



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de compuestos con actividad tripanocida de *Pseudomonas* sp., asociada  
a *Magnolia dealbata* Zucc.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

I.Q. DIANA CAROLINA BAUTISTA TOVAR

TUTOR: Dr. Sergio Sánchez Esquivel  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM - Departamento de Biología Molecular y  
Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM – Departamento de Inmunología  
Dr. Luis Bernardo Flores Cotera  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN- Departamento de  
Biotecnología

CIUDAD DE MÉXICO, Marzo, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el programa NAUTEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por PAPIIT (IN202216), DGAPA UNAM, por el programa de apoyo a los estudios de posgrado PAEP y por CONACYT (CB 219686), México.

## **Dedicatoria**

*A Dios por hacerlo todo posible, por darme la fuerza y determinación.*

A mi familia, por su apoyo incondicional, gracias por creer en mí. Los amo con todo mi corazón.

A mi mamá María Amparo Tovar Garcés y a mi papá Luis Agustín Bautista Gómez, por la fortaleza, por sus innumerables consejos y su paciencia. Mi hermana, Lau gracias por siempre estar ahí, por ser mi confidente, por siempre darme una palabra de aliento y hacerme sonreír.

A Luis Javier mi esposo, mi mejor amigo, mi cómplice y el amor de mi vida.

## Agradecimientos

*A Dios por tantas bendiciones recibidas durante este proceso, especialmente por permitirme hacer parte de éste proyecto de investigación y por la culminación de mi trabajo.*

A todos y cada uno de los que de forma directa o indirecta hicieron que este trabajo haya sido posible,

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme pertenecer a su comunidad académica.
- Al postgrado en ciencias Bioquímicas por el inmenso aprendizaje adquirido durante el posgrado.
- Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su confianza, su paciencia, su guía, el apoyo recibido y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.
- A mi comité tutorial la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez y al Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, por poner a mi disposición el uso de sus laboratorios para los propósitos de mi trabajo, por su apoyo, interés, continuos aportes y su atento seguimiento de éste proyecto durante toda mi maestría.
- A la Dr. Beatriz Ruiz Villafán por su accesoria y apoyo continuo en cada uno de los momentos de éste trabajo, por su confianza, por sus palabras de aliento y su comprensión.
- Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por enseñarme a trabajar con el parásito y el apoyo en el trabajo en el laboratorio.
- Al laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chávez, especialmente a la M en C. Alejandra Abigail González Valdez, por el préstamo de equipos y el apoyo con material de trabajo.
- A la Dra. Amelia Farrés González Sarabia y a su estudiante José Augusto Castro Rodríguez por su colaboración con las pruebas espectroscopicas para la determinación estructural de los compuestos activos.
- A la Dra. Martha Lidia Macías su colaboración en la determinación estructural de los compuestos activos.

- Al E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez por la colaboración en la preservación de las cepa mediante liofilización y el apoyo con material de trabajo.
- A la Dra. Victoria Grosso Becerra por su apoyo en el trabajo con *Pseudomonas*, por su paciencia y apoyo.
- A los Dres. Andrés Navarrete Castro, Arturo Navarro Ocaña, Julio Cesar Carrero Sánchez, Ruy Pérez Montfort y Manuel Jiménez Estrada, por aceptar ser mis sinodales, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por los invaluable aportes al trabajo realizado.
- A mis compañeros de laboratorio, Ana Fernández Amézcuca, Allan Espinoza Gómez, Alba Romero Rodríguez, Brenda Sánchez Salazar, Diana Rocha Mendoza, Invonne Robledo Casados, Elena Martínez Klimova, Hugo Serrano Posada Karol Rodríguez Peña, Monserrat Manzo Ruiz, Miriam Trenado Uribe, Nidia Maldonado Carmona, Omar Jiménez Rodríguez, Sara Centeno Leija, Silvana Tapia Cabrera, Silvia Guzmán Trampe y Victor Tierrafría Pulido, por los momentos compartidos y por sus múltiples aportes a mi trabajo.
- A los estudiantes del laboratorio de la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez, Karla, Cristina, Edgar, Esteban, Génesis, Joselin, Lucio, Luis y Paulina, por su colaboración siempre atenta en el trabajo con *Trypanosoma cruzi*, por su paciencia y su siempre amble y cálido trato.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido durante toda la maestría. Número de becario 298833.

## Resumen

Las limitaciones del uso de los fármacos nifurtimox y benznidazol utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis americana, enfermedad crónica endémica del continente americano, han generado la necesidad de encontrar nuevos compuestos que puedan ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad; con menores efectos secundarios negativos, con actividad frente a las cepas resistentes y con tratamientos más cortos. Se realizó la búsqueda bio-dirigida de compuestos con actividad biológica de una cepa de *Pseudomonas* sp. asociada a *Magnolia dealbata* Zucc, planta endémica mexicana con historial etno-médico. Se encontró que los extractos de éste microorganismo poseen diferentes compuestos con actividad biológica, uno de ellos fue aislado y se evaluaron las actividades: antibiótica, tripanocida y citotóxica. Finalmente, se utilizaron técnicas espectroscópicas para aproximarnos a la determinación estructural del compuesto evaluado.

**Palabras clave:** *Pseudomonas* sp., Chagas, tripanocida.

## **Abstract**

The limitations of using nifurtimox and benznidazole as drugs for the treatment of American trypanosomiasis, a chronic and endemic disease of the American continent, have created the need to discover new drugs for the treatment of trypanosomiasis; with fewer negative side effects and useful against resistant strains without long periods of treatment are necessary. Therefore a bio-directed search was performed, for compounds with biological activity from extracts of a *Pseudomonas* sp. strain, associated with *Magnolia dealbata* Zucc. This is a mexican endemic plant with ethno-medical history. Extracts from this microorganism contained different compounds with biological activity. One of them was isolated and their activities were evaluated: trypanocidal, antibiotic and cytotoxic activity. Finally, spectroscopic techniques were used to approach the determination the structure of the evaluated compound.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp., Chagas, trypanocidal.



## Tabla de contenido

1	Marco teórico.....	8
1.1	Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas).....	8
1.1.1	Agente etiológico .....	9
1.1.2	Fases de la enfermedad.....	13
1.1.3	Tratamiento.....	14
1.1.4	Prevención de la enfermedad.....	19
1.2	Actividad biológica de metabolitos secundarios de <i>Pseudomonas</i> .....	21
1.2.1	<i>Magnolia dealbata</i> Zucc. ....	22
1.2.2	Microorganismos asociados a <i>Magnolia dealbata</i> Zucc.....	24
1.3	<i>Pseudomonas</i> sp. y sus metabolitos secundarios .....	25
2	Justificación.....	31
3	Hipótesis .....	31
4	Objetivos .....	32
4.1	General.....	32
4.2	Específicos .....	32
5	Metodologías.....	33
5.1	Selección de una colonia de <i>Pseudomonas</i> .....	33
5.2	Preservación de microorganismos .....	33
5.2.1	Preservación de la cepa de <i>Pseudomonas</i> .....	33
5.2.2	Preservación de los organismos para antibiosis .....	33
5.3	Mantenimiento de parásitos y líneas celulares.....	34
5.3.1	Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Querétaro .....	34
5.3.2	Cultivo de células Vero .....	34
5.4	Obtención de extractos.....	35
5.5	Medición de actividades biológicas .....	35
5.5.1	Actividad antibiótica.....	35
5.5.2	Actividad tripanocida .....	36
5.5.3	Actividad citotóxica.....	37
5.5.4	Concentración mínima inhibitoria (por sus siglas en inglés MIC) .....	37

5.5.5	Concentración inhibitoria del 50% de la población (CI <sub>50</sub> ).....	37
5.6	Verificación del género <i>Pseudomonas</i> mediante rADN 16s.....	38
5.7	Selección de condiciones de cultivo.....	38
5.7.1	Selección del extracto a utilizar.....	38
5.7.2	Curva de crecimiento y producción.....	38
5.8	Separación y purificación.....	38
5.8.1	Cromatografía en capa fina.....	39
5.8.2	Revelado con ninhidrina.....	39
5.8.3	Revelado con fast blue B.....	39
5.8.4	Cromatografía en placa preparativa.....	39
5.8.5	Fraccionamiento por columna de exclusión molecular.....	40
5.9	Determinación de la estructura química.....	41
5.9.1	Espectroscopía ultravioleta-visible.....	41
5.9.2	Espectrometría de masas.....	41
5.9.3	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	41
6	Resultados y discusión.....	42
6.1	Selección de la colonia de trabajo.....	42
6.2	Confirmación de la actividad tripanocida.....	45
6.3	Producción de extracto tripanocida.....	50
6.4	Fraccionamiento y purificación.....	53
6.5	Determinación de la estructura química.....	54
6.6	Actividades biológicas del compuesto aislado.....	58
7	Conclusiones.....	60
8	Bibliografía.....	62

## Lista de abreviaturas

**16S rDNA:** gen que codifica para el ácido ribonucleico ribosomal 16S.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**CI<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria del 50% de la población.

**LIT:** Liver infusion tryptose.

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria, por sus siglas en inglés.

**OMS:** Organización mundial para la salud.

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**<sup>1</sup>H-RMN:** Resonancia magnética nuclear de protón.

**<sup>13</sup>C-RMN:** Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

**TcNTR:** nitrorreductasa de tipo .I

**Vero:** Células epiteliales del riñón de un mono verde africano.

## Introducción

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es una enfermedad potencialmente mortal causada por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas que se encuentran infectadas, la mayoría de ellas en América Latina (OMS, 2016).

Esta enfermedad ha sido tratada mediante quimioterapia utilizando dos fármacos, el benznidazol y el nifurtimox, cuyo uso se ve limitado por la cantidad de efectos secundarios adversos que pueden aparecer durante las dos primeras semanas de tratamiento, llegando en ocasiones a causar la suspensión del mismo. Adicionalmente, durante la fase aguda de la enfermedad (aproximadamente dos meses a partir del inicio de la infección), se presenta el mayor índice de curación que puede llegar a ser hasta del 100% (OMS, 2016); sin embargo, se sabe que su eficacia disminuye a medida que transcurre el tiempo y se conocen cepas con resistencia a los dos fármacos (Campos *et al.*, 2014, Wilkinson *et al.*, 2008). La prevención de la enfermedad de Chagas, se ha realizado principalmente mediante el cribado en sangre de transfusiones y el control vectorial (triatominos), debido a que no existe una vacuna.

Las limitaciones de los fármacos utilizados para tratar la enfermedad, hacen necesaria la continua investigación en la obtención de nuevos fármacos para su tratamiento. En éste sentido, existe una diversa cantidad de moléculas que han sido evaluadas frente a la enfermedad del Chagas, a partir de modificaciones de los tratamientos ya utilizados y mediante la búsqueda continua de nuevas entidades químicas.

Los productos naturales y sus derivados han sido de gran importancia en la medicina, ya que muchos de estos se han utilizado en diferentes padecimientos. Los microorganismos asociados a plantas son una fuente altamente atractiva de productos naturales debido a que se ha encontrado que pueden inducir, modificar o incluso producir metabolitos producidos por plantas. Adicionalmente, generan compuestos que le permiten competir y comunicarse con otros organismos. Por lo que diversos microorganismos asociados a plantas poseen actividades biológicas cómo: antibiótica, biosurfactante y frente a otros organismos presentes en el ecosistema como protozoarios, insectos y nemátodos.

Algunas bacterias son productoras de compuestos con actividad tripanocida, en el caso específico de *Pseudomonas* existen reportes de Mercado & Colón-Whitt, (1982) que

evaluaron compuestos contra *Trypanosoma cruzi* y evidenciaron cambios ultraestructurales que se producen sobre el protozoario (Mercado *et al.*, 1986), lográndose finalmente la purificación de los compuestos químicos responsables de la actividad (Mercado *et al.*, 1988). Actualmente, se conoce que el compuesto que presentó la actividad tripanocida en los estudios realizado es la viscosina, un lipopéptido cíclico que adicionalmente posee actividad antibiótica, biosurfactante y antiviral (Buerke *et al.*, 1999).

En nuestro grupo de investigación, se han realizado diferentes aislamientos de microorganismos asociados a plantas. Ejemplo de esto es el trabajo realizado con *Magnolia dealbata* Zucc, cuidadosamente seleccionada, debido a que es una planta endémica mexicana utilizada en la medicina tradicional (Sánchez-Velásquez y Pineda-López, 2010; Velazco-Macías *et al.*, 2008). De aislamientos de esta planta se obtuvieron 107 microorganismos de los cuales 55 son bacterias y 52 hongos (siendo cinco levaduras). Ocho de las bacterias aisladas fueron identificadas como *Pseudomonas* sp., mediante secuencia del gen que codifica para el ácido ribonucleico ribosomal 16S (16S rDNA) y fueron estudiadas debido a que presentaron actividad antibiótica, citotóxica y tripanocida (Guzmán-Trampe *et al.*, 2014).

Las evaluaciones previas en el laboratorio, se realizaron a partir de extractos de aislados de *Pseudomonas*, siendo de gran importancia caracterizar, los productos metabólicos causantes de la actividad tripanocida de una cepa específica de *Pseudomonas* asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. e identificar sus condiciones de producción. En miras de identificar nuevas entidades químicas que afecten a este parásito y permitan eventualmente definir tratamientos alternativos a los actualmente utilizados en éste padecimiento. Con menor toxicidad, menores tiempos de tratamiento, mayor eficacia y útiles en cepas resistentes a los fármacos ya utilizados.

## 1 Marco teórico

### 1.1 Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas)

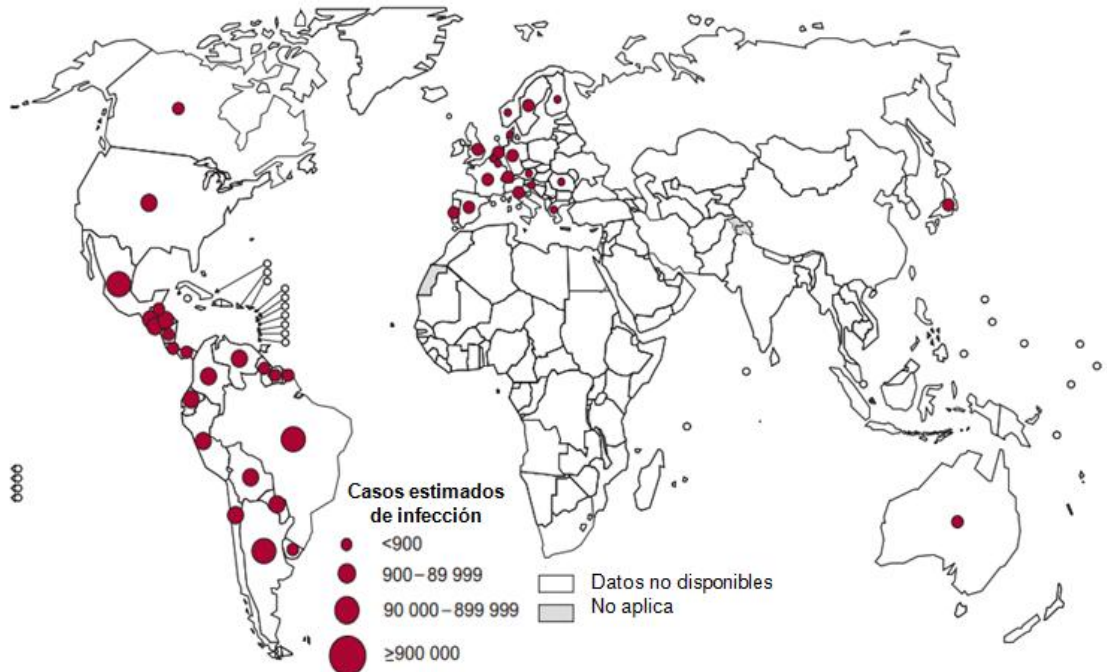
La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es el resultado de la invasión y establecimiento exitoso de *Trypanosoma cruzi* en el ser humano. Fue descubierta y descrita en 1909 por el médico e infectólogo brasileño, Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934).

Esta enfermedad es endémica en 21 países de las Américas y se encuentra distribuida desde el sur de EE.UU. hasta el sur de Argentina. Está relacionada en la mayoría de los casos con poblaciones rurales y en malas condiciones socioeconómicas (Gürtler *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a migraciones internacionales en los últimos 15 años la enfermedad se ha propagado a zonas no endémicas de los EE.UU. y Europa Occidental (Urbina, 2010). Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas (OMS, 2016), siendo Argentina, Brasil y México los países con mayor número de casos estimados de Chagas con valores totales mayores o iguales a novecientos mil como se observa en la Figura 1 con base en estimaciones oficiales de la OMS 2006-2010.

Las discapacidades ocasionadas y la mortalidad que genera la enfermedad de Chagas especialmente en la personas en edad productiva es significativa, por lo que llega a tener una carga económica alta. De acuerdo con el trabajo realizado por Lee *et al.* (2013) la enfermedad de Chagas tiene un costo global de US\$ 7.2 mil millones por año, que es considerable, si bien no se acerca a los de los cánceres más costosos (cáncer de pulmón en US\$ 83 mil millones y el cáncer de mama en US\$ 35 mil millones), es similar o mayor que el de algunos otros tipos de cáncer (US\$ 6.7 mil millones para el cáncer de útero, US\$ 5.3 mil millones para el cáncer de boca y \$ US 4.7 mil millones para el cáncer de cuello uterino) y superan a los de otras enfermedades infecciosas, como el cólera (US\$ 5.43 mil millones) y el rotavirus (US\$ 2.0 mil millones de dólares) (Lee *et al.*, 2013).

La principal vía de transmisión es a través de la picadura de un vector (triatomino hematófago) el cual mientras succiona la sangre del anfitrión excreta sus deposiciones. Cuando el anfitrión se rasca la picadura, promueve el paso del parásito hacia su interior. Otras vías de transmisión son la transfusión sanguínea, congénita, trasplantes de

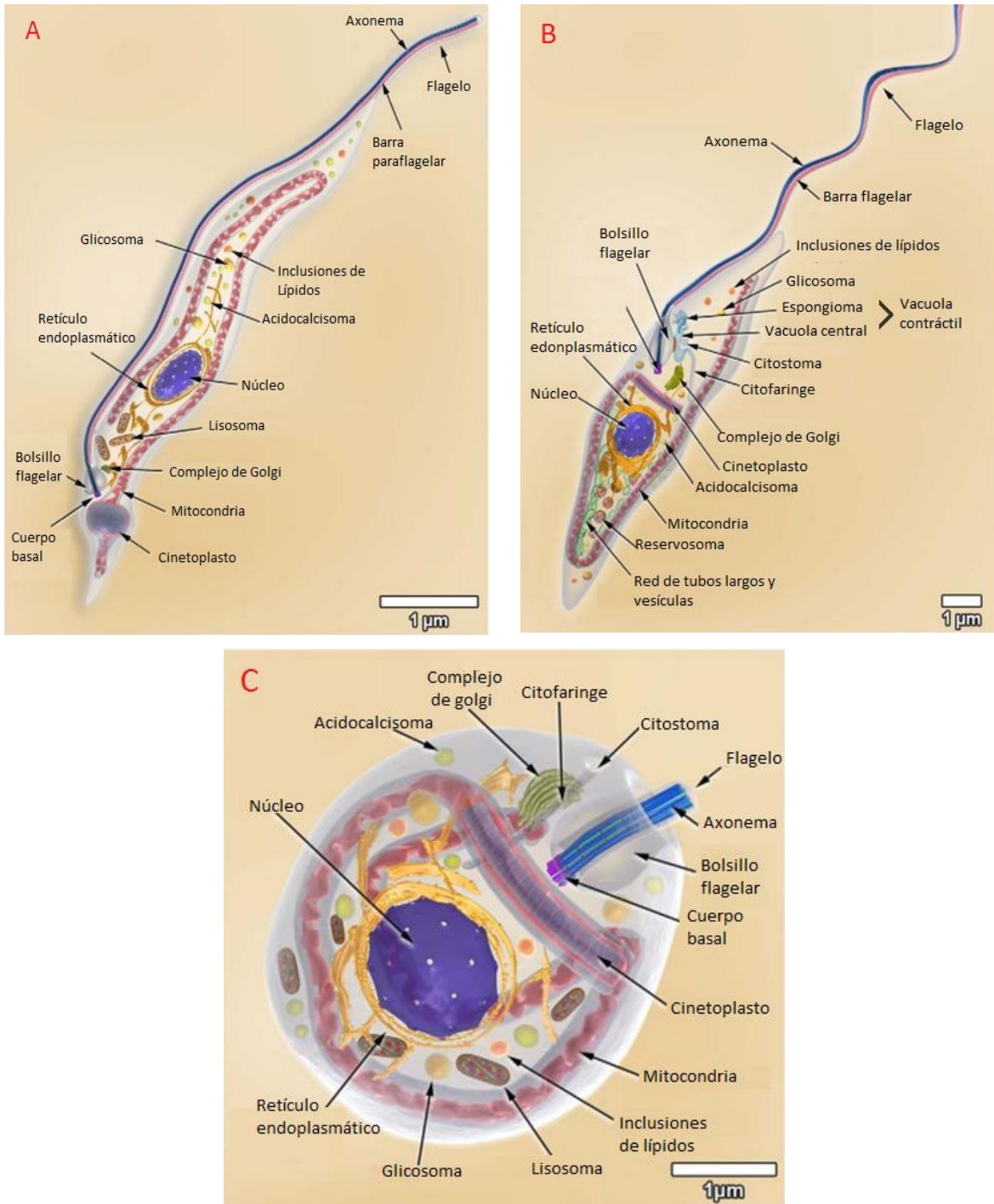
órganos, de forma oral o accidente de laboratorio. Se ha comprobado también la transmisión sexual en ratones en fase crónica (Ribeiro *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Distribución mundial de casos de la enfermedad de Chagas, en base a estimaciones oficiales, 2006-2010 (OMS, 2013).

