orgánicos (como los sideróforos *per se*) y 2) a través de la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ empleando agentes reductores fuertes (como los superóxidos). Por otro lado, los superóxidos son reconocidos por ser especies tóxicas para las células, por lo que otros organismos en el mismo espacio que no estén adaptados a bombear estas especies reactivas fuera de sus células, quedan suprimidos del ambiente⁹³.

En tercer lugar, el farnesol, un precursor fundamental en la biosíntesis de terpenos en todos los organismos. Recientemente se ha descubierto su importante rol en la síntesis de sesquiterpenos de diversos núcleos funcionales en bacterias, como el núcleo geosmina, cembranoide y labdano⁹⁴. Su presencia puede indicar una alta expresión en la producción de terpenos y meroterpenos en bacterias de los géneros *Bacillus*, *Micobacterium* y *Halobacillus* crecidas en medio ISP2 de este trabajo.

En cuarto lugar, el strepsesquitriol, un sesquiterpeno aislado por primera vez en 2013 de una especie de *Streptomyces* originaria del fondo marino en el océano Índico. Se ha reconocido su actividad antiinflamatoria mediante ensayos de Factor de Necrosis Tumoral inducida por liposacáridos (TNG α -LSP)⁹⁵ y actualmente su aplicación como agente antiinflamatorio está patentada⁹⁶.

Finalmente, cabe acentuar la presencia de una serie de isoflavonas, la apigetrina, daidzina, genistina y glicitina, estas tres últimas se han descrito en organismos bacterianos cuando se cultivan en presencia de productos de soya⁹⁷ y se tratarán con detalle más adelante.

Tabla 12. Hits representativos de la RM general

Compuesto	Masa del precursor	Aducto	Formula molecular	Masa teórica	Error (ppm)	Distribución	Ocurrencia (cepa / medio)
Bafilomicina A ₁	645.401	[M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₅₈ O ₉	622.4081	+ 4.9	Man (100%)	NCA-119 / ISP2
Ornitina-Acido cólico	523.377	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₅₀ N ₂ O ₆	522.3669	+ 5.4	Man (100%)	NCA-145 NCA-119
Futalosina	415.127	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₇	414.1175	+ 5.2	Man (100%)	NCA-145 / DSC
Desferrioxamina E/ Nocardamina	623.341	[M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉	600.3483	+ 4.9	Man (44.4%) Tzá (55.6%)	NCA-145 NCA-119 / ISP2 NCA-315
Riboflavina	377.147	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376.1383	+ 3.8	Man (33.3%) Tzá (66.7%)	NCA-145 / ISP2 NCA-315 / DSC NCA-265 / ISP2 NCA-284 / ISP2
3-fenil-N- valerilalanina	250.145	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₉ NO ₃	249.1365	+ 4.9	Man (40%) Tzá (60%)	NCA-119 / DSC NCA-284 / DSC NCA-265 / DSC
Ala-Phe	237.124	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236.1161	+ 2.7	Man (33.3%) Tzá (66.7%)	NCA-119 / ISP2 NCA-265 / ISP2 NCA-284 / ISP2
Val-Pro	215.140	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	214.1317	+ 4.6	Man (33.3%) Tzá (66.7%)	NCA-119 / ISP2 NCA-284
Farnesol	223.206	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₆ O	222.1984	+ 1.6	Man (22.2%) Tzá (55.6%) Noh (22.2%)	NCA-119 / ISP2 NCA-284 / ISP2 NCA-265 / ISP2 NCA-291 / DSC
Daidzina	417.120	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₉	417.1107	+ 4.8	Man (26.6%) Tzá (28.9%) Noh (20.0%) Xca (24.5%)	NCA-119 NCA-284 / DSC NCA-265 / ISP2 NCA-305 / DSC NCA-455 / DSC

Tabla 11. (continuación)

Compuesto	Masa del precursor	Aducto	Formula molecular	Masa teórica	Error (ppm)	Distribución	Origen (cepa / medio)
Genistina	477.105	[M+HCO ₂] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1056	+ 4.7	Man (31.1%) Tzá (34.5%) Noh (20.7%) Xca (13.7%)	NCA-119 NCA-265 / ISP2 NCA-284 / DSC NCA-291 / DSC NCA-305 NCA-455 / DSC
Glicitina	447.130	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.1213	+ 3.2	Man (27.3%) Tzá (27.3%) Noh (18.1%) Xca (27.3%)	NCA-119 / DSC NCA-284 / DSC NCA-305 / DSC NCA-455 / DSC
Apigetrina	431.100	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1056	+ 3.8	Man (26.7%) Tzá (33.3%) Noh (13.3%) Xca (26.7%)	NCA-119 / DSC NCA-284 / DSC NCA-305 / DSC NCA-455 / DSC
Gaburedina A	295.130	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	294.1216	+ 4.5	Man (25.0%) Tzá (50.0%) Noh (12.5%) Xca (12.5%)	NCA-119 NCA-145 / DSC NCA-265 / DSC NCA-284 NCA-315 / DSC NCA-305 NCA-455 / DSC
Coproporfirina I	328.143	[M+2H] ²⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₄ O ₈	654.2690	+ 3.8	Tzá (100%)	NCA-265 / DSC NCA-284 / ISP2
Bisucaberina	401.241	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ N ₄ O ₆	400.2322	+ 3.8	Tzá (100%)	NCA-315 / DSC
Strepsesquitriol	237.186	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₆ O ₃	254.1882	+ 4.6	Tzá (100%)	NCA-284 / DSC NCA-315 / ISP2

5.7.1. Estudio metabolómico de *Glutamicibacter* sp.

La red molecular de *Glutamicibacter* sp., se construyó usando los datos obtenidos de los extractos de mediana escala y de pequeña escala; y se procesó y curó de forma manual. Se excluyeron los datos del cultivo a mediana escala en medio ISP2 debido a una contaminación en el medio. En general la red se constituye de 2,912 nodos agrupados en 232 clústeres y 1376 *singletons*. Las clasificaciones químicas más abundantes según el algoritmo *ClassyFire* son las moléculas de naturaleza lipídica, seguido de los aminoácidos y derivados; en tercer lugar, los fenilpropanoides y policétidos (**Figura 31**). Cerca del 78% de los nodos no pudieron ser clasificados en ninguna familia química. En cuanto a la diferenciación por medio de cultivo, se encontró que la bacteria se mostró significativamente más afín al medio DSC-ASW, pues poco menos del 95% de los nodos de la red se detectaron en este medio y solo el 6.25% son metabolitos exclusivos del medio ISP2 (**Figura 33.A**). De igual manera, un total de 54 clústeres corresponden a nodos exclusivos del medio DSC-ASW, y las familias químicas identificadas como ácidos biliares, alcoholes de cadena larga, taninos hidrolizables, derivados de ácidos grasos, aminas, sesquiterpenoides y macrólidos y macrolactamas son exclusivos de este medio. Por su parte, la separación por sustrato (biomasa y sobrenadante) y por disolvente de extracción no mostró diferencias significativas en la distribución de los datos (Biomasa \cap Pellet = 44% y AcOEt \cap MeOH = 37%), además de que estos grupos no albergan ningún tipo de clúster o familia química en particular.

Por su parte, la dereplicación automática logró anotar 144 metabolitos, principalmente grasas, residuos de aminoácidos además de la nocardamina, riboflavina, gaburedina A y bisucaberina mencionadas anteriormente en la **Tabla 12**. Adicionalmente se anotaron cinco metabolitos significativos y exclusivos de esta cepa (**Tabla 13**), entre los que destacan varios iones precursores del CA y el GCA aislados y caracterizados como los compuestos **1** y **3**, respectivamente. Así como el ácido desoxicólico, glicodesoxicólico, litodesoxicólico, 3-oxo-cólico, Ala-ácido cólico, etc., que formaron el clúster de ácidos biliares y derivados (**Figura 32**).

Tabla 13. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de *Glutamicibacter* sp. (NCA-315).

Compuesto	Masa del precursor (m/z)	Aducto	Fórmula molecular	Masa teórica	Error (ppm)
Ácido cólico (1)	426.323	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.2876	+ 3.8
	355.264	[M-3H ₂ O+H] ⁺			+ 2.4
	834.612	[2M+NH ₄] ⁺			+ 3.6
Ácido glicólico (3)	430.296	[M-2H ₂ O+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465.309	+ 1.9
Ala-Ácido cólico	480.334	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₆	479.3247	+ 4.2
Pantetina	555.254	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₃ N ₄ O ₈ S ₂	554.2444	+ 4.2
	577.237	[M+Na] ⁺			+ 4.9
Ciclo Trp-Ala	258.125	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O ₂	257.1164	+ 5.0

Por otro lado, se detectó la presencia de la pantetina; la forma dimérica de la panteteina, un importante intermediario en la producción de CoA; y finalmente un dipéptido cíclico de núcleo dicetopiperazina formado de triptófano y alanina, cuya fragmentación se ha estudiado ampliamente⁹⁸, aunque su presencia en microorganismos no ha sido descrita hasta ahora.

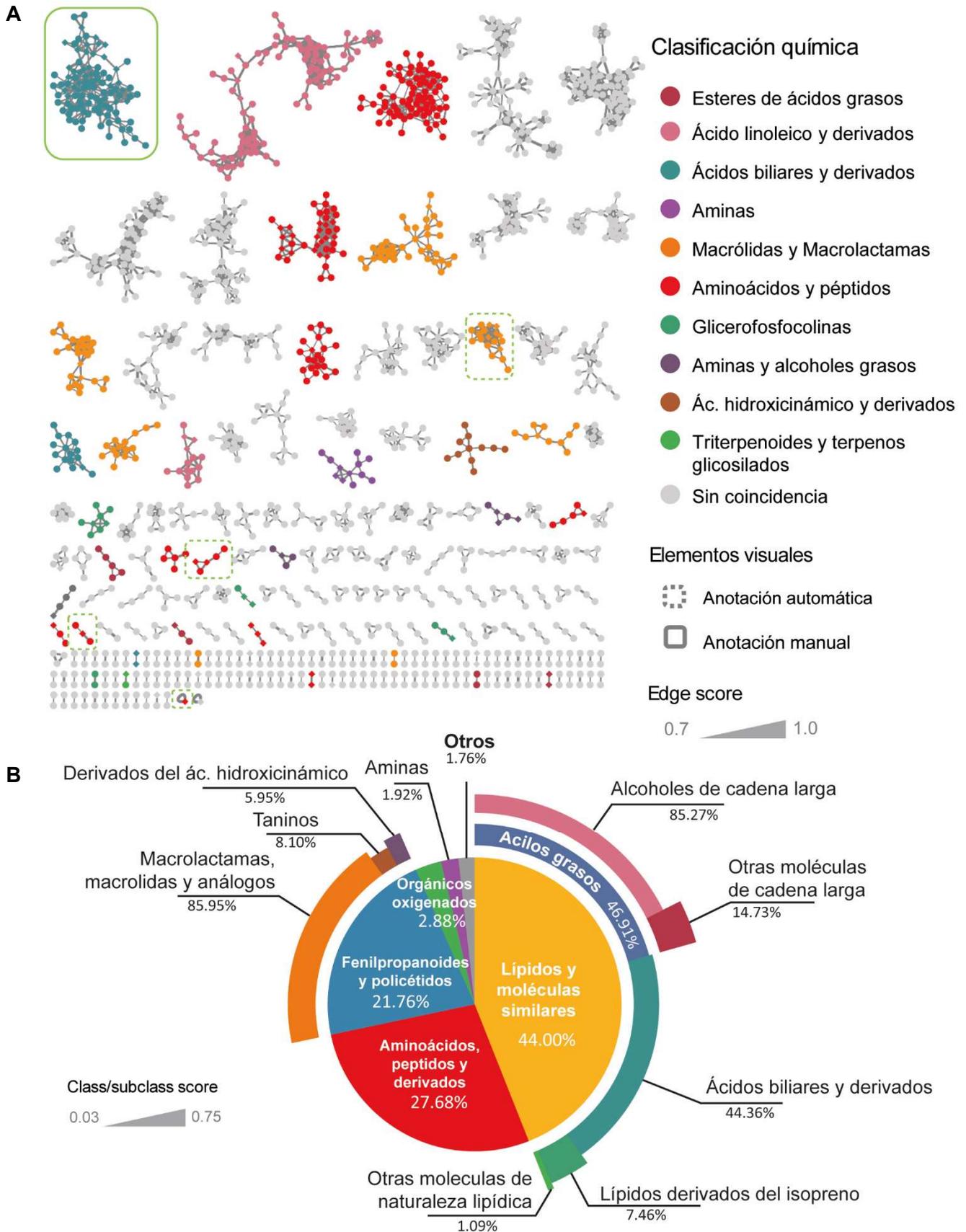


Figura 31. A) Red molecular de *Glutamicibacter* sp. **B)** Distribución de las familias químicas identificadas.