### 1.1.1 Agente etiológico

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo que posee tres estadios de desarrollo como se muestra en la Figura 2. Epimastigote, fusiforme de 40  $\mu\text{m}$ , con núcleo y cinetoplasto en el centro, posee flagelo emergente y se reproduce por fisión binaria. Tripomastigote, estadio infeccioso, flagelado de cuerpo alargado con tamaño de 20-25  $\mu\text{m}$  y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, núcleo central, membrana ondulante, cinetoplasto subterminal posterior al núcleo y carece de capacidad replicativa. Amastigote, estadio intracelular con forma esférica, de 2-5  $\mu\text{m}$ , posee núcleo y cinetoplasto, no posee flagelo y carece de membrana ondulante y se divide por fisión binaria.

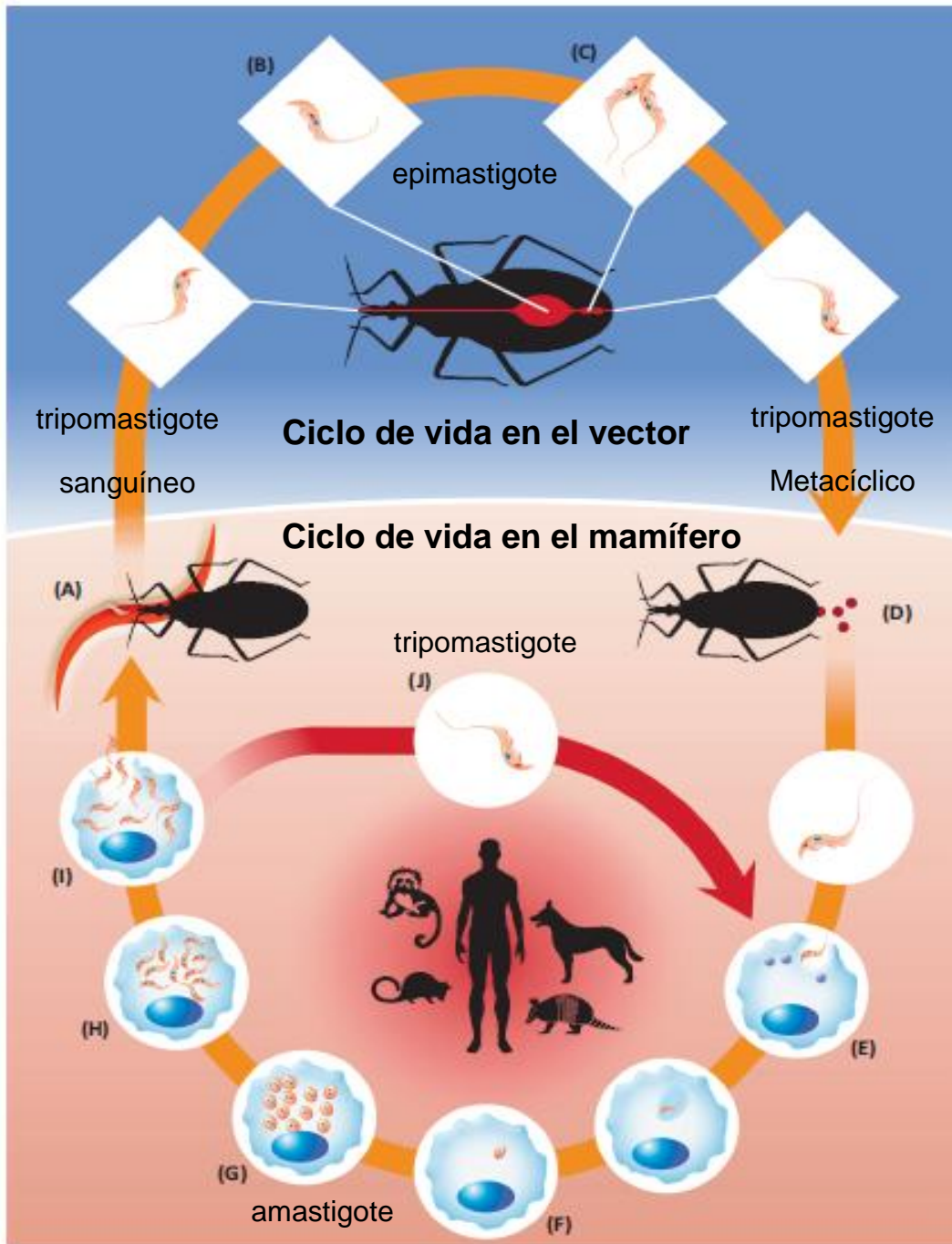


**Figura 2.** Morfología de los tres estadios de desarrollo de *Trypanosoma cruzi* A) tripomastigote B) epimastigote y c) amastigote. Imágenes tomadas y modificadas de Teixeira *et al.* (2012).



Su ciclo biológico se divide en dos partes: en el tracto digestivo del triatomino y en el mamífero infectado, como se esquematiza en la Figura 3. Inicia cuando el vector (triatomino) se alimenta de sangre contaminada con el parásito en estadio de tripomastigote sanguíneo (A). Los parásitos se diferencian en epimastigotes en el intestino medio o estomago de los triatominos (B) donde se replican mediante fisión binaria (C). En el intestino grueso, los parásitos se diferencian en tripomastigotes metacíclicos y se depositan en las heces (D).

Los tripomastigotes metacíclicos entran al torrente sanguíneo de un hospedero a través del sitio de la picadura del insecto debido a que el anfitrión frota accidentalmente las heces contaminadas sobre la piel erosionada; dentro de los tejidos el parásito entra a las células penetrándolas o por fagocitosis (E). Posteriormente, dentro de las células o macrófagos se diferencian en amastigote (F), que se replican mediante fisión binaria (G), luego se diferencian de nuevo en tripomastigotes (H). Las células se rompen y los parásitos son liberados al torrente sanguíneo y espacios intersticiales (I) y proceden a infectar también células de tejido muscular estriado y de sistema nervioso (J). También se puede adquirir la infección mediante otras vías de transmisión (Romero *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Esquema del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Modificada de Pérez *et al.* (2014). En la parte superior se encuentra el ciclo dentro del vector, en (A) el vector adquiere el parásito a través de la sangre del mamífero, posteriormente este es transportado a través del sistema digestivo del triatomino en donde se replica (C) y posteriormente puede contaminar a otros reservorios. En la parte inferior, se encuentra en ciclo en mamíferos desde la adquisición de *Trypanosoma cruzi* mediante las heces del parásito (D), pasando por entrada a las células (E) y la replicación en su interior (G), hasta la obtención de nuevos tripomastigotes sanguíneos (I).

## **1.1.2 Fases de la enfermedad**

### **1.1.2.1 Fase aguda (hasta 60 días)**

La fase aguda inicia en el momento en el que se adquiere el parásito y puede llegar a durar hasta 60 días. De forma general presenta síntomas poco específicos como: fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón, dolor abdominal o torácico, malestar general, adenopatías, mialgias y epistaxis (Pérez *et al.*, 2014). En algunos casos puede ocurrir miocarditis o meninge-encefalitis, particularmente en niños y personas inmunocomprometidas. La tasa de defunción causada por estos síntomas severos es del 10% (Castro, 2014). En el caso de infección a través del vector se puede producir un chagoma (nódulo por el proceso de inflamación localizado), en el caso de ser en la zona ocular se conoce cómo signo de Romaña (edema bpalpebral) (Romero *et al.*, 2013).

La fase aguda de la infección se asocia generalmente con parásitos que circulan por todo el torrente sanguíneo; antes de la migración en órganos de acogida (Pérez *et al.*, 2014). A nivel celular en esta etapa se produce daño celular por invasión y muerte debida a la intensa replicación de los microorganismos en células en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos que son diseminados por vía linfática y hematologica (Romero *et al.*, 2013).

### **1.1.2.2 Fase latente o intermedia**

Es una etapa asintomática que puede permanecer durante años, por lo que no posee un límite de tiempo determinado y finaliza con el inicio de la fase crónica, la cual se caracteriza por ser sintomática. Durante esta fase la infección es detectable mediante pruebas serológicas, parasitológicas (xenodiagnóstico) o histológicas (Pereira *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2014).

### **1.1.2.3 Fase crónica**

Es la etapa de la enfermedad en donde se presentan las consecuencias más graves de la infección por el parásito, se puede presentar diez e incluso treinta años después de la infección y permanecer el resto de la vida.

En esta fase la respuesta inmune celular limita la proliferación del parásito pero es incapaz de erradicar la infección, lo que lleva a una respuesta inflamatoria sostenida que subyace en el desarrollo de una o más de las formas crónicas de la enfermedad del 30-40% de los pacientes, que incluyen miocardiopatía chagásica crónica, megavísceras y neuropatías o combinadas. Presentándose las últimas afecciones en cerca del 10% de los pacientes. (Urbina, 2014; OMS, 2016). También, hay daño autoinmune ya que se cree que algunas proteínas del parásito presentan epítopes compartidos con proteínas del huésped por lo que anticuerpos reaccionan contra proteínas de los tejidos (siendo este el causante de la fase crónica de la enfermedad) (Romero *et al.*, 2013). Además, se considera que se ven afectadas células del sistema simpático de los órganos por sobre estimulación simpática causando daños irreversibles por sobrecarga (Romero *et al.*, 2013).

Entre las consecuencias de la enfermedad se encuentran: bloqueos de ramas del haz de His, del nodo auriculoventricular, arritmias, crecimiento ventricular auricular, valvulopatías, cardiomegalia, megaesófago, megacolon, hepatomegalia, esplenomegalia, aneurisma apical por la destrucción en el ápex y paredes del corazón, tromboembolismo, disautonomía, nidos de amastigotes en órganos como bazo e hígado, hepato y esplenomegalia, destrucción de fibras de musculatura lisa en esófago y colon (Pereira *et al.*, 2013, Romero *et al.*, 2013).

### **1.1.3 Tratamiento**

Por más de cuarenta años el tratamiento utilizado para la tripanosomiasis americana ha sido mediante quimioterapia, utilizando dos fármacos el nifurtimox y el benznidazol, de acuerdo con la Organización Mundial para la salud (OMS) y la Organización Panamericana para la Salud (2013), pueden llegar a curar casi el 100% de los casos si son tratados en la fase aguda de la enfermedad; sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre el tiempo desde el inicio de la infección. De acuerdo con Pérez-Molina *et al.* (2015) la cura parasitológica (medida por la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa) es mayor a 90-100 % en neonatos y se logra entre 76-85 % en pacientes con infección aguda. El éxito del tratamiento se encuentra influenciado por factores como la edad y la región geográfica de procedencia de la cepa infectante.

Estos fármacos se encuentran contraindicados en el embarazo, durante la lactancia y en pacientes con infecciones sistémicas, insuficiencia cardiaca, respiratoria, renal, hepática entre otras afecciones. Los tratamientos se caracterizan por ser prolongados (por lo menos 60 días) y estar en constante supervisión médica. Otros problemas son las infecciones poli-parasíticas con diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* y/o otros parásitos, que pueden estar asociados con variaciones en virulencia, sensibilidad a los fármacos, la predilección de órganos y el resultado clínico (Pérez *et al.*, 2014).

El uso del nifurtimox y el benznidazol en el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad, es controversial, por lo que se utilizan tratamientos estándar para cada una de las afecciones, por ejemplo el implante de desfibrilador cardioversor el tratamiento estándar para la prevención de muerte súbita por cardiomiopatía chagásica (Pereira *et al.*, 2013).

El consenso actual es tratar con benznidazol o nifurtimox a toda persona infectada con *Trypanosoma cruzi* hasta los 18 años de edad. El tratamiento debe ofrecerse a los adultos de 19-50 años que no presenten cardiopatía chagásica avanzada y es opcional en los pacientes mayores de 50 años, debido a que el beneficio del tratamiento no ha sido demostrado en esta población (Murcia *et al.*, 2013).

#### **1.1.3.1 Nifurtimox**

Nombre IUPAC:(N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina). Su estructura se muestra en la Figura 4.

Es un nitrofurano producido por síntesis química y comercializado como Lampit® por Bayer, su uso para el tratamiento de esta enfermedad fue aprobado en 1965 (Apt *et al.*, 2008). Se sabe que actúa sobre las formas amastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*. Como parte del compromiso social, la farmacéutica Bayer realiza donaciones de comprimidos de éste fármaco desde el 2004 a la OMS, adicionalmente a partir de 2012 se comprometió con un millón de comprimidos durante los siguientes cinco años y aportando US \$ 300000 para apoyar la logística y la distribución.

-Dosis: 8-10 mg/kg para adultos mayores a 17 años, 12.5-15 para adolescentes 11-16 años y para niños de 1-10 años 15-20 mg/kg. De forma oral en 3-4 tomas durante 90 a 120 días (Bern, 2015).

-Mecanismo de acción:

La acción de este medicamento está relacionada con la generación de productos de la reducción de oxígeno, contra los cuales el *Trypanosoma* es deficiente en mecanismos de detoxificación, haciéndolo susceptible al estrés oxidativo. (Apt *et al.*, 2008). La reducción por parte la nitrorreductasa de tipo I (TcNTR) (moléculas dependiente de NADH mitocondrial) del nifurtimox produce un nitrilo de cadena abierta, insaturado que tiene propiedades tripanocidas (Campos *et al.*, 2014).

-Efectos secundarios:

Durante el tratamiento se pueden presentar efectos adversos que pueden obligar a suspender el tratamiento (con una frecuencia de 6-40%), entre ellos se encuentran, anorexia y pérdida de peso (muy frecuente 50-57%), náuseas (15-50%), vómitos (15-16%), dolor gástrico, diarrea, dermatitis, vértigos (12-33%), insomnio (10-54%), dolor de cabeza (13-70%), excitabilidad, mialgias (13-30%), artralgias, alucinaciones, parestesias, psicosis, convulsiones, polineuritis periférica (2-5%) cambios de humor (10-49%) (Apt *et al.*, 2008; OMS 2013), disminución de la memoria a corto plazo (poco frecuente de 6 a 14%) y leucopenia (rara, <1%) (Bern, 2015).

### 1.1.3.2 Benznidazol

Nombre IUPAC: (N-Benzil 2 Nitro 1-Imidazolacetamida). Su estructura se muestra en la Figura 4

Es un compuesto nitroimidazolico obtenido mediante síntesis química en 1973, que se comercializó por Hoffman-La Roche con el nombre comercial de Rochagan® (Brasil) y Ranadil® (Argentina), sin embargo la última producción se realizó en el año 2003 y para el 2011 se terminó el stock del medicamento. Por lo que a partir del Abril del año 2012 laboratorios Elea junto con Maprimed y Mundo Sano en Argentina, comenzó a comercializarlo como Abarax®.

-Dosis: 5-7 mg/kg día, en dos o tres tomas durante 60 días en adultos. Menores de 12 años 10 mg/kg día dos tomas durante 60 días (Bern *et al.*, 2015).

De acuerdo con las indicaciones del fármaco se usa en el tratamiento de tripanosomiasis americana y prevención de reactivación de una infección por *Trypanosoma cruzi* en pacientes trasplantados o con inmunosupresión.

-Mecanismo de acción:

Benznidazol actúa a través de tres mecanismos efectores: la formación de enlaces covalentes con macromoléculas de *Trypanosoma cruzi* como el ácido desoxirribonucleico y el citocromo P450; el aumento de la fagocitosis y la lisis parásito a través de un mecanismo dependiente de interferón gamma y finalmente la inhibición de crecimiento del parásito mediante el bloqueo de NADH-fumarato reductasa (Apt *et al.*, 2008; Pereira & Navarro, 2013).

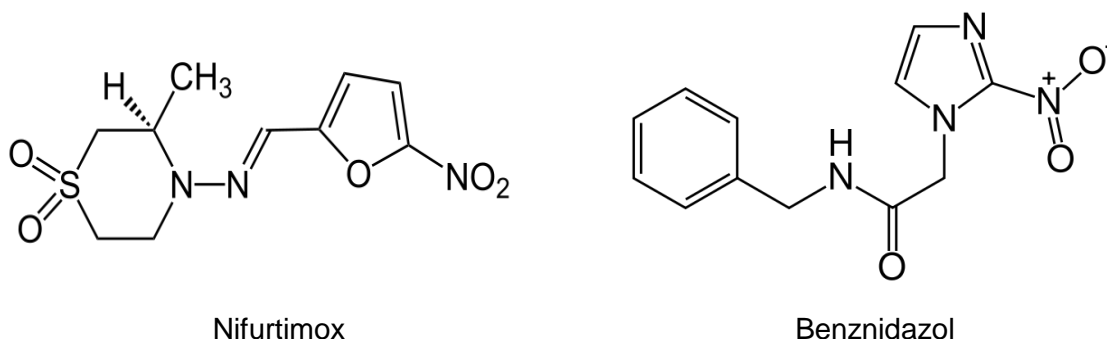
-Efectos secundarios:

Siendo frecuentes efectos adversos durante las primeras semanas de tratamiento, pueden aparecer erupciones cutáneas (la dermatitis alérgica tiene una frecuencia de 29-50%), anorexia y pérdida de peso (frecuencia de 5 a 40 %), edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia y púrpura. Pueden aparecer también náuseas (frecuencia 0-5%), leucopenia (raras <1%) y en raros casos la agranulocitosis, depresión de la médula ósea con trombocitopenia (rara con menos del 1% de frecuencia), parestesia (0-30%) y polineuritis periférica (0-30%). En animales de experimentación se ha demostrado un efecto mutagénico y teratogénico, lo que no se ha evidenciado en el hombre. (OMS, 2013; Apt *et al.*, 2008; Bern, 2015). Es descontinuada por efectos secundarios con una frecuencia de 7-20% (Bern, 2015).

#### Resistencias y variabilidad del efecto terapéutico del nifurtimox y el benznidazol:

Campos *et al.* (2014) resumen tres formas de resistencias de acuerdo con antecedentes y resultados de su investigación, la resistencia cruzada reportada (Wilkinson *et al.*, 2007), asociada la pérdida de una copia de los genes TcNTR, mutaciones dentro de la región de unión de TcNTR a el flavin mononucleótido (por pérdida de actividad enzimática) y mecanismos que no implican TcNTR, como son los casos en los que la resistencia a

nifurtimox ocurre independientemente de la resistencia al benznidazol o variaciones naturales en la sensibilidad al benznidazol.



**Figura 4.** Estructura química de los compuestos utilizados en el tratamiento de la enfermedad del Chagas.

### 1.1.3.3 Otros compuestos para el tratamiento

Existe una continua investigación en la obtención de nuevos compuestos para el tratamiento de la tripanosomiasis americana debido a su uso limitado, sus consecuencias adversas y la existencia de cepas resistentes a los fármacos actualmente utilizados. En la búsqueda de compuestos con menor toxicidad, mayor especificidad y eficacia, se han utilizado diferentes estrategias como: el docking molecular, probar fármacos usado en otros padecimientos, la búsqueda de nuevos compuestos (mediante síntesis química y productos naturales), utilizar otras indicaciones de los fármacos ya existentes y el uso en conjunto de nuevos fármacos y los utilizados tradicionalmente.

El docking molecular, utiliza herramientas computacionales en búsqueda de compuestos activos, que con conocimiento de los procesos bioquímicos establece dianas para el diseño de compuestos con actividad tripanocida, por esta vía se han evaluado gran cantidad de dianas biológicas, siendo las principales la cruzipaina y las involucradas en la síntesis de ergosterol.

Con respecto a la prueba de fármacos utilizados en otros padecimientos, han sido evaluados el posaconazol y el ravuconazol, de forma independiente y en conjunto con el benznidazol, llegando incluso algunos de estos estudios a fase clínica. Adicionalmente, se han evaluado el alopurinol y el itraconazol (Werner *et al.*, 2008).



La búsqueda de nuevos compuestos mediante exploración en productos naturales ha sido ampliamente estudiada en plantas, en organismos marinos y pocos de microorganismos.

De acuerdo con Urbina (2014), ha resultado de gran importancia en la investigación de fármacos en la fase crónica, el cambio de la hipótesis que justifica las respuestas inflamatorias presentadas en esta fase de la enfermedad. Inicialmente se pensaba que la respuesta inflamatoria era debida exclusivamente a una respuesta autoinmune, por lo que no fue de gran importancia el desarrollo de una terapia química parasiticida. Actualmente, se sabe que es necesaria la presencia de parásitos junto con una respuesta inmune desequilibrada en la respuesta inflamatoria característica de la fase crónica de la enfermedad.

Una serie de investigaciones alrededor del tratamiento de la enfermedad en fase crónica ha llegado al nivel de estudios clínicos (ClinicalTrials.gov). Dentro de las evaluaciones realizadas se encuentra el benznidazol y el nifurtimox (BENEFIT, TRAENA), inhibidores de la síntesis de ergosterol (posaconazol y ravuconazol) y su efecto sinérgico con benznidazol (CHAGASAZOL, STOP CHAGAS, E1224), también se han realizado estudios de bioequivalencia con nifurtimox, estudios farmacocinéticos del benznidazol (CINEBENZ) y del nifurtimox para la etapa crónica. Actualmente el flexinidazol está en proceso de reclutamiento para evaluar regímenes de dosificación para adultos (fase 2 de estudios clínicos).

Resultados de los estudios han demostrado que el tratamiento con inhibidores de la síntesis de ergosterol para el tratamiento de las infecciones por *Trypanosoma cruzi* humanos aún no se ha optimizado y siguen siendo los fármacos tradicionalmente utilizados los que presentan mejores resultados (Molina *et al.*, 2014; Urbina, 2015).

#### **1.1.4 Prevención de la enfermedad**

La principal estrategia para la eliminación de la transmisión de la enfermedad ha sido mediante el control del vector en las áreas endémicas, por lo que se han desarrollado diferentes iniciativas: en el Cono Sur (1992), en América Central (1997), en países andinos (1998), en países amazónicos (2003) y en México (2004) (OPS & OMS, 2010); han sido certificado libres de transmisión de vectores, Uruguay (1997), Chile (1999), Brasil (2006),

áreas importantes de Argentina, Bolivia, Paraguay y algunas zonas de América central (Schofield *et al.*, 2006, Pereira & Navarro, 2013). El certificado de la OMS que declara un área libre de transmisión del vector (*Triatoma infestans*) no significa interrupción completa de la transmisión, sino más bien control efectivo (Pereira & Navarro, 2013). La transmisión persiste en amplias zonas del continente, principalmente debido a que no tienen programas nacionales para el control de vectores de la enfermedad de Chagas o aún no han sido implementados efectivamente (Gürtler *et al.*, 2008).

Otras medidas de prevención son el cribado de la sangre en transfusiones, tejidos o células de órganos donados en trasplantes y cribados en hijos de madres infectadas. Como parte de la iniciativa del cono sur el 100 % de los bancos de sangre públicos y el 80% de los privados en Argentina y el 100% de Brasil, Chile y Uruguay realizan el tamizaje serológico obligatorio (Pereira & Navarro, 2013). Aunque el control de vectores y el examen serológico de los bancos de sangre ha reducido en gran medida la transmisión del parásito, los costos para mantener este tipo de programas de control, así como las diferencias entre las especies de vectores, la existencia de reservorios animales, la persistencia del parásito en las personas con infección crónica y la falta de quimioterapia adecuada para el tratamiento de la infección hacen la erradicación completa de *Trypanosoma cruzi* imposible (Rodríguez-Morales *et al.*, 2015). Adicionalmente, se sabe que las mujeres tratadas antes del embarazo son significativamente menos propensas que las no tratadas a transmitir la infección a su descendencia, lo que contribuye a impulsar el tratamiento de las niñas y las mujeres no embarazadas de edad reproductiva (Bern, 2015).

El diseño de vacunas frente a la enfermedad de Chagas se centra en la prevención de la infección y obtener vacunas terapéuticas, para evitar o retrasar la participación de afecciones en el corazón y/o el tracto digestivo en individuos asintomáticos con enfermedad del Chagas crónica y para revertir las lesiones tisulares (Bontempi *et al.*, 2016). No existe actualmente una vacuna que sea utilizada en la prevención de la enfermedad, sin embargo existen constantes estudios de diferentes grupos de investigación para su desarrollo. La inmunización activa contra este protozooario se investiga desde 1912, cuando Blanchard demostró que los animales que sobrevivían a la infección aguda con *Trypanosoma cruzi* se volvían resistentes a la reinfección (Rodríguez-Morales *et al.*, 2015). Se han explorado diferentes estrategias para la producción de

vacunas entre las que se encuentran: vacunación por vectores (Farrow *et al.*, 2016), vacunas de AND (Arce-Fonseca *et al.*, 2015), proteína recombinante y vacunación heteróloga (Quijano-Hernández & Dumonteil, 2011; Vázquez-Chagoyán *et al.*, 2011; Gupta & Garg, 2015). A pesar de las diferentes estrategias utilizadas para la obtención de vacunas en la prevención y tratamiento de la enfermedad ninguna de ellas ha sido probada en humanos.

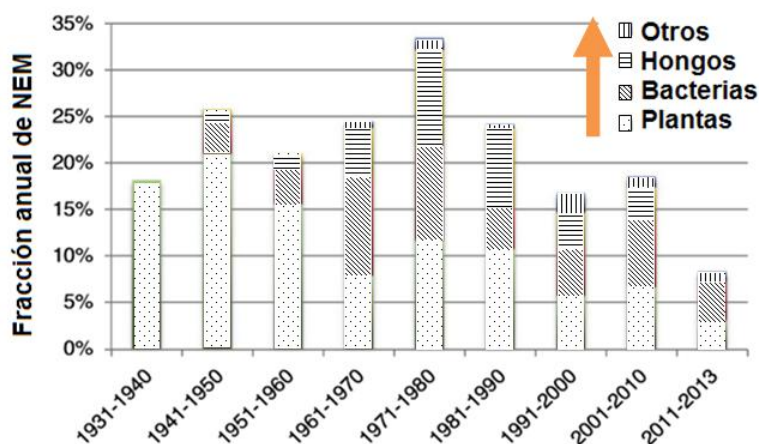
Siguen existiendo aún grandes desafíos en la eliminación de la transmisión de la enfermedad, como lo menciona la OMS (2016), entre los que se encuentran, el surgimiento de la enfermedad en nuevos lugares, el aumento y promoción en el diagnóstico y tratamiento, asistencia sanitaria, fortalecimiento de sistemas de vigilancia e información epidemiológica, así como el mantenimiento y consolidación de avances ya realizados en el control de la enfermedad.

Con relación al control de la enfermedad existen otros esfuerzos como la declaración de Londres sobre Enfermedades Tropicales Desatendidas por OMS, la fundación Bill y Melinda Gates y compañías farmacéuticas, en donde se propone que para el 2020 entre otras cosas el 100% del control de la transmisión congénita, 100% de los países con certificación de la interrupción del trasplante de órganos, 100% de la detección de la transmisión transfusional, 100 % de los países con acceso al tratamiento antiparasitario y 100% de los pacientes infectados atendidos.

## **1.2 Actividad biológica de metabolitos secundarios de *Pseudomonas***

Históricamente los productos naturales y sus derivados han jugado una parte importante en la medicina, produciendo cerca de la mitad de nuevas entidades moleculares (NEM) aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (Patridge *et al.*, 2016). En la Figura 5 se observan los productos naturales aprobados, excluyendo los que provienen de mamíferos. Como se observa desde los años cuarenta, productos naturales derivados de bacterias han mantenido una fracción dentro de los NEM, adicionalmente es notable como han disminuido en las últimas décadas los provenientes de fuentes como plantas y hongos.

Los productos naturales de microorganismos asociados a plantas son altamente atractivos ya que pueden llegar a estar relacionados con los producidos principalmente por las plantas a las que se asocian, en combinación con los generados únicamente por estos para su defensa de predadores y comunicación con otros organismos.



**Figura 5.** Fracción anual aprobada por la FDA de nuevas entidades moleculares (NEM) dividida por fuente ambiental en el tiempo (Patridge *et al.*, 2016).

### 1.2.1 *Magnolia dealbata* Zucc.

*Magnolia* es un género de plantas que se encuentran distribuidas a lo largo del continente americano y sureste del Asia (Lee *et al.*, 2011). De acuerdo con Magnolia Society International (disponible en [magnoliasociety.org](http://magnoliasociety.org)) existen más de 200 especies de magnolias.

Este género se caracteriza por un amplio uso en la medicina tradicional especialmente en China, Japón y Corea (Lee *et al.*, 2011), siendo generosamente estudiado a nivel fitoquímico y farmacológico en el último siglo. Es rico en compuestos bioactivos, se han reportado al menos 255 diferentes compuestos producidos (alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, neolignanos, fenilpropanoides y terpenoides) con actividad biológica (Tachikawa *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011).

En la medicina tradicional la corteza de *Magnolia* ha sido utilizada en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, la ansiedad y enfermedades alérgicas, (Lee *et al.*, 2011).

Entre los compuestos con actividad biológica han destacado los neolignanos, como se describe a continuación:

**Magnolol** (5,5'-dialil-2,2'-dihidroxibifenil): se encontró en la corteza de *Magnolia obovata*, posee actividades, anti-cancerígena, anti-inflamatoria, anti-depresiva, ansiolítica, anti-convulsiva, anti-nociceptiva, anti-accidente cerebrovascular, antiplaquetaria, anti-asmáticos, anti-oxidante, favorece el crecimiento de las neuritas, la relajación del músculo liso y posee potencial uso en terapia contra el cáncer de mama (Lee *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013).

**Honokiol** (3,5'-dialil-4,2'-dihidroxibifenil): fue el segundo compuesto reportado para este género, posee actividades, anti-cancerígena, anti-inflamatoria, anti-depresiva, ansiolítica, anti-convulsiva, anti-nociceptiva, anti-accidente cerebrovascular, antiplaquetaria, efectos anti-asmáticos, anti-oxidante, antiangiogénico, favorece el crecimiento de las neuritas y la relajación del músculo liso. (Leet *et al.*, 2011; Fried & Arbiser, 2009).

**4-O-methylhonokiol** (3,5'-dialil-2'-hidroxi-4-metoxibifenil): presenta actividad anti-accidente cerebrovascular, efectos de: desarrollo de neuritas, anti-inflamatorios, anti-oxidante y anti-Alzheimer (Leet *et al.*, 2011).

**Obovatol** (4',5'- dialil-2,3-dihidroxibifenil éter): posee efectos: anti-cancerígeno, ansiolíticos, anti-inflamatorio y antioxidante (Lee *et al.*, 2011).

La *Magnolia dealbata* Zucc. es una especie endémica mexicana, que posee un amplio uso ornamental, habita en clima templado entre los 1500 y los 1800 metros sobre el nivel del mar, común en la zona de transición entre el bosque mesófilo de montaña y bosques de encino y de pino de acuerdo con el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Pertenece a los bosques de niebla, encontrándose distribuida en los estados de Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz (Velazco-Macías *et al.*, 2008). De acuerdo con la legislación mexicana está considerada en *peligro de extinción* en la NOM-059-SEMARNAT-2001 (DOF, 2002) y se encuentra en la categoría peligro de extinción del IUCN Red Data Book (1994).

En el siglo XVI, Martín de la Cruz la señala como diurético y tónico y Bernardino de Sahagún la refiere como tóxico (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana medicina tradicional). Como uso etnobotánico en Puebla se indica en

problemas del corazón incluyendo ataques. También se le utiliza para calmar los nervios, tratar la alferecía de niños, el susto y en Veracruz para atender a los que sufren de espanto (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana medicina tradicional). Se ha destacado debido a su uso empírico en tratamiento de epilepsia, en enfermedades cardiacas e hipertensión. Además, se ha evaluado su actividad antidiabética e insecticida (Alonso-Castro *et al.*, 2011; Flores-Estévez, 2015).

### **1.2.2 Microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc.**

En trabajos previos realizados en el grupo de investigación, se ha realizado el aislamiento de microorganismos asociados a plantas utilizadas en medicina tradicional y endémicas mexicanas, con un interés principal en microorganismos endófitos. Como parte de este trabajo, en el mes de septiembre del año 2009 fue realizada una colecta de material biológico de *Magnolia dealbata* Zucc. en el municipio de Coyopolan (Veracruz), obteniéndose muestras de corteza, raíz, hojas, ramas y frutos de dos árboles diferentes pertenecientes a esta especie; se obtuvieron un total de 107 aislados: 55 de bacterias y 52 de hongos. Se realizó una caracterización parcial de las cepas de hongos y bacterias mediante microscopio estereoscópico y tinción de Gram (Guzmán-Trampe, 2012). Dentro de los aislamientos bacterianos un grupo clasificado como perteneciente al género de *Pseudomonas* (de acuerdo con la caracterización molecular mediante la secuencia del 16 S rDNA y bioquímica utilizando el equipo VITEK 2) fue altamente llamativo debido a las actividades biológicas exhibidas (antibióticas, antitumorales y tripanocidas) por los que fueron evaluados dos aislados 28A y 1AC, a través de extractos con disolventes (diclorometano y acetato de etilo) a nivel de la biomasa y el sobrenadante (caldo de cultivo junto con metabolitos resultantes del cultivo del microorganismo) (Guzmán *et al.*, 2014).

La actividad antibiótica se presentó solamente en bacterias gram negativas, utilizando como microorganismos modelos a *Micrococcus luteus* y a *Bacillus subtilis* con valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, por sus siglas en inglés) de 6.25 µg/mL en ambos casos para el sobrenadante de 28A; 12.5 y 6.25 µg/mL respectivamente, para la biomasa de 28A; 25.0 y 12.5 µg/mL para el sobrenadante de 1AC; 25.0 y 12.5 µg/mL para la biomasa de 1AC, como controles positivos se utilizó la eritromicina (antibiótico utilizado frente a gram positivos especialmente frente a cocos) con una MIC de 0.78 µg/mL, para

todos los casos las MICs fueron un orden de magnitud mayor que la mostrada por el control .

Con respecto a la actividad tripanocida frente a la cepa de *Trypanosoma cruzi* CL-Brener, utilizando los mismos extractos, la mejor actividad se observó en el sobrenadante con  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria del 50% de la población) de  $14.17 \pm 8.27$  y  $97.00 \pm 13.00 \mu\text{g/mL}$ ; en comparación de la biomasa  $36.25 \pm 5.49$  y de  $280.00 \pm 32.00 \mu\text{g/mL}$ , que tuvo valores del doble de  $CI_{50}$ , mientras que los controles positivos poseen valores con un orden de magnitud menor a los presentados por los extractos (benznidazol  $1.16 \pm 0.10$  y nifurtimox  $0.11 \mu\text{g/mL} \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ).

La evaluación frente a líneas tumorales se realizó utilizando las líneas MCF7 (cáncer de mama de humano) y 4T1 (cáncer de mama de ratón), siendo la mayor actividad la mostrada por el sobrenadante de 28A ( $0.057 \pm 0.05$  y  $0.014 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$ ), que llegó a ser un orden de magnitud más baja que la presentada por el control positivo doxorubicina ( $0.11 \pm 0.03$  y  $0.53 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ), para el caso del aislado 1AC, la actividad presentada frente a las dos líneas celulares fue mucho menor en todos los casos por dos órdenes de magnitud de la presentada por 28A (sobrenadantes  $34.30 \pm 4.76$  y  $18.64 \pm 2.31 \mu\text{g/mL}$  y biomasa  $16.10 \pm 8.75$  y  $11.48 \pm 3.38 \mu\text{g/mL}$ ).

Siendo el sobrenadante de 28A el extracto obtenido que presentó los mejores valores en las actividades biológicas evaluadas.

### **1.3 *Pseudomonas* sp. y sus metabolitos secundarios**

*Pseudomonas* es un género de bacterias, que de acuerdo con su clasificación taxonómica pertenece al filum: proteobacteria, clase: Gammaproteobacteria, orden: Pseudomonadales, familia: Pseudomonadaceae.

Al género de *Pseudomonas* lo conforman bacilos rectos o ligeramente curvos no helicoidales, cuyo tamaño varía entre  $0,5-1,0 \times 1,5-5,0 \mu\text{m}$ . Son bacterias gram negativas, móviles debido a que presentan uno o más flagelos polares, encontrándose también en algunas especies formación de flagelos laterales de onda corta. (Garrity *et al.*, 2005)

Metabólicamente se caracterizan por ser oxidasas positiva o negativa, catalasa positiva, no fermentativas y utilizar la ruta de Entner- Doudoroff. Son aerobios y utilizan el oxígeno como aceptor terminal de electrones, aunque en algunos casos pueden llegar a utilizar un aceptor de electrones alternativo permitiendo el crecimiento anaerobio. La mayoría de especies no requieren factores de crecimiento orgánicos y no crecen a pH inferiores a 4.5. Son quimiorganotróficas (Garrity, 2005). Algunas especies pueden ser patógenas de humanos, de animales y de plantas. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista de humanos. *Pseudomonas syringae*, es patógeno de plantas.

Las especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* constituyen, junto con especies de *Streptomyces* la mayoría de las bacterias que se encuentran a menudo en la rizósfera de muchas plantas de cultivo (Bouizgarne, 2013). Algunas especies de *Pseudomonas* fluorescentes (especialmente asociadas a la rizósfera) han sido altamente estudiadas por: ser promotoras del crecimiento vegetal, mediante la producción de fitohormonas, la mejora en la nutrición vegetal a través de la solubilización de minerales (cómo los sideróforos) y la producción de enzimas y metabolitos con actividad frente a organismos parásitos de plantas (Jousset *et al.*, 2009; Chakravarty & Kalita, 2012; Bouizgarne, 2013; Ahmed *et al.*, 2014).

Los compuestos producidos por *Pseudomonas* fluorescentes con actividades biológicas se pueden clasificar en cuatro grupos: alcaloides, policétidos y derivados de ácidos grasos, derivados de aminoácidos y péptidos no ribosomales y volátiles. A continuación se presentan ejemplos de compuestos bioactivos de los diferentes grupos y algunas de sus estructuras se muestran en la Tabla 1. Se excluyen, metabolitos activos exclusivos de cepas patógenas como: *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas syringae*.

### Alcaloides

Dentro de ésta clasificación se incluyen compuestos como fenazinas, pirroles, índoles y quinolonas.

Se han descrito varias fenazinas producidas por *Pseudomonas* caracterizadas por su amplia actividad antibiótica (*Staphylococcus aureus* FDA JC-1, *Staphylococcus aureus* Smith, *Staphylococcus aureus* MTC96, *Staphylococcus aureus* MLS-16 MTCC2940, *Bacillus subtilis* MTCC121, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* MTCC739, *Pseudomonas*



*aeruginosa* MTCC2453, *Klebsiella planticola* MTCC530, *Candida albicans* MTCC 3017, *Streptococcus pyogenes* C203, *Streptococcus pneumoniae* I, *Micrococcus luteus* y *Mycoplasma gallisepticum* S-6), adicionalmente, se ha reportado actividad antifúngica (*Fusarium oxysporum*, *Pythium capsici*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*), citotóxica (leucemia murina P388, células de hígado humano Hep G2, carcinoma pulmonar humano A549, células de glándula mamaria de un sitio metatástico MDA MB 231 y cáncer cérvico uterino HeLa) e insecticida (*Rhyzopertha dominica*, *Spodoptera litura* y *Achaea janata*) (Brisbane *et al.*, 1987; Shoji *et al.*, 1988; Kamal *et al.*, 2012).

Entre los derivados del ácido antranílico se encuentran las quinolinas, componentes típicos de la familia de plantas Rutaceae. Las 2–alquil quinolina-4-(1H)–onas también han sido encontradas en *Pseudomonas* (Da Silva *et al.*, 2013) y algunos de los compuestos derivados de éste ácido poseen actividades biológicas, entre ellas antiprotozoaria, por lo tanto es posible pensar que existen compuestos característicos de plantas que son producidos por microorganismos que poseen gran cantidad de actividades diferentes. El N-mercapto-4-formylcarbostyryl, es activo frente a hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium culmorum*, *Cladosporium cucumerinum* y *Colletotrichum lagenarium*) (Fakhouria *et al.*, 2001).

Entre los derivados del pirrol se encuentran la pioluteorina que posee actividad antibiótica (*Pythium ultimum*, *Thielavia basicola*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*) (Howell & Stipanovic, 1980; Keel *et al.*, 1992) y la pirrolnitrina con actividad antifúngica (*Pyrenophoratriici-repentis*, *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Alternaria* sp., *Verticillium dahliae* A y *Fusarium* sp.) (Pfender *et al.*, 1993; Howell & Stipanovic, 1979).