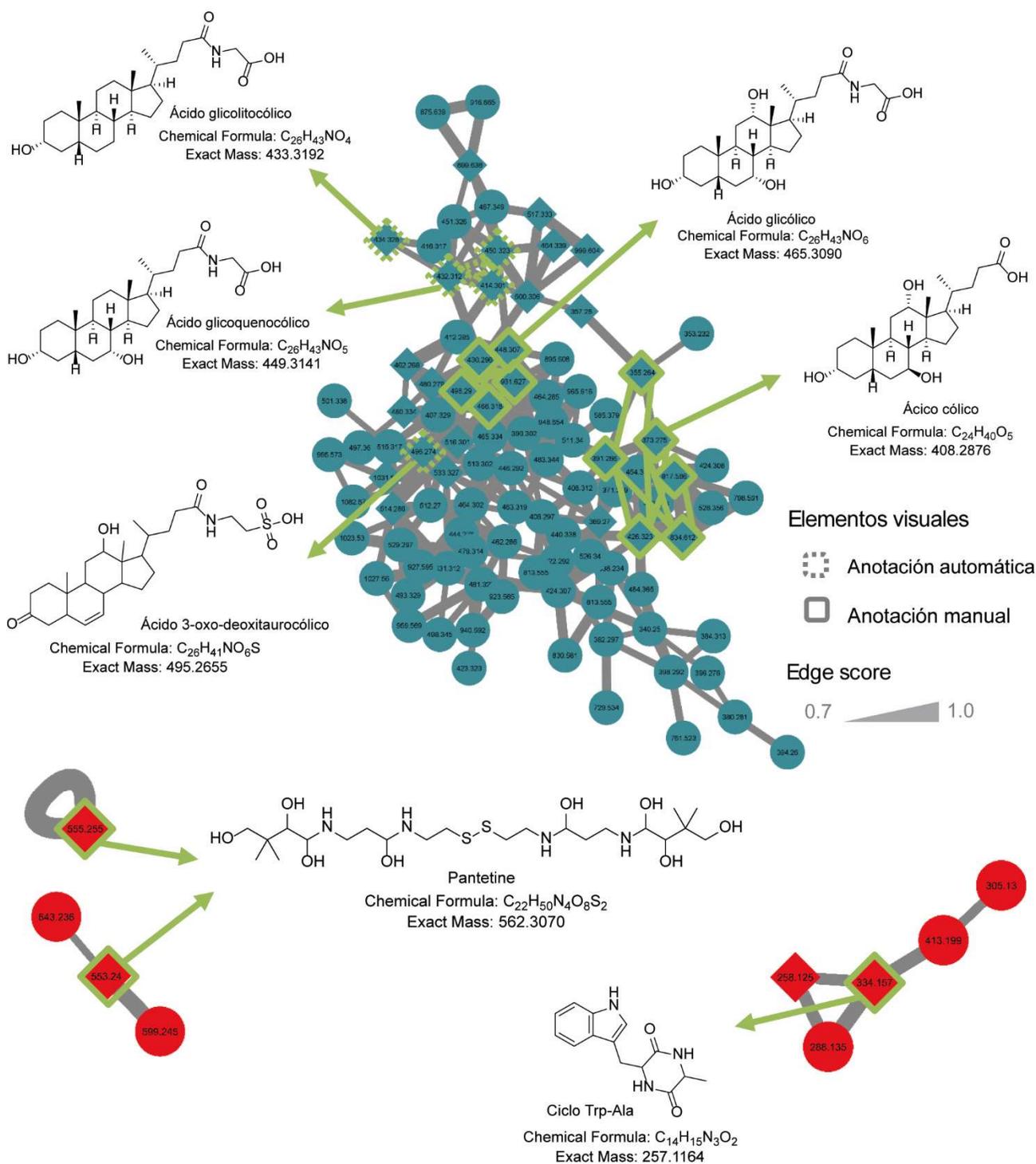


Figura 32. Análisis de los clústeres de la RM de *Glutamicibacter* sp. Las líneas punteadas corresponden a anotaciones automáticas, mientras que las líneas sólidas son compuestos aislados.

5.7.2. Estudios metabolómicos de *Streptomyces* sp.

La red molecular de *Streptomyces* sp., se construyó empleando los datos de cultivo a pequeña y mediana escala. La base de datos resultante se procesó y curó de forma manual. En general, la red se constituye de 1,649 nodos agrupados en 150 clústeres y 752 *singletons*. Las clasificaciones químicas más abundantes según el algoritmo de *ClassyFire* son los ácidos orgánicos y derivados, seguidos de los lípidos y moléculas de naturaleza lipídica, y en tercer lugar los compuestos oxigenados, principalmente carbohidratos y carbohidratos conjugados (**Figura 34**). Un poco más del 95% de los nodos no lograron ser identificados dentro de ninguna familia química. En cuanto a la diferenciación por medio de cultivo, esta bacteria mostró una afinidad muy marcada al medio ISP2, ya que en éste se acumularon el 90% de los datos expresados en la red (**Figura 33.B1**). Además, 135 de los 150 clústeres mostraron una expresión mayoritaria muy significativa en este medio de cultivo y las clasificaciones de sesquiterpenoides, aminoácidos, carbohidratos, y los ácidos tetracarboxílicos y derivados (entre ellos la monactina y bonactina) se presentaron exclusivamente en este medio de cultivo. Por su parte, el metabolito identificado como alpienamida A se expresó preferentemente en el medio ISP2, aunque también se encontró escasamente en datos provenientes del medio DSC-ASW (**Figura 35**). Por otra parte, la diferenciación por sustrato (biomasa o sobrenadante) no mostró relevancia, ya que más del 80% de los datos se encuentran en el sobrenadante y cerca del 56% se encuentra en ambos sustratos. Sin embargo, la diferenciación por disolvente de extracción sí mostró relevancia, dado que poco más del 70% de los datos (**Figura 33.B2**) y la totalidad de los clústeres con identificación química o algún *hit* se hallaron en extractos hechos con AcOEt.

Por su parte, la dereplicación automática logró anotar 76 metabolitos; muchos de los cuales son glicerolípidos, ácidos grasos y algunos coincidentes con otras bacterias ya fueron mencionados en la **Tabla 12**, como la nocardamina, riboflavina, gaburedina A, mientras que los metabolitos más significativos exclusivos de esta cepa se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Metabolitos exclusivos de *Streptomyces* sp. encontrados en los estudios de metabolómica por GNPS.

Compuesto	Masa del precursor (m/z) ^c	Aducto	Fórmula molecular	Masa teórica	Error (ppm)
Monactina	768.493	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	750.4554	+ 4.9
Bonactina	418.282	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₁ H ₃₆ O ₇	400.2461	+ 5.0
	423.237	[M+Na] ⁺			+ 2.7
	401.255	[M+H] ⁺			+ 4.0
Alpienamida A	366.190	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₉ NO ₆	343.1995	+ 2.0
	344.208	[M+H] ⁺			+ 3.6
	342.193	[M-H] ⁻			+ 2.3
2,2,5,9,13-Pentametil-4,8,12-ciclopentadecatrien-1-ol	273.259	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₄ O	290.261	+ 4.8
Metil,2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido[3,4b]indol 3-carboxilate	231.113	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	230.1055	+ 0.8

Entre los metabolitos anotados destacan la monactina y la bonactina, los cuales son metabolitos pertenecientes a la familia de los ionóforos conocidos más comúnmente como antibióticos macrotetrólidos. Estos compuestos han exhibido propiedades antibióticas⁹⁹ antihelmínticas, larvicidas, inmunosupresoras e inhibidoras del transporte de glicoproteínas, además de bloqueadoras de los canales de Ca²⁺. Se aislaron por primera vez en 1962 y desde entonces se ha hallado en diversas especies de *Streptomyces* en todo el mundo¹⁰⁰⁻¹⁰³. Su identificación mediante MS ha sido ampliamente estudiada y ha demostrado tener un patrón característico y diagnóstico cuando se somete a ESI-MS¹⁰⁴. La monactina es una molécula cíclica con cuatro unidades conectadas por enlaces de éster. Cuando se somete a ionización, un mecanismo de fragmentación conducido por la reorganización de McLafferty de ácidos carboxílicos causa la separación de las cuatro subunidades y pérdidas consecutivas y iones de m/z 184 o m/z 198, en función de la sustitución de las cadenas laterales. Estas características fueron confirmadas en los espectros de fragmentación de las muestras y de esta manera se confirmó la presencia de este macrotetrólido. Actualmente, la monactina y sus análogos cercanos (nonactina, dinactina, trinactina y tetranactina) carecen de un uso terapéutico. No obstante la nonactina se ha explorado su aplicación como quelante específico de iones de amonio y como agente de control biológico contra hongos en la industria alimenticia¹⁰².

Por otro lado, también se detectó la presencia de alpiniamida A, un policétido lineal que ha sido aislado de especies de *Streptomyces* endofíticas de plantas del género *Alpinia* y asociadas a esponjas marinas¹⁰⁵. Se ha demostrado su actividad antimicrobiana contra *Fusarium solani*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus subtilis*¹⁰⁶. Recientemente su biosíntesis y aplicaciones han obtenido especial atención debido al increíble potencial que representan los BGC que codifican su biosíntesis. La alpiniamida es un metabolito de biogénesis mixta sintetizado por la ruta de los policétidos (a través de las policétidos-sintasas, PKS) y de la de los péptidos no ribosomales (a través de las sintasas de péptidos no ribosomales, NRPS). Recientemente se ha demostrado que la biosíntesis de este metabolito y de otros metabolitos con estructura semejante, no es lineal y, además, involucra modificaciones inusuales en el uso de aciltransferasas-*cis* y *trans* en diferentes módulos de PKS y multienzimas PKS.NRPS¹⁰⁷.

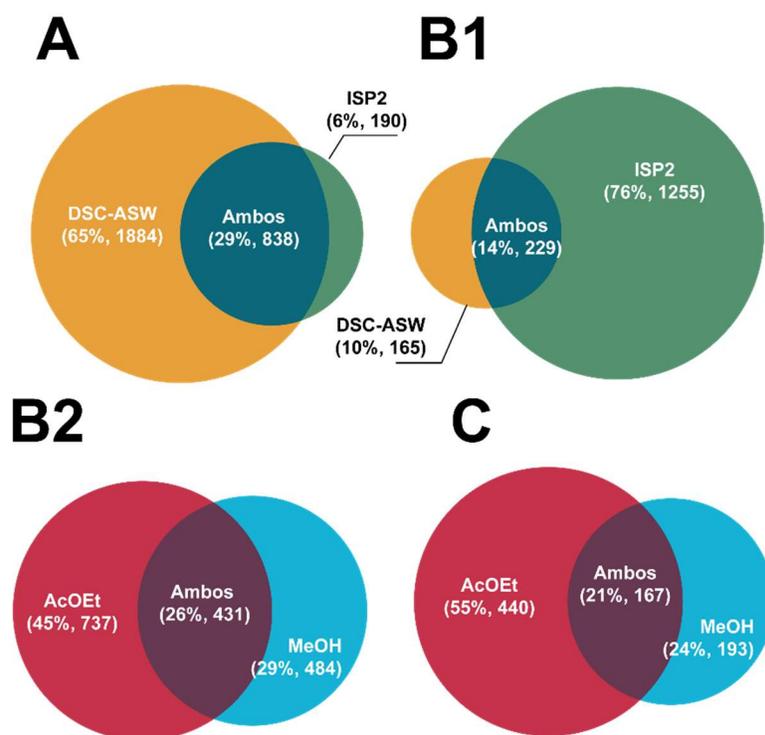


Figura 33. Diagrama de Venn cuantitativo de la distribución de los datos de (A) *Glutamicibacter* sp. por medio de cultivo, (B) de *Streptomyces* sp. por medio de cultivo y por disolvente de extracción y (C) de *Nocardioopsis* sp. por medio de cultivo.