Fluviolos (pirazolo-(4,3-e)-as-triazina) antimicrobianos (*Staphylococcus aureus* 209, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium* B5, *Clavibacter michiganensis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas malvacearum*), antifúngicos (*Epidermophyton* K.W., *Trichophyton gypseum*, *Helminthosporium gramineum*, *Penicillium rugulosum*) y antitumorales (ascitis del carcinoma de Ehrlich en ratones blancos) (Smirnov *et al.*, 1997).

### Policétidos y derivados de ácidos grasos

El 2-4 diacetilfloroglucinol es el compuesto más ampliamente estudiado de *Pseudomonas*; es un tóxico de amplio espectro, posee actividad antifúngica (*Pythium ultimum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycpersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*), antibacteriana (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Clostridium welchii*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Micrococcus luteus*), anti-nemátodos (*Globodera rostochiensis*, *Caenorhabditis elegans*), anti-protozoarios (*Leishmania donovani*), fitotóxica (afectando crecimiento y/o germinación de semillas en plantas de pepino, lino tabaco, berro entre otros) y citotóxica (Vero, células epiteliales del riñón de un mono verde africano y LLC-PK1, células de túbulo proximal de riñón porcino) (Shanahan *et al.*, 1992; Keel *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1992; Cronin *et al.*, 1997; Raaijmakers and Weller, 2001; De La Fuente *et al.*, 2004; Bharate *et al.*, 2007; Neidig *et al.*, 2011).

Existen otros compuestos estudiados pero en menor proporción como los ejemplos presentados a continuación:

Entre los alquil resorcinoles, el 2,5-dialquilresorcinol se encuentra reportado como antibacteriano y antifúngico (*Trichophyton gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Blastomyces dermatitidis*) (Kanda *et al.*, 1975).

La mupirocina (ácido pseudomonico A) es un compuesto antibacteriano activo frente a diferentes aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, incluyendo cepas multi resistentes de *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Sutherland *et al.*, 1985). Se encuentra en el mercado bajo los nombres de: Bactroban (pomada y en crema 2%), Plasmine (2%), Mupirocina dermogen 2mg/g, Mupirocina ISDIN y Centany.

La karalicina es un compuesto antifúngico (*Candida albicans* CDC B3, *Candida albicans*, *Candida keijr* Y0 y *Candida tropicalis* C), antiviral (Herpes simplex virus tipo 1) y citotóxico (Vero) (Lampis *et al.*, 1996).

Ramnolípidos no producidos por *Pseudomonas aeruginosa* se han identificado con actividad antibiótica (*Staphylococcus aureus* MLS-16 MTCC2940, *Bacillus subtilis* MTCC121, *Escherichia coli* MTCC739, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC2453), antifúngica (*Colletotrichum orbiculare*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*), citotóxica (MDA MB 231, HeLa), antidepredadora (*Spodoptera litura* y *Achaea janata*) e insecticida (*Rhyzopertha dominica*) (Ahmed *et al.*, 2012).

#### Derivados de aminoácidos y péptidos no ribosomales

De éste grupo de compuestos son los lipopéptidos cíclicos, conocidos ampliamente por su actividad biosurfactante.

La pseudofactina II ha sido estudiada por su actividad antiadhesiva y la disminución de adhesión de cepas bacterianas a superficies (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* y *Candida albicans*) (Janek *et al.*, 2012) de forma semejante las putisolvinas I y II inhiben la formación de biopelículas (Kuiper *et al.*, 2004) y tiene actividad frente a hongos (causa lisis en zoosporas de *Phytophthora capsici* e inhibe crecimiento miceliar de *Botrytis cinerea* y *R. solani*) (Kruijt *et al.*, 2009).

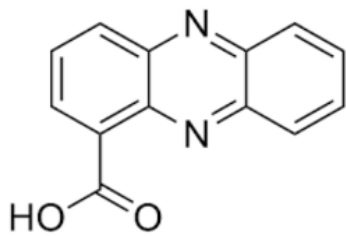
El masetolido A y la viscosina evaden la depredación protozoaria de las bacterias (Mazzola *et al.*, 2009). El Masetolido A adicionalmente posee actividad antifúngica (*Phytophthora infestans*) (Tran *et al.*, 2007). La viscosinamida, la tensina y la anfisina poseen actividad antifúngica (*Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*) (Nielsen & Sørensen, 2003).

#### Volátiles

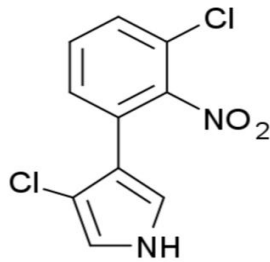
El cianuro de hidrógeno es un compuesto producido por *Pseudomonas* ampliamente reportado por su toxicidad frente a patógenos de plantas, siendo este un mecanismo de las bacterias frente a predadores del suelo, adicionalmente han sido descritos otros compuestos volátiles que promueven el crecimiento vegetal, encontrando que gran parte de estos son volátiles que contienen azufre (Hernández-León *et al.*, 2015).

**Tabla 1.** Ejemplos de las estructuras químicas de algunos compuestos producidos por *Pseudomonas*

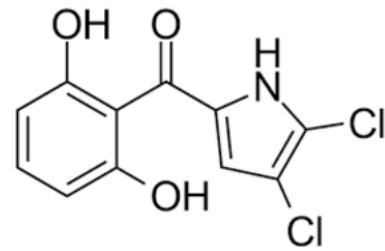
**Alcaloides**



Fenazina-1-carboxílico  
(Brisbane *et al.*, 1987).

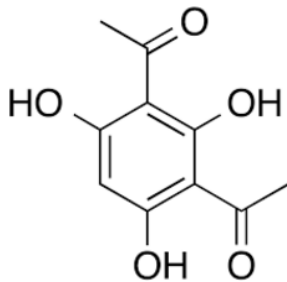


Pirrolnitrina

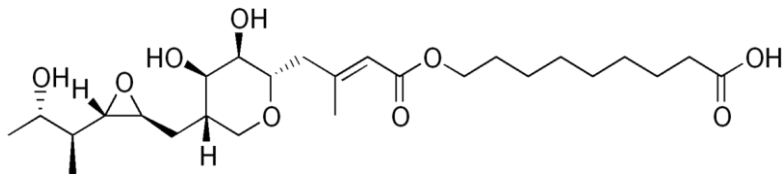


Pioluteorina

**Policétidos y derivados de ácidos grasos**

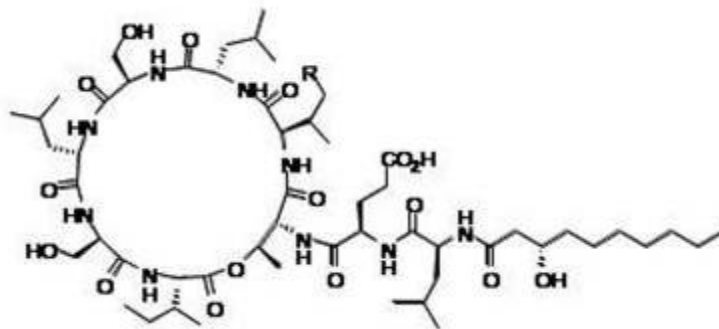


2-4 diacetilfloroglucinol



Ácido pseudomónico A

**Derivados de aminoácidos y péptidos no ribosomales**



R= CH<sub>3</sub>; masetólido y R=H; viscosina (Mazzola *et al.*, 2009).

## 2 Justificación

La tripanosomiasis americana es una enfermedad potencialmente mortal, con cerca de 6-7 millones de personas infectadas a nivel mundial. Los compuestos nifurtimox y benznidazol son fármacos específicos para el tratamiento de ésta y no han sido reemplazados en cerca de cuarenta años. Sin embargo, estos fármacos poseen un uso limitado debido a que: producen múltiples efectos negativos, que pueden ocasionar que se interrumpa el tratamiento y su uso no es eficaz en todas las fases de la enfermedad, ni en todos los casos de infección; debido a resistencias y baja sensibilidad frente a éstos. Lo que en conjunto hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento de la enfermedad.

Dentro las estrategias utilizadas en la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividades biológicas, se encuentra la de los productos naturales; la cual es altamente atractiva la búsqueda de productos metabólicos de microorganismos asociados a plantas.

Por lo tanto, resulta de gran interés la obtención, caracterización y producción de compuestos que presenten actividad tripanocida, de una cepa de *Pseudomonas* sp. asociada a *Magnolia dealbata* Zucc.

## 3 Hipótesis

Uno o varios de los metabolitos producidos por cepa de *Pseudomonas* sp. aislada de *Magnolia dealbata* Zucc. posee o poseen actividad tripanocida.

## 4 Objetivos

### 4.1 General

Caracterizar química y biológicamente los compuestos tripanocidas producidos por una *Pseudomonas* sp. aislada de *Magnolia dealbata* Zucc.

### 4.2 Específicos

1. Seleccionar una cepa con actividad tripanocida a partir de *Pseudomonas* previamente aisladas.
2. Determinar condiciones para obtención de compuestos tripanocidas.
3. Aislar el o los compuestos con actividad tripanocida.
4. Evaluar actividad tripanocida del o los compuestos aislados.
5. Identificar químicamente el o los compuestos con actividad parasiticida mediante técnicas espectroscópicas.

## 5 Metodologías

### 5.1 Selección de una colonia de *Pseudomonas*

Se reactivó un liofilizado del aislado 28A (un conjunto de *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizósfera de *Magnolia dealbata* Zucc.) (Guzman-Trampe, 2012). En condiciones de esterilidad se resuspendió el liofilizado de microorganismos en 3 mL de caldo nutritivo. La suspensión de microorganismos fue sembrada en agar nutritivo, luego de evaporado el medio y se realizó una separación por estría. Pasadas 48 h a 29°C se seleccionaron 12 colonias, que fueron resembradas en agar nutritivo, posteriormente se realizaron ensayos de antibiosis por estría en medio King B y agar nutritivo por triplicado y finalmente se seleccionó una colonia que conservara su patrón de antibiosis.

### 5.2 Preservación de microorganismos

#### 5.2.1 Preservación de la cepa de *Pseudomonas*

Se tomó la colonia seleccionada a partir de una de las cajas estriadas previamente y se cultivó en 50 mL de caldo nutritivo a 29°C y 180 rpm por 24 h. El cultivo fue centrifugado durante 15 min a 12000 rpm y 4°C, posteriormente el sobrenadante se retiró y se realizó un lavado con 10 mL de solución salina (0.85% de NaCl). Se centrifugó nuevamente y el precipitado obtenido fue resuspendido en 10 mL de medio Gherna para criopreservación (ver Anexo 1), consecutivamente distribuido en alícuotas de 300 µL y conservado a -70°C. Adicionalmente se realizó la liofilización de la colonia seleccionada. Para verificar la preservación del microorganismo aislado, se realizó la reactivación del liofilizado. De manera semejante a la realizada durante la selección de la colonia y fue evaluado el patrón de antibiosis de las colonias obtenidas.

#### 5.2.2 Preservación de los organismos para antibiosis

Para todos los casos se realizó el cultivo del microorganismo en caldo nutritivo, a 37°C durante 24 h. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (previamente clasificada como *Micrococcus luteus*) (Tang & Gillevet, 2003), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

Los cultivos se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm y a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con 10 mL de solución salina y fueron nuevamente centrifugados. La biomasa obtenida del lavado fue preservada en una solución de glicerol al 20% y distribuida en alícuotas de 300 µL que fueron preservadas a -70°C.

### **5.3 Mantenimiento de parásitos y líneas celulares**

#### **5.3.1 Cultivo de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro**

El mantenimiento del parásito se realizó mediante cultivos semanales de 5 mL en medio LIT (liver infusion tryptose) complementado (ver Anexo 1), a 28°C y en frascos para cultivo celular de 25 mL; para cada resiembra la concentración inicial de parásitos fue de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL (recuento directo en microscopio, ver anexo 2).

#### **5.3.2 Cultivo de células Vero**

El cultivo se realizó en frascos de 25 cm<sup>3</sup> utilizando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Para el mantenimiento, se retiró el medio y se lavó el cultivo con 2 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (5 mM, estéril) por 5 min a temperatura ambiente, luego se agregó 1 mL de tripsina (1 mg/mL) por 5 min a 37°C para despegar las células adheridas. Transcurrido el tiempo de acción de la tripsina se adicionó 1 mL de DMEM y se mezcló suavemente utilizando una pipeta. Se resembró 0.3 mL (relación 1:6 de acuerdo a instrucciones de ATCC (<http://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#culturemethod>) en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> nuevo y con 5 mL de DMEM complementado con suero fetal bovino. Este procedimiento se realizó cada tercer día.

El EDTA debe prepararse a una concentración final de 5 mM en tampón fosfato salino y se esteriliza por filtración en membrana con poro de 0.22 micrómetros. Debe mantenerse a 4°C.



La tripsina (Tripsina-EDTA GIBCO cat. No. 15405-012) en tampón fosfato salino, se esterilizó por filtración en membrana con poro de 0.22 micrómetros y se mantuvieron a 4°C.

#### **5.4 Obtención de extractos**

Para el cultivo se realizaron inóculos a partir de los viales de preservación, de los cuales se utilizaron 50 µL en 50 mL medio y se les permitió el crecimiento durante 12-16 h.

Los cultivos fueron inoculados con un valor de D.O. máximo de 0.15 a 600 nm. Tanto para el inóculo como para el cultivo utilizado, las condiciones de incubación fueron 29°C y 180 rpm en medio caldo nutritivo complementado con 0.5% de glucosa.

Cumplido el tiempo de cultivo, el microorganismo se separó del sobrenadante mediante centrifugación a 1200 rpm durante 15 min, posteriormente se filtró por membrana con poro de 0.45 µm. Se realizó la extracción líquido- líquido del sobrenadante, utilizando como disolventes diclorometano y acetato de etilo. La relación utilizada en todos los casos para la extracción fue de 1:2 disolvente, sobrenadante.

#### **5.5 Medición de actividades biológicas**

##### **5.5.1 Actividad antibiótica**

Las cepas utilizadas para la antibiosis fueron reactivadas a partir de los viales de preservación en caldo nutritivo durante 24 h y a 37°C, posteriormente se pasaron a medio sólido (agar nutritivo) durante 24h. Para todos los casos en el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó medio YPD (yeast extract, peptone, dextrose) (ver anexo 1). En los ensayos de antibiosis se utilizaron colonias aisladas de cada una de las cepas (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*) y fueron verificadas al microscopio y mediante una tinción de Gram.

La actividad antibiótica fue medida utilizando dos metodologías: mediante estría (de forma cualitativa) y por microdilución (de forma cuantitativa). Para el primer caso, se realiza a través de estrías de todos los microorganismos, iniciando con las de *Pseudomonas* sp. en

forma de línea en el centro de la caja de petri, pasadas 24h se realizaron las de los microorganismos de prueba de forma perpendicular a la inicial evitando que se intersequen. Para el segundo caso, la actividad antibiótica por microdilución, se realizó en medio Mueller Hinton (MH), con excepción de *Saccharomyces cerevisiae*. Se manejó el estándar McFarland 0.5 y se siguió el procedimiento por microdilución reportado por Schwalbe *et al.* (2007).

### **5.5.2 Actividad tripanocida**

Los cultivos de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro se realizaron a 28°C, en medio de cultivo LIT complementado en frascos de cultivo celular de 25 mL, con valores iniciales de  $4 \times 10^6$  parásitos/mL, se incubó durante 4-5 días (hasta alcanzar la fase exponencial óptima  $40 \times 10^6$  -  $60 \times 10^6$  parásitos/mL).

La medición se realizó utilizando el kit de recuento celular WST 8 de Dojindo de acuerdo con la metodología propuesta por Nagafuji *et al.* (2004). Se evaluaron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro en DMEM (DML10-500ML de Caisson Labs). El cambio de medio de cultivo se realizó centrifugando los parásitos en medio LIT complementado a 1000 x g durante 15 min, luego de retirado el medio de cultivo, el precipitado fue resuspendido en DMEM. La evaluación de los tratamientos se realizó en placas de 96 pozos, con 100 µL de volumen total por pozo y la concentración de parásitos utilizada fue de  $30 \times 10^6$ /mL.

En cada tratamiento fue utilizado como vehículo 1.0 % dimetilsulfóxido (DMSO). Los controles positivos fueron el nifurtimox y el benznidazol y un cultivo sin tratamiento, sólo con vehículo control negativo. Pasadas las 20 h de incubación a 28°C se adicionó en cada pozo 5 µL del Kit WST-8 y se incubó 4 h a 28°C. Finalmente para la lectura de los datos fueron adicionados 110 µL etanol por pozo (para un total de 220 µL finales en cada pozo) y se midió la absorbancia de 200 µL a 450 nm.

### **5.5.3 Actividad citotóxica**

La evaluación de la actividad citotóxica se realizó mediante la medición de la viabilidad celular utilizando una solución de MTT (Sigma M2128-1G) a una concentración de 5mg/mL en tampón fosfato salino, filtrada en membrada con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Las células Vero se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/mL, se utilizaron placas de 96 pozos, con un volumen de 100  $\mu\text{L}$  por pozo, se incubaron a 37°C en atmósfera con 5%  $\text{CO}_2$  y se permitió la formación de la monocapa por 24h. Posteriormente fueron puestos los diferentes tratamientos para su evaluación. Después de 45 h de incubación con tratamiento, se adicionaron 20 $\mu\text{L}$  de MTT (para un volumen total de 120  $\mu\text{L}$ ). Pasadas tres horas se retiró el sobrenadante (medio de cultivo y solución de MTT) y los cristales de formazan fueron solubilizados en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. La absorbancia de 70  $\mu\text{L}$  fue medida a 438 nm.

### **5.5.4 Concentración mínima inhibitoria (por sus siglas en inglés MIC)**

Para la obtención de los valores de cada una de las MICs utilizando los diferentes microorganismos, se realizaron diluciones de los compuestos a evaluar entre 100-0.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y mediante una regresión logarítmica se calculó el valor de la concentración a la que se inhibe el total de la población. El tiempo de cultivo para medir la MIC fue de 18-24 h.

### **5.5.5 Concentración inhibitoria del 50% de la población ( $\text{CI}_{50}$ )**

Para la obtención de los valores de  $\text{CI}_{50}$  utilizando los diferentes microorganismos, se realizaron diluciones de los compuestos a evaluar desde 100-0.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y mediante una regresión logarítmica se calculó el valor de la concentración a la que se inhibe el 50% de la población. Para este ensayo la concentración del vehículo fue de 0.5% debido a la sensibilidad de las células Vero frente al DMSO. El tiempo de cultivo para medir la  $\text{CI}_{50}$  fue de 48 h.

## **5.6 Verificación del género *Pseudomonas* mediante rADN 16s**

Se realizó mediante la amplificación de la región rADN 16s de la cepa recuperada a partir del aislado 28A. Para esto se realizó la extracción del ácido desoxirribonucleico genómico mediante la metodología reportada por Aljanabi & Martínez (1997). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando los iniciadores y las condiciones reportadas por Guzmán-Trampe *et al.* (2014). La purificación del amplificado se realizó utilizando el KIT Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). El amplificado fue enviado a secuenciación.

## **5.7 Selección de condiciones de cultivo**

### **5.7.1 Selección del extracto a utilizar**

Para verificar la actividad tripanocida de la cepa seleccionada, se realizaron extractos secuenciales de diclorometano y acetato de etilo (disolventes con polaridad intermedia) de dos litros independientes de cultivo (el mismo proceso se realizó para el medio sin inóculo de *Pseudomas* que fue utilizado como control) y se evaluaron frente a la cepa Querétaro de *Trypanosoma cruzi*.

### **5.7.2 Curva de crecimiento y producción**

Se realizó la curva de crecimiento mediante sacrificio de matraces (para cada punto se utilizó un matraz independiente), por triplicado con dos réplicas en el tiempo. Se realizó el cultivo de acuerdo con los pasos previamente expuestos para la preparación de extractos. Fueron tomadas muestras a las 0, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 42 y 48 h, a las cuales se le midió D.O. y se realizó la extracción del sobrenadante con diclorometano.

## **5.8 Separación y purificación**

La separación y purificación de los compuestos se realizó mediante diferentes técnicas cromatográficas a partir de 0.5 g de extracto de diclorometano obtenidos de 12 L de cultivo, cada uno obtenido de forma independiente en matraz fernbach. Siendo la cromatografía definida como un método de fraccionamiento y separación de componentes

de mezclas, basada en la migración diferencial de componentes transportados en una fase móvil a través de una fase estacionaria, mediante el uso de propiedades como la capacidad de desadsorción, el reparto, el peso molecular y la afinidad de intercambio de iones.

### **5.8.1 Cromatografía en capa fina**

Se utilizaron placas de cromatografía en placa fina en fase normal (gel de sílice) y fase reversa (C18) con indicador de fluorescencia F<sub>254</sub>, Merck en soporte de aluminio.

Las fases móviles utilizadas fueron: fase normal, mezclas de hexano-diclorometano y diclorometano-etanol, y en fase reversa: acetonitrilo-agua.

Esta técnica se utilizó principalmente para la detección de los perfiles cromatográficos de las mezclas y compuestos analizados durante el fraccionamiento químico. Adicionalmente se realizó un registro de los compuestos en el visible y ultravioleta a 245 y 360 nm.

### **5.8.2 Revelado con ninhidrina**

El revelador utilizado consistió en 0.6 g de ninhidrina en 190 mL de etanol y 10 mL de ácido acético. Después de adicionar el revelador, se calentó la planca a 120°C. Este revelador permite la visualización de aminas primarias (púrpura) y secundarias (amarillo).

### **5.8.3 Revelado con fast blue B**

Se preparó una solución de fast blue B al 0.5%, en 5% de ácido acético. Este revelador permite la visualización de: cannabinoides, fenoles, agentes curtientes, cumarinas, flavonoides y aminas (Spangenberg *et al.*, 2011).

### **5.8.4 Cromatografía en placa preparativa**

La cromatografía preparativa es una técnica cromatográfica utilizada para aislar compuestos, para los propósitos de este trabajo se realizó mediante placas cromatográficas.

Se utilizó una placa cromatográfica de TLC de 20 X 20 X 0.05 cm, por aproximadamente 10 mg de muestra, el compuesto se sembró a 2.0 cm del borde inferior de la placa (orientación de acuerdo a como se va a utilizar la placa durante la separación) en forma de línea recta y con márgenes de 1.5 cm a cada uno de los lados. Se permitió el desarrollo de la separación a través de toda la placa hasta que llega al borde superior el disolvente o la mezcla de disolventes.

Para recuperar los compuestos que se separaron durante el fraccionamiento, se raspó la sílica en forma de banda de lado a lado de la placa. Y la sílica recuperada se lavó con disolventes hasta extraer los compuestos separados y posteriormente se recuperaron mediante la evaporación del disolvente.

#### **5.8.5 Fraccionamiento por columna de exclusión molecular**

La cromatografía de exclusión molecular permite hacer la separación de una mezcla de compuestos mediante la diferencia de sus pesos moleculares y la capacidad diferencial de estos para difundirse en el interior de geles no iónicos.

El fraccionamiento se realizó utilizando la resina Sephadex LH-20, que es una red de dextrano hidroxipropilado, lo que le permite tener un carácter hidrofílico y lipofílico. Esta resina de exclusión molecular está diseñada para productos naturales como esteroides, lípidos y péptidos de bajo peso molecular (35 aminoácidos). Tiene un límite de exclusión entre 4000-5000 Da dependiendo de disolvente.

La resina fue hinchada utilizando metanol durante 24 h. Las medidas de la columna fueron 2.5 cm de diámetro y 50 cm de alto en metanol. Para el caso del diclorometano su altura fue de aproximadamente 40 cm. Todas las muestras fraccionadas se resuspendieron en el disolvente utilizado y fueron previamente filtradas con filtros Durapore® con tamaño de poro de 0.45 µm. La elución se realizó utilizando metanol, acetona y diclorometano. La resina se regeneró con cuatro volúmenes iguales al volumen de la resina de metanol.

## **5.9 Determinación de la estructura química**

### **5.9.1 Espectroscopía ultravioleta-visible**

Esta es una técnica aplicable a sistemas conjugados que utiliza radiación electromagnética en la región del ultravioleta. Se utilizó como disolvente metanol. El equipo utilizado fue el espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific™ GENESYS 10S.

### **5.9.2 Espectrometría de masas**

Esta técnica permite obtener el peso molecular y generalmente un patrón de distribución estructural de un compuesto en relación a la masa/carga ( $m/z$ ) de los iones dispersados. Suministrando así información sobre la fórmula molecular del compuesto.

La metodología utilizada durante las muestras procesadas durante el trabajo fue una ionización DART.

### **5.9.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Es una técnica que permite obtener información de núcleos con momento magnético distinto a cero, que componen un compuesto ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) prefiriéndose los isotopos con mayor abundancia natural. Es una técnica no destructiva.

Para los espectros obtenidos se utilizó un equipo Bruker Fourier de 500 MHz y las muestras fueron disueltas metanol deuterado.

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Selección de la colonia de trabajo

La colonia de *Pseudomonas* sp. utilizada en el presente trabajo se obtuvo a partir del aislado previo 28A (derivado de un fragmento de raíz sin sanitizar) (Guzmán-Trampe, 2012), el cual fue reactivado a partir de un liofilizado en caldo nutritivo durante 48 h. Se recuperaron nueve colonias diferentes, que fueron sembradas en los dos medios de cultivo, agar King B y agar nutritivo para la evaluación de su actividad antibiótica, por triplicado mediante antibiosis por estría.

De acuerdo con los antecedentes en el grupo de trabajo (Guzmán-Trampe *et al.*, 2014), los aislados de *Pseudomonas* que presentaron actividad tripanocida se caracterizaron por presentar también un espectro de antibiosis con efecto sobre más de dos microorganismos de prueba evaluados, por lo que seleccionó una cepa que mantuviera esta característica.

En la Figura 6 se observa el crecimiento de la cepa seleccionada en cada uno de los medios de cultivo utilizados, evidenciando la producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas* sp. en agar King B; utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* sp. con base en la producción de fluoresceína (pigmento de color amarillo difusible, amarillo verdoso bajo luz ultravioleta, que es positivo para *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas protegens*) (Pichardo Reyes *et al.*, 1981).

El medio King B conocido también como *Pseudomonas* agar F consta de: proteasa peptona que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, glicerina que favorece la producción de pigmentos, fosfato dipotásico que estimula la producción de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina y piorrubina (metabolitos utilizados en la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*) y sulfato de magnesio que provee los cationes necesarios que incrementan la producción de fluoresceína.

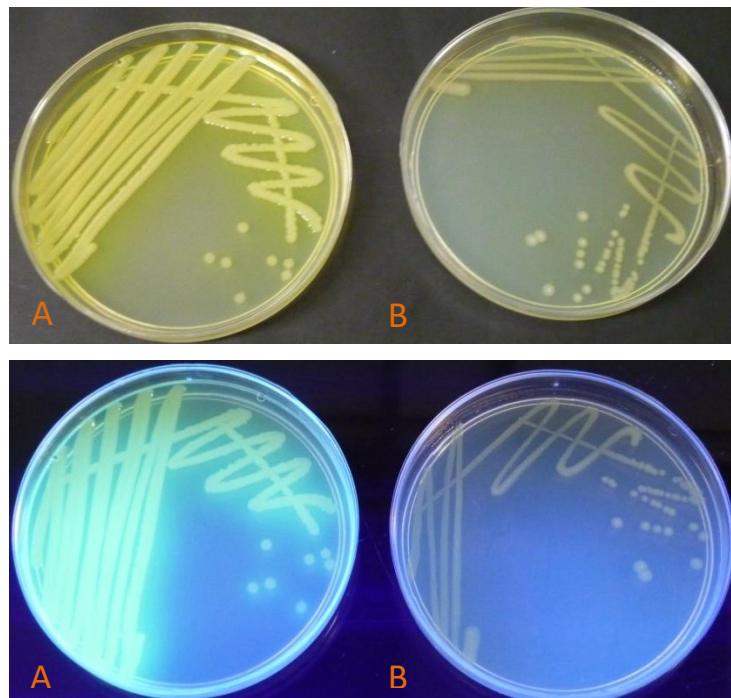
Para la cepa de *Pseudomonas* sp. utilizada en se evidencia la producción de la fluoresceína alrededor de la estría cuando se cultiva en medio King B como se observa en las Figuras 6 y 7, en esta última además se puede ver como la difusión de éste metabolito limita el crecimiento de bacterias gram positivas (*Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*) y



gram negativas (*Escherichia coli*). En el caso del perfil antibiótico en caldo nutritivo, se observa muy poca actividad antibiótica frente a *Escherichia coli*, mediana actividad frente a *Bacillus subtilis* y un nulo crecimiento de *Micrococcus luteus*.

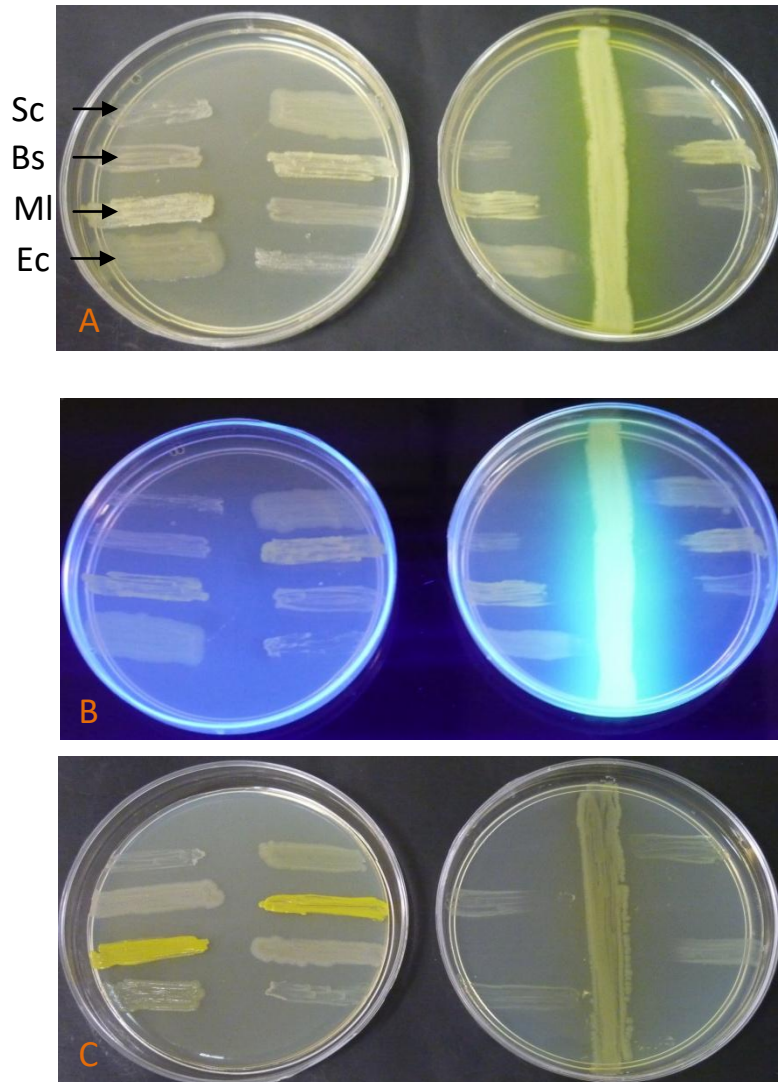
Los perfiles de antibiosis mostrados en la Figura 7 para *Saccharomyces cerevisiae* en ambos medios suponen que existen productos difundibles o volátiles que impiden su crecimiento, observando una clara actividad antibiótica de los productos metabólicos de esta cepa de *Pseudomonas* sp. frente a este hongo.

Como se observa en las cajas control en la Figura 7, el crecimiento de los microorganismos de prueba no se ve inhibido entre ellos y la inhibición mostrada es debida exclusivamente a los productos de la *Pseudomonas* sp., evaluada.



**Figura 6.** Crecimiento de la cepa de *Pseudomonas* sp. seleccionada a partir del aislado 28A en medio de cultivo A) agar King B y B) agar nutritivo, durante 48 h de cultivo a 29°C. A la luz visible y ultravioleta, respectivamente.

Es posible que compuestos que presentan actividad frente a hongos puedan afectar a *Trypanosoma cruzi*, ya que de acuerdo con Pedersen *et al.*, (2011) la toxicidad frente a protozoarios y hongos se encuentra relacionada. Adicionalmente se sabe que entidades químicas que inhiben la síntesis de ergosterol pueden afectar conjuntamente a hongos y protistas como *Trypanosoma*, ya que este esteroide forma parte de su membrana celular.



**Figura 7.** Ensayos de antibiosis por estría de la cepa de *Pseudomonas* sp. seleccionada a partir del aislado 28A en medio de cultivo A) agar King B; B) agar King B al ultravioleta y C) agar nutritivo, con sus correspondientes controles de crecimiento en cada uno de los medios de cultivo, para los microorganismos evaluados durante los ensayos de antibiosis. A 29°C y 48 h de cultivo. Los microorganismos corresponden a Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Bs: *Bacillus subtilis*, MI: *Micrococcus luteus* y Ec: *Escherichia coli*.

Los perfiles de antibiosis para ambos medios de cultivo evidencian una amplia actividad antibiótica presentada por la cepa de *Pseudomonas* sp. frente a los microorganismos de prueba utilizados. Lo que está en relación con los estudios reportados para diferentes *Pseudomonas* aisladas de suelo, ya que poseen metabolitos secundarios con actividades frente a diferentes organismos, permitiéndoles ser utilizadas como agentes de control biológico de patógenos en la agricultura (Jousset *et al.*, 2009; Raaijmakers & Mazzola, 2012; Winding & Oberender, 2012).

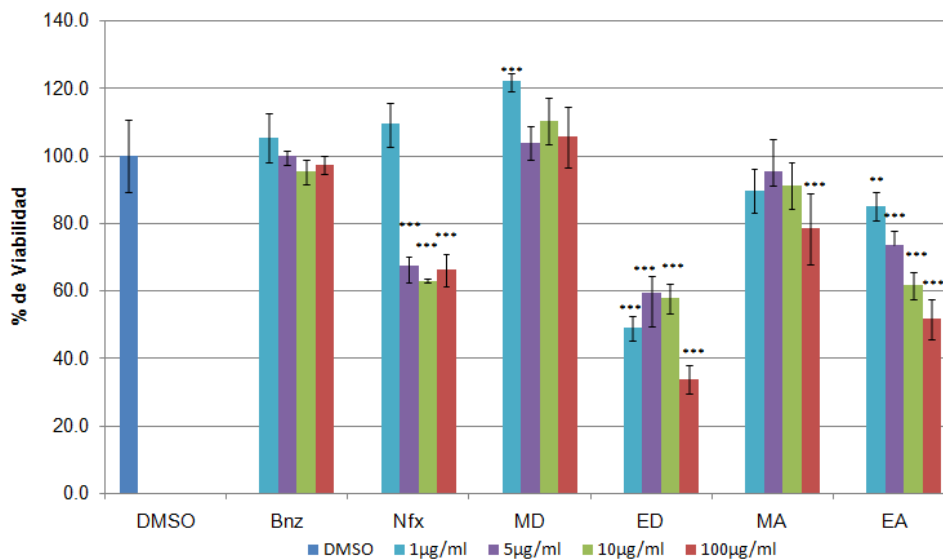
Adicionalmente, el cultivo en agar King B mostró que la cepa seleccionada y utilizada pertenece al género de *Pseudomonas*, lo que se confirmó mediante la amplificación de rADN 16s, su posterior secuenciación y finalmente con la búsqueda comparativa en el programa Basic Local Alignment Search Tool (Ver Anexo 3).

## 6.2 Confirmación de la actividad tripanocida

Para verificar la producción de metabolitos con actividad tripanocida por parte de la cepa seleccionada, se realizaron evaluaciones de los extractos con disolventes de sobrenadante frente al parásito. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

Para todos los grupos de datos presentados en este trabajo se verificó la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y se descartaron datos mediante el diagrama de caja y bigotes. Las diferencias significativas fueron evaluadas mediante una ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey ( $p=0.05$ ). Como resultados del análisis estadístico para los datos presentados en la Figura 8, se presentan las diferencias significativas con respecto al control, observado diferencias con respecto a tres concentraciones del nifurtimox y no hay diferencias frente a benznidazol, sugiriendo que para éste estudio con la cepa *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro, existe baja sensibilidad frente a este último fármaco. En evaluaciones previas se había determinado la actividad del benznidazol frente a la cepa de trabajo (Martínez *et al.*, 2013). Sin embargo, las mediciones realizadas no evaluaron la viabilidad, sino el número total de parásitos mediante cuenta directa en microscopio y su movilidad, evidenciando sensibilidad 10 veces mayor con nifurtimox que con benznidazol. Como resultado final se seleccionó el nifurtimox como control, sin embargo es necesario utilizar concentraciones mayores a 1  $\mu\text{g/mL}$ , debido a que esta concentración no muestra actividad.

Se observan diferencias significativas con todos los tratamientos de extractos de diclorometano y acetato de etilo, mientras de medio (control negativo y blanco del extracto) no poseen actividad frente a *Trypanosoma cruzi*, con excepción de 100  $\mu\text{g/mL}$  de medio de acetato de etilo. Adicionalmente, se observan diferencias significativas con 1  $\mu\text{g/mL}$  de medio de diclorometano, ya que hubo mayor crecimiento que en el control de DMEM con 1% de DMSO.



**Figura 8.** Porcentaje de viabilidad de *Trypanosoma cruzi* medida con el kit WST 8 en presencia de extractos de diclorometano y acetato de etilo obtenidos de manera secuencial de medio y sobrenadante de cultivo de 48 h. Se presentan las diferencias significativas con respecto a crecimiento de parásitos con 1% de DMSO. Bnz= Benznidazol, Nfx=Nifurtimox, MD= extracto de medio con diclorometano, MA= extracto de medio con acetato de etilo, ED= extracto de sobrenadante de 48 h con diclorometano, EA= extracto de sobrenadante de 48 h con acetato de etilo. n= 6, cada uno con cuatro repeticiones. \*\* y \*\*\* diferencias estadísticamente significativas con DMSO ( $p < 0.05$ )

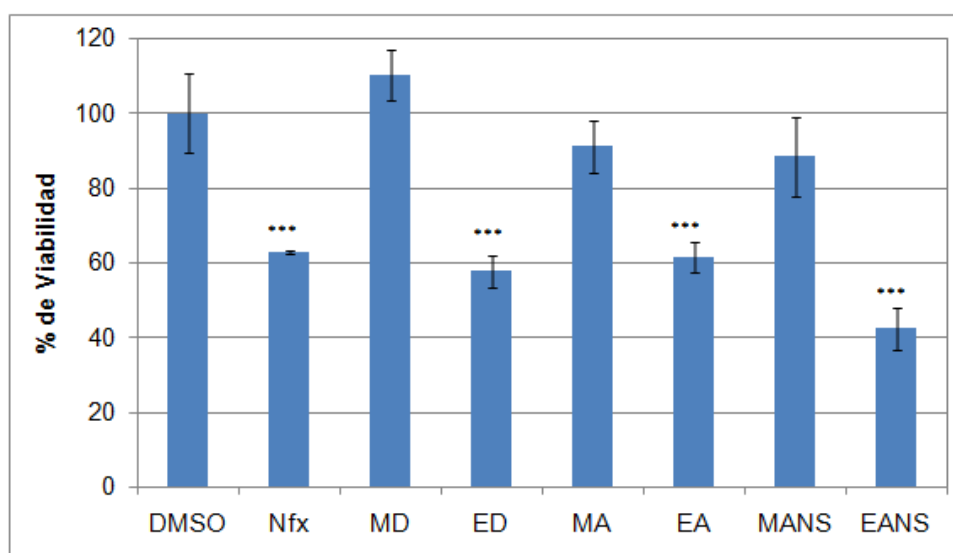
Las diferencias significativas entre las distintas concentraciones de cada tratamiento no son presentadas, sin embargo fueron evaluadas; obteniéndose que sí existen diferencias significativas entre algunos de los tratamientos. Para el caso de diclorometano no se observa una clara variación de la actividad con la concentración, obteniendo que entre sí, las concentraciones no presentan diferencias significativas exceptuando la de 100 µg/mL, que presenta con cada una de las otras concentraciones y evidenciando su toxicidad. En el caso de las pruebas con acetato de etilo, se observa que hay variación de la viabilidad con la concentración, obteniéndose diferencias significativas entre 1 µg/mL y 100 µg/mL y entre 5 µg/mL y 100 µg/mL, además entre 1 µg/mL y 10 µg/mL.

Dado que para la mayoría de los casos 100 µg/mL es una concentración altamente tóxica y concentraciones de 1µg/mL no muestran actividad en el control nifurtimox, se decidió utilizar 10µg/mL como la concentración estándar de prueba para los ensayos.

Debido a que la extracción utilizando diclorometano y acetato de etilo fue secuencial, se verificó que realizandola de forma independiente con cada uno de disolventes como se

muestra en la Figura 9, los compuestos con actividad tripanocida evidenciados en el diclorometano previamente no se obtuvieron también con acetato de etilo. Por lo tanto se repitió el experimento, por triplicado de 50 mL de sobrenadante de forma independiente para cada uno de los disolventes.

Se obtuvieron resultados semejantes a los previamente obtenidos, sin embargo se observa que mejora significativamente la actividad con acetato de etilo no secuencial, por lo que se puede inferir que alcanza a extraer mayor cantidad de compuestos y si presenta diferencias significativas con el de acetato secuencial, pero no con el extracto de diclorometano.