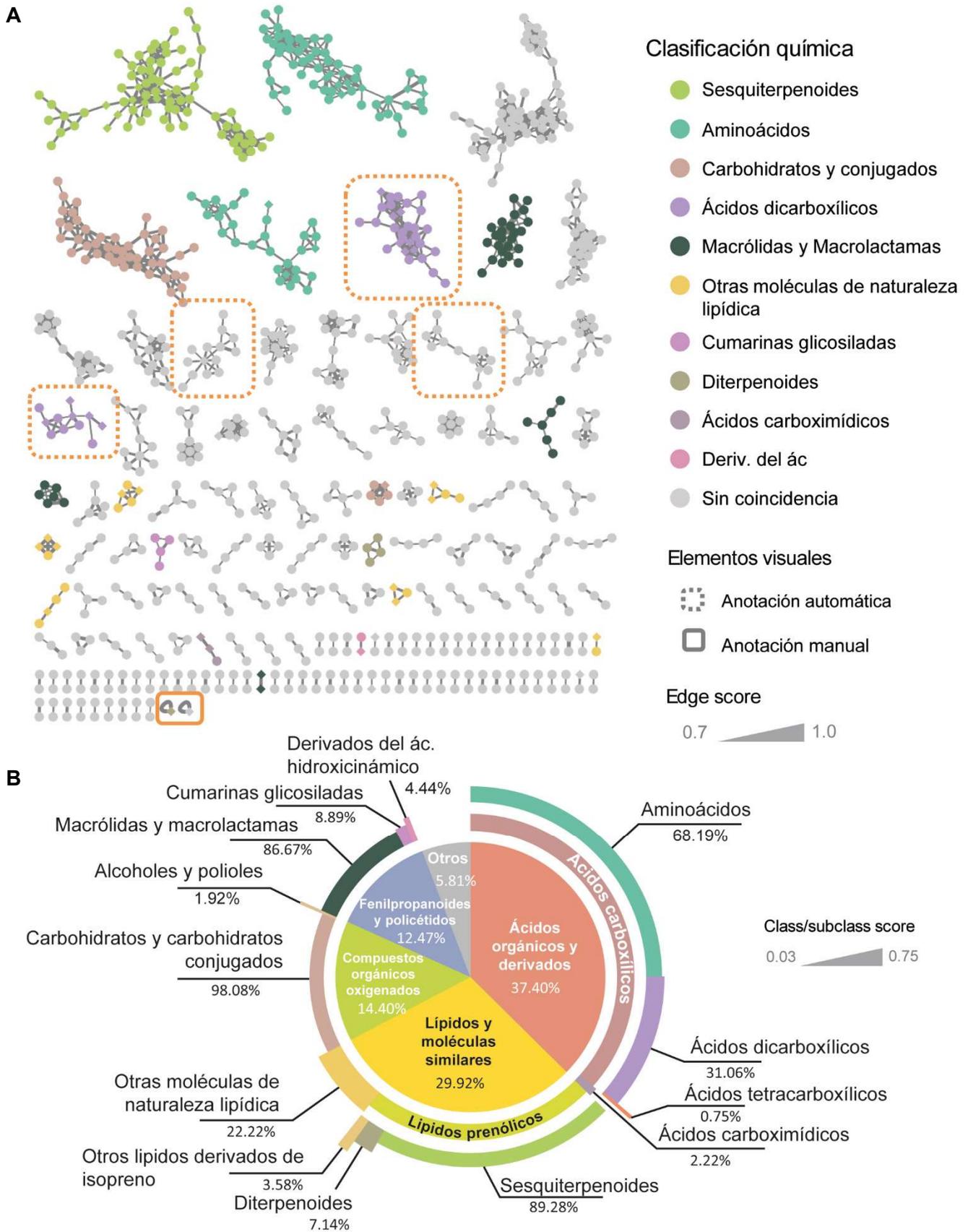


Figura 34. A) Red molecular de *Streptomyces* sp. **B)** Distribución de las familias químicas identificadas.

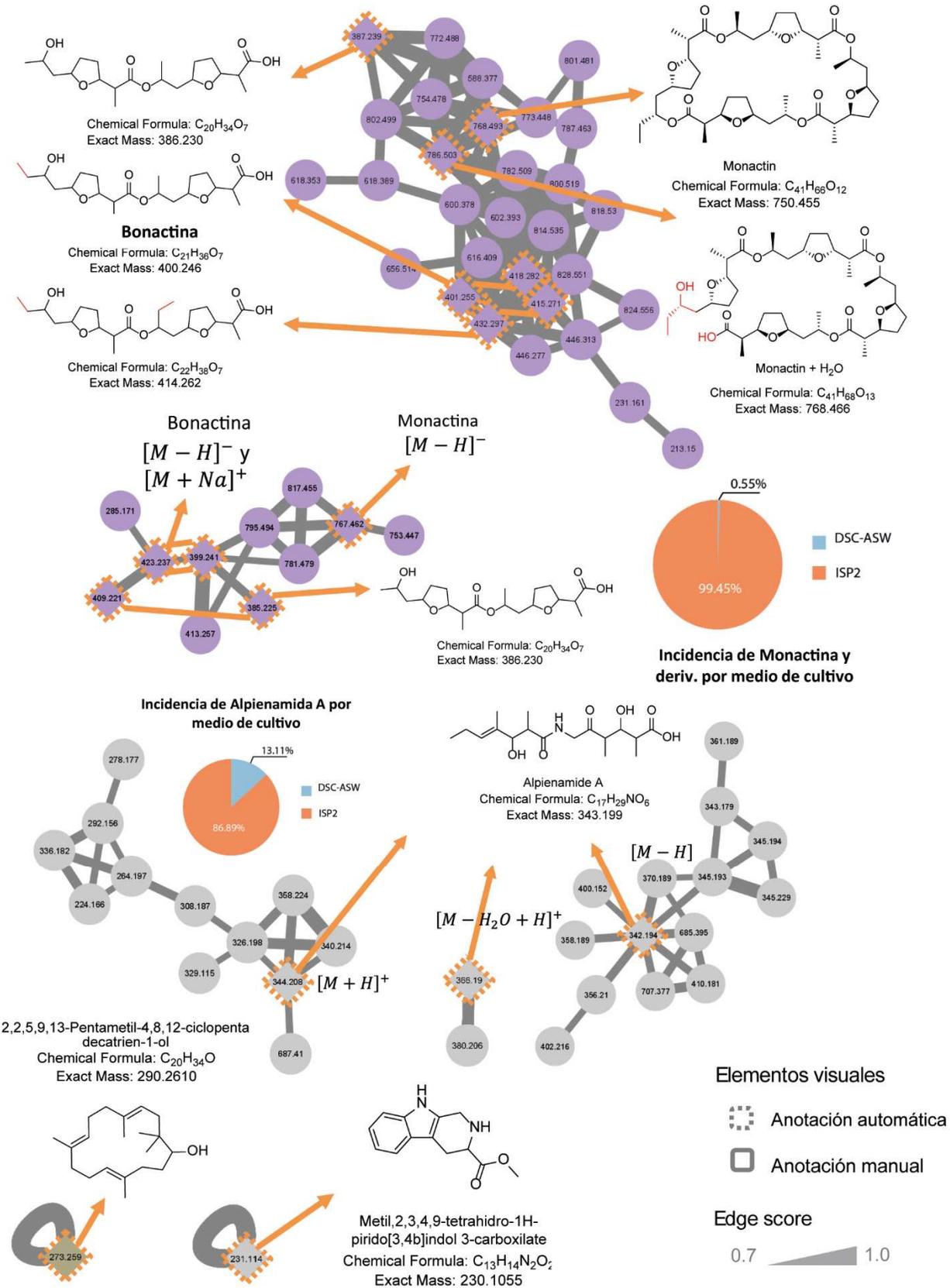


Figura 35. Análisis de los clústeres de la RM de *Streptomyces* sp. Las líneas punteadas corresponden a anotaciones automáticas.

5.7.3. Estudios metabolómicos de *Nocardiopsis* sp.

La red molecular de la bacteria *Nocardiopsis* sp. se construyó empleando los datos obtenidos por HRESIMS de los extractos de pequeña mediana escala y usando nos métodos de elución diferentes. El primer método se describe en el apartado 4.5 de este documento (método general), mientras el segundo comienza con una mezcla constituida por MeCN (A) y agua con H₂CO₂ (0.1%; B), en un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 70% A hasta 100% A en 3 min, manteniendo la composición isocrática por 6.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.1 min, utilizando un flujo de 0.3 mL/min.

En general, la red se constituye de 804 nodos agrupados en 67 clústeres y 437 *singletons*. Las clasificaciones químicas más abundantes según el algoritmo de *ClassyFire* son los lípidos (39%) seguido muy de cerca por los fenilpropanoides y policétidos (35%), en tercer lugar, los aminoácidos y finalmente una pequeña proporción de heterociclos, constituidos por Pironas y derivados (**Figura 36**). En lo tocante a la distribución por medio de cultivo, no fue posible realizar comparaciones ya que la cepa no mostró viabilidad en medio ISP2. Sin embargo, si fue posible separar las variables por sustrato y disolvente. En cuanto al sustrato (biomasa o sobrenadante), no se observó relevancia en su distinción, pues casi el 90% de los datos se encontraron en los extractos hechos del sobrenadante. Por su parte, la distinción por disolvente si resultó relevante, dado que la cantidad de datos obtenidos de los extractos hechos con AcOEt fue más de dos veces mayor a los extractos con MeOH; además, los datos obtenidos con cada disolvente fueron muy diferenciados (**Figura 33.C**) ($\text{AcOEt} \cap \text{MeOH} = 20\%$) y existen clústeres exclusivos fuertemente diferenciados entre disolventes.

En total, la dereplicación automática encontró 24 metabolitos, entre los que destacan ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos conjugados con fructosa. Los *hits* más importantes corresponden al pequeño grupo de las pironas (**Figura 36**) y algunos más a los policétidos y los lípidos (**Tabla 15**).

Tabla 15. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de *Nocardiosis* sp.

Compuesto	Masa del precursor (m/z)	Aducto	Fórmula molecular	Masa teórica	Error (ppm)
Nocarpyrone K	265.145	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	266.1518	+ 1.8
Nocapyrone P	265.145	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	266.1518	+ 1.8
Paprazine	284.129	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	283.1208	+ 3.1
Acetato de 2,4-dihidroxiheptadecilo	331.285	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330.2770	+ 2.2
	313.275	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330.2770	+ 4.1

Entre los metabolitos anotados cabe destacar los análogos de la nocarpirona. Estos compuestos se han reportado como metabolitos la bacteria *Nocardiosis alba* CR167 y *Nocardiosis* sp. HB383, actinobacterias simbiotes del cono marino *Conus rolani*, del mar de Filipinas y la esponja *Halichondria panicea*, del mar Báltico en Alemania, respectivamente. Estos compuestos, junto con otros análogos, han demostrado actividad antibiótica contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida glabrata*, entre otras; actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2) y adenocarcinoma de colon (NIH3T3 y HT29), además de ser neuroactivo a través de la modulación la polarización de las células nerviosas^{108,109}. Las pironas y otros policétidos relacionados han sido aislados de diversos tipos de moluscos de muchos hábitats¹¹⁰⁻¹¹³, sin embargo, dichos estudios no habían probado la fuente de la producción de tales compuestos. Fue hasta 2013, cuando se logró probar la ruta biosintética de las γ-pironas en *N. alba*, revelando el clúster biosintético responsable de su biosíntesis a través de una PKS codificada por el clúster *npc*¹⁰⁹. El rol ecológico de estos compuestos y otros policétidos relacionados, aún es poco claro, pues se han hallado en contextos muy diferentes entre sí. La propuesta más aceptada hasta ahora es que podrían formar parte de un sistema de comunicación entre moluscos, o entre la bacteria y su hospedero, o incluso entre bacterias jugando un rol en el QS¹¹¹.

Por otro lado, también se logró anotar automáticamente la paprazina, un metabolito fenilpropanoide derivado del ácido cinámico encontrado de forma inédita en bacterias. Este compuesto es un constituyente principal de muchos extractos de AcOEt de plantas herbáceas, del cáñamo y de algunas orquídeas. He ha descrito su actividad antimicrobiana contra varios patógenos¹¹⁴, además de actividad antioxidante¹¹⁵ e inhibitoria de la melanogénesis¹¹⁶.

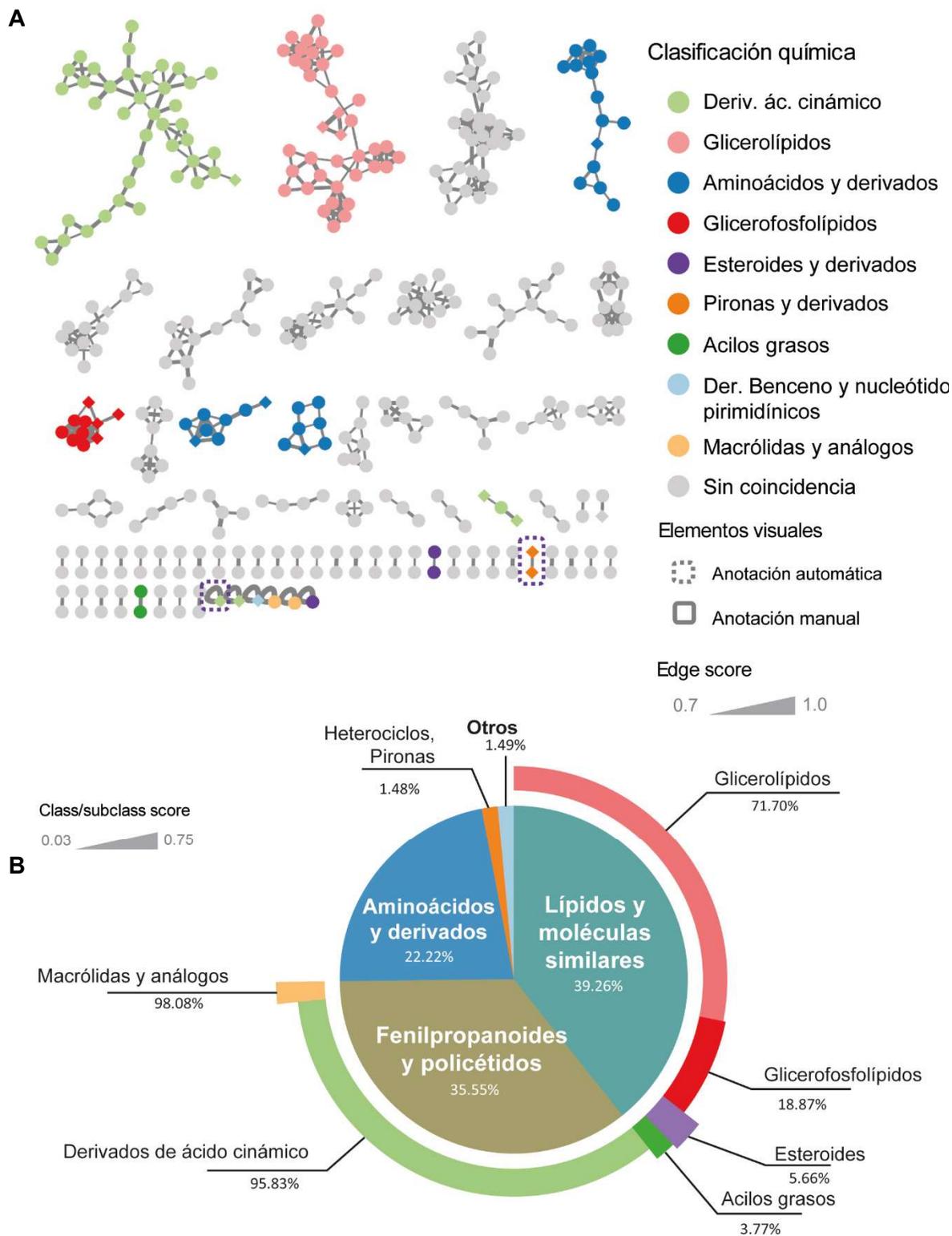


Figura 36. A) Red molecular de *Nocardiosis* sp. **B)** Distribución de las familias químicas identificadas.