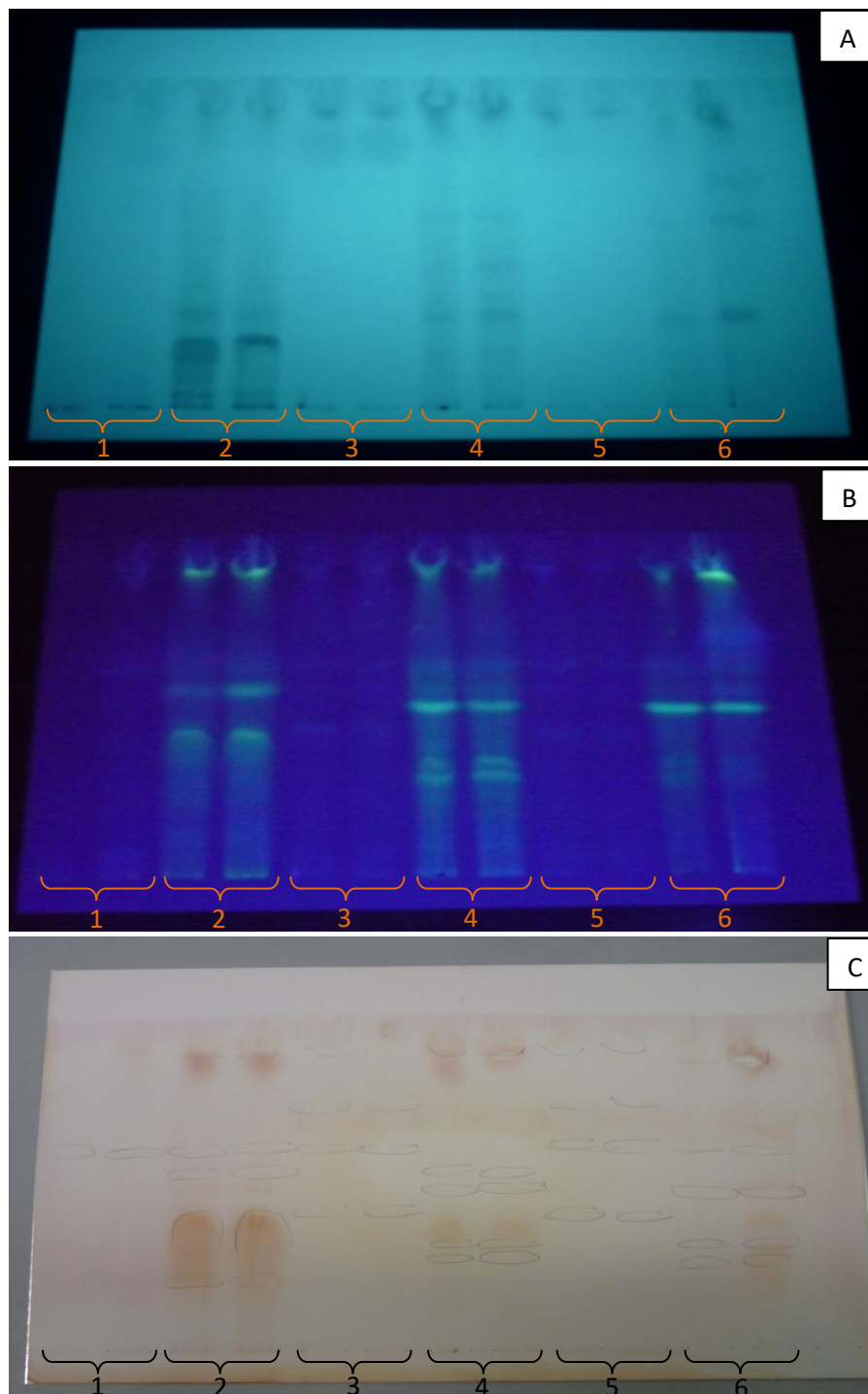


**Figura 9.** Porcentaje de viabilidad de *Trypanosoma cruzi* con el kit WST 8 en presencia de 10 µg/mL de los extractos de diclorometano y acetato de etilo obtenidos independientemente y de manera secuencial de medio y sobrenadante de cultivo de 48 h. Se presentan las diferencias significativas con respecto a DMSO. Nfx=Nifurtimox, MD=extracto de medio con diclorometano, MA=extracto de medio con acetato de etilo, MANS= extracto de medio con acetato de etilo de forma no secuencial, ED= extracto de sobrenadante de 48 h con diclorometano, EA= extracto de sobrenadante de 48 h con acetato de etilo y EANS= extracto de sobrenadante de 48 h con acetato de etilo no secuencial. n= 6, cada uno con cuatro repeticiones. \*\*\* diferencias estadísticamente significativas con DMSO (p<0.05)

En la Figura 10 se observa el patrón cromatográfico de cada uno de los extractos utilizados en las pruebas previas, en donde existen claras diferencias, entre el diclorometano y los de acetato de etilo. Mientras que para los de acetato de etilo extraídos de manera independiente y secuencial, presentan un patrón semejante. Para el caso de los blancos de extracción en los ensayos de actividad no se observan semejanzas con

ninguno de los extractos. Por lo que definitivamente la extracción con diclorometano es conveniente para extraer los compuestos con mayor y mejor actividad tripanocida.

En estudios realizados por Pedersen *et al.* (2011), para diferentes *Pseudomonas* productoras y no productoras de metabolitos secundarios frente a protozoarios del suelo pertenecientes a diferentes linajes, se observó que la mayoría (ocho de nueve) de los protozoarios disminuyó su crecimiento cuando estaban presentes *Pseudomonas* productoras de metabolitos secundarios (viéndose especialmente afectados los protozoarios móviles). De acuerdo con Mazzola *et al.* (2009) la actividad de pastoreo de bacteriovores no sólo es un componente que contribuye al ciclo del nitrógeno en ecosistemas de suelos, sino que también tiene un impacto significativo, estructural de la comunidad bacteriana. Siendo la alimentación preferencial para protozoos en sistemas de suelo: bacterias de géneros como *Pseudomonas* por encima de otros géneros como *Streptomyces* y *Bacillus*. Por lo que para el género de *Pseudomonas* es de gran importancia la producción de compuesto frente a este tipo de depredadores naturales.

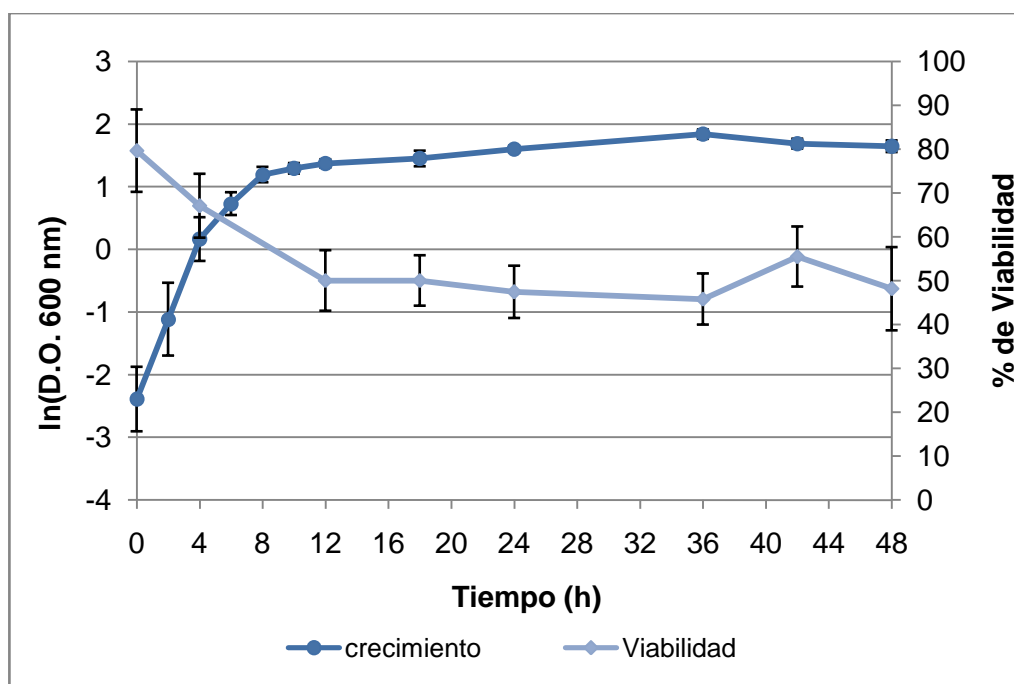


**Figura 10.** Perfil cromatográfico de los extractos de diclorometano y acetato de etilo obtenidos de manera secuencial e independientemente. Los carriles corresponden a los diferentes extractos obtenidos por duplicado, 1. extracto de medio utilizando diclorometano; 2. extracto de sobrenadante utilizando diclorometano; 3. extracto de medio secuencial utilizando acetato de etilo; 4. extracto de sobrenadante secuencial utilizando acetato de etilo; 5. extracto de medio independiente utilizando acetato de etilo; 6. extracto de sobrenadante independiente utilizando acetato de etilo, A) ultravioleta de onda corta (240 nm), B) ultravioleta de onda larga (360 nm) y C) Revelado con ninhidrina. Fase reversa. Fase móvil 1:1 acetonitrilo-agua.

### 6.3 Producción de extracto tripanocida

La producción de extractos con actividad tripanocida durante los ensayos previos se realizaron bajo las condiciones de cultivo previamente reportadas por Lemus, (2013). Sin embargo para establecer el inicio de la producción de los compuestos tripanocidas se realizó el seguimiento de la producción de estos mediante pruebas de viabilidad de los extractos en diclorometano, como se muestra en la Figura 11. Permitiendo evidenciar la producción de compuestos tripanocidas previa a las 48 h, tiempo utilizado inicialmente para la extracción, estableciendo que desde las ocho horas ya hay producción de compuestos con la bioactividad deseada.

Realizar extracciones a las doce horas resulta altamente conveniente en términos de tiempo de cultivo y adicionalmente a horas más tempranas existe menor producción de otros tipos de productos que modifiquen el sobrenadante y dificulten la extracción.



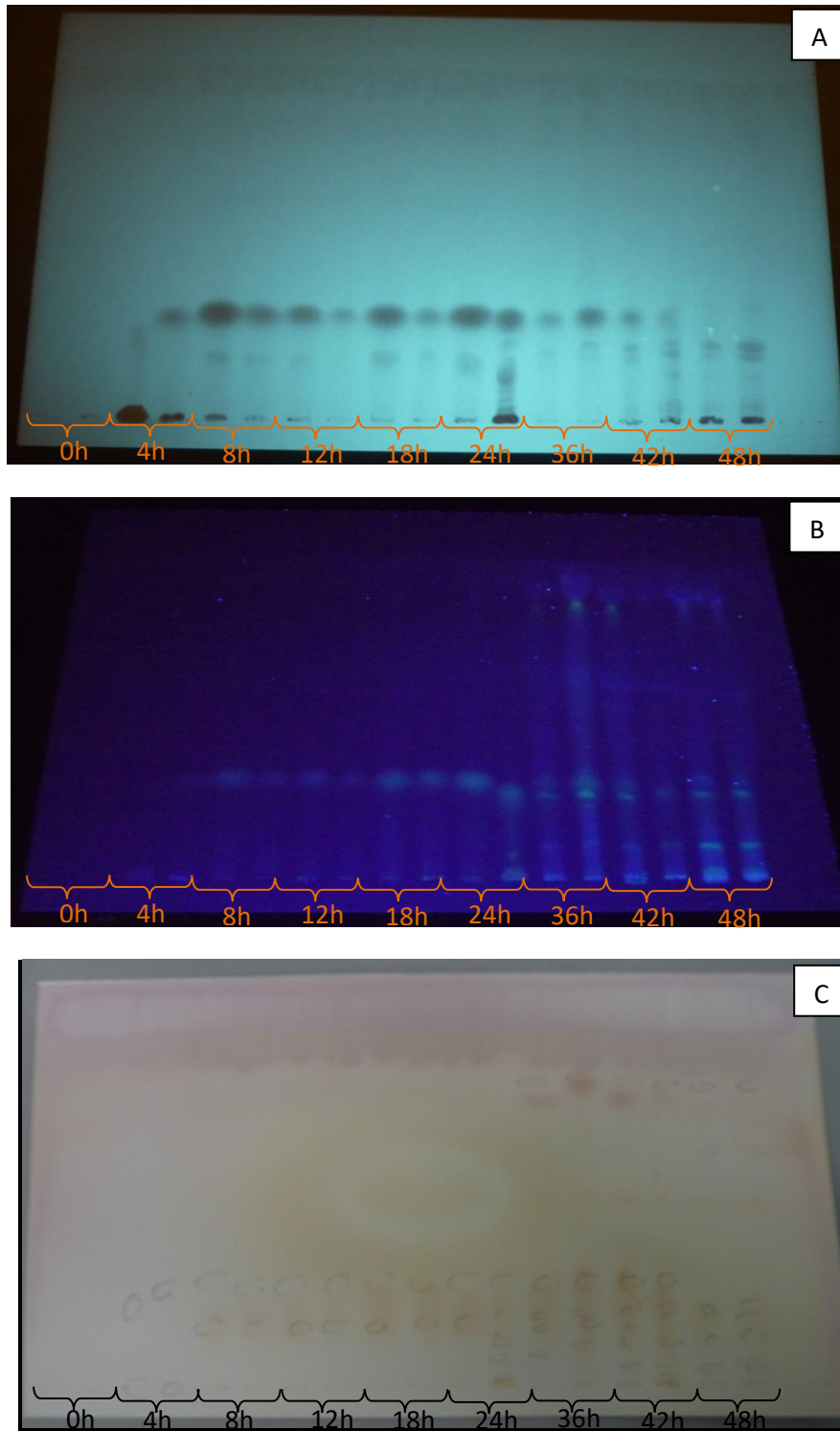
**Figura 11.** Medición del crecimiento y la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* frente a extractos de diclorometano obtenidos en diferentes horas durante 48 h de crecimiento partir de 50 mL de cultivo. n=6.



En la Figura 12 se observa el perfil cromatográfico de los extractos de forma cinética desde el inicio del cultivo hasta las 48 h. A pesar de que en la mayoría de horas se observan compuestos semejantes, que por comparación con la hora cero no corresponden al medio de cultivo; a partir de las 36 h hasta las 48 h, se observan cambios del perfil que pueden estar relacionados con el aumento de la complejidad del extracto y existan algunos compuestos que modifiquen su separación en la cromatoplaque para las condiciones de elución utilizadas. Adicionalmente, es posible que para los tiempos más largos algunos compuestos se dejen de producir mientras que aumenta la producción de otros.

Las condiciones de producción de los metabolitos, afectan fuertemente la producción de los mismos, en estudios previos en *Pseudomonas* realizados por Duffy & Défago (1999), se identificaron varios minerales y fuentes de carbono que tienen influencia diferencial en la producción de distintos antibióticos, obteniéndose que el 2,4- Diacetilfloroglucinol se ve estimulado con  $Zn^{2+}$ ,  $NH_4Mo^{2+}$  y glucosa. La pioluteorina, es estimulada por  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y glicerol, pero se ve reprimida por glucosa. La pirrolnitrina aumenta con fructosa, manitol y una mezcla de  $Zn^{2+}$ ,  $NH_4Mo^{2+}$ . Para el caso de los sideróforos se incrementan con ácido salicílico. La pioquelina aumenta con fructosa, glucosa y manitol y  $Co^{2+}$ . Metabolitos como las fenazinas, también se ven favorecidos por el uso de glucosa como fuente de carbono y el nitrógeno orgánico (Fenazina-1- ácido carboxílico) (Yuan *et al.*, 2008). Además se observó que la concentración de los compuestos variaba con el tiempo, para una fermentación de 5 días no se acumulaba el 2,4- diacetilfloroglucinol. Por lo tanto el medio utilizado puede permitir la producción selectiva de cierto tiempo de productos debido a que se encuentra complementado con glucosa.

Se ha visto que los metabolitos extracelulares de *Pseudomonas* pueden llegar a ser más perjudiciales frente a protozoarios y nemátodos, mientras que metabolitos unidos a la membrana llegan a ser más efectivos frente a hongos (Jousset *et al.*, 2009; Pedersen *et al.*, 2011).

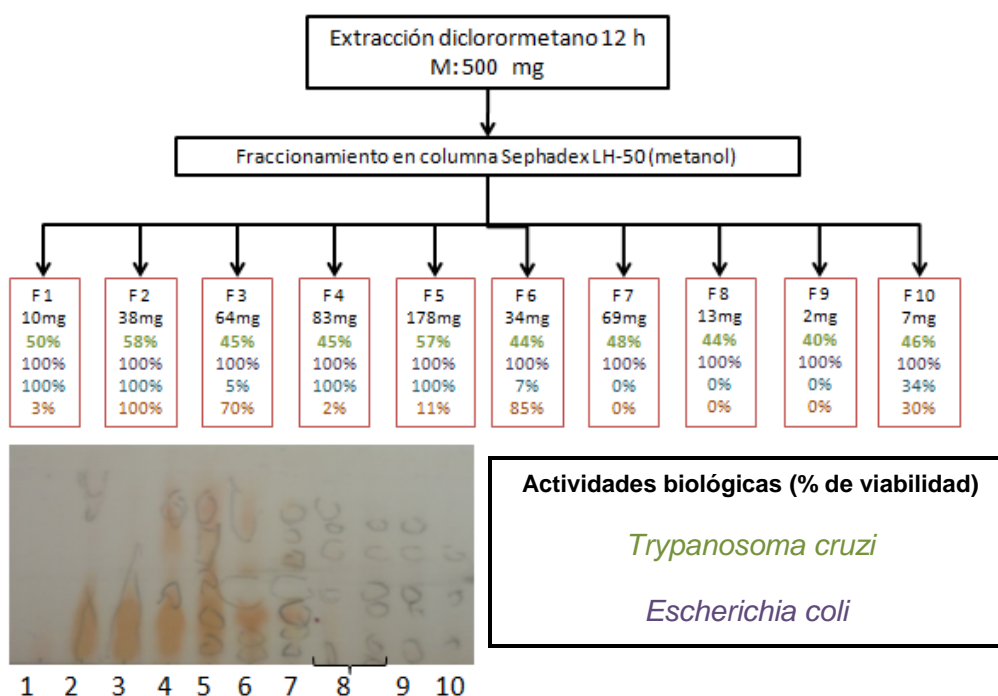


**Figura 12.** Perfil cromatográfico de los extractos de diclorometano de forma cinética por duplicado para cada una de las horas de extracción A) ultravioleta de onda corta (240 nm) B) ultravioleta de onda larga (360 nm) y C) revelado con ninhidrina. Fase reversa. Fase móvil 1:1 acetonitrilo-agua.

## 6.4 Fraccionamiento y purificación

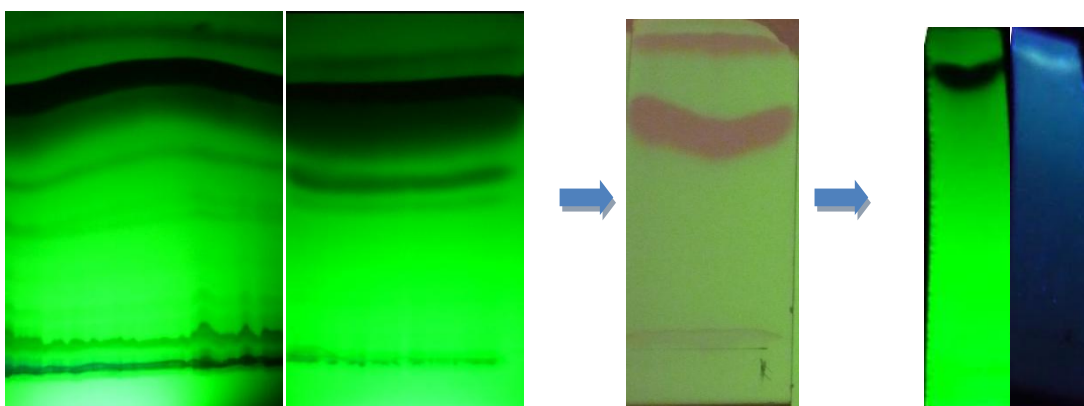
El fraccionamiento inicial se realizó mediante columna de exclusión molecular, utilizando la resina Sephadex LH-20. Se fraccionaron 0.5 g de extracto total del sobrenadante con diclorometano. La elución de la columna se realizó con metanol.

En la Figura 13 se describe el fraccionamiento inicial del extracto total de diclorometano, se incluyen adicionalmente los criterios de selección utilizados para continuar con la separación, siendo el principal criterio la bioactividad frente a *Trypanosoma cruzi*, seguida de la actividad antibiótica y finalmente contar con más de 20 mg de fracción. Debido a que poca masa restringe los pasos de elucidación estructural. Para el caso de las fracciones 1, 8, 9 y 10, no continuaron siendo analizadas ya que se necesitaban todavía varios pasos de separación para poder purificar sus componentes activos. Las fracciones 2-7 fueron con las que se continuó la separación, que coinciden en tener adicionalmente actividad frente a bacterias gram positivas.