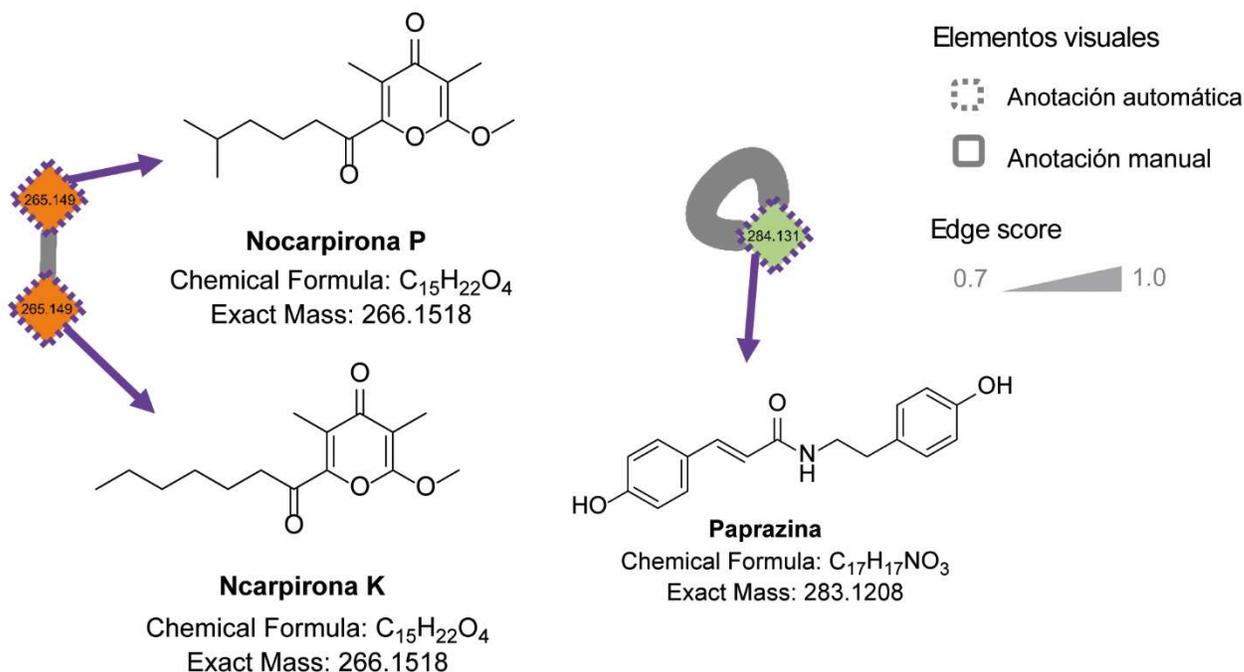


Figura 37. Análisis de los clústeres de la RM de *Nocardiosis* sp. Las líneas punteadas corresponden a anotaciones automáticas

5.7.4. Estudios metabolómicos de NCA-305

La red molecular de la bacteria NCA-305 se construyó empleando únicamente los datos de cultivo a pequeña escala. La base de datos resultante se procesó y curó de forma manual. En general, la red se constituye de 971 nodos agrupados en 77 clústeres y 438 *singletons*. Las clasificaciones químicas más abundantes según el algoritmo de *ClassyFire* son los aminoácidos, péptidos y análogos, seguido de las moléculas de naturaleza lipídica, y en tercer lugar los policétidos y fenilpropanoides (**Figura 38**). Estos últimos se integran principalmente de isoflavonoides, los cuales ya se mencionaron en la **Tabla 12**. En total, la dereplicación automática logró anotar 40 metabolitos; muchos de los cuales son residuos de aminoácidos y aminoácidos conjugados a cadenas lipídicas. Los *hits* más importantes corresponden a los isoflavonoides daidzina, genistrina, glicitina y apigetrina (**Figura 39**), los cuales ya fueron mencionados en la **Tabla 12**. Por otro lado, los metabolitos exclusivos de esta cepa se muestran en la **Tabla 16**

Tabla 16. Anotaciones realizadas a partir de la red molecular de NCA-305.

Compuesto	Masa del precursor (m/z)	Aducto	Fórmula molecular	Masa teórica	Error (ppm)
6-O-Acetilgenistina	475.125	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	474.1162	+ 3.2
Genisteína	539.099	[2M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.0528	+ 3.2
Piro Glu-Tyr	293.114	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₅	292.1059	+ 2.7
N-acetilfenilalanina	206.082	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207.0895	- 1.3

Entre los metabolitos anotados sobresale la familia de isoflavonoides que se han mencionado antes, a los que se anexa la 6-O-acetilgenistina y la genisteína. Estos polifenoles son conocidos por expresarse principalmente en plantas del orden Fabácea, es decir, en leguminosas. Sin embargo, desde 1975 estos compuestos se han encontrado en cultivos bacterianos de *Streptomyces* spp. y otros géneros de actinobacterias, como metabolitos secundarios de algunos líquenes¹¹⁷, y en algunos cultivos fúngicos¹¹⁸. Los isoflavonoides han exhibido una amplia variedad de actividad biológica, como antibiótica, antiviral, antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante. Más aún, la presencia las rutas metabólicas para la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides en hongos y bacterias ha sido descrita y confirmada^{119,120}. En este caso particular se presume que su presencia se debe a los derivados de soya presentes en el medio de cultivo, pues estos metabolitos son distintivos de fermentaciones de harina de soya. No obstante, no es posible comprobar esta hipótesis sin estudios más profundos.

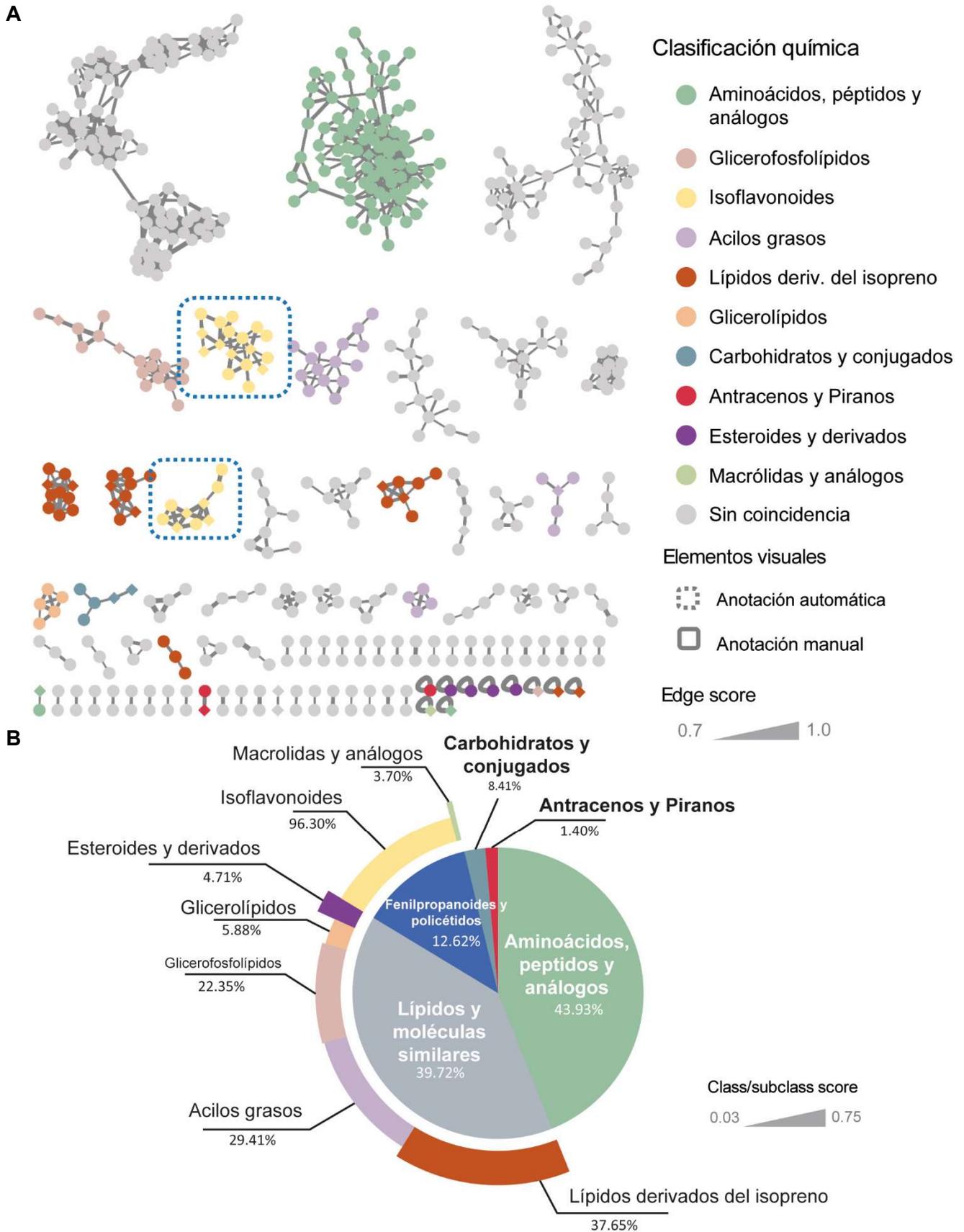


Figura 38. A) Red molecular de NCA-305. **B)** Distribución de las familias químicas identificadas.

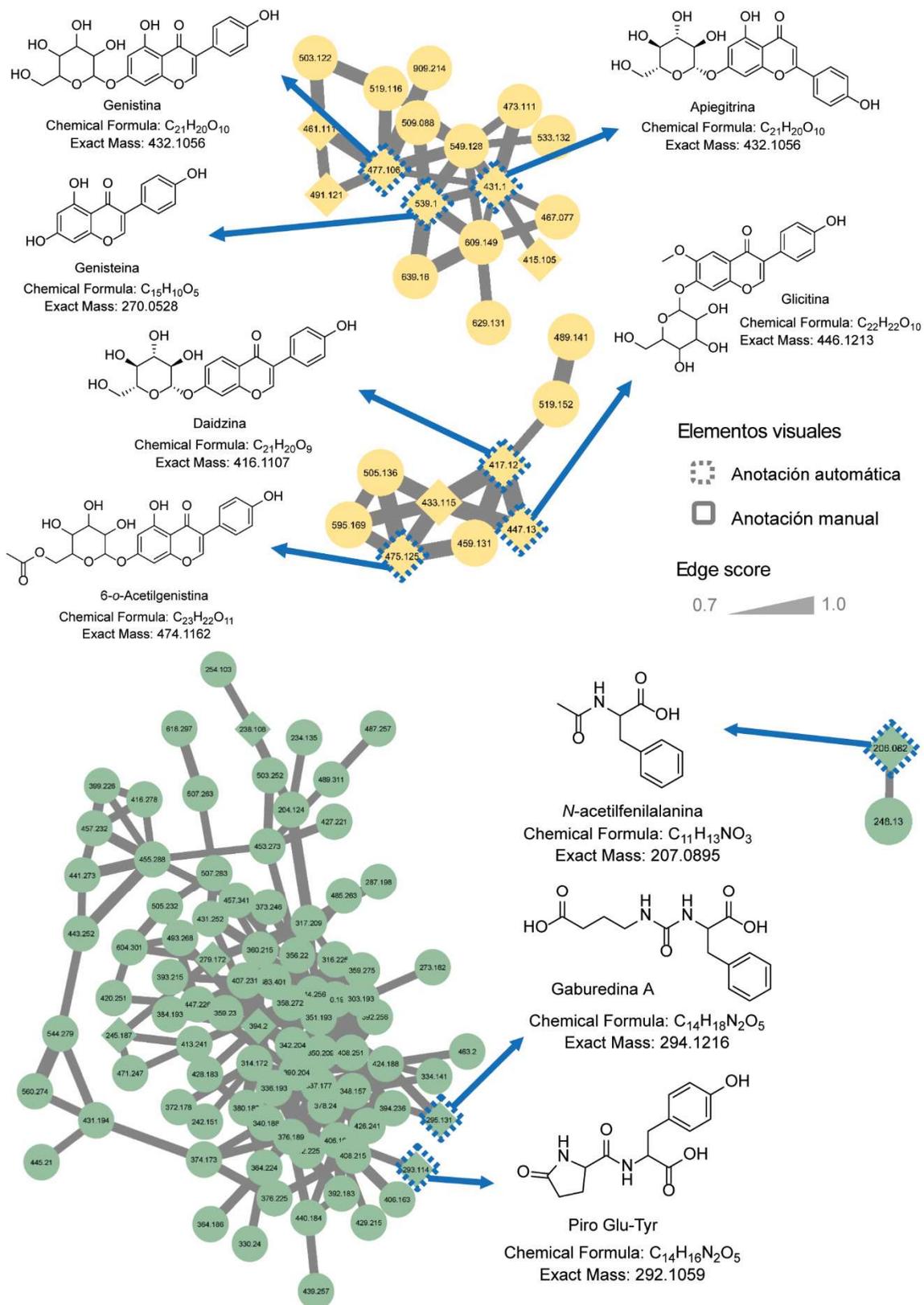


Figura 39. Análisis de los clústeres de la RM de NCA-305 Las líneas punteadas corresponden a anotaciones automáticas.

6. CONCLUSIONES

- 1) Las bacterias procedentes de la península de Yucatán demostraron ser candidatas para su uso con enfoques biotecnológicos y terapéuticos. Con ayuda del estudio químico biodirigido y los estudios de metabolómica, se identificaron metabolitos de importancia terapéutica, tales como los ácidos cólicos en la bacteria *Glutamicibacter* sp., la monactina, bonactina y alpienamida en *Streptomyces* sp., las *nocarpironas* en *Nocardiopsis* sp. y una familia de isoflavonoides en la bacteria NCA-305.
- 2) Los derivados del ácido cólico (**1–4**) demostraron su potencial anti-biopelículas en MRSA. Es importante destacar que este trabajo es el primer reporte, hasta nuestro conocimiento, que evalúa una serie de ácidos biliares contra este factor de virulencia en MRSA.
- 3) Por otro lado, se demostró el potencial biosintético de las actinobacterias, ya que solo los organismos de este filo mostraron importante actividad antibacteriana a nivel de extracto y de fracción. Además de producir metabolitos muy diversos y con diferentes roles ecológicos, como la bisucaberina y la nocardamina. Adicionalmente se concluyó que la separación de los extractos en biomasa y sobrenadante no es relevante en la distribución de los metabolitos producidos por las bacterias de este trabajo.
- 4) Las modificaciones en la posición 7 de los derivados de ácidos cólicos (compuestos **2** y **4**) en los cultivos de *Glutamicibacter* sp. representan un hallazgo interesante, debido a que estas modificaciones no son típicas en la naturaleza y solo se ha reportado a un pequeño grupo de bacterias del género *Clostridium* que son capaces de hacer estas reducciones u oxidaciones selectivas en sustratos de núcleo esteroidal.
- 5) Finalmente, se conoció el repertorio metabólico de la bacteria desconocida (NCA-305) y, se concluyó que pertenece al filo de las actinobacterias, pues solo este filo exhibe la capacidad de síntesis de isoflavonas como metabolitos secundarios una vez que son crecidas en medios con ingredientes derivados de la soya.

7. REFERENCIAS

- (1) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- (2) Fleming, A. The Discovery of Penicillin. *Br. Med. Bull.* **1944**, *2* (1), 4–5. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071032>.
- (3) Waksman, S. A.; Reilly, H. C.; Johnstone, D. B. Isolation of Streptomycin-Producing Strains of *Streptomyces Griseus*. *J. Bacteriol.* **1946**, *52* (3), 393–397. <https://doi.org/10.1128/jb.52.3.393-397.1946>.
- (4) Duggar, B. M. Aureomycin: A Product of the Continuing Search for New Antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1948**, *1241* (1), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06254.x>.
- (5) Ehrlich, J.; Bartz, Q. R.; Smith, R. M.; Joslyn, D. A.; Burkholder, P. R. Chloromycetin, a New Antibiotic from a Soil Actinomycete. *Science* **1947**, *106* (2757), 417–417. <https://doi.org/10.1126/science.106.2757.417>.
- (6) Newton, G. G. F.; Abraham, E. P. Cephalosporin C, a New Antibiotic Containing Sulphur and D- α -Aminoadipic Acid. *Nature* **1955**, *175* (4456), 548–548. <https://doi.org/10.1038/175548a0>.
- (7) Geraci, J. E.; Heilman, F. R.; Nichols, D. R.; Ross, G. T.; Wellman, W. E. Some Laboratory and Clinical Experiences with a New Antibiotic, Vancomycin. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **1956**, *31* (21), 564–582.
- (8) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- (9) Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80* (1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.
- (10) Isono, K.; Nagatsu, J.; Kawashima, Y.; Suzuki, S. Studies on Polyoxins, Antifungal Antibiotics: Part I. Isolation and Characterization of Polyoxins A and B. *Agric. Biol. Chem.* **1965**, *29* (9), 848–854. <https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858475>.
- (11) Umezawa, H.; Okami, Y.; Hashimoto, T.; Sahara, Y.; Hamada, M.; Takeuchi, T. A New Antibiotic, Kasugamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1965**, *18*, 101–103.
- (12) Ōmura, S.; Crump, A. Ivermectin: Panacea for Resource-Poor Communities? *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (9), 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.005>.
- (13) Harada, S.; Kishi, T. Isolation and Characterization of Mildiomycin, a New Nucleoside Antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1978**, *31* (6), 519–524. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.31.519>.
- (14) Arora, S. K. Molecular Structure of Heliomycin, an Inhibitor of RNA Synthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1985**, *38* (1), 113–115. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.38.113>.
- (15) Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N.; Lee, S. Y.; Medema, M. H.; Weber, T. AntiSMASH 5.0: Updates to the Secondary Metabolite Genome Mining Pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (W1), W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>.
- (16) Privalsky, T. M.; Soohoo, A. M.; Wang, J.; Walsh, C. T.; Wright, G. D.; Gordon, E. M.; Gray, N. S.; Khosla, C. Prospects for Antibacterial Discovery and Development. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (50), 21127–21142. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c10200>.
- (17) Lv, Q.; Fan, Y.; Tao, G.; Fu, P.; Zhai, J.; Ye, B.; Zhu, W. Sekgranaticin, a SEK34b-Granaticin Hybrid Polyketide from *Streptomyces* sp. 166#. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (14), 9087–9092. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01022>.

- (18) Messaoudi, O.; Sudarman, E.; Bendahou, M.; Jansen, R.; Stadler, M.; Wink, J. Kenalactams A–E, Polyene Macrolactams Isolated from *Nocardioopsis* CG3. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (5), 1081–1088. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00708>.
- (19) Kontou, E. E.; Gren, T.; Ortiz-López, F. J.; Thomsen, E.; Oves-Costales, D.; Díaz, C.; de la Cruz, M.; Jiang, X.; Jørgensen, T. S.; Blin, K.; Charusanti, P.; Reyes, F.; Genilloud, O.; Weber, T. Discovery and Characterization of Epemicins A and B, New 30-Membered Macrolides from *Kutzneria* sp. CA-103260. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16* (8), 1456–1468. <https://doi.org/10.1021/acschembio.1c00318>.
- (20) Kim, M. C.; Li, Z.; Cullum, R.; Molinski, T. F.; Eid, M. A. G.; Hebishy, A. M. S.; Faraag, A. H. I.; Abdel Moneim, A. E.; Abdelfattah, M. S.; Fenical, W. Chlororesistoflavins A and B, Chlorinated Benzopyrene Antibiotics Produced by the Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces* sp. Strain EG32. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85* (1), 270–275. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01084>.
- (21) Khan, A.; Said, M. S.; Borade, B. R.; Gonnade, R.; Barvkar, V.; Kontham, R.; Dastager, S. G. Enceleamycins A–C, Furo-Naphthoquinones from *Amycolatopsis* sp. MCC0218: Isolation, Structure Elucidation, and Antimicrobial Activity. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85* (5), 1267–1273. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01160>.
- (22) Zhang, Z.; In, Y.; Fukaya, K.; Yang, T.; Harunari, E.; Urabe, D.; Imada, C.; Oku, N.; Igarashi, Y. Kumemycinones A–G, Cytotoxic Angucyclinones from a Deep Sea-Derived Actinomycete of the Genus *Actinomadura*. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85* (4), 1098–1108. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01205>.
- (23) Vind, K.; Maffioli, S.; Fernandez Ciruelos, B.; Waschulin, V.; Brunati, C.; Simone, M.; Sosio, M.; Donadio, S. N -Acetyl-Cysteinyllated Streptophenazines from *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85* (5), 1239–1247. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01123>.
- (24) Subramani, R.; Aalbersberg, W. Marine Actinomycetes: An Ongoing Source of Novel Bioactive Metabolites. *Microbiol. Res.* **2012**, *167* (10), 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>.
- (25) Manivasagan, P.; Kang, K.-H.; Sivakumar, K.; Li-Chan, E. C. Y.; Oh, H.-M.; Kim, S.-K. Marine Actinobacteria: An Important Source of Bioactive Natural Products. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *38* (1), 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.014>.
- (26) Goodfellow, M.; Williams, S. T. ECOLOGY OF ACTINOMYCETES. *Annu. Rev. Microbiol.* **1983**, *37* (1), 189–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>.
- (27) Behie, S. W.; Bonet, B.; Zacharia, V. M.; McClung, D. J.; Traxler, M. F. Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In Situ. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02149>.
- (28) Sarmiento-Vizcaíno, A.; González, V.; Braña, A. F.; Palacios, J. J.; Otero, L.; Fernández, J.; Molina, A.; Kulik, A.; Vázquez, F.; Acuña, J. L.; García, L. A.; Blanco, G. Pharmacological Potential of Phylogenetically Diverse Actinobacteria Isolated from Deep-Sea Coral Ecosystems of the Submarine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. *Microb. Ecol.* **2017**, *73* (2), 338–352. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0845-2>.
- (29) Azman, A.-S.; Othman, I.; Velu, S. S.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H. Mangrove Rare Actinobacteria: Taxonomy, Natural Compound, and Discovery of Bioactivity. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00856>.
- (30) *Yucatán En El Tiempo: Enciclopedia Alfabética*, 1. ed.; Duch, J., Ed.; Inversiones Cares: Mérida, Yucatán, México, 1998.
- (31) *Biodiversity and Conservation of the Yucatán Peninsula*; Islebe, G. A., Calmé, S., León-Cortés, J. L., Schmook, B., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06529-8>.
- (32) Schmitter-Soto, J. J.; Comín, F. A.; Escobar-Briones, E.; Herrera-Silveira, J.; Alcocer, J.; Suárez-Morales, E.; Elías-Gutiérrez, M.; Díaz-Arce, V.; Marín, L. E.;