**Figura 13.** Fraccionamiento de 0.5 g de extracto de diclorometano, las actividades fueron evaluadas con 10 µg/mL. Cromatografía en placa desarrollada en fase reversa, 1:1 acetonitrilo-agua y revelado con ninhidrina.

Ya que la mayoría de fracciones continuaron siendo complejas, se necesitaron varios pasos de separación para obtener compuestos al alto grado de pureza. En la Figura 14 se muestra como a través de separaciones en placa aumentó el grado de purificación de un compuesto obtenido de la fracción 7, un proceso semejante fue llevado para varias fracciones sin embargo en la mayoría de los casos no se obtuvieron compuestos en cantidad suficiente para continuar con su estudio (verificar su actividad biológica y determinación química del mismo).



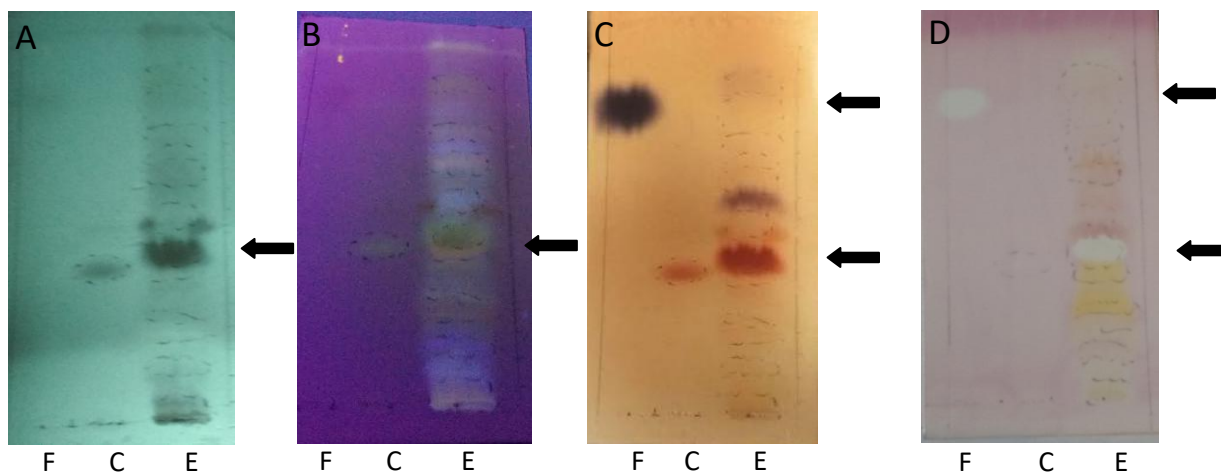
**Figura 14.** Ejemplo del seguimiento de purificación del compuesto seleccionado mediante TLC.

## 6.5 Determinación de la estructura química

Se purificó un compuesto mayoritario de la fracción 7 y se realizaron diferentes ensayos espectroscópicos, para realizar la aproximación a la determinación de su estructura química. Adicionalmente, debido a la posible naturaleza química del compuesto de acuerdo con la información previamente revisada sección 1.3 *Pseudomonas sp.* y sus metabolitos secundarios, podemos clasificar al compuesto principalmente como: alcaloide, policétido y derivado de ácidos grasos, aminoácidos y péptidos no ribosomales y volátiles. Se realizaron revelados para identificar si posiblemente pertenecía a uno de los grupos químicos descritos.

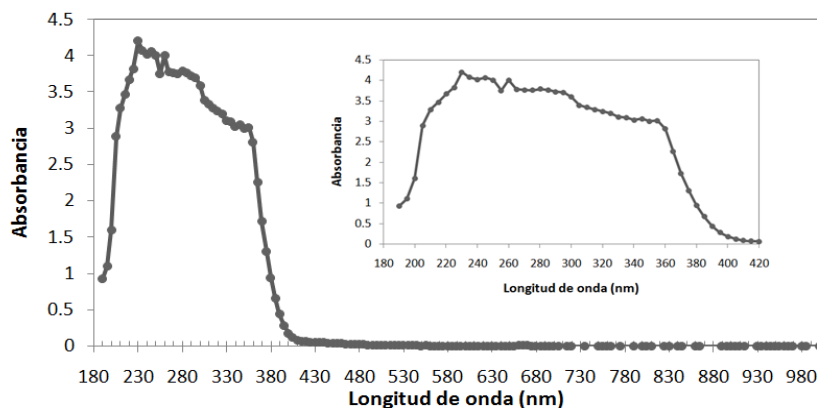
En la Figura 15, se puede observar en la cromatoplaaca del compuesto de interés y a qué banda pertenece dentro del extracto total. A onda corta el compuesto se observa como una mancha oscura, indicando que absorbe a esta longitud de onda. Con respecto a la determinación de grupos funcionales, las placas fueron reveladas con fast blue y con ninhidrina, como el compuesto se reveló con fast blue es posible que sea un fenol o que

contenga aminas, adicionalmente, como no se revela con ninhidrina (que revela aminas primarias y secundarias), posiblemente es un fenol. También se observa una banda que coincide con el control fluoroglucinol en el perfil cromatográfico del extracto. Por lo tanto puede ser un compuesto relacionado con el, 2,4 diacetilfluoroglucinol uno de los compuestos ampliamente caracterizado de *Pseudomonas*.



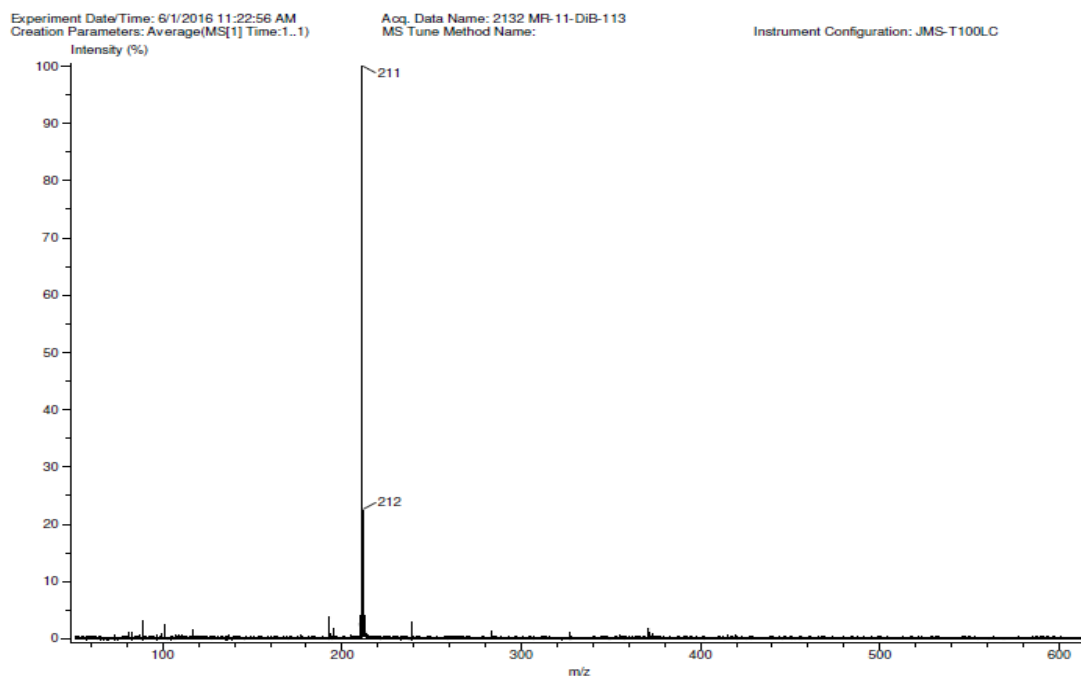
**Figura 15.** Perfil del producto purificado A) ultravioleta onda corta (240 nm) B) ultravioleta onda larga (360 nm), C) revelado con fast blue y D) revelado ninhidrina, F= fluoroglucinol (P1178-100G de sigma), C= compuesto aislado, E= extracto de 12 h por duplicado. Fase reversa. Fase móvil 1:1 acetonitrilo-agua.

Se realizó la espectroscopía de absorción ultravioleta visible, el donde se obtuvo el máximo de absorbancia a 230 nm, como se muestra en la Figura 16; que correlaciona con lo observado en los resultados de la Figura 15, absorbe a onda corta. Por lo tanto el compuesto a caracterizar posee dobles enlaces conjugados. Entre 220 y 360 nm se observan varios picos que pueden estar relacionados con bencenos sustituidos con grupos cromóforos o auxóchromos, generando diferentes desplazamientos de los mismos.



**Figura 16.** Espectroscopía de absorción ultravioleta visible para el compuesto, en metanol.

Para verificar la pureza del compuesto y conocer su peso molecular se realizó una espectrometría de masas DART, que permitió evidenciar que el compuesto existía de forma mayoritaria y que su peso molecular es de 210, como se observa en la Figura 17.



**Figura 17.** Espectrometría de masas DART para el compuesto aislado. En donde se observan los picos de los compuestos existentes con sus respectivos pesos moleculares +1

Finalmente se realizaron los ensayos espectroscópicos de RMN, como se muestran en la Figura 18 los espectros de protón y carbono trece, correspondientes a la muestra purificada. Con respecto al espectro de protón, se observan principalmente tres señales, dos corresponden: a las señales del metanol deuterado que de acuerdo a la literatura se encuentran aproximadamente en 4.8 y 3.3 y otra que corresponde a lo que pudiera ser una cadena alifática.

Para el espectro de  $^{13}\text{C}$ , se observan diferentes señales de carbono, la más intensa está relacionada con el carbono del disolvente, metanol deuterado. La segunda más fuerte corresponde a grupos metilos, como se señalan en la figura y algunas señales a más de 150 ppm se encuentran relacionadas con carbonilos o hidroxilos. Sin embargo estos resultados no son concluyentes respecto a la estructura química.

Adicionalmente con los resultados del RMN obtenidos no se evidencia que exista una relación directa del compuesto con el 2,4 diacetil fluoroglucinol, debido a que específicamente no se observan las señales correspondientes al hidrógeno y a los carbonos aromáticos de éste compuesto. Es necesario confirmar los resultados obtenidos, con el compuesto mejor purificado ya que es posible que por la interferencia de contaminantes no se estén viendo todas las señales correspondientes al compuesto o el peso molecular no corresponda realmente al compuesto, debido a fragmentación o degradación del mismo durante la medición.

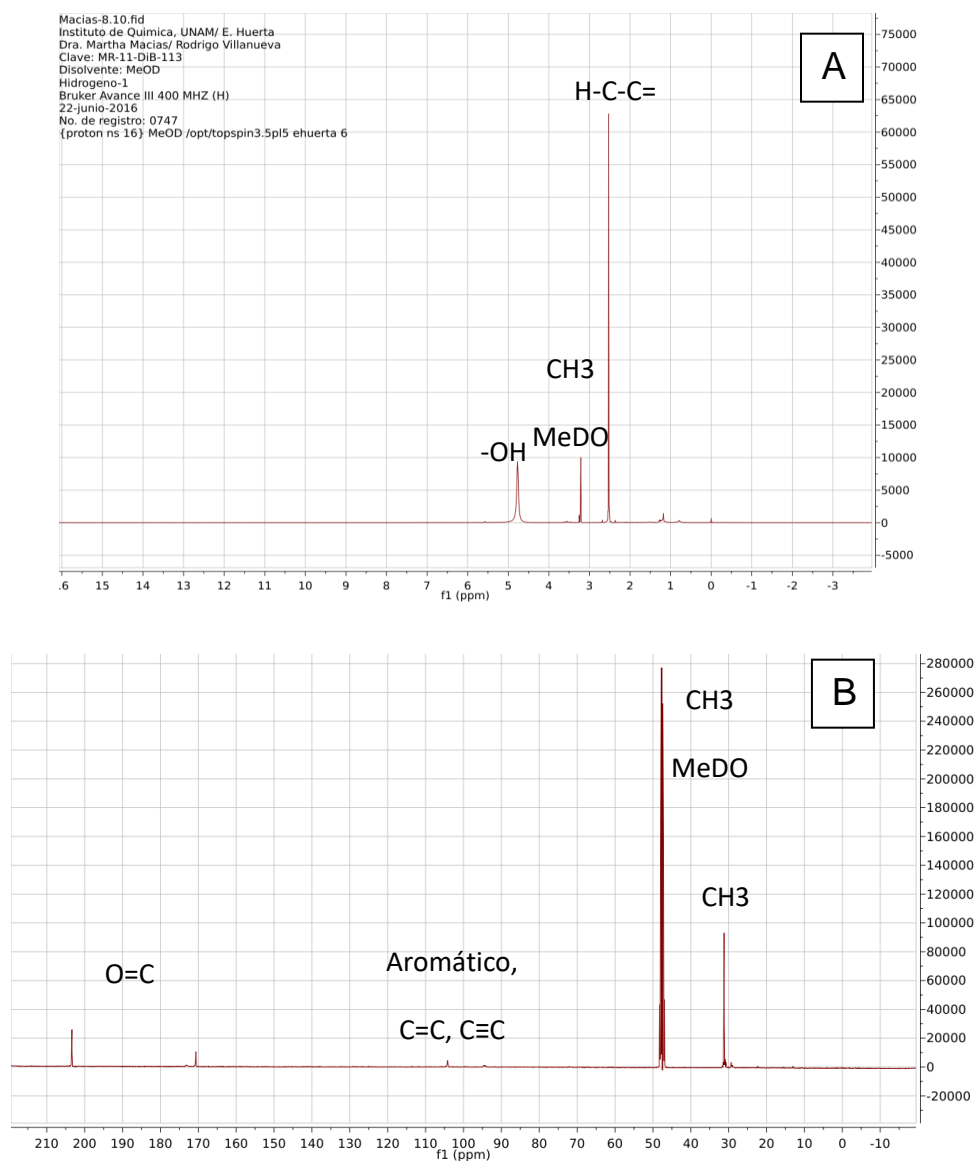


Figura 18. Espectros de A) H-RMN y B) <sup>13</sup>C-RMN.

Estudios sobre la producción de 2,4-diacetilfloroglucinol, han demostrado que las condiciones generales de producción no son semejantes para todas las cepas. De acuerdo con Shanahan *et al.*, (1992) fuentes de carbono como sacarosa, fructosa y manitol favorecen su producción y siendo la glucosa una fuente de carbono que no promueve su producción y condiciones de pH o concentración de hierro no afectan significativamente su producción. Estudios posteriores realizados por Duffy & Défago, (1999) para 42 cepas de *Pseudomonas* diferentes utilizadas como biocontrol, mostraron que de forma general la producción de este compuesto se ve estimulado por  $Zn^{2+}$ ,  $NH_4Mo^{2+}$ , glucosa y relaciones 1/10 de caldo nutritivo y extracto de levadura mejorado con glucosa y/o glicerol aumentan dramáticamente la producción del 2,4 diacetilfloroglucinol. Las variaciones entre cepas pueden ser debidas a adaptaciones específicas de cada una de ellas a condiciones locales ya que no hay preferencias. De forma general el caldo nutritivo complementado con glucosa puede favorecer la producción de éste compuesto y fue el medio utilizado para la producción durante los experimentos realizados. Favoreciendo las posibilidad de haber extraído un compuesto relacionado con esta naturaleza química.

## 6.6 Actividades biológicas del compuesto aislado

Para el compuesto aislado, se evaluó la actividad tripanocida mediante la  $CI_{50}$  para epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro, antibiótica mediante la MIC para bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras y citotóxica mediante la  $CI_{50}$  utilizando células Vero, sus valores se muestran en la tabla 2.

Se evidenció que el compuesto fue notablemente tóxico, sin embargo su actividad frente a gram positivas fue menor que la de los controles y no fue activo frente a *Escherichia coli* y a *Saccharomyces cerevisiae*.

Adicionalmente se observó que el nifurtimox fue tóxico frente a las células Vero, al igual que el compuesto evaluado. Sin embargo, presentó una  $CI_{50}$  menor frente a *Trypanosoma cruzi*. Evaluaciones in vitro e in vivo realizados por Koto *et al.*, 2011 mostraron que el nifurtimox induce la producción de especies reactivas de oxígeno y subsecuente apoptosis en células de neuroblastoma, encontrándose actualmente este compuesto en



evaluaciones de forma sinérgica con otros fármacos para tripanosomiasis africana, neuroblastoma y meduloblastoma (se encuentra en fase de reclutamiento).

Como se mencionó previamente el 2,4-diacetilfloroglucinol es un policétido producido por algunas cepas de *Pseudomonas*, que ha sido ampliamente descrito y estudiado debido a su capacidad tóxica frente a diferentes organismos patógenos de plantas. Entre sus actividades biológicas comparables con las medias en el presente trabajo se pueden destacar: actividad antileishmania, se probó luego de 48 h, utilizando el ensayo de alamar blue sobre *Leishmania donovani*, presentando una  $CI_{50}$  de 27  $\mu\text{g/mL}$  (Bharate *et al.*, 2007). Adicionalmente presentó actividad citotóxica frente a células Vero con una  $CI_{50}$  de 12  $\mu\text{g/mL}$ , a la línea celular LLC-PK1 (epitelio renal de cerdo) con  $CI_{50}$  de 11  $\mu\text{g/mL}$  y para su actividad antibiótica posee MIC para *Bacillus subtilis* de 5  $\mu\text{g/mL}$  y para *Micrococcus luteus* de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Keel *et al.*, 1992; Bharate *et al.*, 2007).

A pesar de no conocer la estructura química del compuesto evaluado, es de alto interés continuar su estudio debido a que su actividad tripanocida que es mejor que la del nifurtimox para esta cepa de *Trypanosoma cruzi*.

**Tabla 2.** Actividades biológicas del compuesto aislado de *Pseudomonas* sp.

Actividades Biológicas	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Controles de actividades Biológicas	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
$CI_{50}$ epimastigotes <i>Trypanosoma cruzi</i> C1	2.78 $\pm$ 1.55	$CI_{50}$ epimastigotes <i>Trypanosoma cruzi</i> nifurtimox	13.37 $\pm$ 1.26
MIC <i>Escherichia coli</i> C1	>50	MIC <i>Escherichia coli</i> ácido nalidíxico	1.23 $\pm$ 0.11
MIC <i>Bacillus subtilis</i> C1	5.97 $\pm$ 0.46	MIC <i>Bacillus subtilis</i> estreptomina	0.59 $\pm$ 0.11
MIC <i>Micrococcus luteus</i> C1	0.84 $\pm$ 0.08	MIC <i>Micrococcus luteus</i> estreptomina	0.30 $\pm$ 0.08
MIC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> C1	>50	MIC <i>Saccharomyces</i> cicloheximida	0.12 $\pm$ 0.04
$CI_{50}$ células Vero C1	5.9 $\pm$ 1.36	$CI_{50}$ células Vero nifurtimox	4.4 $\pm$ 1.45

## 7 Conclusiones

1. Se aisló una colonia de *Pseudomonas* sp. que produce compuestos con actividad tripanocida en su sobrenadante.
2. Los extractos de diclorometano y acetato de etilo presentan actividad tripanocida, sin embargo el primero permitió una extracción selectiva de compuestos con actividad tripanocida, por lo cual fue seleccionado para realizar la extracción de estos compuestos.
3. La actividad tripanocida se puede observar desde las doce horas, siendo importante este parámetro para la purificación de compuestos obtenidos en tiempos previos y así evitar dificultades en la separación, ocasionadas por la producción de otros metabolitos en tiempos posteriores.
4. El compuesto seleccionado presenta además de actividad frente a *Trypanosoma cruzi*, actividad antibiótica frente a bacterias gram positivas y citotóxica.
5. El compuesto mayoritario posee un peso molecular de 210.

## Trabajo a futuro

- Evaluar la actividad tripanocida del compuesto en otras cepas y estadios de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar el mecanismo de acción del compuesto con actividad tripanocida.
- Evaluar alternativas de extracción y producción del metabolito de interés.
- Aislar, purificar y caracterizar otros productos metabólicos de la *Pseudomonas* sp. aislada con actividad tripanocida.