- Steinich, B. Hydrogeochemical and Biological Characteristics of Cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia* **2002**, 467 (1/3), 215–228. <https://doi.org/10.1023/A:1014923217206>.
- (33) Adame, M. F.; Santini, N. S.; Torres-Talamante, O.; Rogers, K. Mangrove Sinkholes (*Cenotes*) of the Yucatan Peninsula, a Global Hotspot of Carbon Sequestration. *Biol. Lett.* **2021**, 17 (5), rsbl.2021.0037, 20210037. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2021.0037>.
- (34) Suárez-Moo, P.; Remes-Rodríguez, C. A.; Márquez-Velázquez, N. A.; Falcón, L. I.; García-Maldonado, J. Q.; Prieto-Davó, A. Changes in the Sediment Microbial Community Structure of Coastal and Inland Sinkholes of a Karst Ecosystem from the Yucatan Peninsula. *Sci. Rep.* **2022**, 12 (1), 1110. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05135-9>.
- (35) Yanez-Montalvo, A.; Águila, B.; Gómez-Acata, S.; Mass-Vargas, M.; Cabanillas-Terán, N.; Vega-Zepeda, A.; Bahena, H.; Hernández-Arana, H.; Falcón, L. I. Depth Related Structure and Microbial Composition of Microbialites in a Karst Sinkhole, Cenote Azul, Mexico. *Geomicrobiol. J.* **2021**, 38 (3), 237–251. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1836086>.
- (36) Santillán, J.; López-Martínez, R.; Aguilar-Rangel, E. J.; Hernández-García, K.; Vásquez-Murrieta, M. S.; Cram, S.; Alcántara-Hernández, R. J. Microbial Diversity and Physicochemical Characteristics of Tropical Karst Soils in the Northeastern Yucatan Peninsula, Mexico. *Appl. Soil Ecol.* **2021**, 165, 103969. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103969>.
- (37) Lian, B.; Yuan, D.; Liu, Z. Effect of Microbes on Karstification in Karst Ecosystems. *Chin. Sci. Bull.* **2011**, 56 (35), 3743–3747. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4648-z>.
- (38) Johnson, D. B.; Beddows, P. A.; Flynn, T. M.; Osburn, M. R. Microbial Diversity and Biomarker Analysis of Modern Freshwater Microbialites from Laguna Bacalar, Mexico. *Geobiology* **2018**, 16 (3), 319–337. <https://doi.org/10.1111/gbi.12283>.
- (39) Fajardo-Hernández, C. A.; Khan, F. S. T.; Flores-Bocanegra, L.; Prieto-Davó, A.; Wan, B.; Ma, R.; Qader, M.; Villanueva-Silva, R.; Martínez-Cárdenas, A.; López-Lobato, M. A.; Hematian, S.; Franzblau, S. G.; Raja, H. A.; García-Contreras, R.; Figueroa, M. Insights into the Chemical Diversity of Selected Fungi from the Tza Itzá Cenote of the Yucatan Peninsula. *ACS Omega* **2022**, 7 (14), 12171–12185. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00544>.
- (40) Abraham, E. P.; Chain, E. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* **1988**, 10 (4), 677–678.
- (41) *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes: Environmental Occurrence and Treatment Technologies*; Hashmi, M. Z., Ed.; Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies; Springer International Publishing: Cham, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-40422-2>.
- (42) O'Neill, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEw iR8NLulqL8AhWRNEQIHcO2D1gQFnoECAwQAQ&url=https%3A%2F%2Famr-review.org%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2FAMR%2520Review%2520Paper%2520-%2520Tackling%2520a%2520crisis%2520for%2520the%2520health%2520and%2520wealth%2520of%2520nations_1.pdf&usg=AOvVaw2o4ZjnxVEhWL9MapFf5DH (accessed 2022-12-30).
- (43) Allied Health Department, Public Health Program, College of Health Sciences, University of Bahrain, Manama, Bahrain; Asokan, G.; Ramadhan, T.; Nursing, College of Health Sciences, WHO Collaborating Centre for Nursing Development University of Bahrain, Manama, Bahrain; Ahmed, E.; Nursing, College of Health Sciences, WHO Collaborating Centre for Nursing Development University of Bahrain, Manama, Bahrain;

- Sanad, H.; Nursing, College of Health Sciences, WHO Collaborating Centre for Nursing Development University of Bahrain, Manama, Bahrain. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med. J.* **2019**, *34* (3), 184–193. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>.
- (44) *Antimicrobial Resistance: Global Challenges and Future Interventions*; Thomas, S., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3658-8>.
- (45) Sionov, R. V.; Steinberg, D. Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria. *Microorganisms* **2022**, *10* (6), 1239. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061239>.
- (46) Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B. S.; Yang, J. Y.; Kersten, R. D.; van der Voort, M.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J. M.; Moore, B. S.; Laskin, J.; Bandeira, N.; Dorrestein, P. C. Mass Spectral Molecular Networking of Living Microbial Colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1203689109>.
- (47) Zdouc, M. M.; Iorio, M.; Maffioli, S. I.; Crüsemann, M.; Donadio, S.; Sosio, M. *Planomonospora*: A Metabolomics Perspective on an Underexplored Actinobacteria Genus. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84* (2), 204–219. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00807>.
- (48) Pinto-Almeida, A.; Bauermeister, A.; Luppino, L.; Grilo, I. R.; Oliveira, J.; Sousa, J. R.; Petras, D.; Rodrigues, C. F.; Prieto-Davó, A.; Tasdemir, D.; Sobral, R. G.; Gaudêncio, S. P. The Diversity, Metabolomics Profiling, and the Pharmacological Potential of Actinomycetes Isolated from the Estremadura Spur Pockmarks (Portugal). *Mar. Drugs* **2021**, *20* (1), 21. <https://doi.org/10.3390/md20010021>.
- (49) Liu, Y.; Ding, L.; Deng, Y.; Wang, X.; Cui, W.; He, S. Feature-Based Molecular Networking-Guided Discovery of Siderophores from a Marine Mesophotic Zone Axinellida Sponge-Associated Actinomycete *Streptomyces Diastaticus* NBU2966. *Phytochemistry* **2022**, *196*, 113078. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113078>.
- (50) Sibat, M.; Réveillon, D.; Antoine, C.; Carpentier, L.; Rovillon, G. A.; Sechet, V.; Bertrand, S. Molecular Networking as a Novel Approach to Unravel Toxin Diversity of Four Strains of the Dominant Dinophysis Species from French Coastal Waters. *Harmful Algae* **2021**, *103*, 102026. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102026>.
- (51) Quinn, R. A.; Nothias, L.-F.; Vining, O.; Meehan, M.; Esquenazi, E.; Dorrestein, P. C. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38* (2), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.011>.
- (52) Krause, J. Applications and Restrictions of Integrated Genomic and Metabolomic Screening: An Accelerator for Drug Discovery from Actinomycetes? *Molecules* **2021**, *26* (18), 5450. <https://doi.org/10.3390/molecules26185450>.
- (53) Aron, A. T.; Gentry, E. C.; McPhail, K. L.; Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J. M.; Sikora, N.; Vargas, F.; van der Hoof, J. J. J.; Ernst, M.; Kang, K. B.; Aceves, C. M.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Koester, I.; Weldon, K. C.; Bertrand, S.; Roullier, C.; Sun, K.; Tehan, R. M.; Boya P., C. A.; Christian, M. H.; Gutiérrez, M.; Ulloa, A. M.; Tejeda Mora, J. A.; Mojica-Flores, R.; Lakey-Beitia, J.; Vásquez-Chaves, V.; Zhang, Y.; Calderón, A. I.; Tayler, N.; Keyzers, R. A.; Tugizimana, F.; Ndlovu, N.; Aksenov, A. A.; Jarmusch, A. K.; Schmid, R.; Truman, A. W.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. Reproducible Molecular Networking of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS. *Nat. Protoc.* **2020**, *15* (6), 1954–1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>.
- (54) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik,

- A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrew, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya P, C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Lington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34* (8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- (55) García-Lara, B.; Saucedo-Mora, M. Á.; Roldán-Sánchez, J. A.; Pérez-Eretza, B.; Ramasamy, M.; Lee, J.; Coria-Jimenez, R.; Tapia, M.; Varela-Guerrero, V.; García-Contreras, R. Inhibition of Quorum-Sensing-Dependent Virulence Factors and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Pseudomonas Aeruginosa* Strains by ZnO Nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *61* (3), 299–305. <https://doi.org/10.1111/lam.12456>.
- (56) Abbas, H. A.; Atallah, H.; El-Sayed, M. A.; El-Ganiny, A. M. Diclofenac Mitigates Virulence of Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202* (10), 2751–2760. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01992-y>.
- (57) van der Hoof, J. J. J.; Wandy, J.; Barrett, M. P.; Burgess, K. E. V.; Rogers, S. Topic Modeling for Untargeted Substructure Exploration in Metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (48), 13738–13743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608041113>.
- (58) Mohimani, H.; Gurevich, A.; Shlemov, A.; Mikheenko, A.; Korobeynikov, A.; Cao, L.; Shcherbin, E.; Nothias, L.-F.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P. A. Dereplication of Microbial Metabolites through Database Search of Mass Spectra. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>.
- (59) Ernst, M.; Kang, K. B.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Nothias, L.-F.; Wandy, J.; Chen, C.; Wang, M.; Rogers, S.; Medema, M. H.; Dorrestein, P. C.; van der Hoof, J. J. J. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. *Metabolites* **2019**, *9* (7), 144. <https://doi.org/10.3390/metabo9070144>.
- (60) Pheiffer, F.; Schneider, Y. K.-H.; Hansen, E. H.; Andersen, J. H.; Isaksson, J.; Busche, T.; Rückert, C.; Kalinowski, J.; Zyl, L. van; Trindade, M. Bioassay-Guided Fractionation Leads to the Detection of Cholic Acid Generated by the Rare *Thalassomonas* sp. *Mar. Drugs* **2022**, *21* (1), 2. <https://doi.org/10.3390/md21010002>.
- (61) Urdaneta, V.; Casadesús, J. Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts. *Front. Med.* **2017**, *4*, 163. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00163>.
- (62) Waterhous, D. V.; Barnes, S.; Muccio, D. D. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids. Development of Two-Dimensional NMR Methods for the Elucidation of Proton Resonance Assignments for Five Common Hydroxylated Bile

- Acids, and Their Parent Bile Acid, 5 Beta-Cholanoic Acid. *J. Lipid Res.* **1985**, *26* (9), 1068–1078. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34280-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34280-2).
- (63) Li, H.; Shinde, P. B.; Lee, H. J.; Yoo, E. S.; Lee, C.-O.; Hong, J.; Choi, S. H.; Jung, J. H. Bile Acid Derivatives from a Sponge-Associated Bacterium *Psychrobacter* sp. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32* (6), 857–862. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1607-1>.
- (64) Ijare, O. B.; Somashekar, B. S.; Jadegoud, Y.; Nagana Gowda, G. A. ¹H and ¹³C NMR Characterization and Stereochemical Assignments of Bile Acids in Aqueous Media. *Lipids* **2005**, *40* (10), 1031–1041. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1466-1>.
- (65) Alexandri, E.; Ahmed, R.; Siddiqui, H.; Choudhary, M.; Tsiafoulis, C.; Gerothanassis, I. High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules* **2017**, *22* (10), 1663. <https://doi.org/10.3390/molecules22101663>.
- (66) Hites, R. A. [44] Mass Spectrometry of Triglycerides. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1975; Vol. 35, pp 348–359. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(75\)35175-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(75)35175-6).
- (67) Nieva-Echevarría, B.; Goicoechea, E.; Manzanos, M. J.; Guillén, M. D. A Method Based on ¹H NMR Spectral Data Useful to Evaluate the Hydrolysis Level in Complex Lipid Mixtures. *Food Res. Int.* **2014**, *66*, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.031>.
- (68) Sannasiddappa, T. H.; Lund, P. A.; Clarke, S. R. In Vitro Antibacterial Activity of Unconjugated and Conjugated Bile Salts on *Staphylococcus Aureus*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1581. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01581>.
- (69) Utari, P. D.; Vogel, J.; Quax, W. J. Deciphering Physiological Functions of AHL Quorum Quenching Acylases. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1123. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01123>.
- (70) Kusada, H.; Arita, M.; Tohno, M.; Tamaki, H. Bile Salt Hydrolase Degrades β -Lactam Antibiotics and Confers Antibiotic Resistance on *Lactobacillus Paragasseri*. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 858263. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858263>.
- (71) Serrano-Aguirre, L.; Velasco-Bucheli, R.; García-Álvarez, B.; Saborido, A.; Arroyo, M.; de la Mata, I. Novel Bifunctional Acylase from *Actinoplanes Utahensis*: A Versatile Enzyme to Synthesize Antimicrobial Compounds and Use in Quorum Quenching Processes. *Antibiotics* **2021**, *10* (8), 922. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080922>.
- (72) López, M.; Blasco, L.; Gato, E.; Perez, A.; Fernández-García, L.; Martínez-Martínez, L.; Fernández-Cuenca, F.; Rodríguez-Baño, J.; Pascual, A.; Bou, G.; Tomás, M. Response to Bile Salts in Clinical Strains of *Acinetobacter Baumannii* Lacking the AdeABC Efflux Pump: Virulence Associated with Quorum Sensing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 143. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00143>.
- (73) Drew, D.; Klepsch, M. M.; Newstead, S.; Flaig, R.; De Gier, J.-W.; Iwata, S.; Beis, K. The Structure of the Efflux Pump AcrB in Complex with Bile Acid. *Mol. Membr. Biol.* **2008**, *25* (8), 677–682. <https://doi.org/10.1080/09687680802552257>.
- (74) Nishino, K.; Yamasaki, S.; Nakashima, R.; Zwama, M.; Hayashi-Nishino, M. Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 737288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>.
- (75) Konings, W. N.; Poelarends, G. J. Bacterial Multidrug Resistance Mediated by a Homologue of the Human Multidrug Transporter P-Glycoprotein. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* **2002**, *53* (4–5), 213–218. <https://doi.org/10.1080/15216540212646>.
- (76) Werner, G.; Hagenmaier, H. A New Group of Macrolide Antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1984**, No. 2, 8.
- (77) Zhang, D.; Wei, G.; Wang, Y.; Si, C.; Tian, L.; Tao, L.; Li, Y. Bafilomycin K, a New Antifungal Macrolide from *Streptomyces Flavotricini* Y12-26. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2011**, *64* (5), 391–393. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.12>.

- (78) Chen, Y.-H.; Yang, J.-C.; Lu, M.-C.; Weng, C.-F.; Su, Y.-D.; Kuo, J.; Wu, Y.-C.; Sung, P.-J. Bafilomycins N and O, Novel Cytotoxic Bafilomycin Analogues Produced by *Streptomyces* sp. GIC10-1 Isolated from Marine Sponge *Theonella* sp. *Tetrahedron* **2017**, *73* (34), 5170–5175. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.07.009>.
- (79) Kobayashi, K.; Fukuda, T.; Usui, T.; Kurihara, Y.; Kanamoto, A.; Tomoda, H. Bafilomycin L, a New Inhibitor of Cholesteryl Ester Synthesis in Mammalian Cells, Produced by Marine-Derived *Streptomyces* sp. OPMA00072. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2015**, *68* (2), 126–132. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.100>.
- (80) Gagliardi, S.; Nadler, G.; Consolandi, E.; Parini, C.; Morvan, M.; Legave, M.-N.; Belfiore, P.; Zocchetti, A.; Clarke, G. D.; James, I.; Nambi, P.; Gowen, M.; Farina, C. 5-(5,6-Dichloro-2-Indolyl)-2-Methoxy-2,4-Pentadienamides: Novel and Selective Inhibitors of the Vacuolar H⁺-ATPase of Osteoclasts with Bone Antiresorptive Activity. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (10), 1568–1573. <https://doi.org/10.1021/jm9800144>.
- (81) Hensens, O. D.; Monaghan, R. L.; Huang, L.; Albers-Schonberg, G. Structure of the Sodium and Potassium Ion Activated Adenosine Triphosphatase Inhibitor L-681,110. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (11), 3672–3679. <https://doi.org/10.1021/ja00349a054>.
- (82) Yu, Z.; Zhao, L.-X.; Jiang, C.-L.; Duan, Y.; Wong, L.; Carver, K. C.; Schuler, L. A.; Shen, B. Bafilomycins Produced by an Endophytic Actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2011**, *64* (1), 159–162. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.147>.
- (83) Li, Z.; Du, L.; Zhang, W.; Zhang, X.; Jiang, Y.; Liu, K.; Men, P.; Xu, H.; Fortman, J. L.; Sherman, D. H.; Yu, B.; Gao, S.; Li, S. Complete Elucidation of the Late Steps of Bafilomycin Biosynthesis in *Streptomyces Lohii*. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (17), 7095–7104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751255>.
- (84) Yamamoto, A.; Tagawa, Y.; Yoshimori, T.; Moriyama, Y.; Masaki, R.; Tashiro, Y. Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. *Cell Struct. Funct.* **1998**, *23* (1), 33–42. <https://doi.org/10.1247/csf.23.33>.
- (85) Vinod, V.; Padmakrishnan, C. J.; Vijayan, B.; Gopala, S. ‘How Can I Halt Thee?’ The Puzzles Involved in Autophagic Inhibition. *Pharmacol. Res.* **2014**, *82*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.03.005>.
- (86) Lumkwana, D.; du Toit, A.; Kinnear, C.; Loos, B. Autophagic Flux Control in Neurodegeneration: Progress and Precision Targeting—Where Do We Stand? *Prog. Neurobiol.* **2017**, *153*, 64–85. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.03.006>.
- (87) Saris, N.-E. L.; Andersson, M. A.; Mikkola, R.; Andersson, L. C.; Teplova, V. V.; Grigoriev, P. A.; Salkinoja-Salonen, M. S. Microbial Toxin’s Effect on Mitochondrial Survival by Increasing K⁺ Uptake. *Toxicol. Ind. Health* **2009**, *25* (7), 441–446. <https://doi.org/10.1177/0748233709103405>.
- (88) Deboer, C.; Dietz, A. The Description and Antibiotic Production of *Streptomyces Hygroscopicus* Var *Geldanus*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1976**, *29* (11), 1182–1188.
- (89) Kadi, N.; Song, L.; Challis, G. L. Bisucaberin Biosynthesis: An Adenylating Domain of the BibC Multi-Enzyme Catalyzes Cyclodimerization of N-Hydroxy-N-Succinylcadaverine. *Chem. Commun.* **2008**, No. 41, 5119. <https://doi.org/10.1039/b813029a>.
- (90) Fujita, M.; Goto, Y.; Sakai, R. Cloning of the Bisucaberin B Biosynthetic Gene Cluster from the Marine Bacterium *Tenacibaculum Mesophilum*, and Heterologous Production of Bisucaberin B. *Mar. Drugs* **2018**, *16* (9), 342. <https://doi.org/10.3390/md16090342>.
- (91) Kameyama, T.; Takahashi, A.; Kurasawa, S.; Ishizuka, M.; Okami, Y.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. Bisucaberin, a New Siderophore, Sensitizing Tumor Cells to Macrophage-Mediated Cytolysis. I. Taxonomy of the Producing Organism, Isolation and Biological

- Properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1987**, *40* (12), 1664–1670. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1664>.
- (92) Ishida, S.; Arai, M.; Niikawa, H.; Kobayashi, M. Inhibitory Effect of Cyclic Trihydroxamate Siderophore, Desferrioxamine E, on the Biofilm Formation of Mycobacterium Species. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34* (6), 917–920. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.917>.
- (93) Ning, X.; Liang, J.; Men, Y.; Wang, Y.; Chang, Y.; Bai, Y.; Liu, H.; Wang, A.; Zhang, T.; Qu, J. Siderophores Provoke Extracellular Superoxide Production by *Arthrobacter* Strains during Carbon Sources-level Fluctuation. *Environ. Microbiol.* **2022**, *24* (2), 894–904. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15914>.
- (94) Li, G.; Zhang, Z.; Wu, M.; Chen, X.; Yin, M.; Jiang, Y.; Huang, X.; Jiang, C.; Han, L. The Discovery of Germacradienol Synthase: Construction of Genetically-Engineered Strain, Glycosylated Modification, Bioactive Evaluation of Germacradienol. *Bioorganic Chem.* **2022**, *124*, 105819. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105819>.
- (95) Yang, X.-W.; Peng, K.; Liu, Z.; Zhang, G.-Y.; Li, J.; Wang, N.; Steinmetz, A.; Liu, Y. Strepesquitriol, a Rearranged Zizaane-Type Sesquiterpenoid from the Deep-Sea-Derived Actinomycete *Streptomyces* sp. SCSIO 10355. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (12), 2360–2363. <https://doi.org/10.1021/np400923c>.
- (96) Xianwen, Y.; Peng, K.; Li, S.; Zhang, G.; Li, J.; Kin, X.; Lin, Y. New strepessquitriol A and its preparation method and application as anti-inflammatory agent. WO2015066960, May 14, 2015.
- (97) Huang, R.; Ding, Z.-G.; Long, Y.-F.; Zhao, J.-Y.; Li, M.-G.; Cui, X.-L.; Wen, M.-L. A New Isoflavone Derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *48* (6), 966–969. <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0440-4>.
- (98) Guo, Y.-C.; Cao, S.-X.; Zong, X.-K.; Liao, X.-C.; Zhao, Y.-F. ESI-MSⁿ Study on the Fragmentation of Protonated Cyclic-Dipeptides. *Spectroscopy* **2009**, *23* (3–4), 131–139. <https://doi.org/10.1155/2009/580182>.
- (99) Meyers, E.; Pansy, F. E.; Perlman, D.; Smith, D. A.; Weisenborn, F. L. The *in Vitro* Activity of Nonactin and Its Homologs: Monactin, Dinactin and Trinactin. Japan Antibiotics Research Association 1965. https://doi.org/10.11554/antibioticsa.18.3_128.
- (100) Beck, J.; Gerlach, H.; Prelog, V.; Voser, W. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 35. Mitteilung. Über Die Konstitution Der Makrotetrolide Monactin, Dinactin Und Trinactin. *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45* (2), 620–630. <https://doi.org/10.1002/hlca.19620450227>.
- (101) Jeong, S.-Y.; Shin, H. J.; Kim, T. S.; Lee, H.-S.; Park, S.; Kim, H. M. Streptokordin, a New Cytotoxic Compound of the Methylpyridine Class from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. **2005**, *7*.
- (102) Silva, L. J.; Crevelin, E. J.; Souza, W. R.; Moraes, L. A. B.; Melo, I. S.; Zucchi, T. D. *Streptomyces Araujoniae* Produces a Multiantibiotic Complex with Ionophoric Properties to Control *Botrytis Cinerea*. *Phytopathology*® **2014**, *104* (12), 1298–1305. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0327-R>.
- (103) Kaaniche, F.; Hamed, A.; Elleuch, L.; Chakchouk-Mtibaa, A.; Smaoui, S.; Karray-Rebai, I.; Koubaa, I.; Arcile, G.; Allouche, N.; Mellouli, L. Purification and Characterization of Seven Bioactive Compounds from the Newly Isolated *Streptomyces Cavourensis* TN638 Strain via Solid-State Fermentation. *Microb. Pathog.* **2020**, *142*, 104106. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104106>.
- (104) Crevelin, E. J.; Crotti, A. E. M.; Zucchi, T. D.; Melo, I. S.; Moraes, L. A. B. Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 Polyether Ionophore Antibiotics by Accurate-Mass Electrospray Tandem Mass Spectrometry: Dereplication of Polyether Ionophores by ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (11), 1117–1126. <https://doi.org/10.1002/jms.3432>.

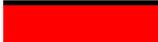
- (105) Zhou, H.; Yang, Y.; Zhang, J.; Peng, T.; Zhao, L.; Xu, L.; Ding, Z. Alkaloids from an Endophytic *Streptomyces* sp. YIM66017. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8* (10), 1934578X1300801. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801012>.
- (106) Paulus, C.; Rebets, Y.; Zapp, J.; Rückert, C.; Kalinowski, J.; Luzhetskyy, A. New Alpiniamides From *Streptomyces* sp. IB2014/011-12 Assembled by an Unusual Hybrid Non-Ribosomal Peptide Synthetase Trans-AT Polyketide Synthase Enzyme. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01959>.
- (107) Sigrüst, R.; Luhavaya, H.; McKinnie, S. M. K.; Ferreira da Silva, A.; Jurberg, I. D.; Moore, B. S.; Gonzaga de Oliveira, L. Nonlinear Biosynthetic Assembly of Alpiniamide by a Hybrid *Cis* / *Trans* -AT PKS-NRPS. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (4), 1067–1077. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00081>.
- (108) Schneemann, I.; Ohlendorf, B.; Zinecker, H.; Nagel, K.; Wiese, J.; Imhoff, J. F. Nocapyrones A–D, γ -Pyrone from a *Nocardioopsis* Strain Isolated from the Marine Sponge *Halichondria Panicea*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (8), 1444–1447. <https://doi.org/10.1021/np100312f>.
- (109) Lin, Z.; Torres, J. P.; Ammon, M. A.; Marett, L.; Teichert, R. W.; Reilly, C. A.; Kwan, J. C.; Hughen, R. W.; Flores, M.; Tianero, M. D.; Peraud, O.; Cox, J. E.; Light, A. R.; Villaraza, A. J. L.; Haygood, M. G.; Concepcion, G. P.; Olivera, B. M.; Schmidt, E. W. A Bacterial Source for Mollusk Pyrone Polyketides. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.019>.
- (110) Manker, D. C. Occurrence, Origin and Function of Secondary Metabolites in Marine Pulmonate Molluscs, Siphonaria Denticulata, Siphonaria Virgulata, University of California, San Diego, CA, 1988.
- (111) Di Marzo, V.; Vardaro, R. R.; De Petrocellis, L.; Villani, G.; Minei, R.; Cimino, G. Cyercenes, Novel Pyrones from the Ascoglossan Mollusc *Cyerce Cristallina*. Tissue Distribution, Biosynthesis and Possible Involvement in Defense and Regenerative Processes. *Experientia* **1991**, *47* (11–12), 1221–1227. <https://doi.org/10.1007/BF01918390>.
- (112) Gavagnin, M.; Marin, A.; Mollo, E.; Crispino, A.; Villani, G.; Cimino, G. Secondary Metabolites from Mediterranean Elysioidea: Origin and Biological Role. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1994**, *108* (1), 107–115. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90170-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90170-8).
- (113) T. Davies-Coleman, M.; J. Garson, M. Marine Polypropionates. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15* (5), 477. <https://doi.org/10.1039/a815477y>.
- (114) Omosa, L. K.; Nchiozem-Ngnitedem, V.-A.; Guefack, M.-G. F.; Mbaveng, A. T.; Kuete, V. Antibacterial Activities of Thirteen Naturally Occurring Compounds from Two Kenyan Medicinal Plants: *Zanthoxylum Paracanthum* (Mildbr). *Kokwaro* (Rutaceae) and *Dracaena Usambarensis* Engl. (Asparagaceae) against MDR Phenotypes. *South Afr. J. Bot.* **2022**, *151*, 756–762. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.050>.
- (115) Wan, J.; Gong, X.; Wang, F.; Wen, C.; Wei, Y.; Han, B.; Ouyang, Z. Comparative Analysis of Chemical Constituents by HPLC–ESI–MSⁿ and Antioxidant Activities of *Dendrobium Huoshanense* and *Dendrobium Officinale*. *Biomed. Chromatogr.* **2022**, *36* (1). <https://doi.org/10.1002/bmc.5250>.
- (116) Kim, J. K.; Heo, H.-Y.; Park, S.; Kim, H.; Oh, J. J.; Sohn, E.-H.; Jung, S.-H.; Lee, K. Characterization of Phenethyl Cinnamamide Compounds from Hemp Seed and Determination of Their Melanogenesis Inhibitory Activity. *ACS Omega* **2021**, *6* (47), 31945–31954. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04727>.
- (117) Wang, J.-F.; Liu, S.-S.; Song, Z.-Q.; Xu, T.-C.; Liu, C.-S.; Hou, Y.-G.; Huang, R.; Wu, S.-H. Naturally Occurring Flavonoids and Isoflavonoids and Their Microbial Transformation: A Review. *Molecules* **2020**, *25* (21), 5112. <https://doi.org/10.3390/molecules25215112>.

- (118) Lee, J.-H.; Oh, E.-T.; Chun, S.-C.; Keum, Y.-S. Biotransformation of Isoflavones by *Aspergillus Niger* and *Cunninghamella Elegans*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2014**, *57* (4), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4145-6>.
- (119) Ebada, S. S.; Eze, P.; Okoye, F. B. C.; Esimone, C. O.; Proksch, P. The Fungal Endophyte *Nigrospora Oryzae* Produces Quercetin Monoglycosides Previously Known Only from Plants. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (11), 2767–2771. <https://doi.org/10.1002/slct.201600478>.
- (120) Kang, H. R.; Lee, D.; Benndorf, R.; Jung, W. H.; Beemelmans, C.; Kang, K. S.; Kim, K. H. Termisoflavones A–C, Isoflavonoid Glycosides from Termite-Associated *Streptomyces* sp. RB1. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (12), 3072–3078. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00738>.

8. ANEXOS

Tabla 17. Resultados de actividad antimicrobiana contra *S. aureus* de las fracciones obtenidas en este trabajo.

<i>Glutamicibacter sp.</i>			<i>Streptomyces sp.</i>			<i>Nocardiopsis sp.</i>		
Clave	MRSA ^a	MSSA ^b	Clave	MRSA ^a	MSSA ^b	Clave	MRSA ^a	MSSA ^b
G ₁ *			S ₁ *			NC ₁ *		
F ₁			F ₁			F ₁		
F ₂			F ₂			F ₂		
F ₃			F ₃			F ₃		
F ₄			F ₄			F ₄		
F ₅			F ₅			F ₅		
F ₆			F ₆			F ₆		
F ₇			F ₇			F ₇		
F ₈			F ₈			NC ₂ *		
F ₉			F ₉			F ₁		
F ₁₀			S ₂ *			F ₂		
F ₁₁			F ₁			F ₃		
F ₁₂			F ₂			F ₄		
F ₁₃			F ₃			F ₅		
F ₁₄			F ₄			F ₆		
F ₁₅			F ₅			F ₇		
F ₁₆			F ₆			F ₈		
F ₁₇			F ₇			F ₉		
F ₁₈			F ₈			F ₁₀		
F ₁₉			F ₉			F ₁₁		
F ₂₀			F ₁₀			F ₁₂		
G ₃ *			F ₁₁			F ₁₃		
F ₁			S ₅ *			F ₁₄		
F ₂			F ₁			F ₁₅		
F ₃			F ₂			NC ₄ *		
F ₄			F ₃			F ₁		
F ₅			F ₄			F ₂		
F ₆			F ₅			F ₃		
			F ₆			F ₄		
			F ₇			F ₅		
			F ₈			F ₆		
			F ₉			F ₇		
						F ₈		
						F ₉		
						F ₁₀		
						F ₁₁		
						F ₁₂		
						F ₁₃		

Escala de inhibición	
	Total a 200 y a 20 µg/mL
	Total a 200, parcial a 20 µg /mL
	Total a 200 µg /ml
	Parcial a 200 y a 20 µg /mL
	Parcial a 200 µg /mL
	Sin actividad

^a CMI = 2.5 µg/mL Vancomicina, ^b CIM = 0.2 µg/mL Ampicilina
*Extracto de origen, exclusivamente para referencia

Bioprospección de actinobacterias de la ciénaga de Sisal, Yucatán

Carlos D. Hernández-Granillo^a, Alejandra prieto-Davó^b, Mario Figueroa^{a*}

^aDepartamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, CDMX, 04510, México. ^bUnidad de Química SISAL, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán, 97356, México.

*mafiquer@unam.mx

Introducción

Los ecosistemas acuáticos son extremadamente complejos y contienen una gran diversidad de formas de vida. Dentro de éstos, la composición química del agua y la disponibilidad variable de nutrientes, han causado que los organismos que los habitan desarrollen mecanismos de defensa química muy avanzados¹. Así, el objetivo de este trabajo es realizar la bioprospección de una serie de bacterias aisladas de península de Yucatán (Figura 1), una de las regiones más biodiversas de México, en busca de nuevos productos naturales (PN) con potencial antimicrobiano².



Figura 1. Sitio de colecta de las bacterias de estudio de este proyecto

Metodología

-**Aislamiento de las bacterias:** Las bacterias fueron aisladas por la Dra. Alejandra Prieto Davó de la Unidad de Química-Sisal, FQ, UNAM, a partir de sedimentos de cenotes en la Reserva Estatal Geohidrológica Anillo de Cenotes (REGAC).

-**Cultivo, identificación y extracción:** Nueve bacterias selectas se cultivaron en los medios ISP2 y DSC-ASW por 7 días a 120 rpm, TA y fotoperiodos 12/12 h. Los extractos de la biomasa y el sobrenadante de cada bacteria se obtuvieron con AcOEt y MeOH. La identificación de las bacterias se realizó mediante la secuenciación de la región 16S ARN y análisis BLAST.

-**Actividad antimicrobiana:** Los 72 extractos se evaluaron contra bacterias patógenas del grupo ESKAPE (E. faecalis, S. aureus, K. pneumoniae, K. aerogenes, A. baumannii, P. aeruginosa y E. cloacae) en el ensayo de microdilución. Las concentraciones de prueba fueron 20 y 200 µg/mL y se empleó el MTT como revelador. Los organismos más activos (Tabla 1) se cultivaron en mediana escala (20x).

-**Fraccionamiento y purificación:** Los extractos en mediana escala se fraccionaron por cromatografía de tipo flash o SPE, empleando mezclas entre H₂O-MeOH-acetona. Las fracciones obtenidas se evaluaron en el mismo ensayo de actividad y las activas se purificaron mediante HPLC a nivel preparativo (C₁₈) o por cromatografía de columna abierta (SI-gel).

-**Caracterización de los compuestos puros:** Los compuestos se caracterizaron mediante el análisis de sus espectros de RMN mono y bidimensionales y de HRMS-MS/MS (Figura 2).

-**Estudios de metabólica.** A partir de los datos de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de los extractos de las bacterias seleccionadas, se realizó el análisis metabólico por redes moleculares empleando la plataforma GNPS y las herramientas Derreplicator+ y MolNetEnhancer (Figuras 3 y 4).

Resultados

Tabla 1. Resultados de actividad biológica contra *S. aureus* sensible (MSSA) y resistente a meticilina (MRSA) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de los extractos activos.

<i>Glutamicbacter sp.</i>			<i>Streptomyces sp.</i>			<i>Nocardopsis sp.</i>		
Fracción	MRSA	MSSA	Fracción	MRSA	MSSA	Fracción	MRSA	MSSA
DSC-S-AcOEt			DSC-S-AcOEt			DSC-S-AcOEt		
F ₁₁			F ₈			F ₆		
F ₁₂			F ₉			F ₇		
F ₁₇			DSC-S-MeOH			DSC-S-MeOH		
F ₁₈			F ₉			F ₁₃		
F ₁₉			F ₁₀			F ₁₄		
F ₂₀			F ₁₁			DSC-P-MeOH		
DSC-P-AcOEt			ISP2-S-AcOEt			F ₁₀		
F ₃			F ₅			F ₁₁		
F ₄			F ₆			F ₁₂		
F ₅			F ₇			CIM (µg/mL)	2.5	0.2
			F ₈			Antibiótico	Vancomicina	Ampicilina
			F ₉					

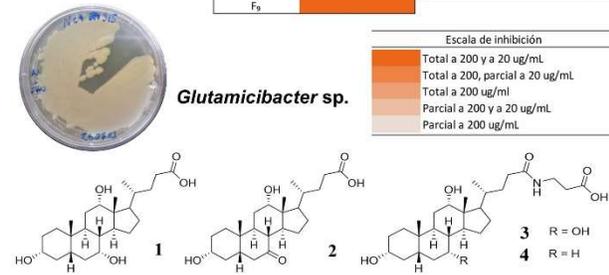


Figura 2. Componentes mayoritarios aislados de las fracciones activas del extracto de *Glutamicbacter sp.*

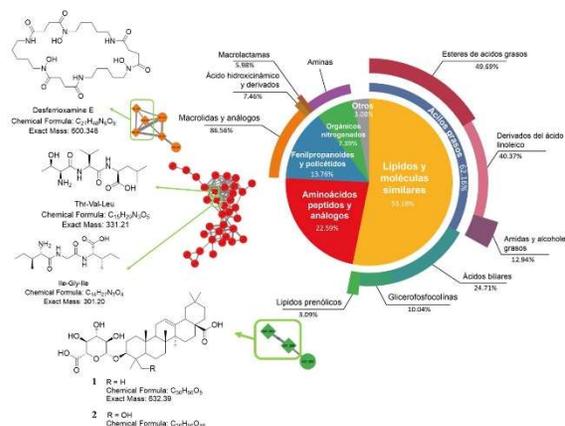


Figura 2. Clasificación química y metabolitos identificados por GNPS de *Glutamicbacter sp.*

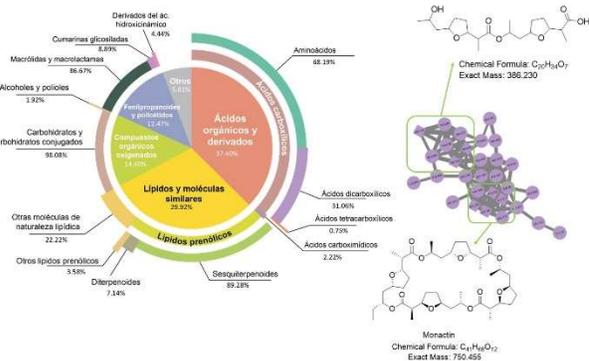


Figura 3. Clasificación química y metabolitos identificados por GNPS de *Streptomyces sp.*

Conclusiones

La búsqueda de nuevos antibióticos contra bacterias del grupo ESKAPE encabeza la lista de prioridades de la OMS. Así, el estudio químico y biológico de nueve actinomicetos aislados de la REGAC permitió la identificación de tres especies con potencial antimicrobiano contra estos patógenos. De *Glutamicbacter*, se aislaron e identificaron cuatro ácidos cíclicos mayoritarios de presencia inédita en un organismo de este género, además de otros compuestos bioactivos que se encuentran en proceso de caracterización. Por otra parte, los estudios químicos de los otros organismos activos (*Streptomyces sp.* y *Nocardopsis sp.*) se encuentran en proceso. Finalmente, los análisis metabólicos por redes moleculares permitieron conocer la diversidad química global de dos de estas bacterias. En conjunto, todos estos datos contribuyen al conocimiento de la biodiversidad química y biológica de México.



Agradecimientos

MF agradece el financiamiento otorgado por la UNAM DGAPA-PAPIIT IN222220 y la FQ-PAIP 5000-9145 para la realización de este proyecto. CDHG agradece al CONACYT por la beca otorgada para los estudios de posgrado (no. 1059306).

Referencias

- Hagström, A. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (7), 3628–3633.
- Fajardo-Hernández, C. A. *et al. ACS Omega* **2022**, *7* (14), 12171–12185.
- Crevelin, E. J. *et al. J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (11), 1117–1126.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas
Subdirección Académica de Químico Farmacéutico Biólogo

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

POR SU PARTICIPACIÓN COMO ASISTENTE DENTRO DEL

“VIII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina
y VI Simposio Nacional de Microbiología Aplicada”

LLEVADO A CABO DEL 5 AL 7 DE OCTUBRE DE 2022

Alere Flammam Veritatis

Dra. Argelia Vargas Moreno
DIRECTORA, FCQ



Dr. Isaías Balderas Rentería
SUBDIRECTOR ACADÉMICO DE QFB