## 8 Bibliografía

1. Ahmed, E. A., Hassan, E. A., Tobgy, K. & Ramadan, E. M. (2014). Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. *Annals of Agricultural Science*, 59(2):273–280.
2. Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22) 4692–3.
3. Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Domínguez F., García-Carrancá, A., & Salazar-Olivo, L. A. (2011). *Magnolia dealbata* Zucc. and its active principles honokiol and magnolol stimulate glucose uptake in murine and human adipocytes using the insulin-signaling pathway. *Phytomedicine*, 18:926–933.
4. Apt, W., Heitmann, I. Jercic, M. I., Jofré, L., Muñoz, P., Noemí, I., & otros. (2008). Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Revista chilena de infectología*, 25 (5): 384-389.
5. Arce-Fonseca, M., Rios-Castro, M., Carrillo-Sánchez, S. D., Martínez-Cruz, M., & Rodríguez-Morales, O. (2015). Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 8:121.
6. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Magnolia&id=7425>).
7. Bharate, S. B., Khan, S. I., Yunus, N. A. M., Chauthe, S. K., Jacob, M. R., Tekwani, B. L., Khan, I. A., & Singh, I. P. (2007). Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15:87–96.
8. Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 373:456-466. DOI: 10.1056/NEJMra1410150
9. Bontempi, I., Vicco, M. H., & Bayry, J. (2016). Chronic Chagas disease: can prophylaxis and therapeutic vaccines crack this 'hard nut'?. *Immunotherapy*, 8(2):99–101.
10. Bouizgarne, B. (2013). Bacteria for plant growth promotion and disease, management. En Maheshwari, D. K., *Bacteria in agrobiología: disease management*. (págs. 15-48). Springer.

11. Brisbane, P., Janik, L. J., Tate, M. E., & Warren, R. F. (1987). Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(12):1967-71.
12. Burke, T. Jr., Chandrasekhar, B., & Knight, M. (1999). Analogs of viscosin and uses thereof. US Patent 5965524 A.
13. Campos, M. C. O., Leon, L. L., Taylor M. C., & Kelly J. M. (2014). Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 193:17–19.
14. Castro, J. (2014). Efectos tóxicos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de chagas. *Ciencia e Investigación*, TOMO 64 Nº 5.
15. Chakravarty, G., & Kalita, C. (2012). Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial wilt of Brinjal and its possible plant growth promoting effects. *Annals of Biological Research*, 3 (11):5083-5094.
16. Cronin, D., Moëne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D. N., & O'Gara, F. (1997). Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1357–1361.
17. Da Silva, M., Fernandes, J. B., Forim, M. R., Vieira, P. C., & Gil de Sá, C. I. (2013). Alkaloids derived from anthranilic acid: quinoline, acridone, and quinazoline. En K. G. Ramawat, & J. M. Mérillon, Natural Products (págs. 715-859). *Springer*. Berlin Heidelberg.
18. De La Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L., & Arias, A. (2004). *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 671–681.
19. Duffy, B., & Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2429–2438.
20. Fakhouria, W., Walkera, F., Vogler, B., Armbruster, W., & Buchenauer, H. (2001). Isolation and identification of N-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry*, 58:1297–1303.
21. Farrow, A. L., Peng, B. J., Gu, L., Krendelchtchikov, A. & Matthews Q. L. (2016). A novel vaccine approach for chagas disease using rare adenovirus serotype 48 vectors. *Viruses*, 8, 78; doi: 10.3390/v8030078.

22. Flores-Estévez, N., Vasquez-Morales, S. G., Cano-Medina, T., Sánchez-Velásquez, L. R., Noa-Carrazana, J. C. & Díaz-Fleischer, F.(2013). Insecticidal activity of raw ethanolic extracts from *Magnolia dealbata* Zucc. on a tephritid pest. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(7):582-6. doi:10.1080/03601234.2013.774933.
23. Fried, L. E., & Arbiser, J. L., (2009). Honokiol, a multifunctional antiangiogenic and antitumor agent. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(5):1139-1148 doi: 10.1089=ars.2009.2440.
24. Garrity, G., Bell, J. A., Lilburn, T. (2005). Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL. En Garrity, G., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. R. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria.* (págs. 323-442). Springer US.
25. Gupta, S., & Garg, N. (2015). A Two-Component DNA-prime/protein-boost vaccination strategy for eliciting long-term, protective cell immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Pathogens*, 11(5):e1004828.
26. Gürtler, R. E., Diotaiuti, L., & Kitron, U., (2008). Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. *International Journal of Epidemiology*, 37:698–701.
27. Guzmán-Trampe, S. M. (2012). Evaluación de la capacidad de microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. para producir compuestos con actividad biológica. México D.F., Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias Biológicas.
28. Guzmán-Trampe, S. M., Lemus, D., Jiménez, O., Ruiz-Villafán, B., García-Carrancá, A., Hernández-Fernández, R., García-Zepeda, E., Rodríguez-Sanoja, R, Macías-Rubalcava, M. L., & Sánchez S. (2014). Evaluation of the potential bioactivity of an endophytic bacteria isolated from *Magnolia dealbata* Zucc. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4): 515-525.
29. Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. D., C, Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., & otros., (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81:83–92.

30. Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluterin. *Phytopathology*, 70:712-715.
31. Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69:480-482
32. Janek, T., Łukaszewicz, M., & Krasowska, A. (2012). Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiology*, 12:24.
33. Jousset, A., Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Scheu, S., & Bonkowski, M. (2009). Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *The ISME Journal*, 3, 666–674.
34. Jousset, A., Lara, E., Wall, L. G., & Valverde, C. (2006). Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Applied Environmental Microbiology*, 72 (11): 7083–7090.
35. Kamal, A., Shaik, A. B., Kumar, C. G., Mongolla, P., Rani, P. U., Krishna, K. V. & otros (2012). Metabolic profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Pseudomonas* sp. strain ICTB-745 isolated from Ladakh, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1):69-79.
36. Kanda, N., Ishizaki, N., Inoue, N., Oshima, M., Handa, A., & Kitahara, T. (1975). DB-2073, A new alkylresorcinol antibiotic I. taxonomy, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 28(12):935-42.
37. Keel, K., Schnider, U., Maurhofer, M., Christophè, V., Laville, J., Burguer, U., Défago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphlorogluciniol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(1), 4-13.
38. Kruijt, M., Tran, H., & Raaijmakers, J. M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2):546-56. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04244.x.
39. Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J. P., Lamers, G. E., Thomas-Oates, J. E., & otros. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and

- break down existing biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(1):97–113  
doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x.
40. Lampis, G., Deidda, D., Maullu, C., Petruzzelli, S., & Pompei, R. (1996). Karalicin, a new biologically active compound from *Pseudomonas fluorescens/putida*. II. Biological properties. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 49, no: 3, 263-266.
  41. Lee, B., Bacon, K., Bottazzi, M., & Hotez, P. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(4): 342–348.
  42. Lee, Y. J., Lee, Y. M., Lee, C. K., Jung, J. K., Han, S. B., & Hong, J. T. (2011). Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2):157-76. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.010.
  43. Levy, E., Gough, F. J., Berlin, K. D., Guiana, P. W., & Smith, J. T. (1992). Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi. *Plant Pathology*, 41, 335-341.
  44. Liu, Y., Cao, W., Zhang, B., Liu, Y., Wang, Z., Wu, Y., y otros. (2013). The natural compound magnolol inhibits invasion and exhibits potential in human breast cancer therapy. *Scientific Reports*, 14(3):3098.
  45. Mazzola, M., Bruijn, I., Cohen, M. F., & Raaijmakers, J. M. (2009). Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6804-11.
  46. Mercado, T. I., & Colón-Whitt, A. (1982). Lysis of *Trypanosoma cruzi* by *Pseudomonas fluorescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(6): 1051–1057.
  47. Mercado, T. I., Butany, J. W., & Ferrans, V. J. (1986). *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural changes produced by an anti-trypanosomal factor from *Pseudomonas fluorescens*. *Experimental Parasitology*, 61(1): 65-75.
  48. Mercado, T. I., Strickler, M. P., Rice, K. C., & Ferrans, V. J. (1988). Purification of an antitrypanosomal factor from *Pseudomonas fluorescens* by high-pressure liquid chromatography. *Current Microbiology*, 16:179-183.
  49. Molina, I., Gómez, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, S., Pou, D. & otros (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, 370(20): 1899- 1908.



50. Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(Supl 1):26-34.
51. Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., & Abe, F. (2004). Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulate*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(2)193-7.
52. Neidig, N., Pau, R. J., Scheu, S., & Jousset, A. (2011). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. *Microbial Ecology*, 61(4):853-9. doi: 10.1007/s00248-011-9821-z.
53. Nielsen, T. h., & Sørensen, J. (2003). Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2):861-8.
54. Organización panamericana de la salud OMS & Organización mundial para la salud OMS (2010), 50. Consejo directivo 62<sup>a</sup> sesión del comité regional. Disponible en: <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/CD50-16-s>.
55. Organización mundial para la salud OMS, (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Second WHO report on neglected tropical diseases.
56. Organización mundial para la salud OMS (2016), La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), Nota descriptiva N°340. Marzo de 2016. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
57. Patridge, E., Gareiss, P., Kinchs, M., & Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2):204-7.
58. Pedersen, A. L., Winding, A., Altenburger, A., & Ekelund, F. (2011). Protozoan growth rates on secondary-metabolite-producing *Pseudomonas* spp. correlate with high-level protozoan taxonomy. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1):16-22.
59. Pereira, M. C., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 27, No. 9.
60. Pereira, P. C. M., & Navarro, E. C. (2013). Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 19, 34. <http://doi.org/10.1186/1678-9199-19-34>

61. Pérez, C. J., Lymbery, A. L., & Thompson, A. (2014). Chagas disease: the challenge of polyparasitism?. *Trends in Parasitology*, 30(4): 176–182.
62. Pérez-Molina, J., Martínez, A., Norman, F., Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2015). Old and new challenges in chagas disease. *The lancet infectious diseases*, 15(11):1347–1356.
63. Pfender, W. P., Kraus, J., & Loper, J. E. (1993). A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Disease control and pest management*, 83(11):1223-8.
64. Pichardo Reye, E. A., Bale, M. J., Cannon, W. H., & Matsen, J. M. (1981). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech Agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 456-458 Vol. 13, No. 3.
65. Quijano-Hernandez, I., & Dumonteil, E. (2011). Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human vaccines*, 7(11):1184-1191.
66. Raaijmakers, J. M., & Weller, D., M. (2001). Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2545–2554. doi: 10.1128/AEM.67.6.2545-2554.2001
67. Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 50:20.1–20.22.
68. Ribeiro, M., Nitz, N., Santana, C., Moraes, A., Hagström, L., Andrade, R., & otros. (2016). Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental Parasitology*, 162:1-6.
69. Rodríguez-Morales, O., Monteón-Padilla, V., Carrillo-Sánchez, S. C., Rios-Castro, M., Martínez-Cruz, M., Carabarin-Lima, A., & otros. (2015). Experimental vaccines against Chagas disease: a journey through history. *Journal of Immunology Research*, Article ID 489758, 8 pages.
70. Romero Cabello R. (2013). Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra Edición. *Editorial Médica panamericana*, Cap 142, año 2013.
71. Sánchez-Velásquez, L. R., & Pineda-López, M. R. (2010). Comparative demographic analysis in contrasting environments of *Magnolia dealbata*: an endangered species from Mexico. *Population Ecology*. 52:203–210.

72. Schofield, C. J., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, (22) 12:583-588.
73. Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). Antimicrobial susceptibility Testing protocols. *CRC Press*.
74. Shanahan, P., O'sullivan, D. G., Simpson, P., Glennon, J. D., & O'gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonas* and investigation of physiological parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1): 353–358.
75. Shoji, J., Sakazaki, R., Nakai, H., Terui, Y., Hattori, T., Shiratori, O., & otros (1988). Isolation of a new phenazine antibiotic, DOB-41, from *Pseudomonas* species. *The Journal of Antibiotics*, 41(5):589-94.
76. Smirnov, V. V., Kiprianova, E. A., Garagulya, A. D., Esipov, S. E., & Dovjenko, S. A. (1997). Fluviols, bicyclic nitrogen-rich antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters*, 153; 357-361.
77. Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins, P. (2011). Quantitative thin-layer chromatography: a practical survey. Bernd Spangenberg. (pág. 184). *Springer*. Berlín.
78. Sutherland, R., Boon, R. J., Griffin, K. E., Masters, P. J., Slocombe, B., & White, A. R. (1985). Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(4):495-498.
79. Tachikawa, E., Tachikawa, M. & Kashimoto, T. (2000), Effects of extract and ingredients isolated from *Magnolia obovata* thunberg on catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochemical Pharmacology*, 60: 433–440.
80. Tang, J. S., & Gillevet, P. M. (2003). Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53;(4):995-7.
81. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., de Souza, W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Neglected Tropical Diseases*. 6(8): e1749.
82. Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., & Raaijmakers, J. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175(4):731-42.

83. Urbina, J., (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, 115:55–68.
84. Urbina, J. A. (2015). Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1):149-56 doi: 10.1111/jeu.12184.
85. Vázquez-Chagoyán, J. C., Gupta, S., & Garg, N. J. (2011). Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and chagas disease. *Advances in Parasitology*, 75:121-146.
86. Velazco-Macías, C. G., Foroughbakhch-Pournavab, R., Alanís-Flores, G. J., & Alvarado-Vázquez, M. A. (2008). *Magnolia dealbata* en Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78(2): 459-463.
87. Werner, (2008) Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5): 384-389.
88. Winding, A., & Oberender, J. (2012). Effects of the secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on soil protozoa and bacteria. *Acta Protozoologica*, 51: 249–258. doi:10.4467/16890027AP.12.020.0766.
89. Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M. & Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *PNAS*, 106(13): 5022–5027.
90. Yuan, Z., Cang, S., Matsupuji, M., Nakata, K., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (1998). High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(6):559-563.
91. Yuan, L. L., Li, Y. Q., Wang, Y., Zhang, X. H., & Xu, Y. Q. (2008). Optimization of critical medium components using response surface methodology for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(3):232-7. doi: 10.1263/jbb.105.232.

Anexos

**Anexo 1. Medios de preservación y de cultivo**

<b>Medio Gherna de criopreservación</b> (Composición por litro)	
Caldo tripticasa de soya	30 g
Glucosa	5 g
Leche en polvo descremada	20 g
Glicerol al 87%	40 mL

<b>Caldo nutritivo Difco<sup>MT</sup></b> (Composición por litro)	
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
pH final: 6.8 ± 0.2 a 25°C	

<b>Agar nutritivo Difco<sup>MT</sup></b> (Composición por litro)	
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
pH final: 6.8 ± 0.2 a 25°C	

<b>Medio King B (Composición por litro)</b>	
Proteasa-peptona	20 g
Glicerol	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub>	1.5 g
pH final: 7.2 ± 0.2 a 25°C	

\*El MgSO<sub>4</sub> se esteriliza por filtración.

<b>Medio Liver Infusion Tryptose (LIT)</b> (Composición por litro)	
NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0 g

Glucosa	2.0 g
Triptosa	5.0 g
Infusión caldo de hígado	5.0 g
pH= 7.2 ± 0.2 a 25°C	

<b>Medio LIT complementado</b>	
Medio LIT	
Hemina	25 µL/mL
Suero fetal bovino* (SFB)	10%

\*El SFB es previamente inactivado a 56°C por 30 min

<b>Medio YPD (Composición por litro)</b>	
Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
pH final: 6.5 ± 0.2 a 25°C	

Para prepararlo como medio sólido se agregaron 15 g de agar.

<b>Medio Mueller Hinton(MH)</b> (Composición por litro)	
Casamino ácidos DIFCO	17.5 g
Extracto de carne DIFCO	3.0 g
Almidón	1.5 g
Solución de MgCl <sub>2</sub>	0.1 mL
Solución de CaCl <sub>2</sub>	0.1 mL

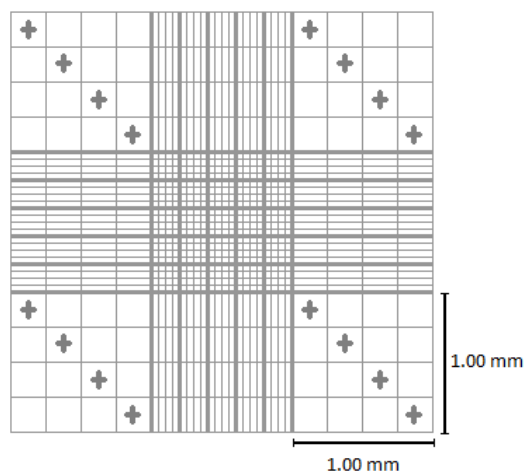
<b>Solución de MgCl<sub>2</sub> para 100 mL</b>	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8.36 g

<b>Solución de CaCl<sub>2</sub> para 100 mL</b>	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.68 g
pH= 7.3±0.2a 25°C	

## Anexo 2. Recuento directo al microscopio de *Trypanosoma cruzi*

El recuento directo en microscopio se realiza mediante el uso de la cámara de Neubauer, de acuerdo con la metodología establecida en “Cell Differentiation in Trypanosomatids and Other Parasitic Protozoa”<sup>1</sup>.

El recuento se realiza en el objetivo de 40X, en las diagonales formadas por los cuadros como se muestra en la Figura a continuación. Los parásitos que se encuentran sobre las líneas de división superior e izquierda de cada uno de los cuadros son tenidos en cuenta en la cuenta total de cada cuadro, mientras que los inferiores y derecho no lo son.



**Detalle de cuadrícula de recuento en cámara de Neubauer.** Se encuentran marcados los cuadros utilizados en el conteo del número de parásitos.

**La concentración de parásitos es igual a:**

$$\text{concentración} \left[ \frac{\text{parásitos}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{número de parásitos}}{\text{Volumen [mL]}}$$

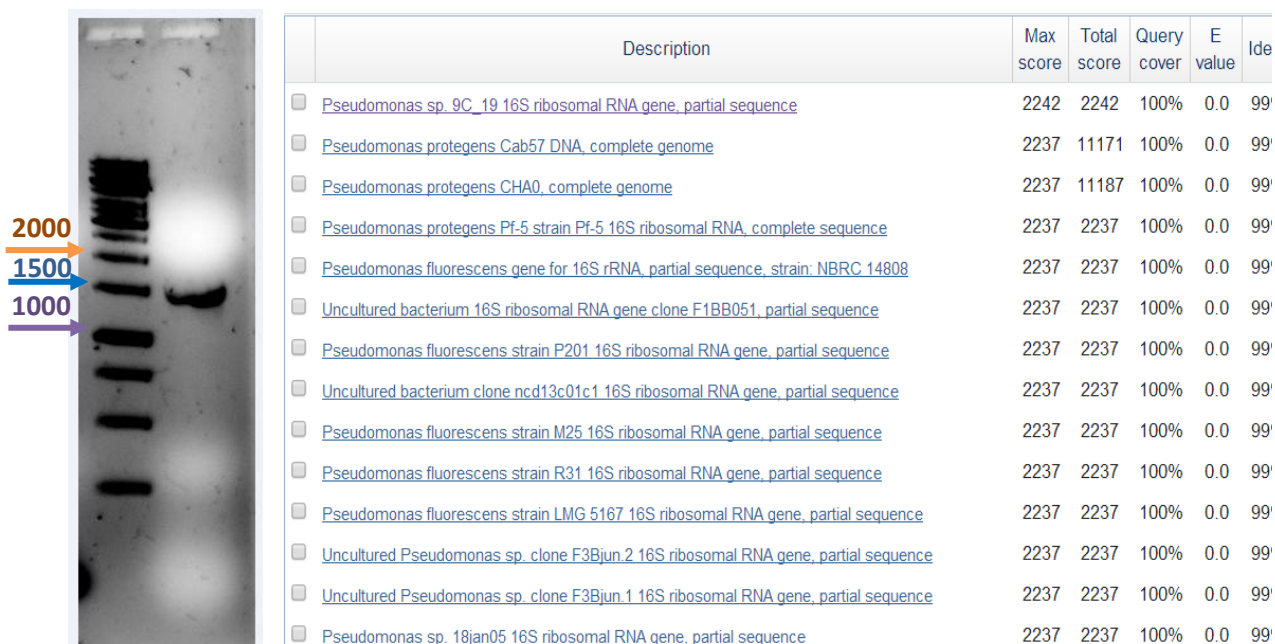
$$\text{Volumen} = \text{Lado} \times \text{Lado} \times \text{Profundidad}$$

Para los cuadros grandes para el recuento, cada lado mide 1.00 mm (0.1 cm) y la profundidad de la cámara es de 0.1 mm (0.01 cm). Por lo tanto el volumen total es:

$$V = 0.1 [\text{cm}] \times 0.1 [\text{cm}] \times 0.01 [\text{cm}] = 1 \times 10^{-4} [\text{cm}^3]$$

<sup>1</sup>Deane, M. P., Moriearty, P. L., Neide, T., Cell Differentiation in Trypanosomatids and Other Parasitic Protozoa, en, Morel, C. M., Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual, Segunda Edición. Fundación Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brazil.1984.

### Anexo 3. Verificación del género *Pseudomonas* mediante rADN 16s



### Secuencia de DNA del 16S para la *Pseudomona* sp. utilizada de 1274pdb

TAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTAAGTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG  
 CCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCTACGGG  
 AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATTAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA  
 ATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGG  
 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG  
 CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGA  
 TTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTG  
 CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAGCCCCG  
 GGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGT  
 AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACAC  
 TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAAC  
 TAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCC  
 GCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGC  
 AACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAAGTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACA  
 TTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGC  
 AACCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  
 AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACA  
 GAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGA