
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS.



Tesis

“Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México”.

Presentada por:
Héctor Eduardo Arellano Franco

Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Oceanografía Costera.

Ensenada, Baja California, Diciembre 2017.

“Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México”.

Tesis que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Oceanografía
Costera

Presenta:
M.C. Héctor Eduardo Arellano Franco

Dra. Irma Esthela Soria Mercado
Director de tesis

Dr. José Vinicio Macías Zamora
Sinodal

Dr. Valentín Miranda Soto
Sinodal

Dra. Amelia Portillo López
Sinodal

Dra. A. Berenice Aguilar Guadarrama
Sinodal

Dra. Blanca E. Domínguez Mendoza
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

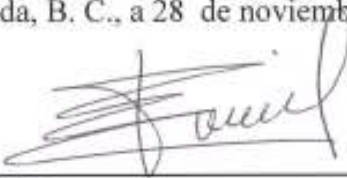
DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
COORDINADORA DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **Héctor Eduardo Arellano Franco** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 28 de noviembre de 2017



DRA. IRMA ESTHELA SORIA MERCADO
DIRECTORA DE TESIS

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
COORDINADORA DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **Héctor Eduardo Arellano Franco** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 28 de noviembre de 2017


DR. VALENTIN MIRANDA SOTO
SINODAL

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
COORDINADORA DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **Héctor Eduardo Arellano Franco** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 28 de noviembre de 2017



DRA. A. BERENICE AGUILAR GUADARRAMA
SINODAL

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
COORDINADORA DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **Héctor Eduardo Arellano Franco** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 28 de noviembre de 2017



DRA. BLANCA E. DOMÍNGUEZ MENDOZA
SINODAL

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

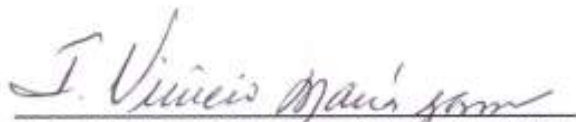
DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
COORDINADORA DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **Héctor Eduardo Arellano Franco** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 28 de noviembre de 2017


DR. JOSE VINICIO MACIAS ZAMORA
SINODAL

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

DRA. LUS MERCEDES LÓPEZ ACUÑA
COORDINADORA DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **Héctor Eduardo Arellano Franco** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

Aislamiento e identificación de principios activos con actividad biomédica antibiótica y anticancerígena, aislados de cepas bacterianas de sedimento marinos de Bahía de Loreto, México.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 28 de noviembre de 2017



DRA. AMELIA PORTILLO LOPEZ
SINODAL

DEDICATORIA

Para mi familia.

A mi padre Eduardo Arellano Amero †.

A mi madre, Carmen Franco Flores... mi mejor y mas grande ejemplo en la vida y por quien he llegado ha ser lo que soy, te quiero muchísimo.

A mis cuñados, hermanas y sobrinos.

Ustedes han sido el motivo por el cual todo sacrificio vale la pena. Por ustedes este trabajo y esfuerzo de 4 años ha llegado hoy a su feliz término, todos los sueños se pueden convertir en realidad si hay motivos como ustedes para lograrlo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Irma Esthela Soria Mercado, por haberme brindado la oportunidad de iniciar este proyecto bajo su dirección y guía, aún cuando el destino me había llevado por otros rumbos, por la infinita paciencia que me ha tenido a través de estos años en los que me recibió con los brazos abiertos en su laboratorio, y en los que he aprendido muchas cosas, no solo de índole profesional, sino personal a través de ella.

A la Dra Amelia Portillo López, y al Dr J. Vinicio Macías Zamora por estar siempre pendiente de mí, del desarrollo de este proyecto y de los jalones de orejas cuando han sido necesarios.

Al Dr. Valentín Miranda Soto, por la paciencia, consejos y facilidades otorgadas para efectuar los análisis de resonancias de mis muestras que muchas veces me hizo favor de ejecutar.

A la Dra. Blanca Domínguez Mendoza y Dra. Berenice Aguilar Guadarrama, por todo este tiempo en que he tenido el placer de ser su alumno desde la licenciatura y en que he aprendido muchas cosas a través de ustedes, además de las facilidades prestadas para hacer la estancia de investigación en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM.

Al Dr. Gerardo Aguirre y Dr. Daniel Chavez del Centro de Graduados e Investigación en Química, del Instituto Tecnológico de Tijuana por el apoyo y las facilidades para efectuar los análisis de mis muestras en sus instalaciones.

A la Dra Ana María Íñiguez Martínez, por ser una excelente amiga y el hombro en el quien me apoyé durante mis etapas de estrés, gracias por estar siempre presente aunque a veces a la distancia, eres una excelente persona, amiga y compañera de trabajo en esos días de trabajo en el laboratorio.

A Fátima Yadira Castro Ochoa, por toda la ayuda desde que llegue al laboratorio y para la realización de las pruebas presuntivas de citotóxicidad de mis muestras, y a todos los demás compañeros del Laboratorio de Química Marina con los que compartí espacio y trabajo en estos años.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma Baja California y todo su personal administrativo y académico, por haberme aceptado como uno más de sus alumnos durante estos años, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

La presente investigación se llevó a cabo con financiamiento del proyecto de Ciencia básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt CB-2011-01-168484) y apoyado con Beca Doctoral Conacyt No. 360626.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.	i
ABSTRACT.	iii
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	4
3. HIPÓTESIS.	8
4. OBJETIVO GENERAL.	8
4.1 Objetivos Específicos.	8
5. METODOLOGÍA.	9
5.1 Sitio de muestro.	9
5.2 Aislamiento y crecimiento de cepas.	10
5.3 Tinción de Gram.	12
5.4 Preparación de extractos.	13
5.5 Bioensayos de actividad antibacteriana.	17
5.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
5.5.2 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	17
5.5.3 <i>Escherichia coli</i>	18
5.6 Prueba presuntiva, bioensayo antimicrobiano.	19
5.7 Prueba de dosis - respuesta inhibitoria media.	20
5.8 Bioensayos de citotoxicidad.	21
5.8.1 Células HCT-116.	21
5.8.2 Células HeLa.	21
5.8.3 Células MDA-MB-231.	21
5.8.4 Células CRL-5872.	22
5.9 Cultivo de las líneas celulares.	22
5.10 Preparación del cultivo celular.	23
5.11 Conteo celular.	24
5.12 Preparación de microplacas para el bioensayo citotóxico.	25
5.13 Adición de muestras para bioensayo citotóxico.	26
5.14 Adición del indicador de metabolismo celular.	26
5.15 Lectura de las placas, bioensayo citotóxico.	27
5.16 Análisis Probit.	27
5.17 Separación y purificación de compuestos bioactivos.	32
5.18 Elucidación estructural.	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
6.1 Pruebas presuntivas.	38
6.2 Fracciones Antimicrobianas.	39
6.3 Fracciones Citotóxicas.	42

6.4 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear.....	44
6.5 Determinación de CE_{50}	51
7. CONCLUSIONES.....	54
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	56
ANEXOS.	62

TABLAS.

Tabla I Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo de sedimentos.....	11
Tabla II Datos ejemplo Probit	28
Tabla III Relación de las cepas aisladas y sus sitios de localización.	33
Tabla IV Cepas bacterianas elegidas por bioactividad.	34
Tabla V Descripción morfológica de las cepas.	34
Tabla VI Bioactividad antimicrobiana y citotóxica presuntivas de los 9 extractos crudos.	38
Tabla VII Resultados de análisis antimicrobianos.	40
Tabla VIII Desplazamientos químicos por RMN de la muestra 25A6-3	45
Tabla IX Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular HCT-116.....	51
Tabla X Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular CRL-5872.	52
Tabla XI Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular MDA-MB-231.	52
Tabla XII Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular HeLa.	52
Tabla XIII Resultados de CE_{50} , de las muestras 25A6-2-1 y 25A6-3.	53
Tabla XIV Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-2-1, línea celular HCT-116.	80
Tabla XV Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-2-1, línea celular CRL-5872.	82
Tabla XVI Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-2-1, línea celular HeLa.	84
Tabla XVII Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-2-1, línea celular MDA-MB-231.....	86
Tabla XVIII Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular HCT-116.	88
Tabla XIX Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular CRL-5872.	90
Tabla XX Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular HeLa.....	92
Tabla XXI Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular MDA-MB-231.	94

FIGURAS.

Figura 1. Relación filogenética de las Actinobacterias marinas. Fuente: NCBI (2017).	3
Figura 2 Ubicación del sitio de muestreo.	10
Figura 3. Ubicación de las estaciones de muestreo de sedimentos.	11
Figura 4. Crecimiento de cepas en medio semisólido y líquido.	13
Figura 5. Ruta de obtención del aislamiento de las cepas.	15
Figura 6. Ruta de obtención de extractos orgánicos.	15
Figura 7. Ruta de prueba de citotoxicidad.	16
Figura 8. Ruta de prueba de actividad antimicrobiana.	16
Figura 9. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Figura 10. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figura 11. <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 12. Disposición de pocillos en microplaca para bioensayos.	20
Figura 13. Fotografía de las líneas celulares cancerosas a 10X y 40X en microscopio compuesto.	22
Figura 14. Cámara de Neubauer para conteo de densidad celular/mL.	25
Figura 15. Preparación de las microplacas para el cultivo celular.	26
Figura 16. Gráfico de supervivencia, análisis Probit.	30
Figura 17. Gráfico de fallas acumuladas, análisis Probit.	31
Figura 18. Gráfico de probabilidad, análisis Probit.	31
Figura 19. Vista del cultivo en medio semisólido de CP25 <i>Streptomyces gancidicus</i>	35
Figura 20. Vista del cultivo en medio líquido y líquido de CP25 <i>Streptomyces gancidicus</i>	35
Figura 21. Micrografía de la tinción de Gram, CP25 <i>Streptomyces gancidicus</i>	35
Figura 22 Vista del cultivo en medio semisólido de CP27 <i>Micromonospora sp.</i>	36
Figura 23. Vista del cultivo en medio líquido y líquido de CP27 <i>Micromonospora sp.</i>	36
Figura 24. Micrografía de la tinción de Gram CP27 <i>Micromonospora sp.</i>	36
Figura 25. Vista del cultivo en medio semisólido de CP34 <i>Streptomyces sp.</i>	37
Figura 26. Vista del cultivo en medio líquido de CP34 <i>Streptomyces sp.</i>	37
Figura 27. Micrografía de la tinción de Gram de CP34 <i>Streptomyces sp.</i>	37
Figura 28. Diagrama de bloques de la separación y purificación de las fracciones antimicrobianas.	40
Figura 29. Diagrama de bloques de la separación y purificación de las fracciones citotóxicas.	43
Figura 30. Espectrómetro Varian 700 MHz (16.45T).	44
Figura 31. Espectrómetro Bruker 400MHz.	45
Figura 32. Interacciones ^1H - ^{13}C en experimento HMBC.	47
Figura 33. Interacciones ^1H - ^{13}C en experimento Noesy.....	48
Figura 34. Estructura química propuesta para la fracción 25A6-3.	49
Figura 35. Búsqueda electrónica de en MarinLit y SciFinder-CAS de la estructura propuesta. ..	50

Figura 36. Espectros de RMN ^1H de 700 MHz para la fracción 25A6-3.	63
Figura 37. Espectros de RMN ^{13}C de 700 MHz para la fracción 25A6-3.	66
Figura 38. Espectros de 2D RMN Cosy ^1H - ^1H de 700 MHz para la fracción 25A6-3.	69
Figura 39. Espectros de 2D RMN Noesy ^1H - ^1H de 700 MHz para la fracción 25A6-3.	72
Figura 40. Espectros de 2D RMN HSQC ^1H - ^{13}C de 700 MHz para la fracción 25A6-3.....	74
Figura 41. Espectros de 2D RMN HMBC ^1H - ^{13}C de 700 MHz para la fracción 25A6-3.....	77

ECUACIONES.

Ecuación 1. %Efecto inhibitorio, análisis antimicrobiano.	19
Ecuación 2. %Mortalidad, análisis citotóxico.	27

GLOSARIO

AcOEt	Acetato de Etilo, Solvente. ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$)
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
CE_{50}	Concentración Efectiva media.
CRL-5872	Línea celular de cáncer de pulmón.
FN	Fase Normal, en cromatografía.
FR	Fase Reversa, en cromatografía.
G-C	Guanina – Citocina.
HCT-116	Línea celular de cáncer colorrectal.
HeLa	Línea celular de cáncer cérvico-uterino.
HMBC ^1H - ^{13}C	Experimento Correlación Heteronuclear de Enlaces Múltiples.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución).
HSQC ^1H - ^{13}C	Experimento de Correlación Cuántica Heteronuclear Simple.
Hx	Hexano, Solvente (C_6H_{14})
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, por sus siglas en inglés (International Union of Pure and Applied Chemistry).
MDAMB-231	Línea celular de cáncer de mama.
MeOH	Metanol, Solvente (CH_3OH).
Mesh	Malla, unidad granulométrica empleada para sólidos.
Pellet	Denominación genérica, utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido de diferentes materiales formado comunmente por procesos de centrifugación.
Rf	Relacion frontal entre el recorrido del soluto y el recorrido del solvente en una cromatografía en capa fina.
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón.
RMN COSY ^1H - ^1H	Experimento de Espectroscopía de Correlación.
RMN NOESY ^1H - ^1H	Experimento de Correlación de Efecto Nuclear Overhauser.
TLC	Tin Layer Chromatography (cromatografía en capa fina).
δ	Desplazamiento químico, en RMN.

RESUMEN.

A partir de 27 muestras de sedimento obtenidas en el golfo de California, dentro de bahía de Loreto, Baja California Sur, se aislaron e identificaron filogenéticamente 48 cepas bacterianas correspondientes al género *Actinobacteria*. De ese total de 48 cepas, se eligieron 3 identificadas como CP25 *Streptomyces gancidicus*, CP27 *Micromonospora sp.*, y CP34 *Streptomyces sp.* De los cuales se llevó a cabo escalamiento del cultivo líquido, para obtener la mezcla de metabolitos secundarios que fueron extraídos en 3 fases orgánicas de diferentes polaridades (acetato de etilo, acetona y metanol).

Estos extractos orgánicos fueron probados de forma presuntiva en bioensayos antimicrobianos contra 3 cepas patógenas multirresistentes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y citotóxicos contra 4 líneas celulares (HCT-116 cáncer colorrectal, CRL-5872 cáncer de pulmón, HeLa cáncer cervicouterino y MDAMB-231 cáncer de mama).

Tras haber efectuado los ensayos presuntivos, se descartaron los extractos que presentaron poca o nula actividad, y se continuó con la separación y purificación de los mismos por métodos cromatográficos, en fase normal o reversa de acuerdo a lo que se necesitó en cada caso. Una vez obtenidas las subfracciones, fueron ensayadas para confirmar la presencia de la actividad buscada.

Fueron obtenidas 3 subfracciones provenientes de la fracción orgánica de acetato de etilo (25AE1A, 25AE21E y 25AE21F) de la cepa de *Streptomyces gancidicus*, que fue la que demostró tener mejor actividad antimicrobiana, así como 2 subfracciones de la misma cepa pero de la fracción orgánica de acetona que presentaron bioactividad citotóxica.

Las subfracciones 25AE1A, 25AE21E y 25AE21F, fueron probadas en un bioensayo antimicrobiano construyendo una curva inhibición desde las 24 a las 72 horas de exposición para los organismos de prueba. En estas curvas, se observó que la fracción 25AE21E, fue la que tuvo mejor efecto inhibitorio (a una concentración de 0.4mg/mL) sobre los tres organismos de prueba, destacándose a partir de un tiempo de exposición de 48 horas, alcanzando porcentajes de inhibición de 62.2% para *Pseudomonas aeruginosa*, 38.8% para *Staphylococcus aureus* y 75.5% para *Escherichia coli*, alcanzando máximos porcentajes de inhibición a las 72 horas, con 85.2% para *Pseudomonas aeruginosa*, 71.2% para *Staphylococcus aureus* y 88.7% para *Escherichia coli*.

Las subfracciones probadas para actividad citotóxica contra las líneas celulares cancerosas y que presentaron actividad presuntiva, provienen de igual forma de la cepa *Streptomyces gancidicus*, pero de la fase orgánica de acetona, las cuales fueron identificadas bajo la clave 25A6-2-1 y 25A6-3.

Se llevó a cabo el análisis de las muestras antes mencionadas por resonancia magnética nuclear, para tratar de obtener la estructura química del o de los compuestos bioactivos presentes en las subfracciones, sin embargo, debido a la poca cantidad obtenida y a la naturaleza

de las muestras, solo fue posible trabajar con una de ellas para la elucidación estructural, esta muestra fue la identificada bajo la clave 25A6-3.

Se obtuvieron los experimentos de RMN ^1H , ^{13}C , 2D RMN COSY ^1H - ^1H , NOESY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C , y HMBC ^1H - ^{13}C , con los cuales a través de los desplazamientos de los núcleos de ^1H y ^{13}C y sus correlaciones se llegó a proponer una estructura química la cual está de acuerdo para la fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$. Esta estructura, está compuesta por una γ -lactama la cual posee en posición α un carbonilo, una insaturación, unida con una β -lactona en posición 4, mientras que en posición 3 tiene un grupo etilo, en posición 5 un metilo y un sec-butilo. Esta molécula posee 3 centros quirales con configuración (S) cada uno de ellos, y la cual de acuerdo con las reglas de la IUPAC recibe el nombre de (S)-5-((S)-sec-butil)-3-etil-5-metil-4-((S)-4-oxoetan-2-il)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona. Se llevó a cabo una búsqueda electrónica para encontrar coincidencias en las bases de datos de SciFinder-CAS® de la American Chemical Society y MarInLit® de la Royal Society of Chemistry, sin encontrar coincidencias, por lo que se propone como una molécula novedosa.

Se determinó la CE_{50} de las dos subfracciones ensayadas para citotoxicidad (25A6-2-1 y 25A6-3) con las 4 líneas celulares, las cuales presentaron valores de 182.34 $\mu\text{g/mL}$ y 182.78 $\mu\text{g/mL}$ contra la línea HCT-116; 209.73 $\mu\text{g/mL}$ y 193.99 $\mu\text{g/mL}$ para CRL-5872; 193.33 $\mu\text{g/mL}$ y 173.18 $\mu\text{g/mL}$ para MDAMB-231 y 153.04 $\mu\text{g/mL}$ y 202.91 $\mu\text{g/mL}$ para HeLa, respectivamente.

ABSTRACT.

From 27 sediment samples obtained in the Gulf of California, in Loreto Bay, Baja California Sur, 48 bacterial strains corresponding to the genus Actinobacteria were isolated and phylogenetically identified. From this total of 48 strains, 3 strains, identified as CP25 *Streptomyces gancidicus*, CP27 *Micromonospora sp.*, and CP34 *Streptomyces sp.* Scaling of the liquid culture was carried out to obtain the mixture of secondary metabolites that were extracted in 3 organic phases of different polarities (ethyl acetate, acetone and methanol).

These organic extracts were presumptively tested in antimicrobial bioassays against 3 multi-resistant pathogenic strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and cytotoxic against 4 cell lines (HCT-116 colorectal cancer, CRL-5872 lung cancer, HeLa cervical cancer and MDAMB-231 breast cancer).

After carrying out the presumptive tests, the extracts with little or no activity were discarded, and the separation and purification of the same were continued by chromatographic methods, in normal or reverse phase according to necessary in each case. Once the subfraction was obtained, they were bioassayed to confirm the presence of the activity sought.

Three subfractions were obtained from the organic fraction of ethyl acetate (25AE1A, 25AE21E and 25AE21F) from the *Streptomyces gancidicus* strain, which showed to have better antimicrobial activity, as well as 2 subfractions of the same strain but of the organic fraction of acetone which exhibited cytotoxic bioactivity.

The 25AE1A, 25AE21E and 25AE21F subfractions were tested in an antimicrobial bioassay by constructing an inhibition curve from 24 to 72 hours of exposure for test organisms. In these curves, the 25AE21E fraction was the subfraction that had the best inhibitory effect (at a concentration of 0.4mg/mL) on the three test organisms, standing out from an exposure time of 48 hours, reaching percentages of inhibition of 62.2% for *Pseudomonas aeruginosa*, 38.8% for *Staphylococcus aureus* and 75.5% for *Escherichia coli*, reaching their maximum inhibition rates at 72 hours, with 85.2% against *Pseudomonas aeruginosa*, 71.2% for *Staphylococcus aureus* and 88.7% for *Escherichia coli*.

The subfractions tested for cytotoxic activity against cancer cell lines and showing presumptive activity are derived from the *Streptomyces gancidicus* strain, but from the acetone organic phase, which were identified under the key 25A6-2-1 and 25A6-3.

Analysis of the aforementioned samples was carried out by nuclear magnetic resonance to try to obtain the chemical structure of the bioactive compound (s) present in the subfractions, however, because of the amount obtained and the nature of the samples, alone it was possible to work with one of them for structural elucidation, this sample was identified under key 25A6-3.

The ^1H , ^{13}C , 2D NMR experiments COSY ^1H - ^1H , NOESY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C , and HMBC ^1H - ^{13}C were obtained, with which through the displacements of the ^1H and ^{13}C nuclei and their correlations it was proposed to propose a molecular structure of $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$. This structure is composed of a γ -lactam having α -carbonyl position an unsaturation, a β -lactone in

the 4-position, whereas in the 3-position has an ethyl group, in the 5-position a methyl and a sec-butyl. This molecule has 3 chiral centers with configuration (S) each, and which according to the IUPAC rules is named (S)-5-((S)-sec-butyl)-3-ethyl 5-methyl-4-((S)-4-oxoethan-2-yl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one. An electronic search was conducted to find matches in the SciFinder-CAS® databases of the American Chemical Society and MarinLit® of the Royal Society of Chemistry, without finding any matches, so it is suspected that it may be a novel molecule.

The EC₅₀ of the two subfractions tested for cytotoxicity (25A6-2-1 and 25A6-3) were determined with the 4 cell lines, which values of 182.34 µg/mL and 182.78 µg/mL against the HCT-116 line; 209.73 µg/mL and 193.99 µg/mL for CRL-5872; 193.33 µg/mL and 173.18 µg/mL for MDAMB-231 and 153.04 µg/mL and 202.91 µg/mL for HeLa, respectively.

1. INTRODUCCIÓN.

La historia de la humanidad siempre ha estado condicionada a la utilización de ciertos productos naturales como remedios para paliar enfermedades, los cuales han sido obtenidos a partir del aprovechamiento de recursos obtenidos del medio ambiente en donde nos hemos desarrollado, proviniendo de hierbas, animales, materiales minerales, etc. El empleo de este tipo de productos naturales se ha transmitido a través de generaciones en todas las culturas, y a medida del desarrollo tecnológico y científico, nos ha permitido conocer los principios activos o sustancias bioactivas contras muchas afecciones que sufrimos.

El término “Producto natural”, se refiere a un compuesto químico o sustancia producida por un organismo vivo, encontrado en la naturaleza y que posee la característica de presentar actividad biológica o farmacológica para su uso terapéutico sobre un determinado padecimiento. Este tipo de productos naturales pueden ser extraídos a partir de organismos tanto terrestres como de origen marino, con la finalidad de su aprovechamiento a diferentes niveles.

Este tipo de compuestos, son sintetizados a partir del metabolismo del carbono y nitrógeno en los organismos, siendo este tipo de compuestos los denominados metabolitos secundarios, ya que por su naturaleza, no intervienen directamente sobre los procesos que rigen la reproducción o el crecimiento de los mismos.

El valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido durante mucho tiempo, y se consideraban simplemente como productos finales de los procesos metabólicos, sin alguna función específica, como meros productos de desecho de los organismos. A causa de esta percepción que perduró durante mucho tiempo sobre su importancia biológica, las funciones de muchos de los metabolitos secundarios aún son desconocidas.

A la fecha, las investigaciones en el área de la química de productos naturales, ha generado un número muy importante de publicaciones nacionales e internacionales, en donde detallan trabajos de aislamiento y caracterización de miles de compuestos químicos pertenecientes a muchas familias de metabolitos secundarios.

Cada vez es más necesaria la aplicación de nuevos medicamentos, en especial antibióticos, para prevenir y contrarrestar la propagación de agentes patógenos resistentes a los antibióticos comunes, así como para el tratamiento de nuevas enfermedades o difícil tratamiento como el cáncer. Aunque se han hecho progresos considerables en el ámbito de la síntesis química y la biosíntesis de compuestos antimicrobianos, la naturaleza sigue siendo la más rica fuente de este tipo de compuestos (Manivasagan *et al.*, 2014).

Dado que más del 70% de la superficie del planeta está cubierta por océanos, es de esperarse que la abundancia de vida en este sea varios órdenes de magnitud más grande que la encontrada en la superficie terrestre, por tanto, se considera que parte de esa abundancia y riqueza biológica de los océanos, sea susceptible de ser aprovechada.

La gran diversidad microbiológica presente en los océanos, hasta ahora ha sido explorada en un grado muy limitado, por lo que su riqueza metabólica es sumamente atractiva para la prospección y brinda un campo de estudio sumamente amplio para ser abordado. Los productos

naturales presentes en el agua marina, se diluyen rápidamente, por lo tanto la capacidad para presentar diversos efectos sobre los organismos, debe ser muy alta para ser detectada, es por esto y debido a la inmensa riqueza biológica el mar en su conjunto, cada vez más se reconoce que existe un gran número de productos naturales y nuevas entidades químicas en los océanos, con actividades biológicas que pueden ser útiles en la búsqueda de nuevos fármacos con mayor eficacia y especificidad para el tratamiento de muchas enfermedades. (Burkhard Haefner, 2003)

Las actinobacterias son productores prolíficos de sustancias empleadas como antibióticos, y han sido ampliamente utilizadas por la industria farmacéutica para la obtención de una amplia variedad de sus metabolitos secundarios. Este tipo de organismos pertenecientes a la familia *Actinomycetae* son bien conocidos por su capacidad de producción de metabolitos, muchos de los cuales tienen bioactividad contra organismos patógenos. Estas bacterias tradicionalmente han sido aisladas principalmente de fuentes terrestres (Manivasagan et al., 2014).

Después de la revolución de la “era dorada” en las décadas de los años 1940 y 1950s, cuando casi todos los grupos de antibióticos antibacterianos importantes fueron descubiertos (Tetraciclina, Cefalosporina, Aminoglucósidos, Macrólidos), este tipo de compuestos fueron aislados a partir de algunas familias de actinobacterias, entre ellas los *Streptomyces* (más del 70% de los compuestos). Durante este periodo y las décadas siguientes, el descubrimiento de nuevos compuestos con actividades antitumorales, antivirales y demás apenas comenzaría (Bais YG et al 2012).

Las actinobacterias marinas se distribuyen ampliamente en fuentes biológicas tales como peces, moluscos, esponjas, algas marinas, manglares además de agua de mar y sedimentos. Estos organismos están ganando importancia, no solo por sus perspectivas taxonómicas y ecológicas, sino también por la producción de compuestos bioactivos como antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores, enzimas, pigmentos, etc. (Dharmaraj, 2010). Se estima que aproximadamente 23,000 compuestos con actividad antibiótica han sido descubiertos a partir de microorganismos; siendo aproximadamente 10,000 de estos aislados a partir de actinobacterias.

Este tipo de microorganismos han sido objeto de atención considerable debido a los efectos beneficiosos que sus metabolitos ofrecen para la salud humana a través de la industria farmacéutica y la medicina (Janardhan *et al.*, 2014).

Los actinomicetos son bacterias Gram positivos, a menudo filamentosos, y reconocidas por su capacidad insuperable para la producción de metabolitos secundarios con actividades biológicas. Este tipo de microorganismos ha tenido una amplia proyección desde inicios de 1950, y han dado origen a muchas drogas con capacidades antimicrobianas (como la Anfotericina B, Eritromicina, Vancomicina) y otros que han sido empleados como tratamientos contra algunos tipos de cáncer (Daunorubicina, Bleomicina, Mitomicina) y algunos otros fármacos inmunosupresores (Rapaminina)(Zotchev, 2012).

Las actinobacterias marinas, mantienen una relación filogenética en común, perteneciendo al *phylum* Actinobacteria y a la clase Actinobacteria, de la cual se diferencian en diversas familias y géneros como *Actinomadura*, *Aeromicrobium*, *Gordonia*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Solwaspora*, *Williamsia*, *Verrucosipora* y algunos otros (Jayaprakashvell, 2012), como se muestra en la figura 1.

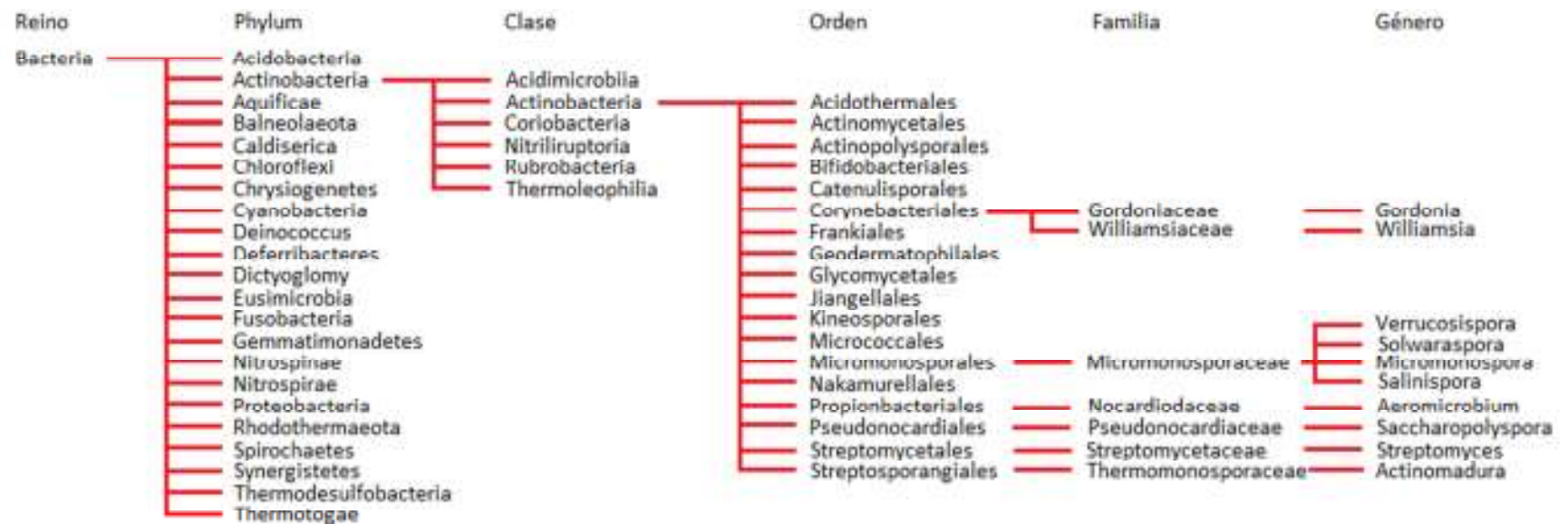


Figura 1. Relación filogenética de las Actinobacterias marinas. Fuente: NCBI (2017).

2. ANTECEDENTES.

La historia de la humanidad está condicionada a la utilización de ciertos productos naturales como remedios para paliar enfermedades. Por citar algunas, la Aspirina, la Morfina y la Penicilina han marcado un parte aguas en expectativas de calidad de vida, incluso productos como la Adriamicina o el Taxol, se emplean a diario como tratamiento de ciertos tipos de tumores cancerosos.

Estos compuestos, junto con otros miles, han sido fruto de la exploración de plantas y microorganismos como fuentes de moléculas con aplicación en medicina. Las grandes compañías farmacéuticas se han posicionado en estrategias de descubrimiento de compuestos durante los últimos setenta años, y han desarrollado miles de nuevos compuestos derivados de sustancias de origen natural y las han modificado químicamente para generar nuevos compuestos con mayor potencia y nuevas aplicaciones (De la Calle, 2007).

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos patógenos presentan un desafío serio para la farmacología actual, así lo evidencian las millones de muertes prematuras a nivel mundial por esta causa (WHO, 2002). Por otro lado, el rápido desarrollo de la resistencia antibiótica por muchos patógenos, y la toxicidad de algunos antibióticos usados actualmente, propicia la búsqueda y el desarrollo constante de nuevos agentes antimicrobianos (Leiva *et al.*, 2004).

En los últimos años, se han explorado ecosistemas marinos en busca de metabolitos bioactivos para enfrentar algunas de las enfermedades que se han considerado incurables o de difícil tratamiento, como ciertos tipos de cáncer o infecciones de tipo bacteriano o viral. (Bonar *et al.*, 1986).

Debido a que los océanos ocupan casi un 70% de la superficie del planeta, se ha hecho evidente la importancia del estudio de la microbiología marina, para comprender el papel que juegan los microorganismos en los procesos biológicos que ocurren en el océano. Además, el potencial de estos para proveer de productos naturales bioactivos es inmenso a juzgar por la extensión y diversidad de hábitats y condiciones en las que este tipo de organismos habitan; por lo que este grupo de organismos representa un potencial enorme de caracterización y explotación de metabolitos naturales con fines terapéuticos (Barbier y Prieur, 1991).

La evolución ha definido y seleccionado diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque y comunicación entre organismos marinos que componen un vasto arsenal de moléculas que pueden ser empleadas como medicamentos. Este tipo de sustancias van desde las que presentan actividad citotóxica y que se aplican en terapias oncológicas para controlar la división celular; así también las sustancias neurotóxicas presentes en algunos dinoflagelados y moluscos se han aplicado en el tratamiento de dolor (De la Calle, 2007). La mayoría de los compuestos bioactivos presentan toxicidad en animales y humanos y algunos otros presentan efectos secundarios en estos organismos, por lo que diariamente se ha incrementado la demanda por nuevos fármacos que tengan menos efectos indeseables (Sudha y Masilamani, 2012).

En la actualidad un gran número de organismos marinos son considerados fuentes provisionarias de sustancias bioactivas. Hallazgos de nuevos microorganismos marinos muestran la existencia de cepas nativas que producen una variedad de metabolitos secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de importancia en la industria farmacológica, cosmética, nutricional y química entre otros. Tradicionalmente las algas han sido fuente de metabolitos con principios activos útiles en medicina, sin embargo, las superficies y espacios internos de otros organismos como los invertebrados son también, los hábitats de cientos de bacterias y microorganismos, que a su vez pueden ser empleados para este fin. (León *et al.*, 2010).

Actualmente más de 23,000 metabolitos secundarios producidos por microorganismos han sido reportados y de esos, aproximadamente 10,000 fueron aislados Actinomicetos, los cuales representan aproximadamente el 45% de todos los metabolitos secundarios descubiertos. Algunos de estos compuestos tienen una potente actividad antibiótica, además algunos de estos han sido empleados como drogas antitumorales, entre las que se encuentran las antraciclinas, proteínas (bleomicina y actinomicina D), ácidos aureólicos (mitramicina), enediynas (neocarzinostatin) y antimetabolitos (pentostatin), entre otros (Sudha y Masilamani, 2012).

La capacidad metabólica y fisiológica de los actinomicetos marinos varía notablemente de los terrestres debido al tipo de ecosistema en el que se encuentran, lo que ofrece un enorme potencial para el descubrimiento de nuevas drogas. Sin embargo, el reto de la obtención de estas sustancias, se encuentra en el aislamiento en el laboratorio ya que su presencia es en concentraciones sumamente pequeñas. Es por ello que la Ingeniería Genética y Biotecnología entran en este campo a fin de contar con la identificación de los genes codificantes para la producción de los metabolitos de interés y poder mediante la manipulación de estas secuencias pronosticar la presencia de sustancias de interés en cultivos de cepas modificadas que permitan obtener el o los productos en mayores rendimientos y menores tiempos de crecimiento (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012b).

Las Actinobacterias son un grupo de microorganismos filamentosos, que tienen crecimiento en forma de red, llamada micelio, y aunque las dimensiones son mucho más reducidas que el micelio de los hongos, son en muchos sentidos comparables. La mayoría de los actinomicetos forman esporas y la forma en que éstas se generan y agrupan se usa en la clasificación de subgrupos. La composición de su ADN cae en el intervalo del 63 al 78% de Guanina – Citosina (G-C) y son conocidas por ser los organismos que más alto índice G-C tienen (Madigan *et al.*, 2005). Son bacterias abundantes en suelos, pero también encontradas en ambientes acuáticos dulceacuícolas y marinos.

Las bacterias del suelo siguen siendo estudiadas, pero hay una notable merma en el hallazgo de nuevos productos, estimándose que más del 90% de los cultivos bioactivos descubiertos producen agentes ya formados o variaciones menores de uno ya descrito con anterioridad. Por ello, la investigación se ha reorientado hacia ambientes como son ríos, lagos y el mar, que pueden ofrecer la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas hasta el momento, las cuales produzcan nuevos metabolitos secundarios activos (Leiva *et al.*, 2004).

La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos incluye antimicrobianos, anti-cancerígenos, antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases

químicas no descritas en microorganismos terrestres. Estando algunos de ellos ya en etapa de evaluación clínica. (Leiva *et al.*, 2004).

Los microorganismos, especialmente los actinomicetos son los productores más comunes de agentes antimicrobianos, tradicionalmente, han sido aislados de fuentes terrestres y solo en las últimas décadas llegó a ser evidente el potencial de microorganismos marinos como productores de antibióticos. Muchos de estos microorganismos, han sido aislados directamente del suelo marino, en condiciones extremas de salinidad, temperatura, pH, y presión, aunque también se han podido aislar a partir de las simbiosis con invertebrados y algas, los cuales también han sido objeto de estudios para la obtención de metabolitos con actividad biomédica (León, 2010; Villarreal-Gómez *et al.*, 2010).

A nivel mundial existen trabajos en donde se han identificado consorcios de bacterias aisladas a partir de sedimentos marinos, las cuales han sido objeto de estudio para la identificación y posible explotación de sus metabolitos biomédicamente activos (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012a; Becerril-Espinosa *et al.*, 2012b; Bowman 2007; González *et al.*, 2005; Gulve y Deshmukh, 2012; Hong *et al.*, 2009; León *et al.*, 2007; Li Hang, 2006; Maldonado *et al.*, 2009; Martínez-García *et al.*, 2007; Olano *et al.*, 2009; Pérez-Carrascal, 2012; Soria-Mercado *et al.*, 2004; Sudha y Masilamani, 2012; Sunaryanto *et al.*, 2010; Vimal *et al.*, 2009; Villareal-Gómez *et al.*, 2010, Renu Solanki *et al* 2008, Li-yang T. *et al* 2010, N. Sithranga Boopathy and K. Kathiresan (2010), Gram L. *et al* 2010, Anzai Kozue *et al* 2008) encontrándose entre las familias identificadas: *Acinetobacter*, *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, entre muchas otras.

En particular, en el laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas, de la UABC, durante 7 años se han estado desarrollando estrategias para el cultivo de actinobacterias a partir de sedimentos marinos. Específicamente, se realizaron colectas de sedimento en mayo de 2010 en la Bahía Todos Santos y el Golfo de California y se logró obtener las condiciones óptimas de cultivo, probando diversos medios, temperaturas, pH y salinidad y se ha logrado aislar alrededor de 1700 actinobacterias que forman parte del cepario del laboratorio. Las más importantes se encuentran debidamente registradas en el GenBank (números de acceso: HQ873926 al HQ873952 y HQ877411 al HQ877448).

Las muestras de sedimentos analizadas se colectaron de diferentes sitios en la Bahía Todos Santos, BC. (Becerril-Espinosa *et al.*, 2011; Becerril-Espinosa *et al.*, 2012a) y del oeste del Golfo de California (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012b, Torres-Beltrán *et al.*, 2012) de donde se recogieron 126 muestras de sedimentos y se aislaron en promedio 3.1 a 38.3 cepas de actinobacterias de cada muestra.

Se realizó el análisis filogenético de 136 cepas y se identificaron miembros de los géneros *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Saccharomonospora*, *Salinispora*, *Streptomyces* y *Verrucosipora*. Estas cepas se agruparon en 26 unidades taxonómicas operacionales (UTO) basados en secuencias del gen 16SrRNA con identidades del 98 % y en 56 UTOs al 100% de identidad. Se identificaron también por sus necesidades para crecer en ambientes salinos (35%) y al 98% de identidad, 3 cepas son consideradas no reportadas con anterioridad y pertenecen al género *Streptomyces*, así como un nuevo filotipo (L) de *Salinispora pacifica*, al 100% de identidad. Estas nuevas cepas de actinobacterias son sumamente bioactivas

contra células de cáncer colorrectal HCT-116, y cérvico-uterino HeLa, así mismo presentan actividad antibiótica contra algunas cepas patógenas.

También se realizaron análisis filogenéticos con dominios cetosintetasa asociados con los genes policétido sintetasa y estas secuencias revelaron que las muestras bacterianas varían desde un 55 hasta un 99% de identidad en sus nucleótidos, lo que sugiere que algunos pueden estar asociados con la producción de nuevos metabolitos secundarios, indicando que la Bahía Todos Santos y el Golfo de California son un reservorio de nuevos metabolitos bioactivos que pueden ser aprovechados en un futuro como fármacos (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012a y b).

3. HIPÓTESIS.

Existen cepas de actinobacterias en el sedimento de bahía de Loreto en el Golfo de California que producen metabolitos secundarios de interés biomédico sobre líneas celulares cancerosas y sobre cepas de bacterias patógenas multirresistentes, los cuales pueden ser aisladas y sus metabolitos purificados e identificados estructuralmente para una futura explotación farmacológica.

4. OBJETIVO GENERAL.

- Llevar a cabo el aislamiento, purificación e identificación molecular de actinobacterias marinas de Bahía de Loreto en el Golfo de California, así como la búsqueda de su actividad citotóxica y antibiótica mediante pruebas *in vitro*, y el aislamiento de sus metabolitos bioactivos con la finalidad de ser propuestos para explotación farmacológica.

4.1 Objetivos Específicos

- Aislar cepas de Actinobacterias provenientes de 28 muestras de sedimento marino de 40 a 300 m de profundidad, obtenidas de Bahía de Loreto en el Golfo de California.
- Cultivar las cepas puras de actinobacterias aisladas a un volumen de 100 mL, y preparar extractos orgánicos de los cultivos líquidos.
- Evaluar la actividad de extractos orgánicos sobre líneas celulares cancerosas.
- Evaluar la actividad de los extractos orgánicos sobre bacterias patógenas.
- Efectuar el escalamiento del cultivo a 15 L para obtener extractos orgánicos de aquellas actinobacterias que resulten ser nuevas y/o que presenten mejor bioactividad.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las cepas de actinobacterias que sean nuevas especies y/o presenten mejor bioactividad sobre líneas celulares cancerosas y sobre bacterias patógenas.
- Llevar a cabo la elucidación químico estructural de los metabolitos aislados y purificados con actividad biomédica de interés.
- Determinar la CE₅₀ del o los compuestos aislados que presentan bioactividad.

5. METODOLOGÍA.

5.1 Sitio de muestro.

El Golfo de California, se caracteriza por ser un mar largo y estrecho de aproximadamente 1000 km longitud y una anchura que varía de entre los 108 y 234 km, con profundidades máximas de 180 m en el Alto Golfo y casi 4000 m en las fosas abisales del Golfo Central y Sur. La zona oceánica está constituida por cuencas marinas con profundidades mayores a los 3000 m, montes submarinos, pendientes pronunciadas, plataforma continental angosta y ancha, numerosas islas y fosas hidrotermales, estos sitios funcionan como oasis marinos de los cuales depende un gran número de especies oceánicas. Debido a las diferentes características de variabilidad de temperatura, profundidades y productividad primaria, el Golfo de California fue incluido en la provincia pelágica del Pacífico Tropical Oriental. Los rasgos fisiográficos difieren en ambas costas, siendo del lado sudcaliforniano en su mayoría rocosas, con acantilados y accidentadas en su desarrollo, mientras que las de lado occidental, son predominantemente areno-lodosas con frecuentes playas arenosas de varios kilómetros de longitud. Los procesos oceanográficos presentes en el Golfo de California son de alta importancia, ya que promueven la elevada productividad biológica característica de la región. La elevada cinética de la corrientes provoca las grandes concentraciones de fitoplancton, lo que a su vez, genera complejas cadenas alimenticias (CONANP, 2011).

Las corrientes de marea son intensas y provocan una mezcla profunda de la columna de agua, lo cual promueve que la productividad de la región sea elevada y a su vez genere una alta diversidad y densidad de invertebrados y vertebrados marinos. El clima de la región del Golfo es más costero que oceánico, debido al efecto moderador que ejerce una cadena montañosa con una extensión de 100 a 3000 m de altura a lo largo de la península de Baja California, lo que contribuye a los amplios gradientes de temperatura diurnos y anuales que se registran en la región. Las temperaturas superficiales en la región norte del Golfo varían desde un promedio de 10°C en invierno, hasta 32°C en verano. En la región sur varían desde los 20°C en invierno hasta las de 25°C en verano. La precipitación anual en el extremo norte no excede los 100 m, prevaleciendo condiciones climáticas típicas de las zonas áridas del macizo continental. En la parte sur, se han registrado precipitaciones anuales hasta 10 veces mayor que en el norte y el clima es más húmedo (CONANP, 2011).

El sitio de muestreo de los sedimentos, está comprendido entre las coordenadas 25°54' N - 111°18' O y 25°46' N - 111°08' O, en las inmediaciones de Isla Danzante e Isla del Carmen, frente a las costas de la ciudad de Loreto, la cual es cabecera del municipio homónimo ubicada a 345 km al norte de La Paz, en el estado de Baja California Sur (Fig 2).

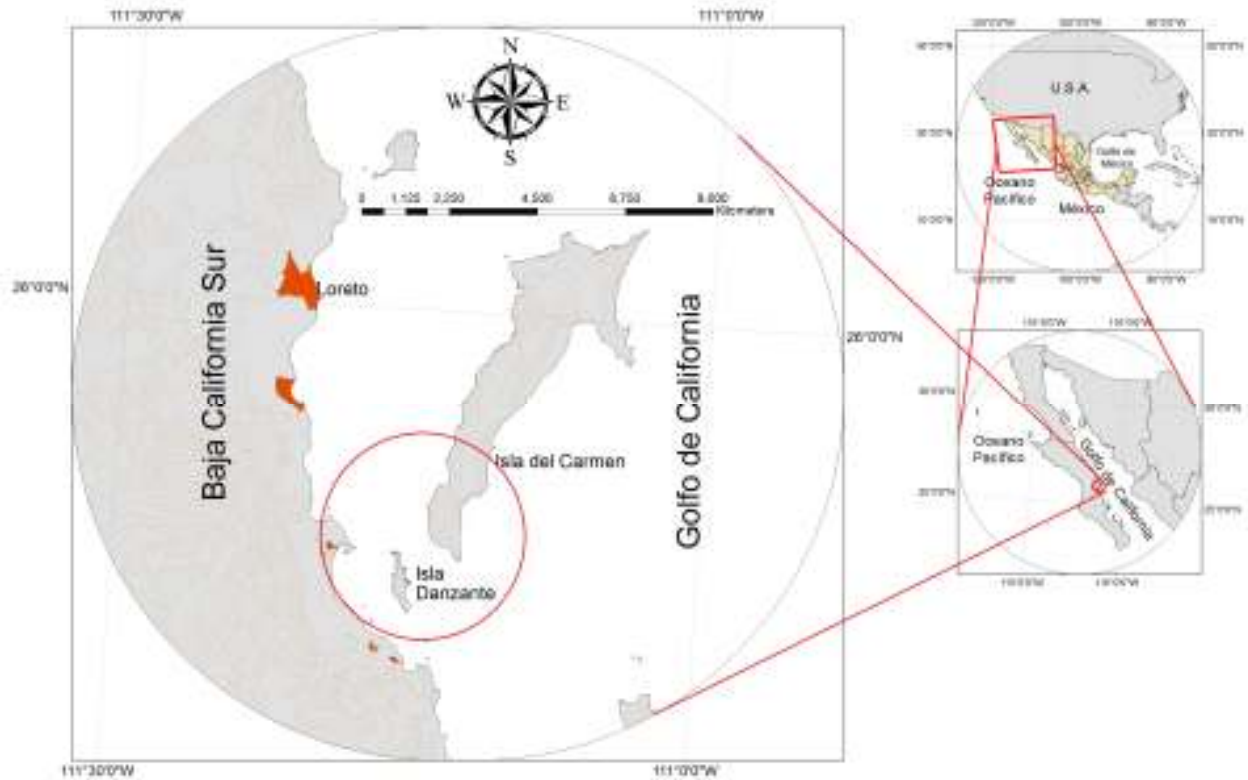


Figura 2 Ubicación del sitio de muestreo.

5.2 Aislamiento y crecimiento de cepas.

Durante el mes de Mayo de 2010, fueron tomadas 28 muestras de sedimentos a través de una draga Van Veen (tomando la parte superficial del sedimento), a diferentes profundidades en las inmediaciones de la bahía de Loreto, México mostrándose sus localizaciones en la Tabla I y Fig 3.

Tabla I Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo de sedimentos.

Estación	Coordenadas		Profundidad (m)	Estación	Coordenadas		Profundidad (m)
	Latitud	Longitud			Latitud	Longitud	
E1-1	25.806369°N	111.169548°W		E15-1	25.7636°N	111.2522°W	53
E2-1	25.825271°N	111.182991°W	261	E16-1	25.7740°N	111.2280°W	226
E3-1	25.826609°N	111.186125°W	215	E17-1	25.7892°N	111.2240°W	304
E4-1	25.828194°N	111.186931°W	286	E18-1	25.7959°N	111.2283°W	307
E5-1	25.827734°N	111.188146°W	200	E19-1	25.8070°N	111.2349°W	306
E6-1	25.841823°N	111.184035°W	226	E20-1	25.8229°N	111.2405°W	302
E7-1	25.800042°N	111.186919°W	118	E21-1	25.8587°N	111.2409°W	270
E8-1	25.789948°N	111.180033°W	50	E22-1	25.8766°N	111.2305°W	93
E9-1	25.765552°N	111.21916°W	238	E23-1	25.8853°N	111.2508°W	303
E10-1	25.763830°N	111.25029°W	63	E24-1	25.8883°N	111.2519°W	309
E11-1	25.7842°N	111.1842°W	47	E25-1	25.8916°N	111.2530°W	>300
E12-1	25.7933°N	111.2802°W	56	E26-1	25.8914°N	111.2509°W	275
E13-1	25.7778°N	111.2802°W	44	E27-1	25.8879°N	111.2514°W	315
E14-1	25.7726°N	111.2613°W	43	E28-1	25.8844°N	111.2513°W	308

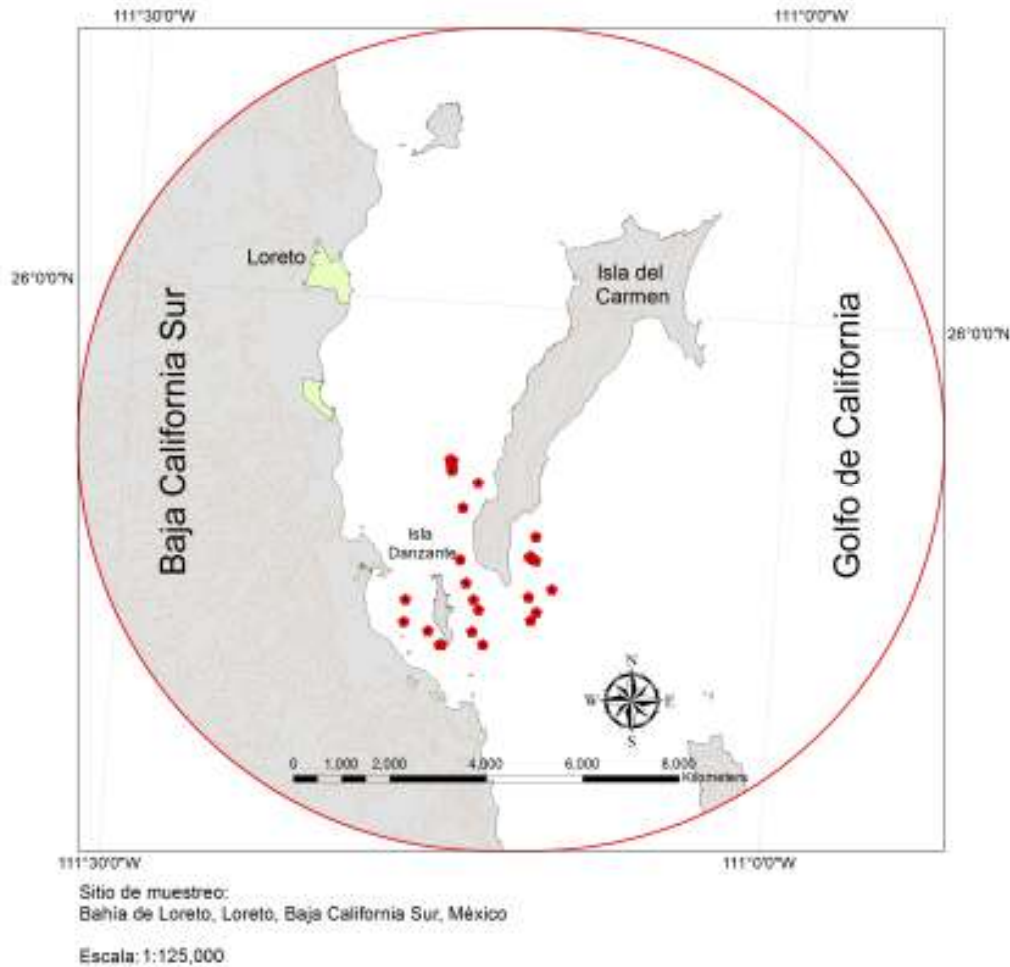


Figura 3. Ubicación de las estaciones de muestreo de sedimentos.

Las muestras, fueron preservadas en obscuridad y refrigeración en envases estériles hasta el momento de procesarlas.

Los sedimentos fueron colocados en cajas petri estériles y se mantuvieron en corriente de aire hasta su deshidratación total. Una vez deshidratados, se procedió a hacer un aislamiento de las bacterias mediante un cultivo en medio semisólido A1 (16 g de agar, 10 g de almidón de papa, 4 g de peptona y 2 g de extracto de levadura, en 1 L de agua marina filtrada).

Al medio A1 se le adicionó un 0.01% de Ciclohexitida (100 mg/L) para evitar el crecimiento de hongos y Rifampicina o Gentamicina como agente antibacteriano para inhibir bacterias de crecimiento rápido favoreciendo con esto el crecimiento selectivo de las cepas de Actinobacterias.

La incubación se llevó a cabo a 28°C por espacio de entre 5 y 10 días dependiendo del crecimiento de las cepas. Posteriormente, se llevó una observación de las células teñidas con la técnica de Gram bajo un microscopio óptico. Las células tipo fueron aisladas en el mismo medio de cultivo A1.

En el capítulo de resultados, se detalla la descripción microscópica de las cepas aisladas. Para esto fue necesario efectuar una tinción diferencial mediante la técnica de Gram, en la cual la tinción de la pared celular de las bacterias positivas es denotada por la presencia de una coloración adquirida a través de la exposición con un colorante catiónico como es el cristal violeta, contrastando con la coloración rojiza de resto de las bacterias adquirida por la safranina o fucsina (Attimarad *et al.*, 2012).

5.3 Tinción de Gram.

- Para llevar a cabo la tinción de Gram, se tomó una pequeña muestra del cultivo celular, y se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada, homogenizando esta muestra con un aplicador de vidrio o palillo de madera, extendiendo dicha muestra en la superficie del portaobjetos. Posteriormente esta muestra se dejó secar a temperatura ambiente o bien utilizando fijación directa por flama.
- Una vez obtenida la muestra fija sobre la superficie del portaobjetos, se agregó una gota de cristal violeta o violeta de genciana cubriendo en su totalidad el frotis, y se dejó actuar por 1 minuto. Posterior a este tiempo se enjuagó con agua destilada gota a gota sobre la superficie de la muestra para retirar el exceso de colorante.
- Se agregó una gota de Lugol (KI - I₂) cubriendo el frotis, esperando por un minuto y enjuagando por escurrimiento con agua destilada gota a gota, secando al aire. Se agregó un poco de la solución de alcohol-cetona y se esperó por 30 segundos para hacer la decoloración del cristal violeta de las células que no tienen pared celular (Gram Negativas), lavando nuevamente con agua destilada gota a gota.

-
- Por último, se adicionó una gota de safranina o fucsina básica cubriendo la superficie del frotis, y dejándola actuar por 1 minuto. Posteriormente se lavó por escurrimiento gota a gota con agua destilada y se secó al aire, obteniendo así la tinción diferencial de las bacterias presentes en la muestra de aplicación.
 - Se procedió a efectuar la observación microscópica de la cepa.

Una vez obtenido el crecimiento de la cepa purificada, se hizo el cultivo de las mismas en medio líquido A1, partiendo de un volumen de 25 mL aproximadamente, hasta obtener una biomasa suficiente para tomar una alícuota y escalar el cultivo a 100 mL, manteniendo siempre las condiciones de temperatura a 28 °C, con agitación orbital a 200 rpm aproximadamente por espacio de entre 5 a 10 días o hasta obtener la cantidad necesaria de biomasa para poder efectuar una extracción.

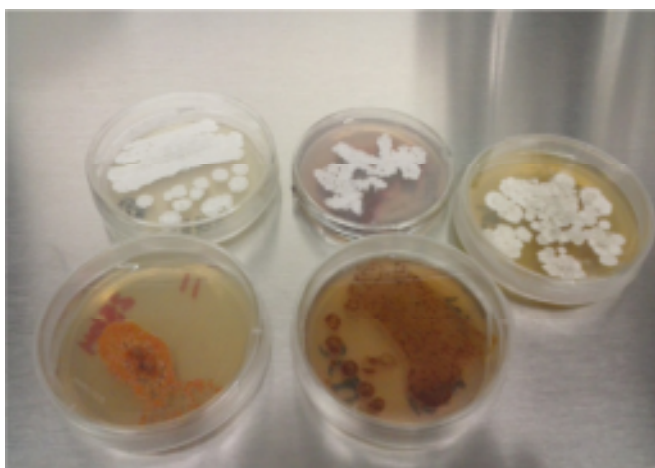


Figura 4. Crecimiento de cepas en medio semisólido y líquido.

Fotografía tomada en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

5.4 Preparación de extractos.

De las cepas ya crecidas en medio líquido y que alcanzaron un volumen de biomasa aceptable para su extracción, se tomó una alícuota para resembrar en cajas petri con medio de cultivo A1 a fin de corroborar que el cultivo no presentara contaminación y mantenerlo en incubación.

A la par de la prueba de no contaminación de las cepas, fue necesario llevar a cabo la preparación de extractos orgánicos, los cuales contienen la mezcla de los metabolitos de interés, mediante la adsorción de los mismos con amberlita XAD7 (resina acrílica, ampliamente utilizada para la absorción de moléculas de peso molecular de hasta 60,000 umas, ampliamente utilizada en la recuperación de insulina, iones metálicos, desechos secos, y compuestos orgánicos, así como de antibióticos) a una concentración de 2 g/100 mL de cultivo, la cual se agregó al medio líquido (previamente lavada con acetona, metanol y agua destilada) y se mantuvo en agitación orbital constante por espacio de 2 horas, esto con la finalidad de llevar a cabo la adsorción de los metabolitos sobre el área superficial de este material.

Posteriormente los medios que contenían tanto la amberlita como la biomasa, se separaron del medio líquido por centrifugación a 5000 rpm por 5 min, las fracciones acuosas sobrenadantes fueron separadas de los pellets formados por la amberlita y la biomasa, haciendo 2 enjuagues más de los pellets con agua destilada, separando estos del resto de los medios de cultivo, reservándolos en ultracongelación a -80 °C hasta su posterior liofilización. Los pellets así obtenidos, así como la fracción acuosa fueron preservados en refrigeración, hasta confirmación de no contaminación de la cepas.

Una vez confirmada la pureza del proceso de cultivo, la fase acuosa fue tratada por separado y se sometió a una extracción discontinua con acetato de etilo, obteniendo una fase orgánica por decantación posterior. Esta fase orgánica, se deshidrató empleando filtración sobre sulfato de sodio anhidro y posteriormente eliminando el solvente mediante rotoevaporación a presión reducida, a una temperatura no mayor de 40 °C para evitar la termolabilidad de algunos productos. La fracción orgánica así obtenida de la concentración a un volumen mínimo, fue identificada y registrada de acuerdo al número correspondiente a la cepa de la que proviene.

Los *pellets* liofilizados que fueron reservados en refrigeración fueron sometidos a una extracción empleando un par de disolventes, para obtener una extracción por gradiente de polaridad de los metabolitos.

Los *pellets*, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL a los cuales se les adicionó un volumen de 100 mL de Acetona, manteniendo estos en agitación orbital por espacio de 2 horas. Una vez terminado el proceso, se dejó precipitar la biomasa y la amberlita, y se separó la fracción acetónica por filtración sobre lana de vidrio o algodón desengrasado, procurando no resuspender totalmente la fracción sólida para evitar la pérdida de biomasa y amberlita. A la fracción sólida obtenida se le hizo una serie de lavados con el mismo solvente limpio, para tratar de remover la mayor cantidad posible de coloración debida a los metabolitos. Una vez obtenida la fracción acetónica se reunió en su totalidad, y se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta la evaporación a un volumen mínimo por rotoevaporación posterior.

A la biomasa y la amberlita resultante de la extracción con acetona, se le agregó un volumen de 100 mL de Metanol, repitiendo el procedimiento de extracción empleado para la fracción acetónica.

Una vez obtenidos así los extractos de las fases orgánicas de acetato de etilo, acetona y metanol para cada una de las cepas obtenidas, fue necesario filtrarlos por medio de acrodiscos de 0.45 micras para evitar el paso de cualquier partícula sólida que dificulte su manipulación para los bioensayos posteriores.

En las figuras 5 a 8 se ejemplifica el proceso de obtención de los metabolitos en tres fases orgánicas de acuerdo a su polaridad, así como del procedimiento general de los bioensayos.

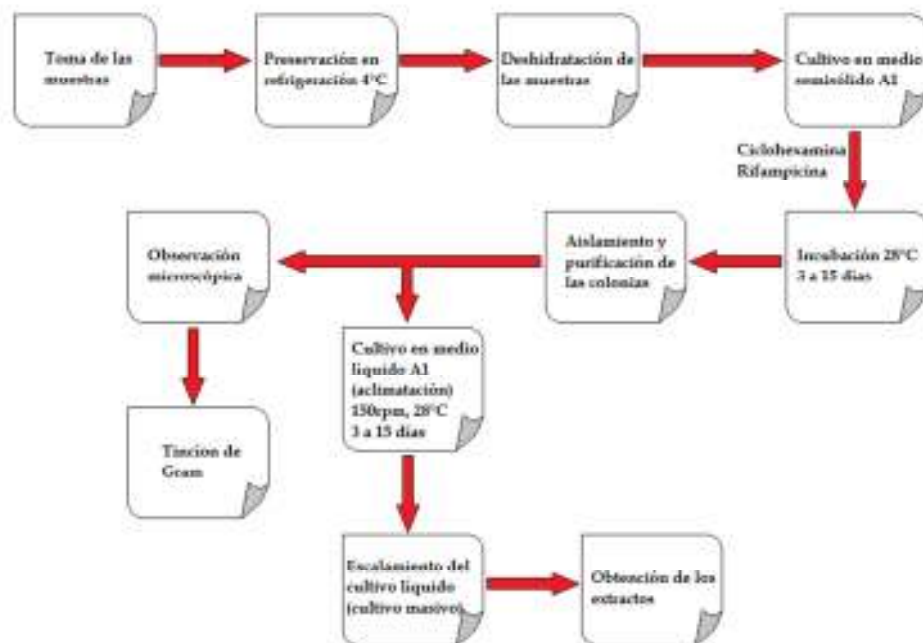


Figura 5. Ruta de obtención del aislamiento de las cepas.

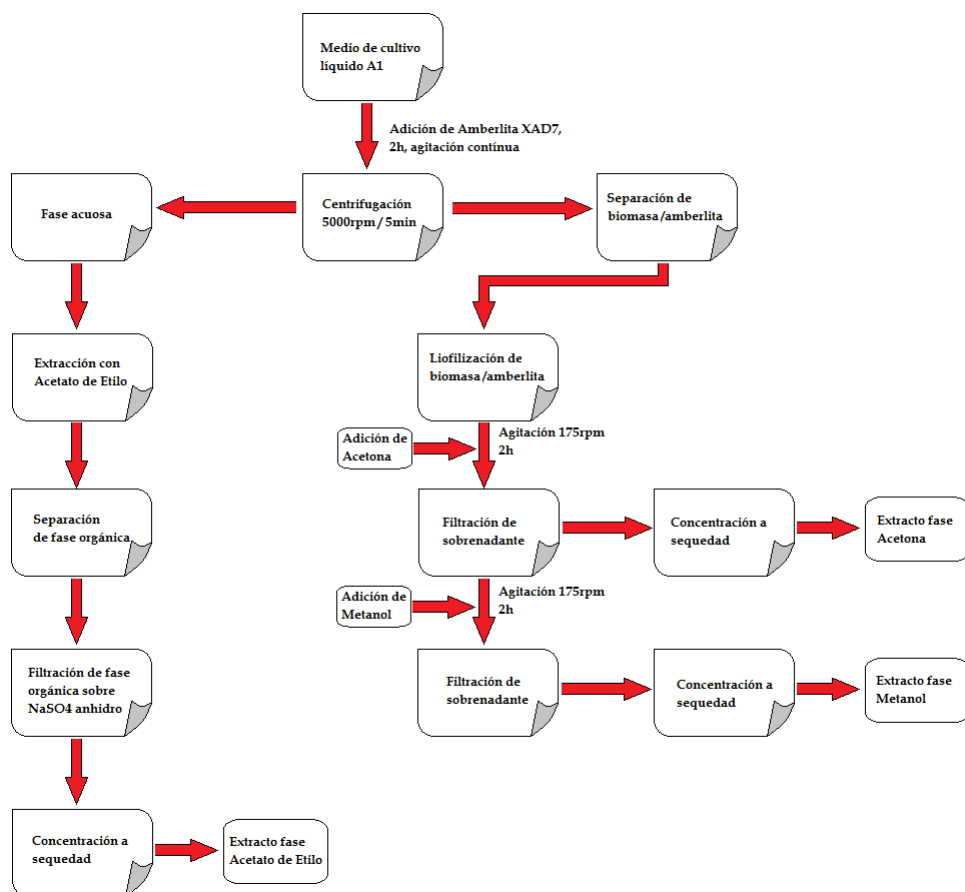


Figura 6. Ruta de obtención de extractos orgánicos.

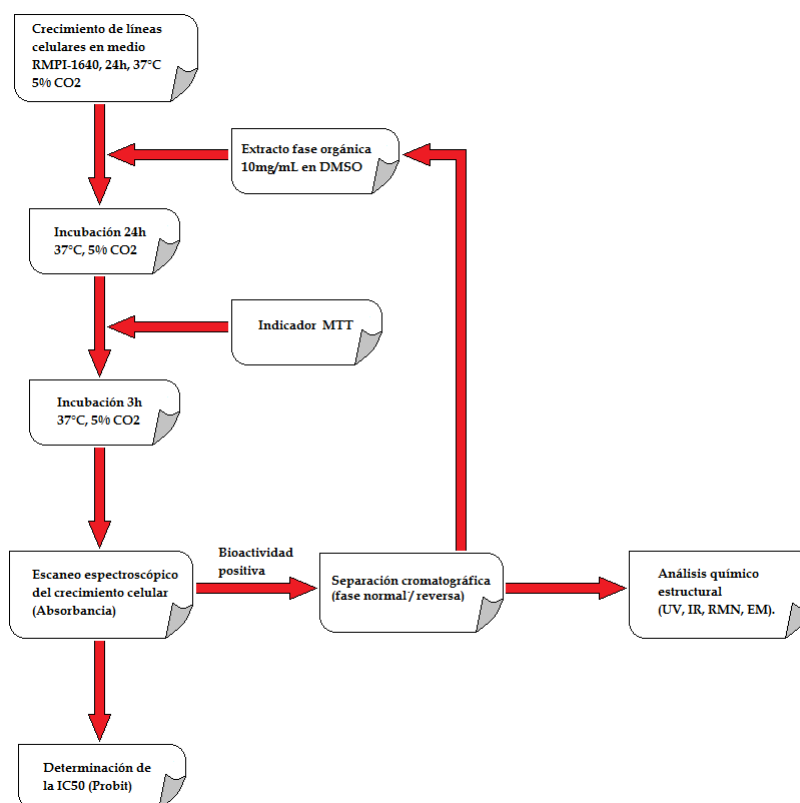


Figura 7. Ruta de prueba de citotoxicidad.

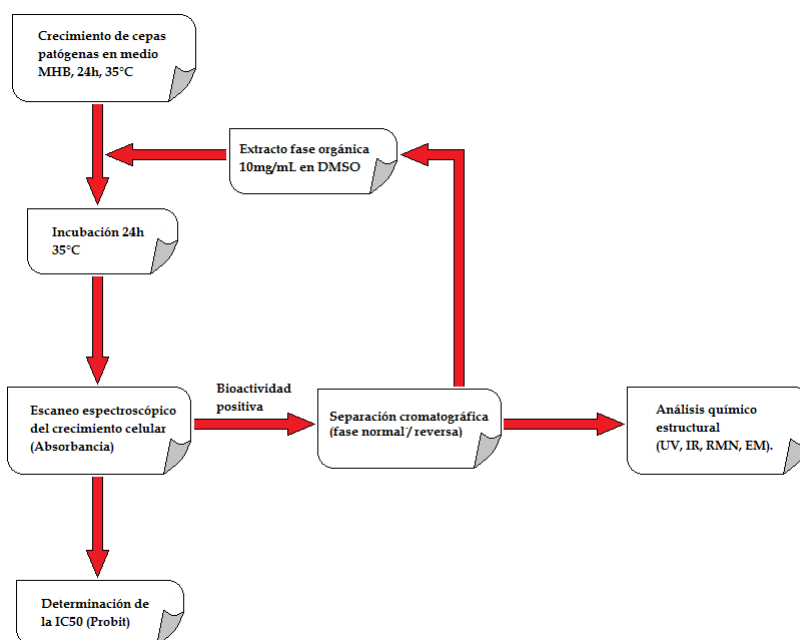


Figura 8. Ruta de prueba de actividad antimicrobiana.

5.5 Bioensayos de actividad antibacteriana.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC27853), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC27853) y *Escherichia coli* (ATCC27853) utilizadas para los bioensayos antimicrobianos fueron donadas por el Laboratorio de Bioprospección Costera, de la Unidad Química de SISAL-UNAM.

5.5.1 *Staphylococcus aureus*.

En particular *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) es un patógeno de alta virulencia responsable de varias enfermedades infecciosas relacionadas con la neumonía, osteomielitis, endocarditis, dolor de garganta, espinillas y afecciones cutáneas. Se ha reportado resistencia de *S.aureus* a Meticilina y Vancomicina, encontrando reportes de resistencia a Meticilina en Gran Bretaña desde el año 1961, siendo común encontrar infecciones hospitalarias por parte de *S.aureus*. (Sathish K.S.R, Rao, 2012).

Las células esféricas de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, se les encuentran aisladas, en pares y se multiplican característicamente en más de un solo plano para formar conglomerados irregulares, inmóviles no se les conocen etapas de latencia. La pared celular contiene péptidoglucano y ácidos terciarios, tienen metabolismo respiratorio y fermentativo, catalasa positivas. Utilizan una amplia variedad de carbohidratos con producción de ácidos. Anaerobias facultativas con desarrollo óptimo de 35 a 40 °C. (Ronald M. Atlas, 1990).



Figura 9. *Staphylococcus aureus*
Fotografía tomada de The Electron Pencil (2016)

5.5.2 *Pseudomona aeruginosa*.

Es un bacilo Gram negativo no fermentador que afecta principalmente a pacientes con alteraciones locales o generales de los mecanismos de defensa frente a infecciones, de ahí, que sea considerado como un patógeno oportunista. Principalmente es causante de infecciones intrahospitalarias, entre las que destaca la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV), así como también enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, entre otras (Vallés J. and Mariscal D., 2005).

Son células en forma de bacilos rectos o curvos aislados, no forman espiral, generalmente de 0.5 a 1 μm por 1.5 a 4 μm . Móviles mediante flagelos polares, no se les conoce etapas de latencia Gram negativas, con metabolismo respiratorio, nunca fermentativo. (Ronald M. Atlas, 1990).

Las infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, son difíciles de tratar debido a que las cepas responsables pueden ser resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación. Puede ocurrir resistencia antibiótica durante o después del tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*.



Figura 10. *Pseudomonas aeruginosa*
Fotografías tomadas de Byoprotect (2017) y Baggini, S.P. (2016).

5.5.3 *Escherichia coli*.

Es una enterobacteria, Gram negativa, no esporulada, anaerobia facultativa, con una proporción de entre 39 y 59 % de G-C en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y de amplia distribución en matrices ambientales, constituye parte de la flora intestinal de organismos de sangre caliente, por lo que es común encontrarla en las deposiciones fecales, aguas residuales y alimentos contaminados con heces fecales, y puede ocasionar infecciones gastrointestinales en pacientes debilitados.

Son bacilos rectos de 1.1 a 1.5 μm por 2.0 a 6.0 μm , gram negativos que se presentan solos o en pares y que pueden ser móviles mediante flagelos práticos o inmóviles. Pueden utilizar acetato, pero no citrato como fuente única de carbono. La glucosa y otros carbohidratos son fermentados con producción de ácido láctico, acético, fórmico. La lactosa es fermentada por la mayoría de las cepas. Son anaerobios facultativos, indol positivos, no producen H_2S en medio de agar TSI. (Ronald M. Atlas, 1990).

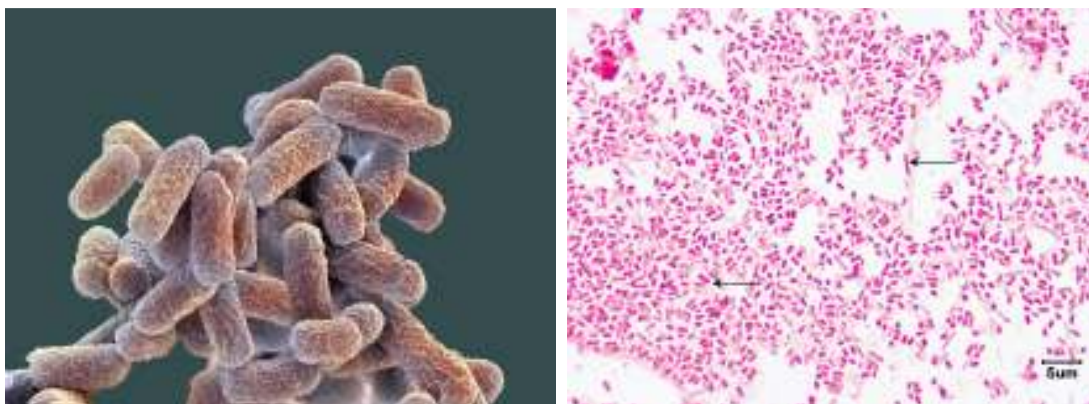


Figura 11. *Escherichia coli*
Fotografías tomadas de Gschmeissner S. (2013) y Willis G. (2017).

5.6 Prueba presuntiva, bioensayo antimicrobiano.

La prueba presuntiva de bioactividad antimicrobiana, se llevó a cabo mediante la inoculación de la o las cepas patógenas previamente incubadas por espacio de 24 horas a 35 °C en medio líquido Mueller Hinton (MHB a 23 g/L en agua destilada) en microplacas de 96 pozos, en donde se colocan 96 µL de medio estéril y adicionando 4 µL de la muestra o extracto a probar a una concentración de 10 mg/mL en DMSO, para posteriormente efectuar las diluciones seriadas con 50µL del medio de cultivo inoculado.

De forma paralela se manejaron controles (Gentamicina como control positivo, y medio de cultivo MHB estéril como control negativo) para verificar la inhibición y el crecimiento normal del organismo patógeno. Una vez terminada la inoculación, se leyó la absorbancia de dichas muestras con la ayuda de un lector de microplacas a 492 nm.

Posteriormente, las microplacas fueron incubadas a 35 °C por 24 horas, para poder observar el efecto inhibitorio que sobre las cepas tuvieron las muestras o extractos a probar; esto se logra leyendo nuevamente la absorbancia de los pozos de la microplaca y haciendo la transformación del efecto con respecto al blanco o control negativo mediante la fórmula:

Ecuación 1. %Efecto inhibitorio, análisis antimicrobiano.

$$\%Efecto\ Inhibitorio = 100 - \frac{(Abs\ Mtra\ Xhr - Abs\ Ctrl^{(-)})}{Abs\ Ctrl^{(-)}} * 100$$

Una vez calculado el efecto inhibitorio, este se consideró como parámetro de selección de aquellas muestras o extractos con un efecto inhibitorio ≥ 25 % con respecto al Control negativo. Las muestras cuyos valores de inhibición fueron negativos, son consideradas como efecto de inhibición negativo hacia la cepa patógena a probar.

5.7 Prueba de dosis - respuesta inhibitoria media.

Para llevar a cabo la prueba de inhibición bacteriana con la finalidad de establecer la CE_{50} (Concentración efectiva media) se procedió de manea similar.

Aprovechando la disposición de los pozos en las microplacas, se tuvo una capacidad de 12 pruebas por placa, considerando 8 concentraciones (diluciones seriadas) para cada una de las muestras a probar.



Figura 12. Disposición de pocillos en microplaca para bioensayos.

Foto tomada en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

En la fila A de las microplacas se depositó un volumen de 96 μL de medio MHB estéril con la o las cepas a probar y 4 μL de la muestra (a una concentración de 10 mg/mL en DMSO), homogenizando perfectamente. A partir de la fila B y hasta la H, se depositó un volumen de 50 μL de medio de cultivo estéril. Se homogenizó la mezcla del pocillo de la fila A (medio de cultivo estéril y la muestra a probar), tomando posteriormente un volumen de 50 μL , y se trasvasó a la fila B homogenizando perfectamente, y se tomó de esta nuevamente un volumen de 50 μL , repitiendo consecutivamente este procedimiento hasta llegar a los pozos de la fila H, del cual se descartarán los 50 μL sobrantes.

Terminado el proceso de diluciones seriadas se obtuvieron así 8 diluciones de la muestra de interés, a las cuales se les agregó un volumen de 50 μL del inóculo del patógeno en medio MHB a una densidad celular aproximada del orden de 1×10^3 células vivas/mL, homogenizando perfectamente los pozos con las diluciones y el inóculo, para posteriormente incubarlo a 35 °C durante 24 horas, posteriormente se medirá la absorbancia de los pozos de la microplaca a una longitud de onda de 492 nm, para efectuar el cálculo del efecto inhibitorio por cada una de las concentraciones establecidas.

Para construirse una curva de inhibición a 24, 48 y 72 horas de exposición, calculando de forma separada la dosis-respuesta a estos tiempos a través de un análisis Probit, el cual establecerá la DI_{50} o CE_{50} (dosis inhibitoria media o concentración efectiva media) para cada muestra. Para este análisis Probit, se empleó el paquete estadístico Minitab 17 Statistical Software®.

5.8 Bioensayos de citotoxicidad.

Este ensayo se basa en la respuesta de líneas celulares cancerosas tales como la HCT-116 (colon), HeLa, MDAMB-231 (mama) y CRL-5872 (pulmón), las cuales, después de ser expuestas a las posibles sustancias citotóxicas, reaccionan ante la adición de una sal conocida como Metil-Tiazol-Tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), con la cual las células tienen una reacción que mide el metabolismo celular y está basada en la reducción de esta sal por acción de las succinato-deshidrogenasas mitocondriales, con la consecuente formación del colorante azul-violeta Formazán, cuya producción es proporcional al número de células metabólicamente activas y fácilmente cuantificable por métodos espectrofotométricos (Mosmann T, 1983).

5.8.1 Células HCT-116.

Esta línea celular, fue aislada a partir de una biopsia de un hombre con carcinoma de colon. Este tipo de cáncer es aquel que comienza en el intestino grueso y en el recto. Es una de las principales causas de muerte debido a cáncer. Casi todos los cánceres de colon comienzan como pólipos no cancerosos que lentamente derivan en este tipo de cáncer. Presenta una mayor incidencia de aparición después de los 50 años.

5.8.2 Células HeLa.

Tipo celular clasificado como línea celular inmortal, es utilizado usado en la investigación científica. Es la línea celular más común y antigua que se ha utilizado. La línea derivó de unas células de cáncer cervical obtenidas el 8 de Febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks, quien, eventualmente, murió de cáncer el 4 de Octubre de 1951. La línea celular resulto ser de gran durabilidad comparada con otras múltiples líneas celulares que se usan en investigación. Las células HeLa también se usan en gran variedad de estudios sobre el cáncer incluyendo aquellos relacionados con las hormonas sexuales, esteroides como el Estradiol, Estrógenos, y sus receptores. También ha habido estudios con células HeLa sobre los efectos de flavonoides y antioxidantes con Estradiol en la proliferación de células cancerígenas. Estas células proliferan anormalmente rápido, incluso comparándolas con otras células cancerígenas (Brendan et al, 2009).

5.8.3 Células MDA-MB-231.

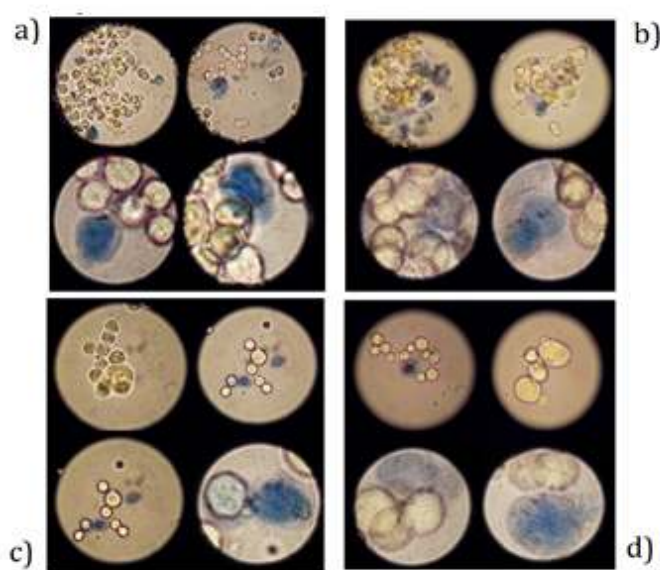
La línea celular MDA-MB-231 se estableció a partir de una única muestra de un derrame pleural, obtenida el 17 de octubre de 1973 de una mujer de 51 años a la que habían practicado una mastectomía radical derecha en enero de 1969. El estudio anatomopatológico de la pieza tumoral indicaba carcinoma indiferenciado con componentes ductales y papilares. Además, la paciente presentó un carcinoma intraductal. En junio y julio de 1973 presentó, respectivamente, derrame pericárdico y derrame pleural izquierdo. Ambos contenían células malignas compatibles con carcinoma primario de mama.

La enferma murió el 13 de enero de 1974, en la habitación 231, del edificio principal (Main Building) del Hospital Anderson, en Houston. En recuerdo a dicha paciente se denominó así esta línea. La muestra del drenaje era hemática y contenía muchas células tumorales que mostraron una viabilidad del 40%. Las células fueron lavadas, concentradas y sembradas en diferentes medios. En pocas semanas se conseguía aislar la línea MDA-MB-231.

Aunque sólo habían transcurrido 7 meses, la consideraron una línea celular por su uniformidad y rápido crecimiento, así como por la gran rapidez con que estas células producían nódulos tumorales cuando se inyectaban al ratón. El comportamiento de estas células hacía apasionante su estudio y, comercializadas desde hace muchos años y hasta el día de hoy por la ATCC, pueden considerarse sin duda unas de las más investigadas en cáncer de mama. Trabajos posteriores indicarían que estas células no poseen receptores de estrógenos y que pueden crecer sin éstos (Martínez y Mavarro, 2003).

5.8.4 Células CRL-5872.

Esta línea celular, proviene de una biopsia de pulmón; derivada del sitio metastático con derrame pleural de un adenocarcinoma de células no pequeñas de un paciente masculino de 60 años de edad con antecedentes de tabaquismo. Este tipo de cáncer de pulmón es considerado como el más común, generalmente crece y se disemina de forma más lenta que el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Phelps *et al*, 1996).



a)HCT116 – colorrectal b)CRL-5872 pulmón c)HeLa cervicouterino d)MDAMB231 mama
La coloración azul en las células indica muerte celular.

Figura 13. Fotografía de las líneas celulares cancerosas a 10X y 40X en microscopio compuesto.
Foto tomada en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

5.9 Cultivo de las líneas celulares.

El cultivo de las líneas celulares se inició con el ajuste de las temperaturas de la incubadora y el baño maría, los cuales deben permanecer a una temperatura de 37 °C, y 5 % de CO₂ para el caso de la incubadora, con humedad relativa. Posteriormente se preparó el medio de cultivo completo (suplementando 500 mL medio McCoy (HeLa y MDA-MB-231) o RPMI-1640 (HCT116 y CRL-5872) con 57.5 mL Suero Fetal Bovino, 12.5 mL Solución Hepes 1 M, y 6.25 mL Sol. Antibiótica (Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B).

Una vez preparado este medio, se descongeló el criotubo que contiene cada una de las líneas celulares a trabajar, colocándolas un par de minutos en el baño maría con la ayuda de un flotador y sanitizando después la superficie del mismo con solución de etanol al 70% o toallitas desinfectantes antes de introducirlo a la campana de flujo laminar o caseta de bioseguridad clase II.

Se colocó 1 mL del cultivo celular ya temperado, en un tubo de centrifuga estéril de 2 mL, con un volumen de 1 mL de medio completo y se centrifugó a 5000 rpm por 3 min para formar un *pellet* de células. Al mismo tiempo, se colocaron 10 mL de este medio completo en una caja petri, preincubándola por 15 min a 37 °C.

Una vez terminado el tiempo de centrifugación, se retiró el sobrenadante del tubo y se repuso el volumen con medio completo para resuspender y mediante agitación suave o inversión del tubo. Posteriormente el contenido de este tubo se mezcló con el contenido de la caja petri preincubada para formar un volumen total aproximado de 20 mL y se llevó a incubación por 24 horas en atmósfera al 5 % de CO₂ a 37 °C.

Cada 24 horas se revisó visualmente el crecimiento del cultivo celular sobre la superficie de la caja petri mediante el uso de un microscopio estereoscópico para observar la formación de una biopelícula de células. Cuando estas células se hayan adherido bien, se efectúa un recambio de medio, teniendo precaución de no resuspender la película de células e incubar por 24 horas más. Este cultivo puede dejarse por más tiempo para alcanzar una mayor densidad celular a fin de obtener criopreservados para bioensayos posteriores.

5.10 Preparación del cultivo celular.

Una vez obtenida la biopelícula de células que se han adherido a la superficie de la caja petri se colocó una alícuota de solución DBPS y así como de Tripsina durante 15 a 30 min en un baño maría a 37 °C para temperarlas, y sanitizando sus contenedores antes de introducirlos a la campana de bioseguridad.

Se sacó de incubación la caja petri que contiene el cultivo celular y que está en óptimas condiciones para trabajar con él, se retiró con cuidado el sobrenadante de cultivo completo, procurando no despegar o resuspender la biopelícula de células. Se agregaron 10 mL de solución DBPS y se agitó suavemente para lavar el posible resto de medio completo, removiéndolo con cuidado posteriormente.

Se añadieron 2 mL de Tripsina a la caja, procurando cubrir totalmente el fondo de la misma, tapándola de inmediato y colocándola nuevamente en incubación por 3 minutos; este procedimiento es necesario para la recuperación de la biopelícula celular sin dañar las células al despegarlas del fondo de la caja.

Posteriormente se agregaron 2 mL de medio completo para neutralizar la Tripsina y que no dañe las células. El contenido de la caja se homogenizó suavemente con la ayuda de una micropipeta, para posteriormente transferir el contenido de la misma en viales o tubos Eppendorf estériles.

Se tomó un volumen de 20 μ L de este cultivo resuspendido y homogenizado con 20 μ L del colorante indicador Azul de Trypan para efectuar el conteo celular en un hematocitómetro o cámara de Neubauer. Este colorante permite hacer la discriminación de células viables y no viables, tiñendo de color azul aquellas células no viables.

5.11 Conteo celular.

Con la ayuda de una micropipeta, se tomó un volumen de 10 μ L de la solución homogenizada de las células con el colorante azul de Trypan, y se colocó en la cámara de Neubauer, y se observa a través de un microscopio, comenzando la observación a 10X para localizar la retícula de cuadrantes que permite efectuar el conteo celular. Una vez, lograda la observación de la retícula con el objetivo 10X se cambió el objetivo del microscopio a 40X para poder efectuar correctamente la observación de dichas células, ajustando el campo visual con los tornillos micrométricos del microscopio y el paso de luz con el diafragma.

Se contabilizaron todas las células que no presentaron una pigmentación azul propia del colorante Trypan, que se encuentren dentro de los 25 cuadrantes del centro de la retícula. Un número normal de células estará comprendido entre 150 y 350 células.

El número obtenido de células contabilizadas dentro de los 25 cuadrantes, se multiplicó por un factor de 10,000 para así obtener un estimado del número de células viables por mililitro.

Una vez obtenido el número de células por mililitro en las alícuotas de cultivo celular, se calculó el volumen de medio completo para preparar una suspensión celular a una concentración de 2.5×10^4 células/mL. Por ejemplo, suponiendo que por microplaca de 96 pozos se requiere 16 mL de medio completo y se requiere probar 10 muestras.

$$\begin{aligned} (16 \text{ ml medio por microplaca}) * (1 \text{ placa}) &= 16 \text{ mL de medio completo} \\ (16 \text{ mL de medio total}) * (2.5 \times 10^4 \text{ células/mL}) &= 4.0 \times 10^5 \text{ células requeridas} \end{aligned}$$

Si en el hematocitómetro se contaron 175 células, este valor es multiplicado por una constante de 10,000 para obtener el valor de densidad celular por mililitro.

$$\begin{aligned} (175) * (10000) &= 1.75 \times 10^6 \text{ células totales} \\ (4.0 \times 10^5 \text{ células requeridas}) / (1.75 \times 10^6 \text{ células contadas}) &= 0.228 \text{ mL de células requeridas.} \\ 16 \text{ mL de medio completo} - 0.228 \text{ mL células} &= 15.977 \text{ mL.} \end{aligned}$$

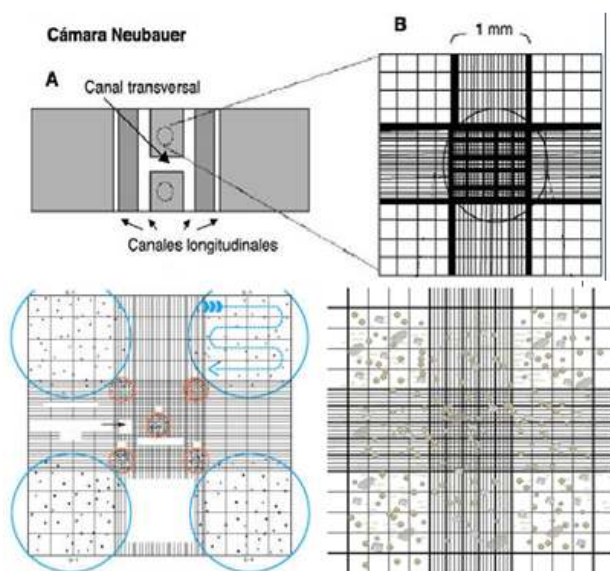


Figura 14. Cámara de Neubauer para conteo de densidad celular/mL.

5.12 Preparación de microplacas para el bioensayo citotóxico.

Se identificó la microplaca de acuerdo con el número de muestras a bioensayar, manteniendo siempre el cuidado de no tocar el interior de los pocillos. Con ayuda de una micropipeta se agregó una pequeña cantidad de medio completo en una de las canaletas de plástico y se adicionaron 150 μL de medio completo a los pocillos correspondientes a los blancos G11 y H11 en cada microplaca.

Se desechó el sobrante de medio completo de la canaleta y ahí mismo se agregó la solución celular previamente preparada (homogenizada).

Posteriormente se agregan 175 μL de la solución celular a todos los pocillos de la fila A (A1 a A12). Mientras que se colocaron 150 μL de la solución celular al resto de la microplaca evitando los pocillos para blancos, colocando en incubación 24 horas a 37°C y 5%CO₂.

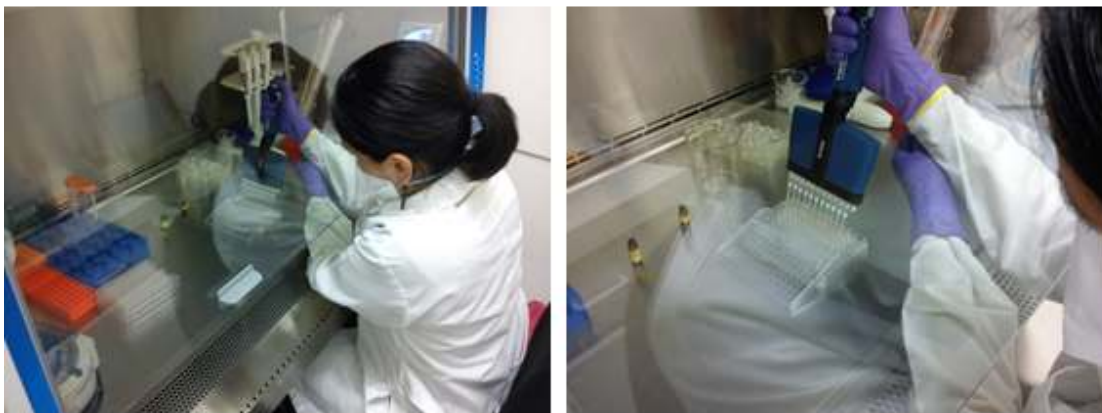


Figura 15. Preparación de las microplacas para el cultivo celular.

Foto tomada en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

5.13 Adición de muestras para bioensayo citotóxico.

Partiendo de la preparación de las muestras a probar a una concentración de 10 mg/mL en DMSO, teniendo 100 μ L de esta solución para tener material suficiente en caso de requerir análisis posteriores.

A las microplacas que fueron incubadas por 24 horas, se les agregó un volumen de 25 μ L de cada muestra en el pocillo correspondiente (A1 a A10) registrando las posiciones respectivas.

Se agregó 25 μ L de DMSO al pocillo A11 (control negativo), y 25 μ L del anticancerígeno Etopósido al pocillo A12 (control positivo).

Posteriormente con una micropipeta multicanal, se realizó la homogenización del contenido de los pocillos de la fila A (en donde se han depositado las muestras a bioensayar, con cuidado de no tocar las paredes y el fondo de los pocillos para evitar la resuspensión de las células) y posteriormente se tomaron 50 μ L de esta primer fila A, y agregar a la fila B, homogenizar perfectamente bien y tomar 50 μ L de esta para adicionar a la fila C (diluciones seriadas), evitando siempre los pocillos de los blancos (G11 y H11).

Una vez terminadas las diluciones de todas las microplacas, se incuban por 24 horas a 37 °C en atmósfera al 5 % de CO₂.

5.14 Adición del indicador de metabolismo celular.

Se prepara o descongela una pequeña alícuota del indicador MTS-PMS (precaución: hay que tener en cuenta que dicha solución es fotosensible, por lo que su manejo debe ser en un ambiente con baja iluminación para evitar que este se degrade y de falsos positivos).

El indicador se preparó pesando 0.92 mg de la sal PMS y disolviéndolo en 1 mL de solución DBPS y filtrándolo sobre 0.2 micras. El reactivo MTS se preparó pesando 2.0 mg, y disolviéndolo en 1 mL de solución DBPS y filtrándolo por 0.2 micras. La mezcla del reactivo indicador, se preparó en una proporción de 20:1 MTS:PMS.

Se agregó un volumen de 20 µL de este indicador a todos los pocillos, excepto a las filas A y B (ya que estas filas tienen la mayor concentración de DMSO y muestra a bioensayar y no es recomendable tomar en cuenta dichas filas para estimar una bioactividad con miras a determinar una CE₅₀).

Se incubaron las microplacas por 3 horas más y se guardó el sobrante de la solución MTS-MPS en refrigeración a -20 °C y protegido de la luz.

5.15 Lectura de las placas, bioensayo citotóxico.

Transcurridas las 3 horas de incubación, las microplacas fueron leídas en un lector de microplacas a 492 nm, para determinar la absorbancia de cada pocillo.

Pocillos oscuros indican que la muestra no es activa (las células están vivas y metabolizando el indicador), mientras que pocillos claros indican que la muestra es bioactiva (las células están muertas y no metabolizaron el indicador).

Para poder observar el efecto que sobre las líneas celulares tuvieron las muestras a probar; se hace la transformación del efecto con respecto a los blancos o controles negativos mediante la fórmula:

Ecuación 2. %Mortalidad, análisis citotóxico.

$$\%Mortalidad = 100 - \left(\frac{(Abs\ mtra - Abs\ Bco\ medio)}{Abs\ Bco\ celular} \right) * 100$$

5.16 Análisis Probit.

El análisis Probit es un tipo particular de regresión lineal, el cual se construye para conocer la correlación entre una variable independiente (en nuestro caso de interés, la concentración o dosis), y una variable dependiente (la respuesta o mortalidad) de un conjunto de organismos de prueba, a través de un periodo de exposición que puede ser clasificado de acuerdo al tiempo como agudo, con periodos de tiempo cortos hasta de 72 horas o hasta 14 días para el caso de emplear un modelo humano, subcrónico o crónico el cual, extiende el tiempo de contacto hasta más de un año en el caso de modelos humanos, de acuerdo con la Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) es una agencia del Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Sociales (HHS).

Este análisis estadístico, nos permite cuantificar la relación que existe entre un estímulo y la proporción de casos que representan sus respuestas o efectos sobre un organismo o modelo de prueba.

El principal objetivo de esta prueba es la de evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos o modelos de prueba. El nivel de estímulo que causa esta respuesta o efecto sobre el 50 % de la población de individuos o modelos de prueba, es un parámetro muy importante en la caracterización del efecto que tiene un estímulo y es denotado como DL_{50} o CE_{50} (Dosis Letal media o Concentración Efectiva media) la cual deriva para el caso que nos atañe a una dosis de inhibición de crecimiento microbiano o celular, por lo que se le conoce también como IC_{50} (Medium Inhibitory Concentration).

Suponiendo un experimento en donde tenemos los siguientes valores de respuestas a diferentes estímulos en determinado número de organismos o modelos como se muestra en la siguiente tabla, y utilizando el software estadístico Minitab® en su versión 17.1.0 se corrió el análisis Probit de dichos datos para estimar la CE_{50} .

En la Tabla II de datos experimentales hipotéticos, podemos observar una variable dependiente (Respuesta o Mortalidad), una variable independiente o factor de estímulo (Dosis) y el tamaño de muestra (Número de Organismos expuestos).

Tabla II Datos ejemplo Probit

Dosis (mg)	Org. expuestos	Respuesta o Mortalidad
1.6907	59	6
1.7242	60	13
1.7552	62	18
1.7842	56	28
1.8113	63	52
1.8369	59	53
1.8610	62	61
1.8839	60	60

El resumen del análisis estadístico efectuado por el paquete estadístico, arroja una salida de datos que muestra el modelo estimado así como las pruebas de significancia para coeficientes del modelo.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
Respuesta o Mortalidad	Evento	291
	Sin evento	190
Org. expuestos	Total	481

Método de cálculo: Máxima verosimilitud (Modelo estimado de regresión)**Tabla de regresión**

Variable	Error	Coef	estándar	Z	P
Constante		-34.9353	2.63950	-13.24	0.000
Dosis		19.7279	1.48406	13.29	0.000
Natural					
Respuesta	0				
Log-verosimilitud = -185.679					

Pruebas de bondad del ajuste

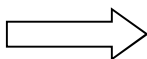
Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	9.5134	6	0.147
Desviación	10.1198	6	0.120
Distribución de tolerancia			

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error	IC normal de 95.0%	Inferior	Superior
Estimación		estándar		
Media	1.77085	0.0037778	1.76345	1.77826
Desv.Est.	0.0506895	0.0038132	0.0437407	0.0587423

Tabla de percentiles

		IC fiducial de		
		Error	95.0%	
Porcentaje	Percentil	estándar	Inferior	Superior
1	1.65293	0.0101162	1.62992	1.67039
2	1.66675	0.0091584	1.64596	1.68260
3	1.67552	0.0085607	1.65613	1.69036
4	1.68211	0.0081173	1.66376	1.69621
5	1.68748	0.0077614	1.66996	1.70098
6	1.69204	0.0074623	1.67522	1.70504
7	1.69605	0.0072032	1.67984	1.70862
8	1.69963	0.0069742	1.68396	1.71182
9	1.70289	0.0067685	1.68771	1.71474
10	1.70589	0.0065815	1.69115	1.71743
20	1.72819	0.0052879	1.71655	1.73762
30	1.74427	0.0045148	1.73455	1.75250
40	1.75801	0.0040281	1.74957	1.76556
50	1.77085	0.0037778	1.76321	1.77818
60	1.78369	0.0037662	1.77636	1.79129
70	1.79743	0.0040196	1.78989	1.80585
80	1.81351	0.0046021	1.80515	1.82346
90	1.83581	0.0057435	1.82565	1.84856
91	1.83881	0.0059167	1.82837	1.85197
92	1.84207	0.0061087	1.83131	1.85569
93	1.84566	0.0063240	1.83454	1.85979
94	1.84966	0.0065693	1.83814	1.86437
95	1.85423	0.0068544	1.84224	1.86961
96	1.85959	0.0071960	1.84703	1.87578
97	1.86619	0.0076241	1.85292	1.88339
98	1.87496	0.0082052	1.86071	1.89352
99	1.88877	0.0091427	1.87295	1.90952



Para este caso en particular, bajo las respuestas cuantificadas de los modelos en el experimento, la DL_{50} corresponde a un percentil o concentración de 1.77085 mg, y nos despliega los gráficos de supervivencia, fallas acumuladas y de probabilidad.

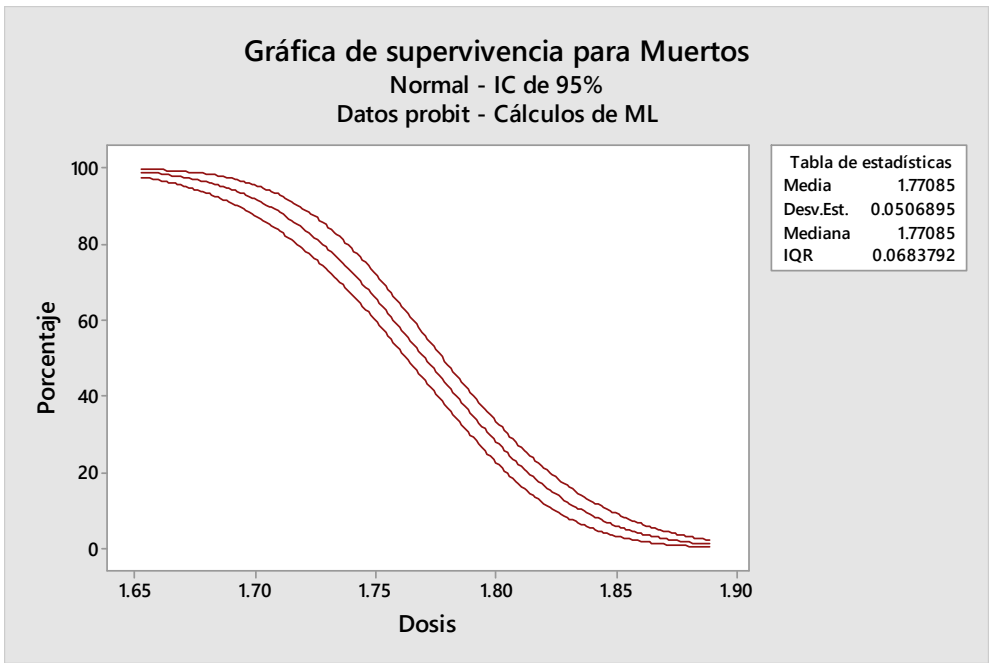


Figura 16. Gráfico de supervivencia, análisis Probit.

En este gráfico, se muestra el comportamiento estimado para la relación de nuestro estímulo cuantitativo o variable independiente a medida que esta crece contra la variable de respuesta

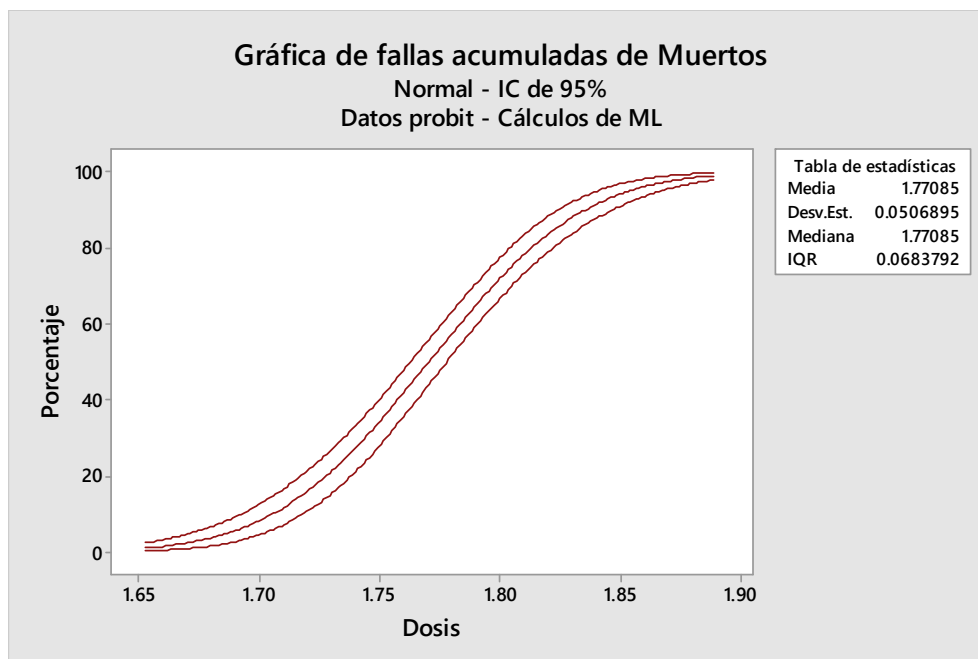


Figura 17. Gráfico de fallas acumuladas, análisis Probit.

Gráfica de fallas acumuladas, que presenta la probabilidad estimada de un resultado $P(x)$ versus cualquier variable predictora sola, contra las otras variables constantes, a través de este gráfico se puede obtener el valor de la CE_{50} , mediante la interpolación gráfica.

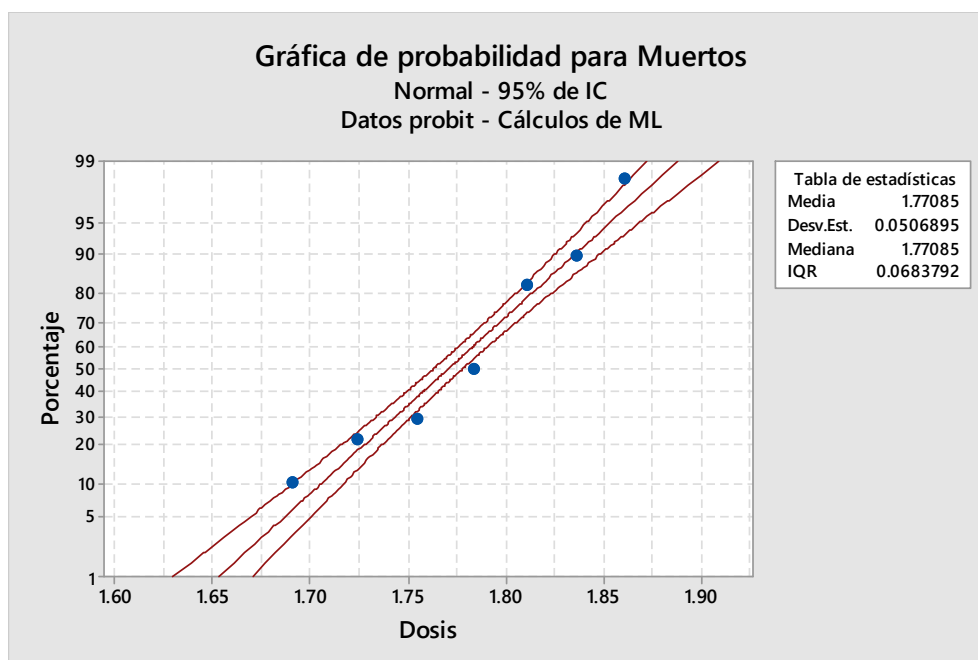


Figura 18. Gráfico de probabilidad, análisis Probit.

El gráfico de probabilidad para nuestra variable dependiente, es similar al gráfico de fallas acumuladas, solo que el eje vertical está escalado de manera que el modelo será una línea recta.

5.17 Separación y purificación de compuestos bioactivos.

La separación de las mezclas complejas de metabolitos secundarios se llevó a cabo en primera instancia, mediante cromatografía en columna, utilizando gel de sílice fase normal con 60 Å, 70-230 mesh, empacando columnas de vidrio de aproximadamente 30 cm de longitud, con un volumen de 10 g de sílice, y colocando en la parte superior un aproximado de 0.5 g sílice que contendrá adsorbida la muestra. De igual forma, se utilizarán cromatoplasmas TLC Sílica gel 60F₂₅₄ para separación cromatográfica en capa delgada.

En caso de ser necesaria la separación de las fracciones o de los crudos en fase reversa, se utilizó gel de sílice C-18, de alta pureza a 60 Å, 70-230 mesh, en columnas de vidrio empacadas de 15 cm, con un volumen de 5 g de sílice, o cromatoplasmas TLC de gel de sílice 60 RP-18 F₂₅₄.

5.18 Elucidación estructural.

Cada extracto crudo y cada fracción obtenida de las purificaciones cromatográficas, fueron monitoreados para observar y discriminar aquellos que presentaron bioactividad (antimicrobiana y/o citotóxica), a fin de poder obtener mezclas o en su caso compuestos puros, de los cuales mediante técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN ¹H) o de Carbono-13 (RMN ¹³C) se determinó la estructura molecular del o los compuestos a través de la adquisición de los datos y correlaciones espectroscópicas en los experimentos bidimensionales homonucleares (¹H-¹H COSY, NOESY), y correlaciones bidimensionales heteronucleares (HMBC, HSQC).

La elucidación estructural se llevó a cabo utilizando los equipos Varian VNMRs 700 MHz (16.45 T) del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, a cargo de la Dra. Blanca E. Domínguez Mendoza, y un Espectrómetro Bruker Advance III 400MHz, del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana a cargo del Dr. Valentín Miranda Soto.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se llevó a cabo el aislamiento de actinobacterias provenientes de las 27 muestras de sedimento marino, pudiendo aislar y purificar un total de 48 cepas, las cuales fueron identificadas filogenéticamente. Posteriormente se llevó a cabo un cultivo masivo, con la finalidad de obtener aproximadamente 300 mL de cada uno de ellos, para obtener suficiente producción de metabolitos los cuales fueron extraídos a través de tres fases orgánicas (metanol, acetona y de acetato de etilo), con rendimientos de entre 20 a 200 mg en cada fracción orgánica.

Las 48 cepas aisladas, provinieron de los sedimentos 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 26 (Tabla III).

Tabla III Relación de las cepas aisladas y sus sitios de localización.

Estación	Latitud (Norte)	Longitud (Oeste)	Profundidad (m)	Cepas aisladas
E1	25.806369°	111.169548°	superficial	
E2	25.825271°	111.182991°	261	
E3	25.826609°	111.186125°	215	LC3-1 (6)
E4	25.828194°	111.186931°	286	LC4-1 (1), LC4-2 (13), LC4-3 (14), LC4-4 (16), LC4-5 (21), LC4-6 (25) , LC4-7 (26)
E5	25.827734°	111.188146°	200	LC5-1 (2), LC5-2 (23), LC5-3 (44)
E6	25.841823°	111.184035°	226	LC6-1 (48)
E7	25.800042°	111.186919°	118	
E8	25.789948°	111.180033°	50	LC8-1 (40)
E9	25.765552°	111.21916°	238	LC9-1 (27)
E10	25.763830°	111.25029°	63	LD10-1 (17), LD10-2 (18), LD10-3 (19), LD10-4 (28), LD10-5 (29)
E11	25.7842°	111.1842°	47	LD11-1 (24)
E12	25.7933°	111.2802°	56	LD12-1 (3), LD12-2 (4), LD12-3 (9), LD12-4 (30), LD12-5 (31), LD12-6 (32), LD12-7 (33), LD12-8 (34) , LD12-9 (42)
E13	25.7778°	111.2802°	44	
E14	25.7726°	111.2613°	43	
E15	25.7636°	111.2522°	53	
E16	25.7740°	111.2280°	226	
E17	25.7892°	111.2240°	304	
E18	25.7959°	111.2283°	307	LD18-1 (35)
E19	25.8070°	111.2349°	306	LD19-1 (10), LD19-2 (11), LD19-3 (12), LD19-4 (22), LD19-5 (36)
E20	25.8229°	111.2405°	302	LC20-1(46), LC20-2 (47)
E21	25.8587°	111.2409°	270	LC21-1 (5), LC21-2 (49), LC21-3 (50)
E22	25.8766°	111.2305°	93	LC22-1 (20), LC22-2 (41)
E23	25.8853°	111.2508°	303	LC23-1 (37), LC23-2 (38)
E24	25.8883°	111.2519°	309	LC24-1 (8), LC24-2 (43)
E25	25.8916°	111.2530°	>300	
E26	25.8914°	111.2509°	275	LC26-1 (7), LC26-2 (45)
E27	25.8879°	111.2514°	315	
E28	25.8844°	111.2513°	308	

Con esta distribución se observó que del sedimento número 12 fueron aisladas la mayor variedad de cepas (9 cepas). De los sedimentos que no figuran en esta lista, únicamente se pudieron cultivar cepas de bacterias de crecimiento rápido, de apariencia cremosa, viscosa y translúcida, de coloración ligeramente amarillentas, que no corresponden a las características de las actinobacterias con las que se pretendía trabajar.

Las 48 cepas aisladas, se cultivaron en medio líquido, hasta alcanzar un volumen aproximado de 300 mL, para obtener las 3 fracciones orgánicas (metanol, acetona y acetato de etilo) para efectuar bioensayos de actividad antimicrobiana presuntiva sobre *Staphylococcus aureus*, y elegir 3 cepas con las cuales continuar trabajando y que se presentan en la Tabla IV:

Tabla IV Cepas bacterianas elegidas por bioactividad.

Clave de la cepa	Identificación	Bioactividad frente a:
CP25	<i>Streptomyces gancidicus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CP27	<i>Micromonospora sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CP34	<i>Streptomyces sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Con base a este parámetro, se seleccionaron estas tres cepas descritas morfológicamente en la Tabla V, y mediante figuras de las células, su cultivo líquido y micrografías de la tinción Gram de estas cepas representadas en las figuras 18, 19 y 20 para la cepa CP25 identificada como *Streptomyces gancidicus*, Figuras 21, 22 y 23 para CP27 identificada como *Micromonospora sp* y Figuras 24, 25 y 26 para CP34 identificada como *Streptomyces sp*. Se inició el cultivo masivo de las mismas en medio A1 haciendo un escalamiento de cultivo a un volumen aproximado de 15 L y posterior extracción mediante metanol, acetona y acetato de etilo, seguidos del fraccionamiento por cromatografía en columna (fase normal o reversa dependiendo el caso) o por métodos instrumentales como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography).

Tabla V Descripción morfológica de las cepas.

	Cepa #25	Cepa # 27	Cepa #34
Identificación filogenética	<i>Streptomyces gancidicus</i>	<i>Micromonospora sp</i>	<i>Streptomyces sp</i>
Tinción de Gram	Positivo	Negativo	Positivo
Forma	Puntiforme circular	Puntiforme circular	Puntiforme circular
Borde	Entero	Ondulado	Entero
Elevación	Convexa acuminada	Acuminada	Convexa
Superficie	Lisa	Rugosa	Lisa
Brillo	Mate	Mate	Mate
Comportamiento con la luz	Translúcida	Opaca	Opaca
Textura	Seca membranosa	Membranosa	Seca membranosa
Color	Paja	Naranja	Paja grisáceo
Micelio	Aéreo al madurar	No presenta	Aéreo al madurar
Color del micelio	Gris	No presenta	Blanco
Tiempo de cultivo	5 a 7 días	14 a 28 días	5 a 7 días
Turbidez en cultivo líquido	Presenta turbidez color ligeramente grisácea después del 4 día cuando alcanza máxima densidad celular	Presenta turbidez color naranja después del día 8 a 12 al alcanzar máxima densidad celular	Presenta turbidez color ligeramente grisácea después del 4 día cuando alcanza máxima densidad celular
Forma en cultivo líquido	Esferas bien definidas de 2 a 3mm de diámetro	Esferas bien definidas de 1 a 2mm de diámetro	Esferas bien definidas de 1 a 2mm de diámetro



Figura 19. Vista del cultivo en medio semisólido de CP25 *Streptomyces gancidicus*.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC



Figura 20. Vista del cultivo en medio líquido y líquido de CP25 *Streptomyces gancidicus*.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

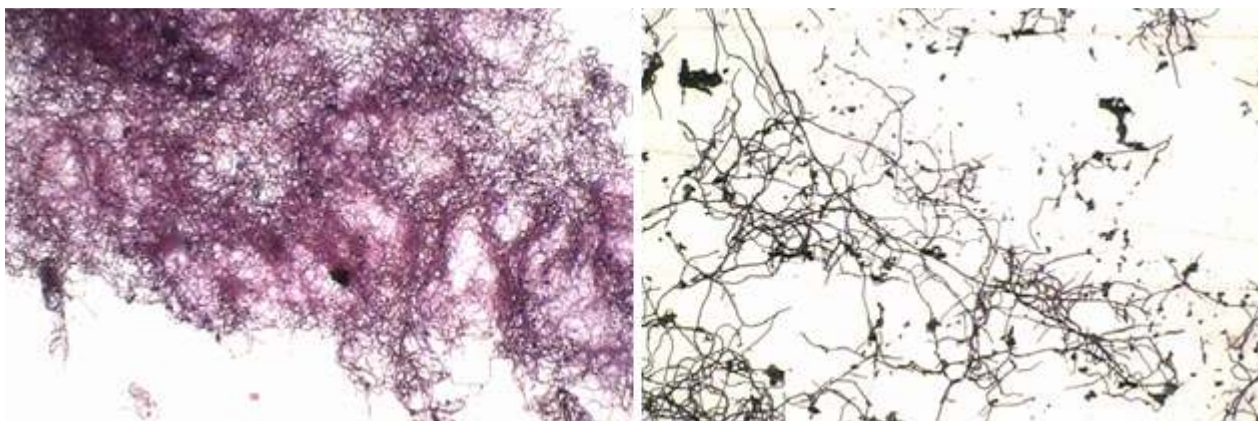


Figura 21. Micrografía de la tinción de Gram, CP25 *Streptomyces gancidicus*.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC



Figura 22 Vista del cultivo en medio semisólido de CP27 *Micromonospora* sp.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC



Figura 23. Vista del cultivo en medio líquido y líquido de CP27 *Micromonospora* sp.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC



Figura 24. Micrografía de la tinción de Gram CP27 *Micromonospora* sp.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

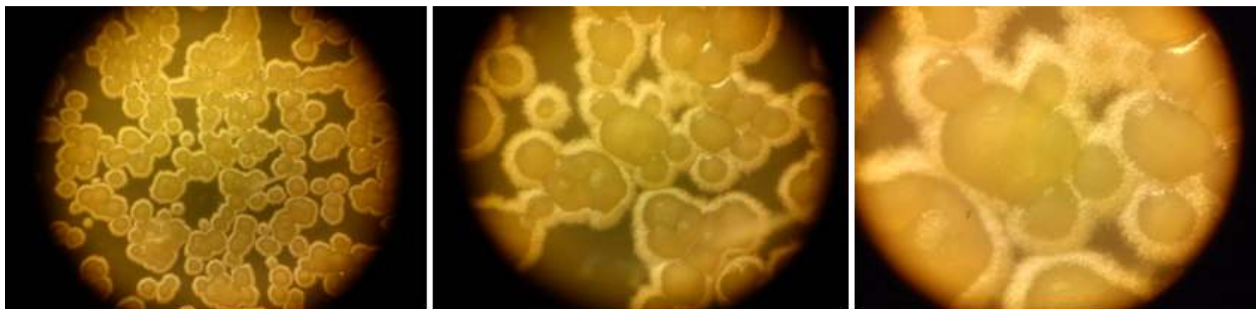


Figura 25. Vista del cultivo en medio semisólido de CP34 *Streptomyces* sp.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC



Figura 26. Vista del cultivo en medio líquido de CP34 *Streptomyces* sp.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

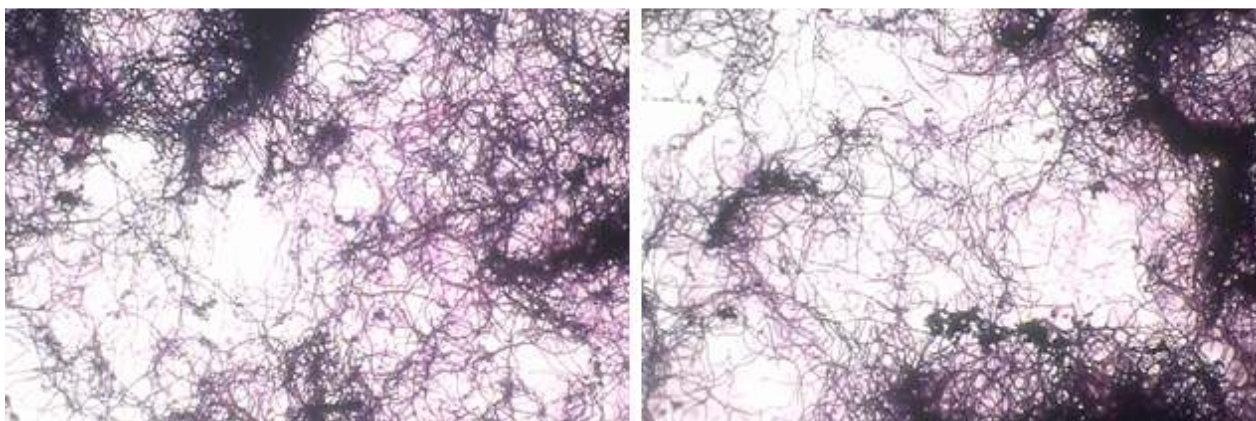


Figura 27. Micrografía de la tinción de Gram de CP34 *Streptomyces* sp.
Fotos tomadas en el Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC

6.1 Pruebas presuntivas.

Una vez obtenidos los tres extractos orgánicos de cada una de las tres cepas aisladas e identificadas, se probaron de manera paralela para observar su posible bioactividad antimicrobiana contra 3 cepas microbianas multirresistentes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Escherichia coli*). Se encontró que los extractos de acetato de etilo, tuvieron mejor bioactividad antimicrobiana que los demás, por lo cual se decidió proseguir trabajando en la separación y purificación de forma biodirigida (Tabla VI).

De igual forma, se probaron todos los extractos en bioensayos citotóxicos para observar su bioactividad inhibitoria en el crecimiento de 4 líneas celulares cancerosas (HCT116 cáncer colorrectal, CRL-5872 cáncer de pulmón, HeLa cáncer cervicouterino y MDA-MB-231 cáncer de mama). Se observó que de las 9 muestras a probar, los extractos acetónicos tuvieron una mayor actividad contra estas líneas celulares (Tabla VI), por lo cual se tomó la decisión de seguir trabajando en su separación y purificación hasta lograr obtener algún compuesto puro con bioactividad, y poder efectuar así, la identificación química del mismo mediante técnicas espectroscópicas.

Tabla VI Bioactividad antimicrobiana y citotóxica presuntivas de los 9 extractos crudos.

	Bioensayos presuntivos de actividad													
	Antimicrobianos									Citotóxicos				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			HCT-116	HeLa	CRL-5872	MDA_MB-231	
Extracto	24 horas	48horas	72 horas	24 horas	48horas	72 horas	24 horas	48horas	72 horas					
CP25AE	33.1	S/A	S/A	S/A	S/A	46.2	50.6	38.9	26.5	37.2	Baja	Media	Alta	Media
CP25A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	Alta	Alta	Alta	Media
CP25M	34.4	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	49.0	47.9	33.2	Media	S/A	S/A	Baja
CP27AE	34.8	S/A	S/A	S/A	27.7	25.7	S/A	41.7	41.0	S/A	Media	Baja	Baja	S/A
CP27A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	29.4	S/A	27.9	30.4	S/A	Alta	Baja	Alta	Media
CP27M	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	Baja	S/A	S/A	S/A
CP34AE	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	Alta	Alta	Alta	Media
CP34A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	Baja	Media	Alta	Media
CP34M	33.8	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	50.8	51.0	39.8	Media	S/A	S/A	S/A
S/A Sin Actividad														
Los resultados de bioensayos antimicrobianos son expresados como %Inhibición.														

6.2 Fracciones Antimicrobianas.

Como se mencionó en el apartado anterior, se llevó a cabo la separación biodirigida de las subfracciones de acetato de etilo, encontrando que las subfracciones de la cepa 25 (*Streptomyces gancidicus*), tuvieron mayor efecto inhibitorio contra las bacterias probadas. En el diagrama de bloques de la Figura 28, se representa el proceso de separación y obtención de las fracciones bioactivas.

Inicialmente, se partió de la fracción cruda del extracto en acetato de etilo, la cual fue separada por medio de HPLC Flash Isolera - Biotage del Instituto Tecnológico de Tijuana a cargo del Dr. Gerardo Aguirre del Centro de Graduados e Investigación en Química, empleando un cartucho SnapUltra10 g fase normal, empleando como sistema de elución un gradiente de 100 % Éter de petróleo a 100 % de Acetato de Etilo, por 5 minutos, y 100 % de Acetato de etilo por 10 min y un lavado del sistema y columna con 100 % Metanol, obteniendo un total de 21 fracciones, las cuales fueron concentradas por rotoevaporación con presión reducida, manteniendo una temperatura no mayor a 40°C. Las fracciones concentradas así obtenidas posteriormente de monitoreo la bioactividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas, para identificar la o las fracciones que mostraran mejor actividad y proceder a la separación y purificación de las mismas.

Una vez efectuados los bioensayos, se identificaron 2 fracciones que resultaron de interés, las fracciones denominadas como 25AE1 y la 25AE21, mismas que se separaron a través de cromatografía en capa fina, utilizando TLC fase normal (características de las placas). La fracción 25AE1, fue eluida con un sistema 5:5 Hexano / Acetato de etilo, pudiendo observar y separar 6 manchas mayoritarias bien definidas por medio de exposición de las placas con radiación UV (longitud de onda corta y larga), pudiendo identificarlas como 25AE1A (Rf: 0.96), 25AE1B (Rf: 0.82), 25AE1C (Rf: 0.62), 25AE1D (Rf: 0.50), 25AE1E (Rf: 0.18) y 25AE1F (Rf: 0.06). Por otra parte, la fracción 21AE21 fue separada y eluida con un sistema 8:2 Acetato de etilo / Hexano, observando de igual forma la presencia de 6 bandas mayoritarias bien definidas por medio de radiación UV, las cuales se identificaron como 25AE21A (Rf: 0.94), 25AE21B (Rf: 0.79), 25AE21C (Rf: 0.65), 25AE21D (Rf: 0.46), 25AE21E (Rf: 0.26) y 25AE21F (Rf: 0.17).

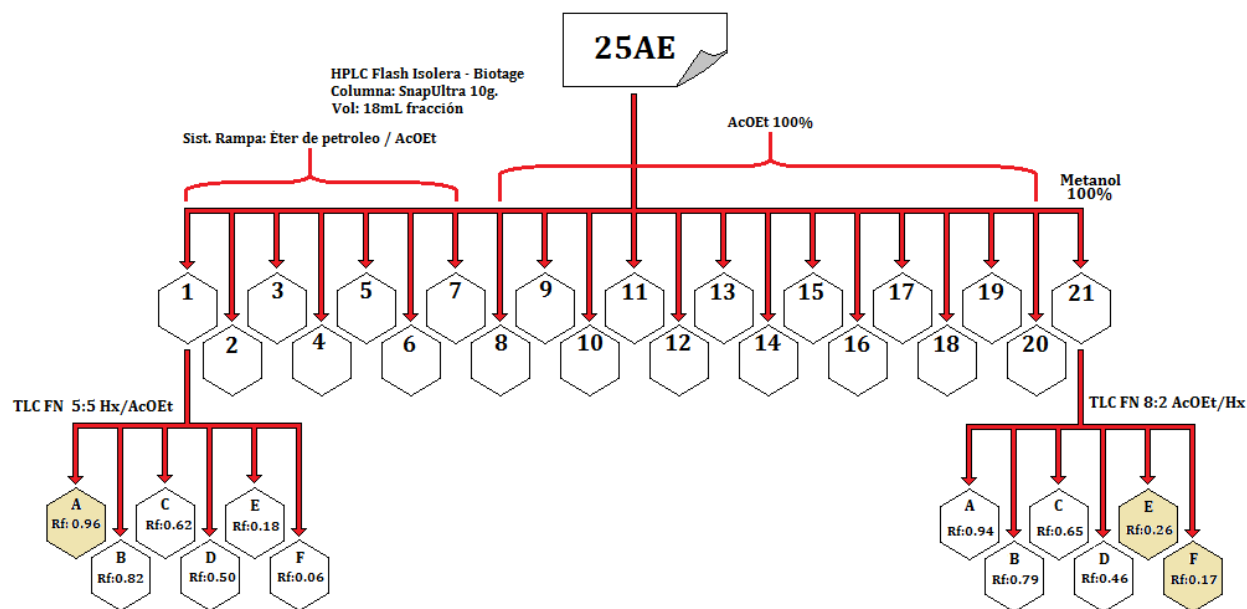


Figura 28. Diagrama de bloques de la separación y purificación de las fracciones antimicrobianas.
Hx: Hexano; AcOEt: Acetato de etilo; Rf: Relación Frontal; TLC: Cromatografía en capa fina; FN: Fase Normal.

De estas subfracciones aisladas, se probó su bioactividad contra las cepas patógenas, utilizando el protocolo del bioensayo antimicrobiano descrito en el apartado de Metodología, y se obtuvieron los resultados de inhibición a 24, 48 y 72 horas de exposición, las cuales se muestran en la tabla VII.

Tabla VII Resultados de análisis antimicrobianos.

	% Inhibición		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Muestra	24 horas	48 horas	72 horas
25AE1A	13.06	31.26	79.11
25AE21E	16.07	62.26	85.21
25AE21F	11.43	16.85	50.96
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	24 horas	48 horas	72 horas
25AE1A	22.51	19.60	41.78
25AE21E	40.94	38.89	71.29
25AE21F	25.94	22.26	53.82
	<i>Escherichia coli</i>		
	24 horas	48 horas	72 horas
25AE1A	-4.19	22.36	66.97
25AE21E	35.83	75.55	88.70
25AE21F	8.10	40.77	83.49

De las subfracciones así obtenidas que fueron probadas, se pudo observar que las subfracciones 21AE1A, 21AE21E y 21AE21F fueron las que mostraron mejores bioactividades antimicrobianas. En el caso del organismo de prueba *Pseudomonas aeruginosa*, la subfracción 25AE21E fue la que mostró mejor bioactividad, alcanzando un 62.26 % de inhibición a las 48

horas de exposición, mientras que las otras dos subfracciones no sobrepasan del 32%. El efecto alcanzado a las 72 horas, muestra que para la subfracción 25AE21E, se alcanza un porcentaje de inhibición del 85.21 % mientras que el de las otras subfracciones se encuentra entre el 50.96 % para 21AE21F y 79.11 % 21AE1A.

En el caso del organismo de prueba *Staphylococcus aureus*, se observa que de nuevo la subfracción 25AE21E es la que presenta mayor bioactividad desde las 24 horas de exposición, alcanzando un porcentaje de inhibición de 40.94 %, mientras que las otras subfracciones presentaron bioactividad de entre el 22.51 % y 25.94 %, se observó que a las 40 horas de exposición, la bioactividad bajó ligeramente en las tres subfracciones activas, mostrando una bioactividad máxima de 38.89 % para 25AE21E. Al cabo de las 72 horas, se presenta el máximo porcentaje de inhibición de las 3 subfracciones bioactivas, de las cuales, la que presenta la mayor inhibición es nuevamente 25AE21E con 71.29 %, mientras que las dos subfracciones restantes se manejan con un porcentaje de inhibición de entre el 41.78 y el 53.82 %.

Durante los bioensayos con el organismo *Escherichia coli*, la subfracción 25AE21E, nuevamente presenta la mayor bioactividad desde las 24 horas de exposición, alcanzando un 35.83 %, mientras que las dos subfracciones probadas solo reflejan bioactividades por debajo del 8.10 %. A las 40 horas, dichas actividades alcanzan un máximo de 75.55 % de inhibición por parte de la subfracción 25AE21E, mientras que en el caso de las subfracciones 25AE21F y 25AE1A presentan un 40.77 y 22.36 % respectivamente.

Se pudo observar que para estos tres organismos de prueba, el *Staphylococcus aureus*, fue el que tuvo la menor sensibilidad ante estas tres subfracciones a las 48 y 72 horas de exposición. Mientras que *Escherichia coli*, fue la que mayor sensibilidad presentó para estas subfracciones probadas.

6.3 Fracciones Citotóxicas.

De igual forma como se hizo con el extracto de la fracción de acetato de etilo para los ensayos antimicrobianos, se llevó a cabo el análisis citotóxico prospectivo partiendo de los 9 extractos crudos de las cepas de CP25 *Streptomyces gancidicus*, CP27 *Micromonospora sp* y CP34 *Streptomyces sp*, para posteriormente descartar aquellas que mostraran actividad citotóxica baja o nula, y continuar con la separación cromatográfica de las mismas de forma biodirigida.

Se encontró que la fracción orgánica de acetona de la cepa 25, tuvo la mejor bioactividad citotóxica contra las 4 líneas celulares, por lo cual se tomó la decisión de seguir con la separación de la misma por métodos cromatográficos, empleando una columna empacada con gel de sílice fase reversa C-18, iniciando con un sistema 100 % H₂O destilada con un volumen de 200 mL, para posteriormente iniciar con un sistema de mezclas de H₂O : Metanol en forma progresiva sufriendo decrementos de polaridad en un 5 % para cada sistema, hasta llegar al sistema 100 % Metanol, en total fueron 21 sistemas de elución para la separación de este extracto en fase reversa (Fig 29). Posteriormente las fracciones colectadas fueron concentradas a sequedad mediante rotoevaporación a presión reducida a una temperatura no mayor de 40°C.

Las fracciones así obtenidas fueron monitoreadas mediante bioensayo presuntivo citotóxico con la línea celular HCT-116, y se eligió la fracción 6, misma que se purificó mediante cromatografía en capa fina fase reversa empleando cromatoplasas TLC Gel de Sílice 60 RP-18 F₂₅₄, con la cual se obtuvieron 3 subfracciones denominadas 25A6-1 (Rf: 0.59), 25A6-2 (Rf: 0.48) y 25A6-3 (Rf: 0.32) en un sistema de elución 7:3 Metanol / H₂O destilada y empleando radiación UV de onda larga y corta para revelar los productos. Se monitorearon nuevamente mediante TLC para verificar la pureza de las subfracciones, encontrando que la subfracción presentaba una impureza, la cual fue separada nuevamente por TLC fase reversa empleando con nuevamente un sistema de elución 7:3 Metanol / H₂O destilada y usando radiación UV como revelador, pudiendo separar dos productos que fueron identificados como 25A6-2-1 (Rf: 0.46) y 25A6-2-2 (Rf: 0.39). Se probaron nuevamente las subfracciones así obtenidas y se identificaron las subfracciones bioactivas como 25A6-2-1 y 25A6-3. Posteriormente estas subfracciones se utilizaron para los análisis de resonancia magnética nuclear con el propósito de la elucidación estructural de los compuestos bioactivos y posteriormente para la determinación de la CE₅₀.

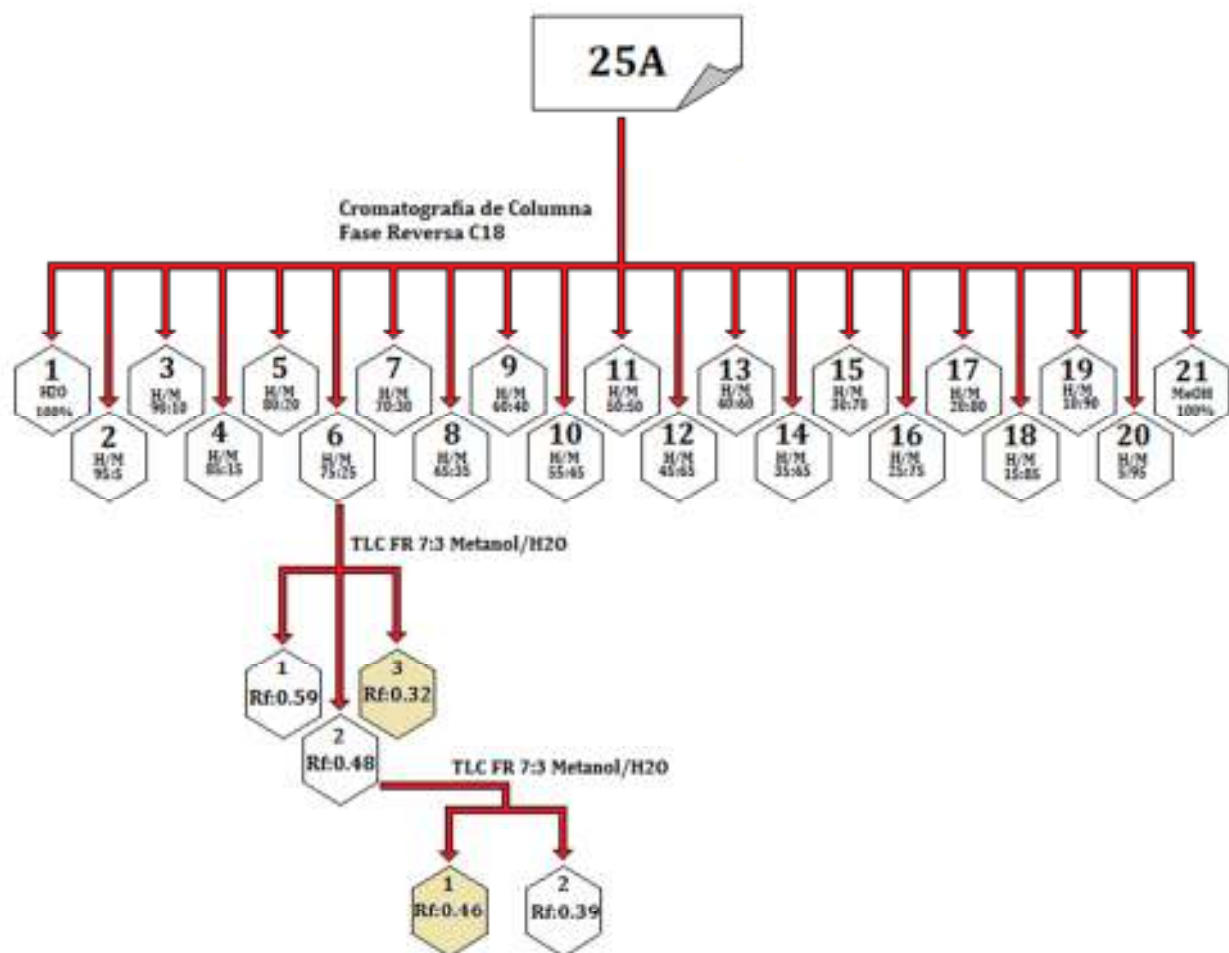


Figura 29. Diagrama de bloques de la separación y purificación de las fracciones citotóxicas.
H: Agua; M: metanol; MeOH: metanol; Rf: Relación Frontal; TLC: Cromatografía en capa fina; FR: Fase Reversa.

6.4 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear.

De forma presuntiva se efectuó la adquisición de los espectros de resonancia de protón de las muestras 25AE1A, 25AE21E, 25AE21F, 25A6-2-1 y 25A6-3, utilizando los espectrómetros marca Bruker de 400 MHz y Varian de 700 MHz, de los laboratorios de resonancia magnética nuclear del Centro de Graduados e Investigación en Química, del Instituto Tecnológico de Tijuana, y del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos respectivamente, para hacer un análisis prospectivo de las muestras.

De los resultados obtenidos de dichas muestras analizadas, se pudo observar que las muestras 25AE1A, 25AE21E, 25AE21F y 25A6-2-1, se trataba aún de mezclas complejas de diferentes compuestos químicos, por lo cual, se intentó separarlos y purificarlos por TLC fase reversa, pero debido a la cantidad de producto con el que se contaba, no fue posible proseguir con dichos análisis.



Figura 30. Espectrómetro Varian 700 MHz (16.45T).
Foto tomada en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del CIQ-UAEM



Figura 31. Espectrómetro Bruker 400MHz.
Foto tomada en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del CGeIQ-ITT

Solo la muestra 25A6-3, pudo ser utilizada para la adquisición de los espectros de resonancia ^1H y ^{13}C , con sus interacciones bidimensionales homo y heteronucleares, de las cuales fue posible obtener la tabla VIII, en la que se muestran los desplazamientos químicos de los experimentos de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

Tabla VIII Desplazamientos químicos por RMN de la muestra 25A6-3

#	^1H δ ppm	Tipo	J	Cosy ^1H - ^1H δ ppm	HSQC ^1H - ^{13}C δ ppm	HMBC ^1H - ^{13}C δ ppm	NOESY ^1H - ^1H δ ppm	^{13}C δ ppm
1	0.90	t	7.45	1.55, 1.68	11.9	28.1, 41.0	1.55, 1.68, 2.48	11.9
2	0.96	d	6.68		22.5	22.5, 28.5, 43.4	2.03, 2.33	12.8
3	1.04	t	7.44	2.40	12.8	17.3, 105.2	2.40	17.3
4	1.21	d	6.94	2.48	18.2	28.5, 41.0, 168.7	1.55, 1.68, 2.48	18.2
5	1.55	tt	7.42; 13.86	1.68	28.1	11.9, 18.2, 41.0, 168.6	1.68, 2.48	22.5
6	1.68	m		1.55	28.1	11.9, 18.2, 41.0, 168.6	2.48	28.1
7	2.33	d	7.22	5.98	43.4	22.5, 28.5, 102.2, 164.6		28.5
8	2.40	q	7.44	1.04	17.3	12.8, 105.2, 168.6		41.0
9	2.48	dd	6.99; 14.00	1.55, 1.68	41.0	17.3, 28.1		43.4
10	2.66	s						100.4
11	5.98	s		2.33	100.4	41.0, 105.2, 168.6	0.96, 1.21, 1.55, 1.68, 2.33, 2.48	102.2
12								105.2
13								164.6
14								168.7

En el espectro de ^1H (700MHz, metanol- d_4), se identificaron las siguientes 11 señales: un triplete con δ 0.90 ppm, el cual integra para tres protones y posee una constante de acoplamiento (J) de 7.45 Hz; un doblete con δ 0.96 ppm que integra para tres protones que tiene una $J = 6.68$ Hz; un triplete con δ 1.04 ppm que integra para tres protones y posee una $J = 7.44$ Hz y un doblete con δ 1.21 ppm que integra para tres protones, todos ellos característicos de metilos. Dos señales múltiples, un triple de tripe en δ 1.55 ppm con $J = 7.72$ y 13.98 Hz y otra con δ 1.68 ppm con una, las cuales integran para un protón cada una de ellas; una señal doble en δ 2.33 ppm con $J = 7.22$ Hz que integra para dos protones; una señal múltiple en δ 2.40 ppm que integra para dos protones y posee una $J = 7.44$ Hz ambas señales de carbonos secundarios que se encuentran siendo desplazados a campos más bajos por la presencia en posición α o β de un grupo

electrodonador como puede ser un carbonilo; una señal doblete de dobletes en 2.48 ppm que integra para un protón que tiene un $J = 6.99$ y 14.00 Hz, característico de un carbono terciario de metino como carbono puente; un singulete en δ 2.66 ppm que integra para dos protones y por último un singulete en δ 5.98 ppm, el cual integra para un protón, el cual se encuentra desplazado hacia campo mucho más bajo que los demás, al encontrarse como carbono puente entre dos grupos electrodonadores más fuertes.

Con la adquisición del experimento 2D RMN ^1H - ^1H COSY, fue posible observar las correlaciones intramoleculares que guardan los protones con sus análogos vecinales. El protón δ 0.90 ppm presenta correlación con los protones vecinales δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm, mientras que el protón δ 1.04 ppm está relacionado a la señal del protón δ 2.40 ppm; el protón δ 1.21 ppm presenta una relación con el protón δ 2.48 ppm; el protón δ 1.55 ppm está relacionado con los protones δ 1.68 ppm y δ 2.48 ppm; el protón δ 1.68 ppm con δ 1.55 ppm y con δ 2.48 ppm; el protón δ 2.33 ppm con el δ 5.98 ppm; el protón δ 2.40 ppm con el δ 1.04 ppm; el protón δ 2.48 ppm con los protones δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm y por último el protón δ 5.98 ppm con el δ 2.33 ppm. El protón δ 2.66 ppm no presenta correlación con ningún otro de la molécula.

Por medio de la determinación simultánea con el espectro de ^{13}C , y de los espectros 2D ^1H - ^{13}C HSCQ y HMBC se determinó que la molécula tenía un total de 14 carbonos, determinando el tipo de carbono presente en cada señal. Se observan 4 carbonos primarios, los cuales corresponden a metilos, uno con δ 11.9 ppm muestra un acoplamiento con la señal de protón en δ 0.90 ppm; mientras que el carbono en δ 22.5 ppm corresponde con la señal de protón en δ 0.96 ppm, el carbono δ 12.8 ppm que correlaciona con los protones en δ 1.04 ppm y finalmente el carbono δ 18.2 ppm que observa acoplamiento con el protón en δ 1.21 ppm. De igual forma se observan 3 carbonos que corresponden a grupos metileno, uno de los cuales se muestran en δ 28.1 ppm y observa acoplamiento con las dos señales de δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm siendo estas señales de protones diasterotópicos, el carbono en δ 43.4 ppm correlaciona con la señal del protón con δ 2.33 ppm que se observa desplazado por efecto inductivo de un grupo electrodonador en posición cercana y por último, el carbono en δ 17.3 ppm que observa un acoplamiento con la señal de protón en δ 2.40 ppm. También se muestran dos señales de metinos, uno de los cuales en δ 41.0 ppm que presenta acoplamiento con el protón en δ 2.48 ppm; mientras que el segundo grupo metino, se encuentra siendo más desplazado a campos bajos hasta δ 100.4 ppm, el cual tiene acoplamiento con la señal en protón de δ 5.98 ppm, lo cual indica que este grupo metino que es un puente se encuentra afectado por dos grupos electrodonadores mucho mayores que los demás.

Adicionalmente se pudo identificar la presencia de dos grupos carbonilos en la región de campos bajos, con desplazamientos de δ 164.6 ppm, y 168.6 ppm, que pueden ser de amidas o ésteres. También, con estos experimentos se pudo identificar la presencia de 3 carbonos cuaternarios, uno de ellos en δ 28.5 ppm, mientras que los dos restantes se encuentran desplazados a campos bajos en δ 102.2 ppm y δ 105.2 ppm, característicos de grupos olefínicos.

De acuerdo con las correlaciones que se presentan en el espectro 2D de HMBC, se pueden observar interacciones entre protones y carbonos que se encuentran a 2, 3, 4 y hasta 5 enlaces de distancia, con los cuales se ha propuesto una estructura compuesto de una γ -lactama (amida cíclica de 5 miembros), la cual se encuentra substituida en posición 3 por un grupo etilo sobre un carbono α a carbonilo, el cual posee una insaturación α - β a carbonilo, en posición 4 unida a una β -lactona (éster cíclico de 4 miembros) y finalmente en posición 5, un grupo metilo y un sec-butilo.

En la figura 32, se esquematizan las correlaciones observadas entre protones y carbonos en dicho experimento. En donde los protones (δ 0.90 ppm) del metilo #14 en δ 11.9 ppm observa correspondencia con los carbonos #13 en δ 28.1 ppm y con el #12 en δ 41.0 ppm a 2 y 3 enlaces respectivamente, mientras que los protones (δ 0.96 ppm) del metilo #10 en δ 22.5 ppm se relacionan con los carbonos #4 en δ 28.5 ppm a 2 enlaces y con el metileno #6 en δ 43.4 ppm a 5 enlaces; los protones (δ 1.04 ppm) de metilo #9 en 12.8 ppm están correlacionados con el carbono del metileno #8 en δ 17.3 ppm a 2 enlaces y con el carbono #2 en δ 105.2 ppm a 3 enlaces; los protones (δ 1.21 ppm) del metilo #11 en δ 18.2 ppm observan interacciones con el carbono del metino #12 en δ 41.0 ppm a 2 enlaces, con el carbono #4 en δ 28.5 ppm a 3 enlaces y con el carbono del carbonilo #1 en δ 168.6 ppm a 5 enlaces.

Los protones diasterotópicos (δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm) del metileno #13 en δ 28.1 ppm correlacionan con el carbono del metilo #14 en δ 11.9 ppm y con el carbono del metino #12 en δ 41.0 ppm a 2 enlaces, con el carbono del metilo #11 en δ 18.2 ppm a 3 enlaces y con el carbono #1 del carbonilo de la amida en δ 168.6 ppm a 5 enlaces. Los protones (δ 2.33 ppm) del carbono #6 del metileno en δ 43.4 ppm están correlacionados con el carbono #5 del carbonilo en δ 164.6 ppm a 2 enlaces, con el carbono #3 en δ 102.2 ppm a 3 enlaces, con el carbono #4 en δ 28.5 ppm a 4 enlaces, finalmente el con el carbono del metilo #10 en δ 22.5 ppm a 5 enlaces. Los protones (δ 2.40 ppm) del metileno #8 en δ 17.2 ppm α al carbonilo de γ -lactama se correlacionan con el carbono #9 del metilo en δ 12.8 ppm, y con el carbono #2 en δ 105.2 ppm a 2 enlaces, mientras que con el carbono #1 del carbonilo en δ 168.6 ppm a 3 enlaces. El protón (δ 2.48 ppm) del metino #12 en δ 41.0 ppm presenta correlación con el carbono del metileno #13 en δ 28.1 ppm a 2 enlaces y con el carbono de metileno #8 en δ 17.2 ppm a 5 enlaces.

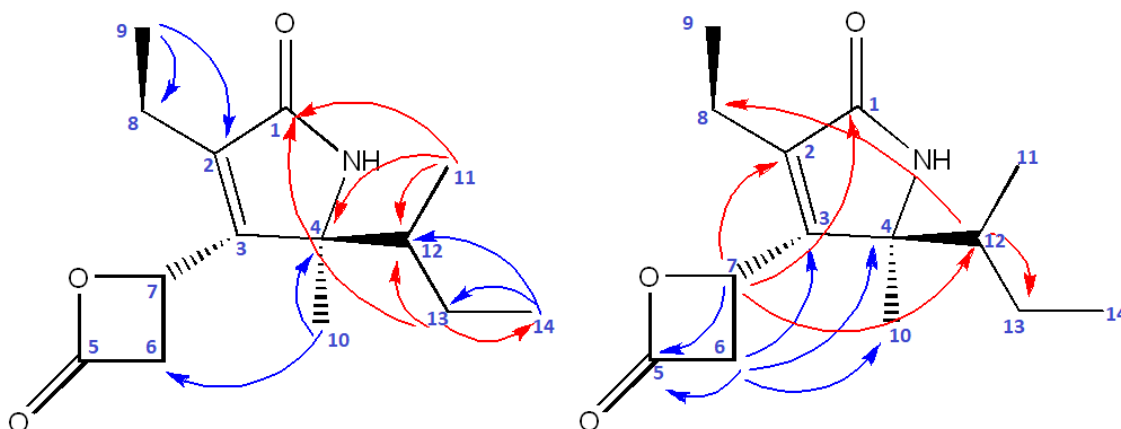


Figura 32. Interacciones ^1H - ^{13}C en experimento HMBC.

Finalmente en el experimento NOESY (Fig 33) del mismo compuesto, podemos observar las correlaciones intramoleculares de los protones, las cuales podemos apreciar en la figura, en donde se ven representadas las interacciones de los protones (δ 0.90 ppm) del metilo #14 en δ 11.9 ppm con los protones vecinales (δ 1.55 ppm, δ 1.68 ppm) sobre el carbono #13 del metileno en δ 28.1 ppm y con el protón (δ 2.48 ppm) que se encuentra sobre el carbono #12 del metino en δ 41.0

ppm; el protón (δ 0.96 ppm) del metilo #10 en δ 22.5 ppm con el protón (δ 2.33 ppm) sobre el carbono #6 en δ 43.4 ppm α a carbonilo de β -lactona; el protón (δ 1.04 ppm) sobre el carbono del metilo #9 en δ 12.8 ppm con el protón (δ 2.40 ppm) del carbono #8 en δ 17.2 ppm del metileno α a carbonilo de γ -lactama; los protones (δ 1.21 ppm) del metilo #11 en δ 18.2 ppm con el protón (δ 2.48 ppm) de metino #12 en δ 41.0 ppm y con los protones diasterotópicos (δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm) del metileno #13 en δ 28.1 ppm. Los protones diasterotópicos (δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm) sobre el metileno #13 en δ 28.1 ppm presentan relación con el protón (δ 2.48 ppm) del metino #12 en δ 41.0 ppm y por último el protón (δ 5.98 ppm) del metino #7 en δ 100.4 ppm con los protones (δ 2.33 ppm) del metileno #6 en δ 43.4 ppm, con los protones (δ 0.96 ppm) del metilo #10 en δ 22.5 ppm, con el protón (δ 2.48 ppm) del metino #12 en δ 41.0 ppm, con los protones (δ 1.21 ppm) del metilo #11 en δ 18.2 ppm y con los protones diasterotópicos (δ 1.55 ppm y δ 1.68 ppm) del metileno #13 en δ 28.1 ppm.

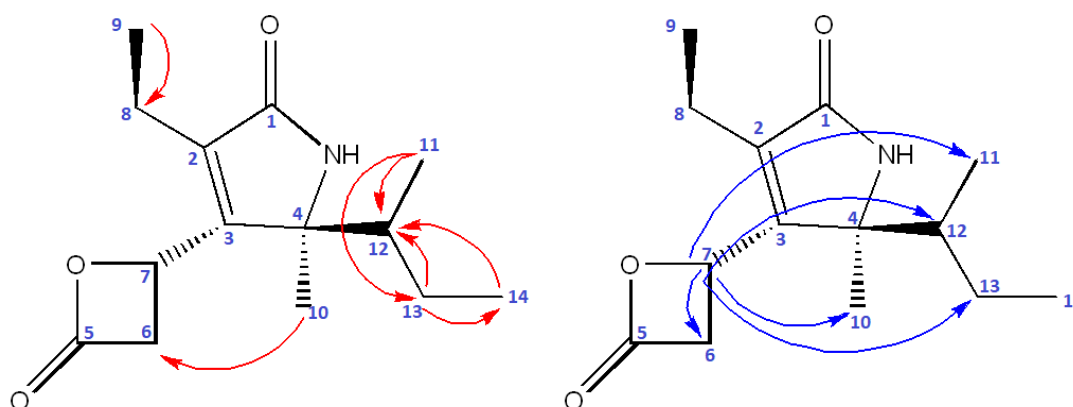


Figura 33. Interacciones ^1H - ^{13}C en experimento Noesy

Con base en los datos de desplazamientos químicos obtenidos de los espectros de ^1H , ^{13}C , 2D RMN ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC se propone para este compuesto, una estructura química, la cual consiste en una amida cíclica (lactama) de 5 miembros, la cual posee una insaturación α - β a carbonilo, sobre la posición 2 un grupo etilo, en posición 3 está unida a un éster cíclico (lactona) de 4 miembros, en posición 4 está unida a un metilo y un grupo sec-butilo. Con ayuda del software ChemBioDraw® y ChemBio3D® Ver13.0, se determina la estereoquímica de los 3 centros quirales así como el nombre de químico de acuerdo con la nomenclatura IUPAC, el cual recibiría el nombre de *(S)*-5-((*S*)-sec-butil)-3-etil-5-metil-4-((*S*)-4-oxoetan-2-il)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona, con una fórmula molecular de $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ y peso molecular calculado en 251.3260 umas, la cual se presenta esquemáticamente en la figura 34.

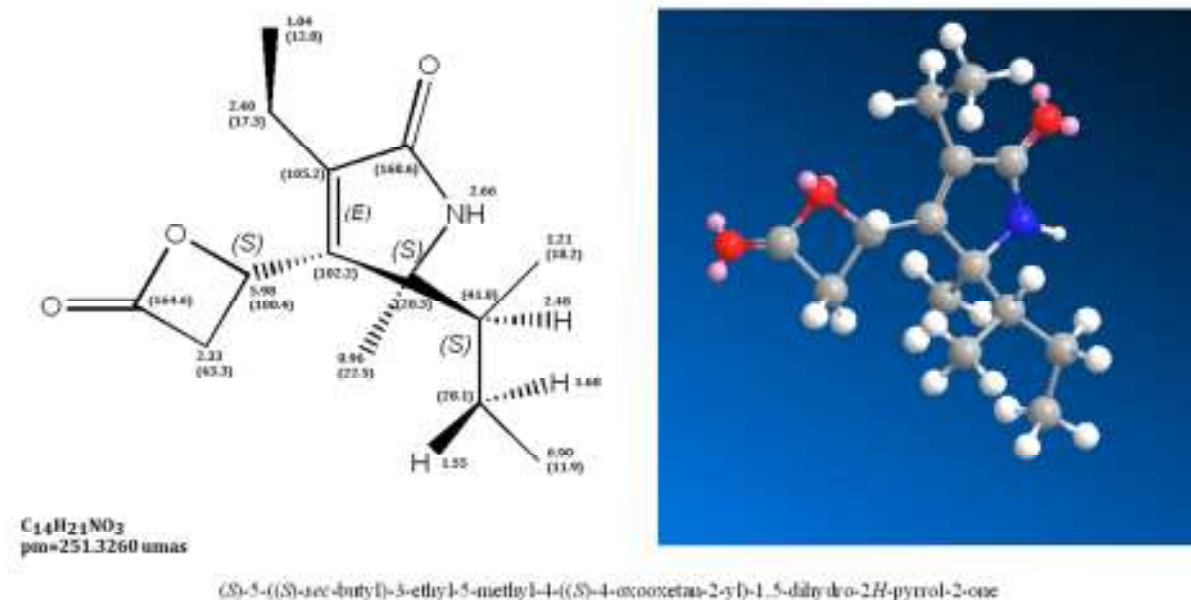


Figura 34. Estructura química propuesta para la fracción 25A6-3.

Se llevó a cabo una búsqueda electrónica en bases de datos de SciFinder-CAS® de la American Chemical Society y MarinLit® de la Royal Society of Chemistry, para verificar registros a cerca de esta estructura propuesta, de la cual no se encontró registro alguno de la misma, por lo que se presume como estructura nueva.



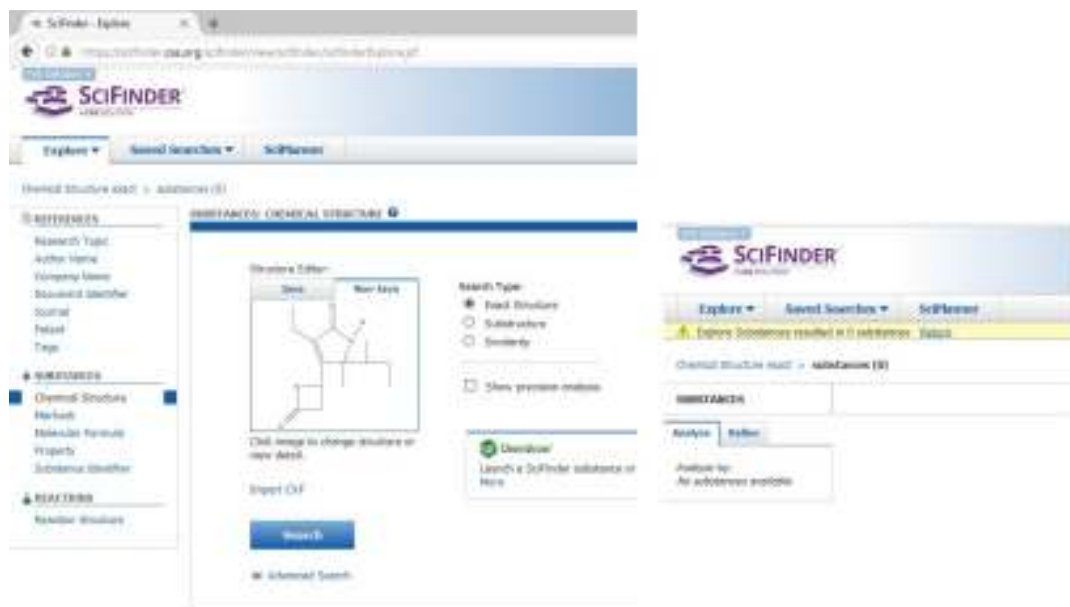


Figura 35. Búsqueda electrónica de en MarinLit y SciFinder-CAS de la estructura propuesta.

6.5 Determinación de CE₅₀.

Se llevó a cabo la determinación de la CE₅₀ de las dos fracciones obtenidas del extracto crudo 25A, como se muestra en la figura 28, dichas fracciones identificadas como 25A6-2-1 y 25A6-3, fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología para la prueba citotóxica, empleando una concentración de 10 mg/mL de DMSO, y colocando en primera instancia 15 µL de esta concentración y haciendo las diluciones subsecuentes, obteniendo un rango de concentraciones que van desde los 750 µg/mL a los 0.05 µg/mL, siendo descartada la primer concentración a fin de descartar el posible efecto que pudiera presentarse debido a la presencia del DMSO en el experimento, por lo que el rango de concentraciones finales manejadas para dichos ensayos fue de 187.50 µg/mL a 0.05 µg/mL. Los ensayos se hicieron por triplicado, y se agregaron controles negativos y un anticancerígeno como control positivo de la prueba.

Una vez obtenidas las absorbancias de las diluciones transcurrido el tiempo de exposición a las líneas celulares, se procedió a calcular el % Mortalidad de cada uno de los pocillos de acuerdo con la ecuación 2, descrita de igual forma en el apartado de metodología para esta prueba. Con estos porcentajes de mortalidad, se sometieron al análisis Probit (manteniendo $\alpha = 0.95$) mediante el uso del software Minitab®17.1.0, para estimar la CE₅₀ de cada muestra. En dicho análisis el porcentaje de actividad fue tomado como número entero, para poder efectuar el cálculo. Tomando como el número de eventos, cada uno de los porcentajes, y el número de ensayos como 100 (al tratarse de porcentajes), mientras que la Tensión o estímulo, se consideraron las diferentes concentraciones.

En las tablas IX a XII, se muestran los valores de % de Mortalidad para cada concentración ensayada, mismos que fueron utilizados para el análisis Probit correspondiente de la estimación de la CE₅₀ de cada muestra ensayada, a los cuales se les tomó el promedio para considerarlo como valor final.

Tabla IX Resultados %Mortalidad y determinación de CE₅₀, línea celular HCT-116.

Conc. (ug/mL)	Plate 1:	HCT-116					
	Muestra	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-3	25A-6-3	25A-6-3
750.00	A						
187.50	B	47.23	48.46	44.74	47.28	47.54	45.30
46.88	C	38.39	37.07	37.86	34.05	34.97	35.85
11.72	D	31.29	31.64	32.78	30.46	29.50	31.03
2.93	E	24.72	23.72	22.66	25.60	25.99	24.29
0.73	F	13.78	13.03	13.56	10.40	11.06	11.32
0.18	G	9.97	9.48	9.05	3.70	4.40	4.71
0.05	H	5.41	6.33	0.55	1.03	1.95	0.55
CE ₅₀		181.135	177.234	188.64	182.002	177.537	188.801
Promedio		182.34			182.78		

Tabla X Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular CRL-5872.

Conc. (ug/mL)	Plate 1:	CRL-5872					
	Valor	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-3	25A-6-3	25A-6-3
750.00	A						
187.50	B	41.12	41.51	40.74	44.77	42.24	43.18
46.88	C	41.17	41.08	41.77	41.94	41.85	41.17
11.72	D	34.26	34.69	33.70	34.26	35.55	34.65
2.93	E	29.25	31.65	28.22	28.22	26.33	25.86
0.73	F	19.21	19.90	17.32	14.58	12.99	13.59
0.18	G	7.72	8.83	8.23	8.32	7.12	7.72
0.05	H	2.19	1.37	0.30	1.59	1.76	1.16
		CE_{50}	212.729	208.004	208.467	185.703	200.179
		Promedio	209.73			193.99	

Tabla XI Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular MDA-MB-231.

Conc. (ug/mL)	Plate 1:	MDA-MB-231					
	Valor	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-3	25A-6-3	25A-6-3
750.00	A						
187.50	B	43.59	44.26	43.79	48.60	48.42	48.16
46.88	C	39.14	39.34	39.22	37.91	37.19	37.56
11.72	D	30.64	31.07	30.35	29.94	30.29	29.53
2.93	E	24.23	24.67	23.94	22.46	22.17	22.78
0.73	F	18.18	18.94	18.76	15.76	14.34	14.72
0.18	G	6.27	6.57	5.95	2.69	4.18	3.39
0.05	H	0.34	0.54	0.25	1.47	0.83	1.12
		CE_{50}	192.74	194.153	193.095	170.902	175.462
		Promedio	193.33			173.18	

Tabla XII Resultados %Mortalidad y determinación de CE_{50} , línea celular HeLa.

Conc. (ug/mL)	Plate 1:	HeLa					
	Valor	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-2-1	25A-6-3	25A-6-3	25A-6-3
750.00	A						
187.50	B	51.53	52.25	52.42	41.98	41.75	42.13
46.88	C	46.40	47.86	45.65	37.33	37.54	36.73
11.72	D	34.89	34.59	35.21	30.86	30.32	29.96
2.93	E	18.39	18.87	18.00	21.05	22.12	20.69
0.73	F	11.80	11.14	11.50	12.99	13.35	12.66
0.18	G	4.70	4.28	4.61	6.43	8.82	6.97
0.05	H	1.35	0.88	0.97	0.43	1.21	0.82
		CE_{50}	153.056	153.017	153.056	202.234	203.374
		Promedio	153.04			202.91	

En la tabla XIII, se muestran los valores de CE_{50} calculada de las dos muestras ensayadas, se puede observar que dichos valores son relativamente similares para ambas muestras en cada una de las líneas ensayadas, sin embargo, la fracción 25A6-2-1, se trata aún de una mezcla de compuestos que no lograron ser totalmente separados y purificados. En el caso de la línea celular HCT116 ambas concentraciones calculadas son muy similares, mientras que para la línea CRL-5872, la concentración calculada para la muestra 25A6-2-1, fue mayor que la calculada para la

25A6-3. El mismo comportamiento es observable en el caso de la línea celular MDA-MB-231, en la cual la concentración más baja fue la calculada para la fracción 25A6-3. Caso contrario a lo observado para la línea HeLa, la cual tuvo mejor respuesta para la fracción 25A6-2-1, la cual tuvo una CE_{50} de 153.04 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con los 202.91 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción 25A6-3.

Para la fracción 25A6-2-1, el intervalo de concentraciones efectivas calculadas fue de entre 153.04 $\mu\text{g/mL}$ y 209.73 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para la fracción 25A6-3, fue de 173.18 $\mu\text{g/mL}$ y 202.91 $\mu\text{g/mL}$. Al tratarse de una fracción compuesta por una mezcla de compuestos aún sin identificar, el efecto inhibitorio del crecimiento celular de las 4 líneas ensayadas, pudiera variar al separar totalmente dicha muestra debida principalmente a efectos antagonistas o sinérgicos presentes entre los participantes de la mezcla.

Tabla XIII Resultados de CE_{50} , de las muestras 25A6-2-1 y 25A6-3.

<i>Línea / Muestra</i>	<i>CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</i>	
	25A6-2-1	25A-6-3
HCT-116	182.34	182.78
CRL-5872	209.73	193.99
MDA-MB-231	193.33	173.18
HeLa	153.04	202.91

7. CONCLUSIONES.

1. De las 27 muestras de sedimento trabajadas, fueron aisladas un total de 48 cepas bacterianas correspondientes al *phylum* actinobacteria, las cuales fueron secuenciadas e identificadas filogenéticamente por el MC. Honorio Cruz López.
2. A partir de estas cepas identificadas, se obtuvieron los extractos orgánicos en las 3 fases orgánicas que permitieron hacer el análisis preliminar para observar bioactividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, la cual permitió discriminar 3 cepas para continuar con el escalamiento del cultivo.
3. A partir de las 3 cepas elegidas e identificadas como CP25 (*Streptomyces gancidicus*) CP27 (*Micromonospora sp*) y CP34 (*Streptomyces sp*) de las cuales se llevó a cabo el cultivo a escala, se obtuvieron extractos crudos para ensayos antimicrobianos (contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* multirresistentes) y citotóxicos (contra las líneas celulares HCT-116, CRL-5872, HeLa, MDA-MB-231) para discriminar las fracciones a purificar por métodos cromatográficos y de forma biodirigida para la obtención de compuestos bioactivos.
4. Se obtuvieron 3 fracciones (mezclas de metabolitos) aún sin resolver con actividad antimicrobiana 25AE1A, 25AE21E y 25AE21F; de las cuales la fracción 25AE21E fue la que mostró tener mejor potencial bioactivo contra las tres cepas de prueba desde las 48 horas de exposición, alcanzando porcentajes de inhibición del 85.2 % para *Pseudomonas aeruginosa*, 71.3 % para *Staphylococcus aureus* y 88.7 % para *Escherichia coli* a las 72 horas las cuales fueron probadas a una concentración de 0.4mg/mL.
5. Se obtuvieron 2 fracciones las cuales presentaron bioactividad contra las 4 líneas celulares ensayadas (HCT-116 cáncer colon; CRL-5872 cáncer de pulmón; HeLa cáncer cervicouterino y MDA-MB-231 cáncer de mama), a estas fracciones se les determinó la CE₅₀, mostrando valores que oscilan entre los 153.04 µg/mL y los 209.73 µg/mL.
6. Se propone la estructura química para la fracción 25A6-3, a través de experimentos de resonancia magnética nuclear, proponiendo un compuesto denominado (*S*)-5-((*S*)-sec-butyl)-3-etil-5-metil-4-((*S*)-4-oxoetan-2-il)-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona del que no se encontró registro en las bases de datos del SciFinder-CAS® de la American Chemical Society y MarinLit® de la Royal Society of Chemistry, por lo que se sospecha que es una molécula nueva.
7. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que las actinobacterias marinas aisladas durante el evento de muestreo en bahía de Loreto, México en el golfo de California, tienen un gran potencial para continuar siendo estudiadas así como sus metabolitos, los cuales presentan bioactividades farmacológicas interesantes, las cuales se pretende seguir explorando para lograr de la elucidación química estructural de los metabolitos aislados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anzai Kozue, Nakashima Takuji, Kuwahara natsumi, Suzuki Rieko, Ohfuku Yuko, Takeshita Satoshi, Ando Katsuhiko; (2008); Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore área of Nagasaki prefecture, Japan: Diversity and biological activity; Journal of Bioscience and Bioengineering 106(2):215-217.
- Attimarad S.L., Ediga G.N., Karigar A.A., Karadi R., Chandrashekhar N.; (2012); Screening, isolation and purification of antibacterial agents from marine actinomycetes; International Current Pharmaceutical Journal 1(12):394-402.
- Baggini Santiago Pablo, (2016), fotografía de *Pseudomonas aeruginosa* en Seguridad Alimentaria, Bromatología y Microbiología de los Alimentos, recuperada de <https://bagginis.blogspot.mx/2016/11/enterobacterias-ultima-parte.html>.
- Bais Y.G., Nimbekar T.P., Wanjari B.E., Timade S.P.; (2012); Isolation of antibacterial compound from marine soil Actinomycetes; International Journal of Biomedical and Advance Research 3(3).
- Barbier G. D. and Prieur D.; (1991); Une Nouvelle filiare: Les microorganismes marins. Biofutur 106(1):41-46.
- Becerril-Espinoza A.; (2011); Tesis doctoral: Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa; Universidad Autónoma de Baja California.
- Becerril-Espinosa A., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N. and Soria-Mercado I.E.; (2012a.); Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay. Baja California, México; Revista de Biología Marina y Oceanografía 47(2):317-325.
- Becerril-Espinosa A., Freel K., Jensen P.R., Soria-Mercado I.E.; (2012b); Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and sencondary metabolite biosynthetic potential; Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology 102(3).
- Bonar D.B., Weiner R.M., Colwell R.R.; (1986); Microbial-invertebrate interactions and potential for biotechnology; Microbial Ecology 12(1):101-10.
- Bowman J.; (2007); Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus Pseudoalteromonas; Marine Drugs 5(1):220-241.
- Brendan P. Lucey, Walter A. Nelson-Rees, Grover M. Hutchins; (2009); Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination; Archives of Pathology & Laboratory Medicine 133(9):1463-1467.

-
- Burkhard Haefner; (2003); Drugs from the deep, marine natural products as drug candidates; Drug Discovery Today 8(12).
 - Byoprotect, (2017), fotografía de *Pseudomona aeruginosa*, recuperada de <http://byoprotect.com/before-and-after/>
 - Castillo Robles A.M.; (2011); Elucidación asistida de estructuras a partir de espectros de resonancia magnética nuclear; Universidad Nacional de Colombia.
 - CONANP - Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas; (2011); Estudio previo justificativo para el establecimiento del área natural protegida con la categoría de reserva de la biosfera zona marina profunda golfo de California, localizada frente a las costas de los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco; México; Marzo 2012.
 - Cruz-López H.; (2015); Tesis de maestría: Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas; Facultad de Ciencias Marinas; Universidad Autónoma de Baja California.
 - Dharmaraj S.; (2010); Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26(12):2123–2139.
 - De la Calle F.; (2007); Fármacos de origen marino; Treballs de la SCB 58(1):141-155.
 - Fenical W., Jensen P.R.; (2006); Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria; Nature Chemical Biology 2(1):666–673.
 - Gonzalez I., Ayuso-Salcido A., Anderson A., Genilloud O.; (2005); Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences; FEMS Microbiology Ecology 54(1):401-415.
 - Goodfellow M., Fiedler H.P.; (2010); A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics; Antonie Van Leeuwenhoek 98(1):119–142.
 - Gram Lone, Melchiorson, Bartholin Bruhn Jesper; (2010); Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms; Marine Biotechnology 12(1):439-451.
 - Gschmeissner, Steve (2013), fotografía de *Escherichia coli*, recuperada de <https://fineartamerica.com/featured/4-e-coli-bacteria-sem-steve-gschmeissner.html>
 - Gulve R.M., Deshmukh A.M.; (2012); Antimicrobial activity of the marine actinomycetes; International Multidisciplinary Research Journal 2(3):16-22.

-
- Hong K., Gao A., Xie Q., Zhuang L., Lin H., Yu H., Yao X., Goodfellow M. and Ruan J.; (2009); Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China; *Marine Drugs Journal* 7(1):24-44.
 - Janardhan A., Kumar A.P., Viswanath B., Saigopal D.V.R., Narasimha G.; (2014); Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties; *Biotechnology Research International Vol 2014 ArticleID 217030*.
 - Jayaprakashvell M.; (2012); Therapeutically active biomolecules from marine actinomycetes; *Journal of Modern Biotechnology*, 1(1):1-7.
 - Jensen P.R., Fenical W., Oh D.C., Zeiger L.; (2007); Species-specific secondary metabolite production in marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*; *Applied Environmental Microbiology* 73(1):1146-1152.
 - Leiva S., Yañez M., Zaror L., Rodríguez H., García-Quintana H.; (2004); Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile; *Revista Médica Chilena* 132(1):151-159.
 - León J., Liza L., Soto I., Cuadra D.L., Patiño L., Zerpa R.; (2007); Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú; *Revista Peruana de Biología* 14(2):259-270.
 - León J., Liza L., Soto I., Torres M, Orosco A.; (2010); Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aislados a partir de invertebrados intermareales; *Revista Peruana de Medicina; Exp Salud Pública* 27(2):215-221.
 - Li Hang; (2006); Thesis: Chemical investigations of natural products from Australian marine sponge-derived fungi; Griffith University; Nathan Queensland Australia.
 - Li-yang Tao, Jian-ze Zhang, Yong-ju Liang, Li-mingChen, Li-sheng Zheng, Fang Wang, Yan-jun Mi, Zhi-gang She, Kenneth Kin Wah To, Yong-cheng Lin, Li-wu Fu; (2008); Anticancer effect and structure-activity analysis of marine products isolated from metabolites of mangrove fungi in the south China Sea; *Marine Drugs* 8(1):1094-1105.
 - Maldonado L., Fragoso-Yañez D., Pérez-García A., Rosellón-Druker J., Quintana E.; (2009); Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico; *Antonie van Leeuwenhoek* 95(1):111-120.
 - Madigan M.T., Martinko J.M. Parker J.; (2005); *Brock Biology of Microorganisms*; 11th Edition; Pearson Prentice Hall 414pp.
 - Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.K.; (2014); Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research* 169(4):262-278.
-

-
- Martinez Carpio P.A., Navarro Moreno M.A.; (2003); El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama; *Revista de Oncología* 5(4):184-191.
 - Martinez-García M., Díaz-Valdéz M., Ramos-Esplá A., Salvador N., López P., Larriba E., Antón J.; (2007); Cytotoxicity of the ascidian *Cystodytes dellechiaiei* against tumor cells and study of the involvement of associated microbiota in the production of cytotoxic compounds; *Marine Drugs* 5(1):52-70.
 - Mosmann T.; (1983); Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays; *Journal of Immunological Methods* 65(1983):55-63.
 - National Center for Biotechnology Information NCBI (2017), The taxonomy database maintained by NCBI/GenBank, consultado en Agosto 2017 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>
 - Olano C., Méndez C. and Salas J.; (2009); Antitumor compounds from marine actinomycetes; *Marine Drugs* 7(1):210-248.
 - Pérez-Carrascal O.M.; (2012); Tesis: Análisis molecular de la microbiota bacteriana presente e muestras asociadas al caracol pala (*Strombus gigas*) y determinación de las actividades antibacterianas y enzimáticas de bacterias aisladas; Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; Facultad de Ciencias.
 - Phelps R.M., Johnson B.E., Ihde DC; Gazdar AF, Carbone DP, McClintock PR, Linnoila RI, Mattews MJ, Bunn PA Jr, Carney D, Minna JD, Mulshine JL; (1996), NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base; *journal of cellular biochemistry supplement*; 1996(24):32-91.
 - Pradeep V., Khajure J.L, Rathod L.; (2011); Antimicrobial and cytotoxic potential of the compound secreted by marine bacteria collected from the Karwar Coast, West Coast of India; *Indonesian Journal of Biotechnology* 16(1):60-65.
 - Ronald M. Atlas; (1990); Microbiología, fundamentos y aplicaciones; Compañía Editorial Continental SA de CV; México ISBN 0-02-304550-7.
 - Sathish K.S.R, Rao Kokati V.B. (2012). In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*; *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(10):787–792.
 - Sithranga Boopathy N., Kathiresan K.; (2010); Anticancer drugs from marine flora: an overview; *Journal of Oncology* Vol 2010, Article ID 214186, 18 pages
 - Solanki Renu, Monisha Khanna, Lal Rup; (2008); Bioactive compounds from marine actinomycetes; *Indian Journal for Microbiology* 48(1):410-431.
-

-
- Soria-Mercado I.E., Prieto-Davo A., Jensen P.R., Fenical W.; (2005); Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete (Streptomycetacea); Journal of Natural Products 68(1):904-910.
 - Sudha S., Masilanami-Selvam M.; (2012); Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete Streptomyces avidinii strain SU4; Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine 2(10):770-773.
 - Sunaryanto R., Marwoto B., Irawadi T., Mas'ud Z.; (2010); Antibiotic compound from marine actinomycetes (Streptomyces sp A11): isolation and structure elucidation; Indonesian Journal of Chemistry 10(2):226-232.
 - The Electron Pencil, (2016), fotografía de *Staphylococcus aureus*, recuperado de <https://electronpencil.com/2016/09/>
 - Torres Beltrán M, Cardoso Martínez F, Millan Aguiñaga N, Becerril Espinosa A, Soria Mercado IE; (2012); Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas; Ciencias Marinas 38(4):604-624.
 - Vallés J. and Mariscal D.; (2005); Neumonía por Pseudomonas aeruginosa; Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 23(3):30-36.
 - Villareal-Gómez L., Soria-Mercado I.E., Guerra-Rivas G., Ayala-Sánchez N.; (2010); Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface; Revista de Biología Marina y Oceanografía 45(2):267-275.
 - Vimal V., Mercy-Rajan B., Kannabiran K.; (2009); Antimicrobial activity of marine actinomycete Nocardiopsis sp VITSVK5 (FJ973467); Asian Journal of Medical Sciences 1(2):57-63.
 - Willis, Gladden (2017), fotografía de *Escherichia coli* bacteria-Gram negative bacilli, recuperada de http://www.allposters.com/-sp/E-Coli-Bacteria-Gram-Negative-Bacilli-Gram-Stain-LM-X400-Posters_i9012754_.htm
 - World Health Organization; (2002); Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance; Fact sheet N° 194. Geneva: WHO. URL: http://www.who.int/emc/amr_interventions.htm
 - Zheng L., Lin W., Yan X., Chen H.; (2004); A primary study on antimicrobial and cytotoxic activity of marine bacteria. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 15(9):1633-6.
 - Zotchev S.B.; (2012); Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines; Journal of Biotechnology 158(4):168-175.
-

ANEXOS.

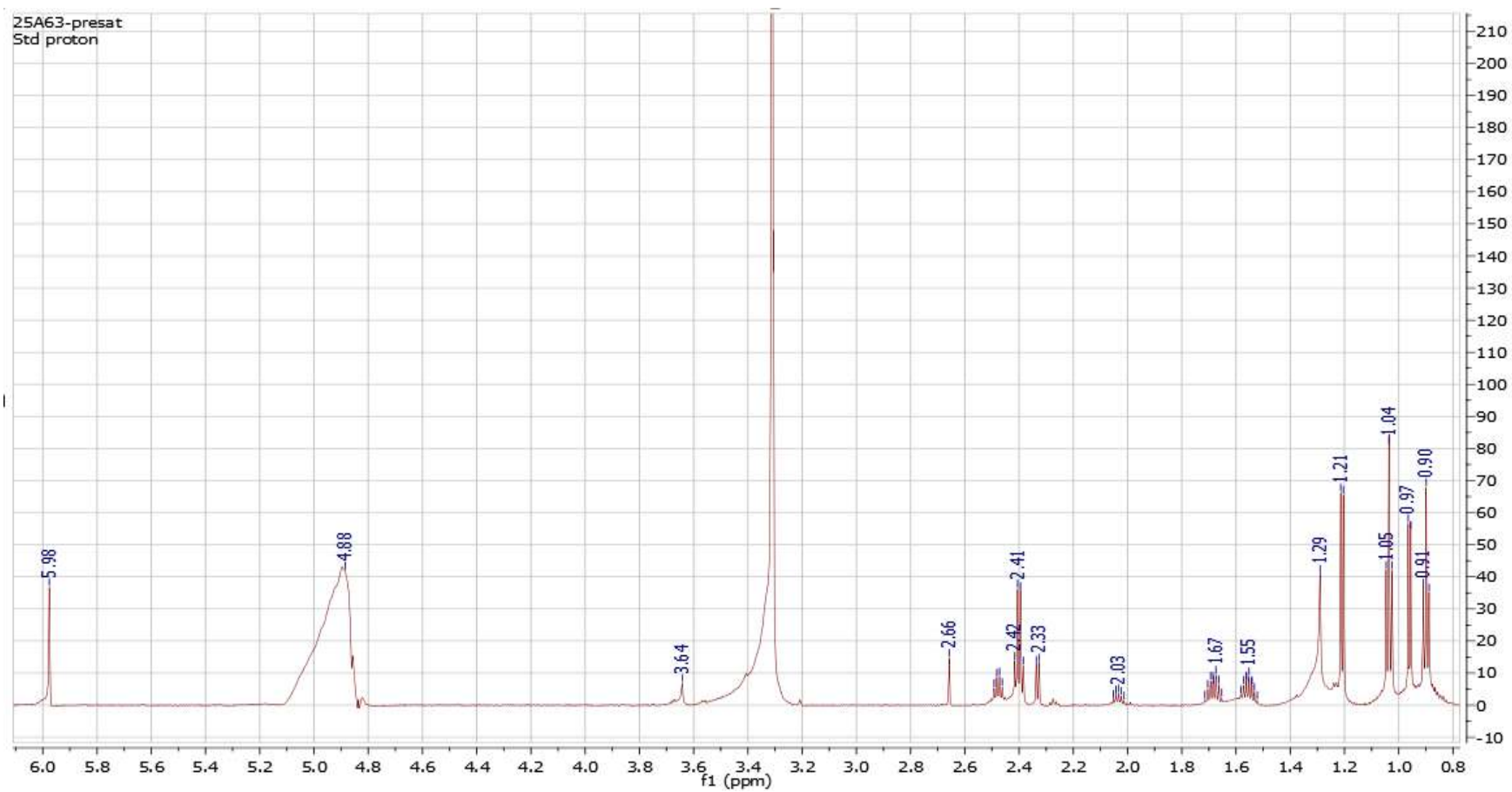
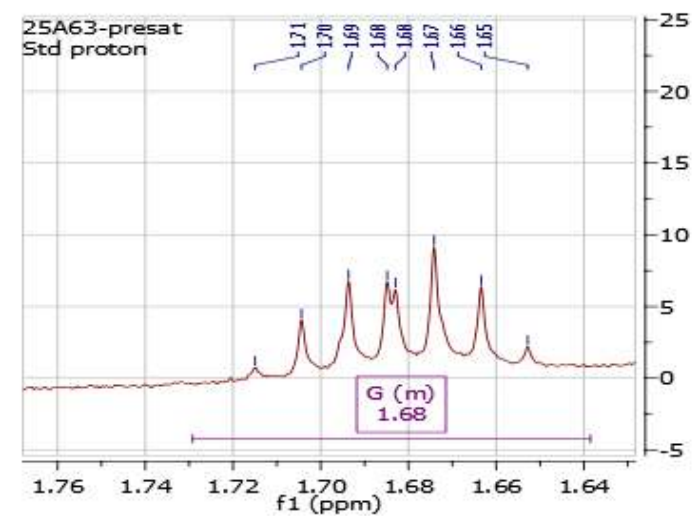
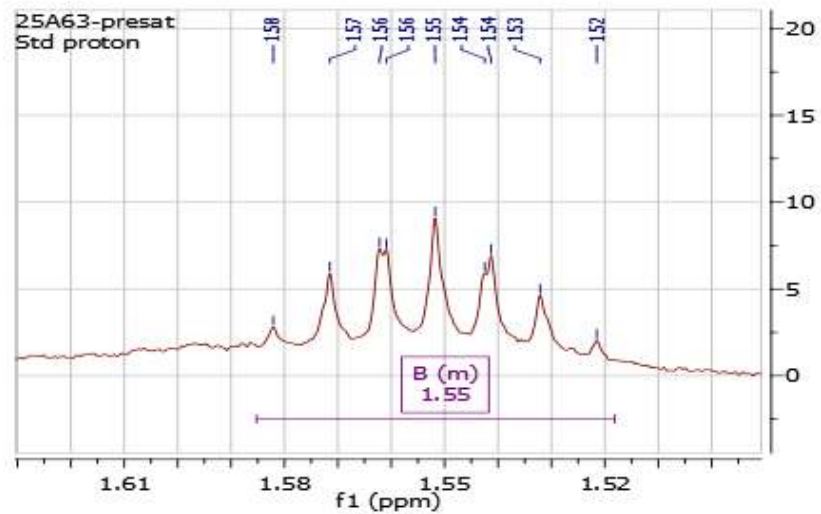
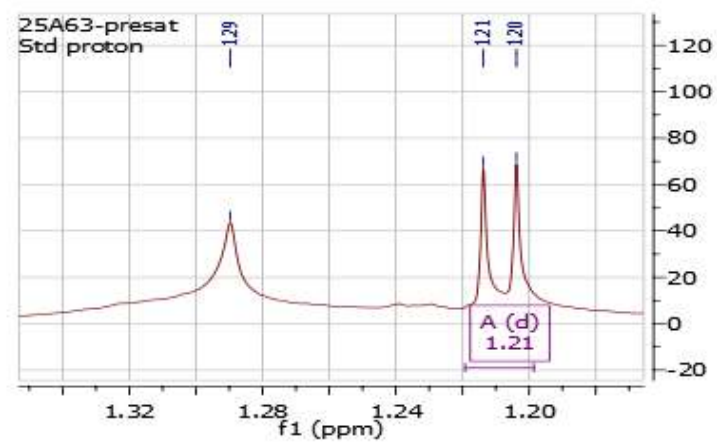
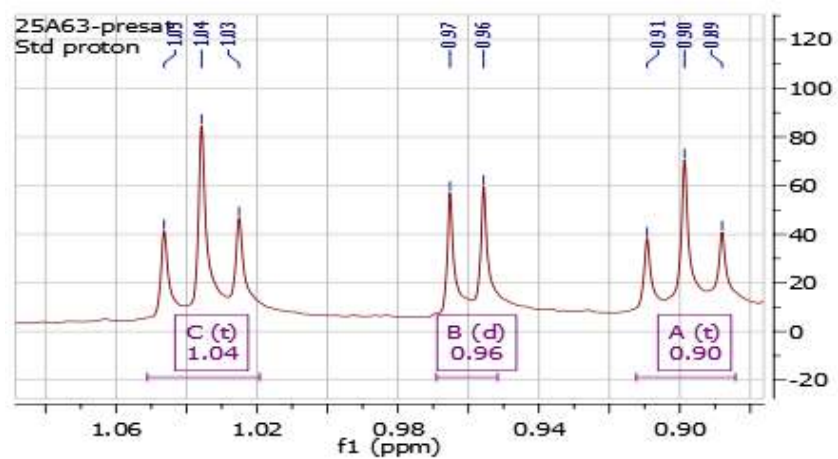
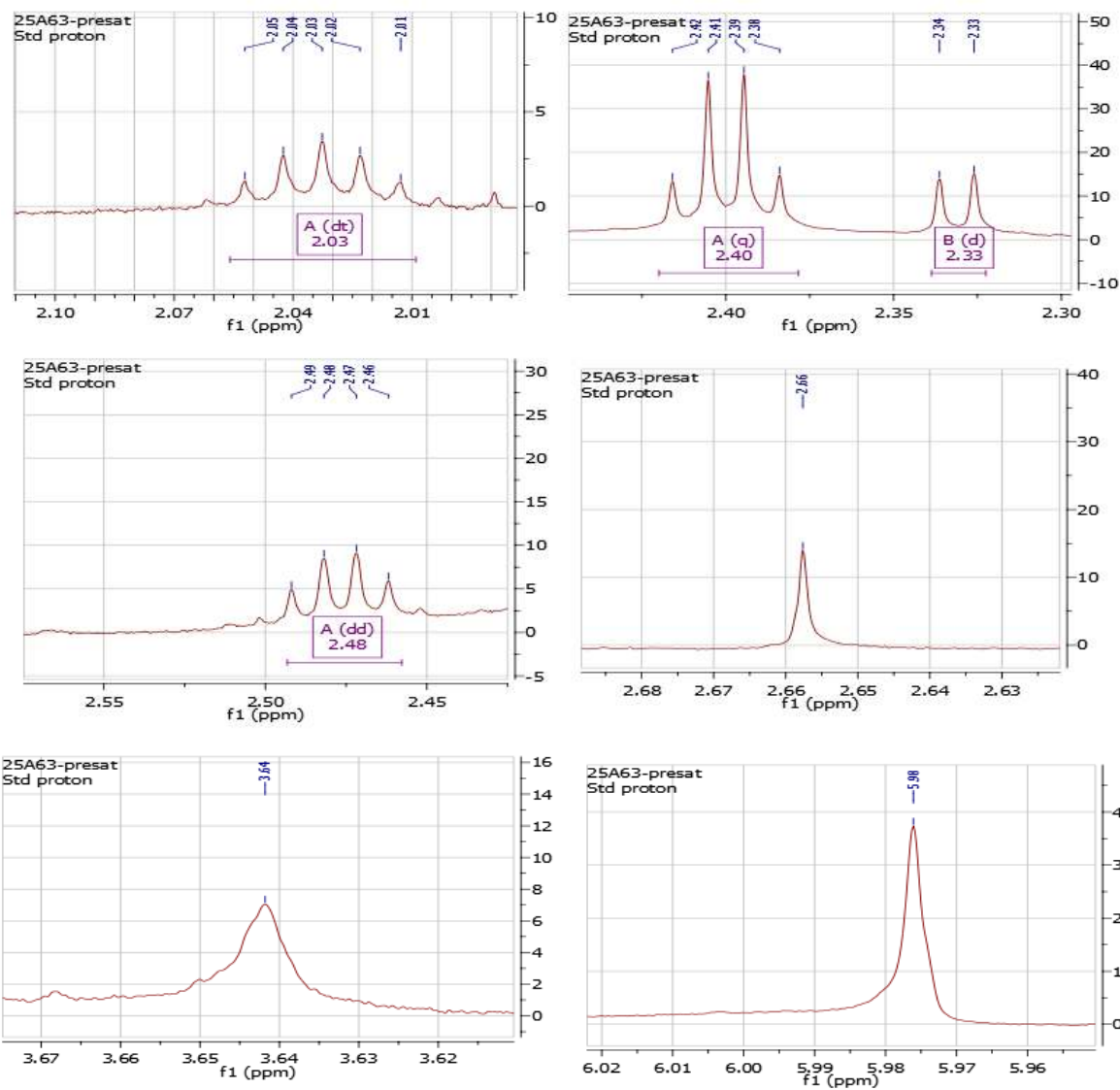


Figura 36. Espectros de RMN ^1H de 700 MHz para la fracción 25A6-3.





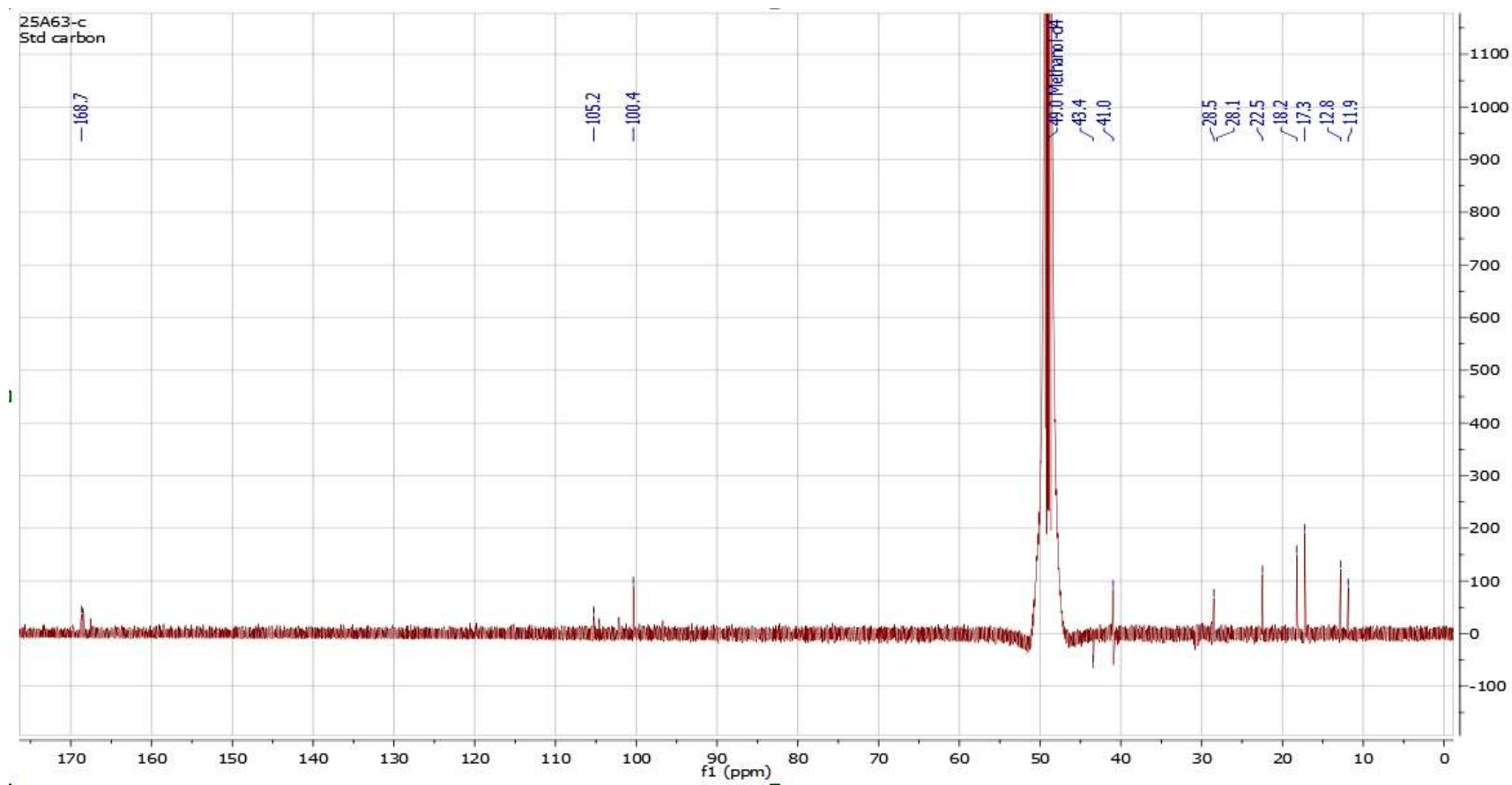
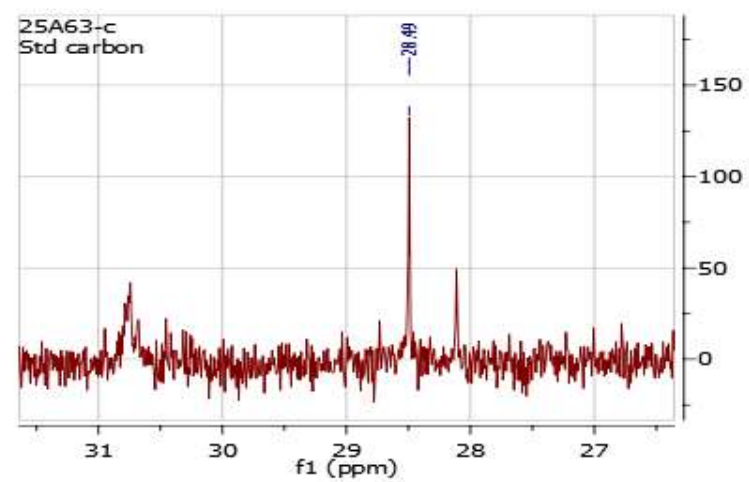
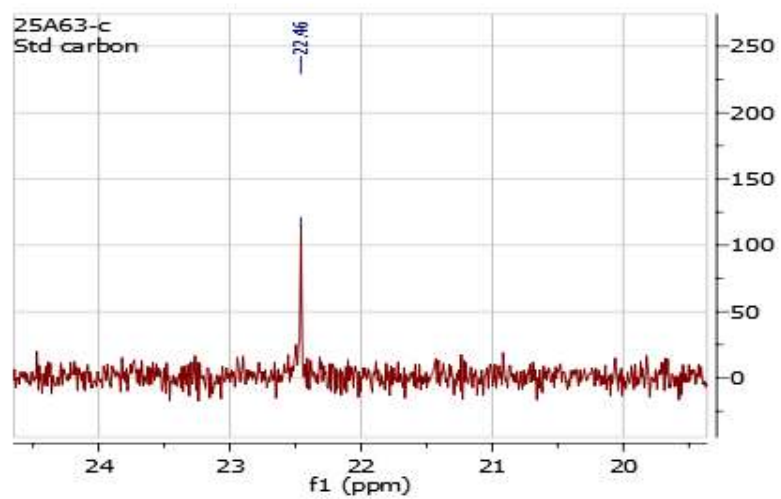
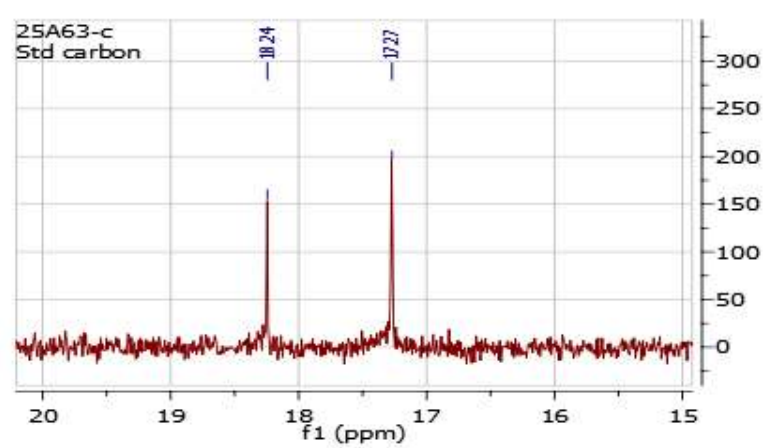
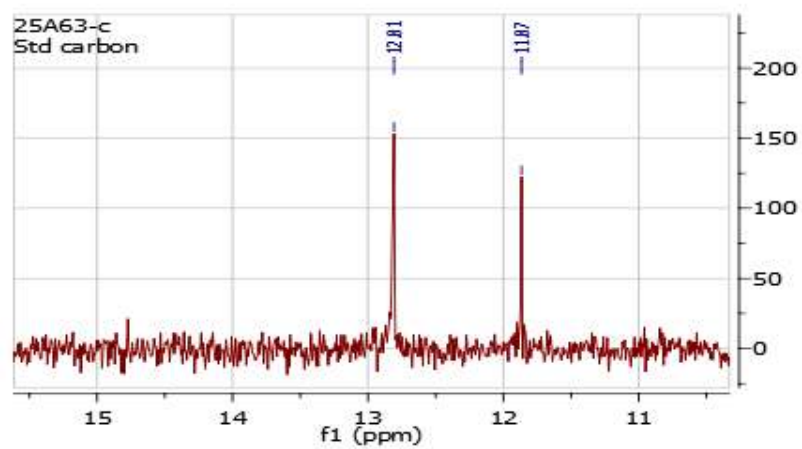
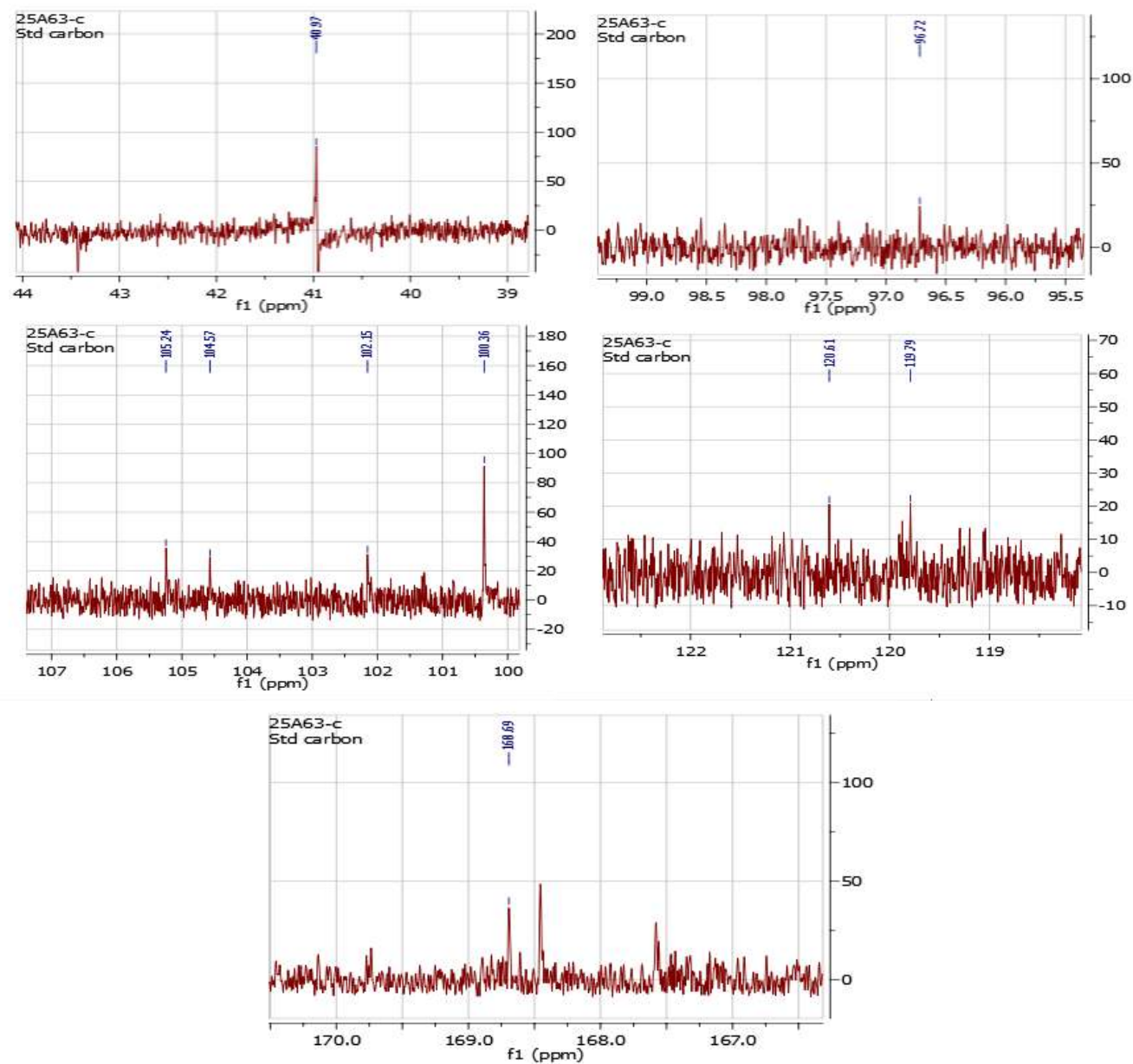


Figura 37. Espectros de RMN ^{13}C de 700 MHz para la fracción 25A6-3.





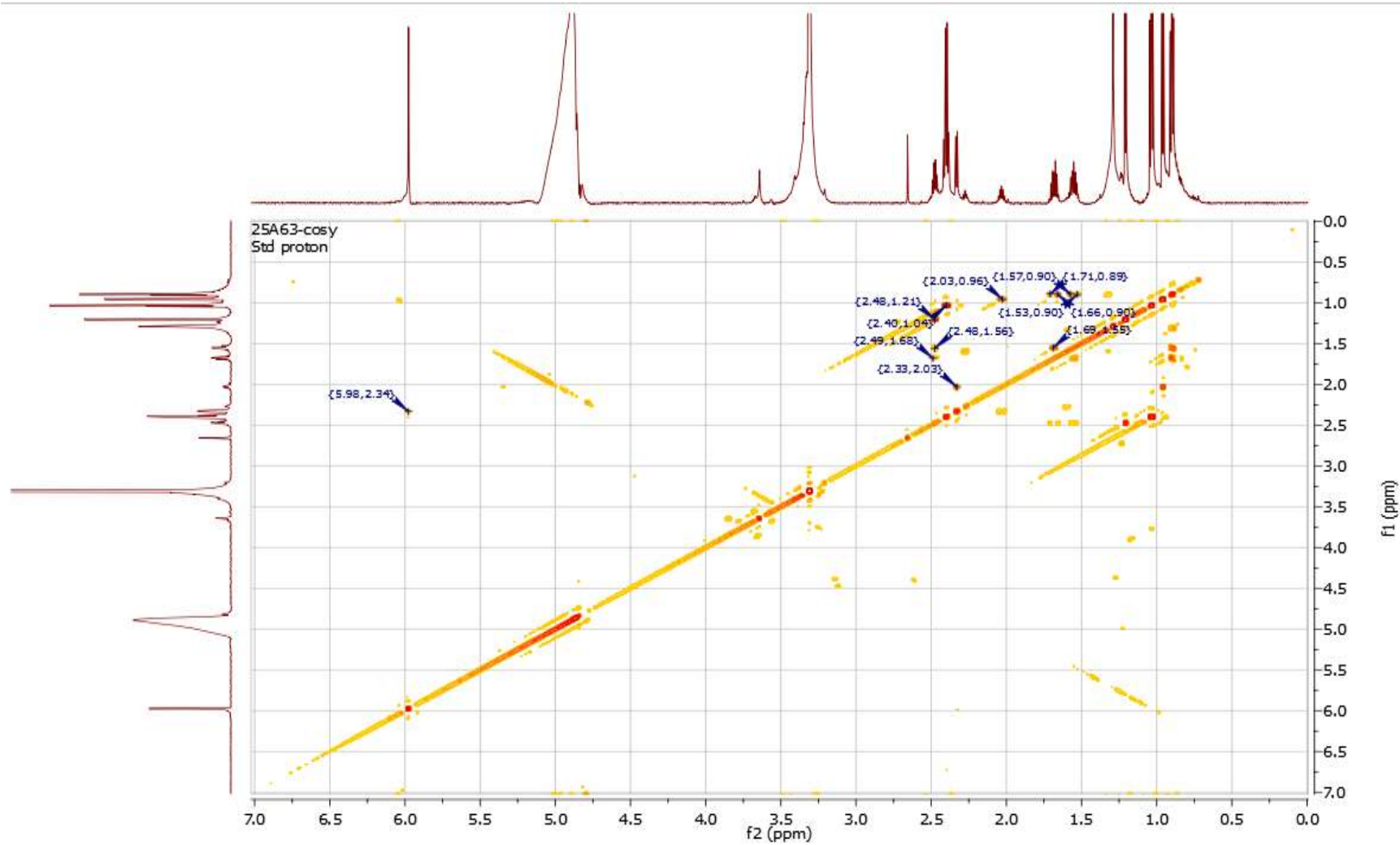
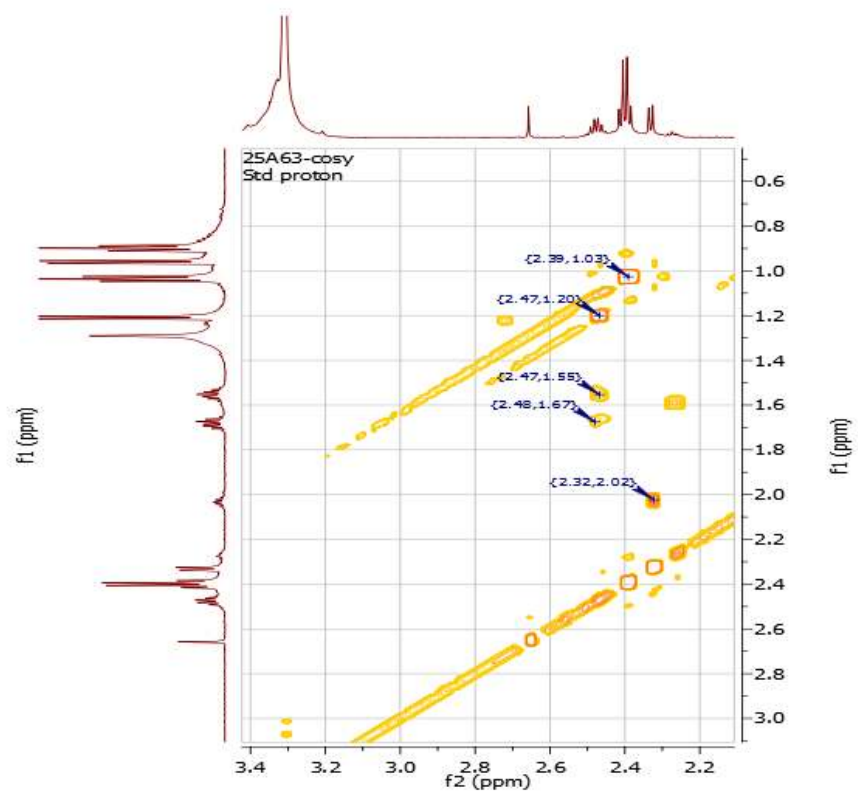
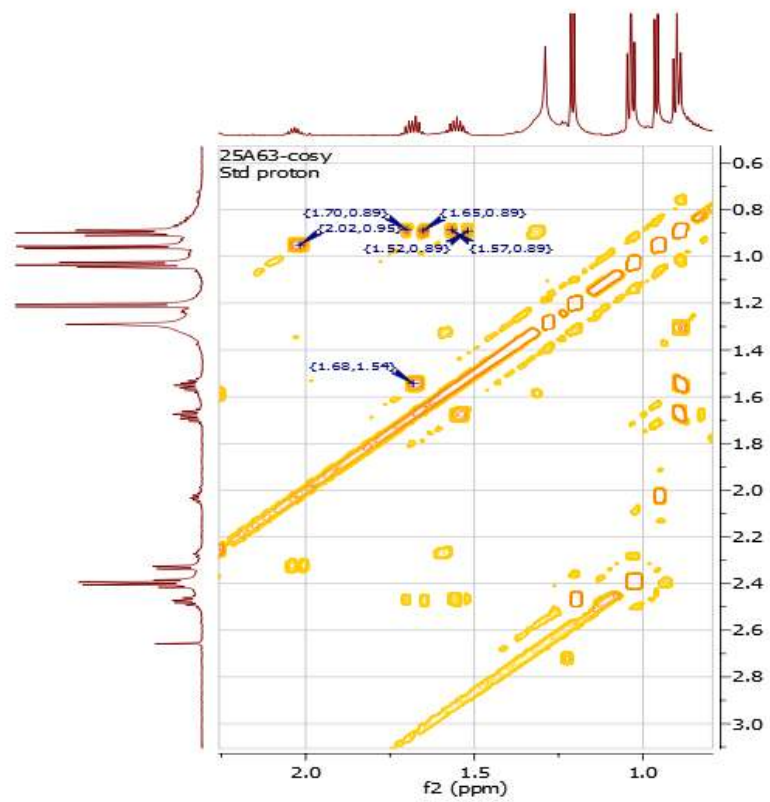
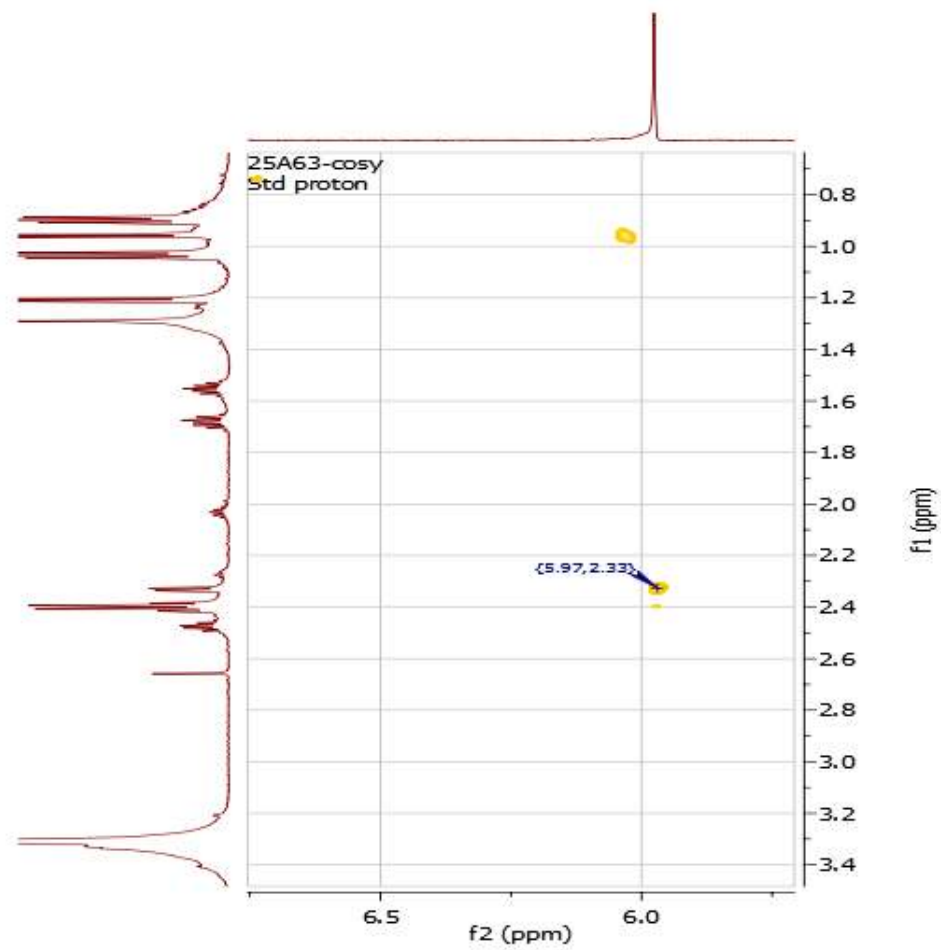


Figura 38. Espectros de 2D RMN Cosy ^1H - ^1H de 700 MHz para la fracción 25A6-3.





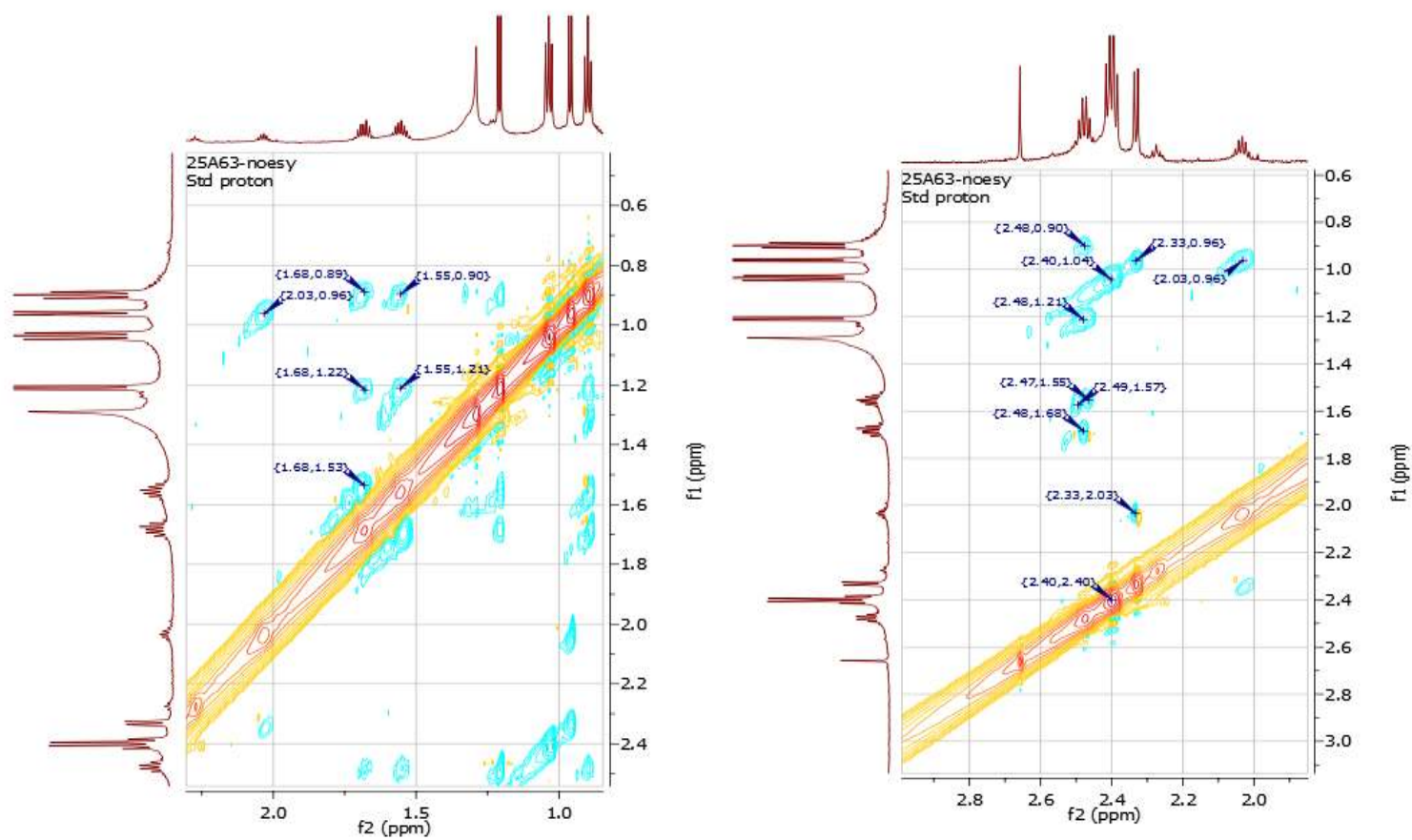
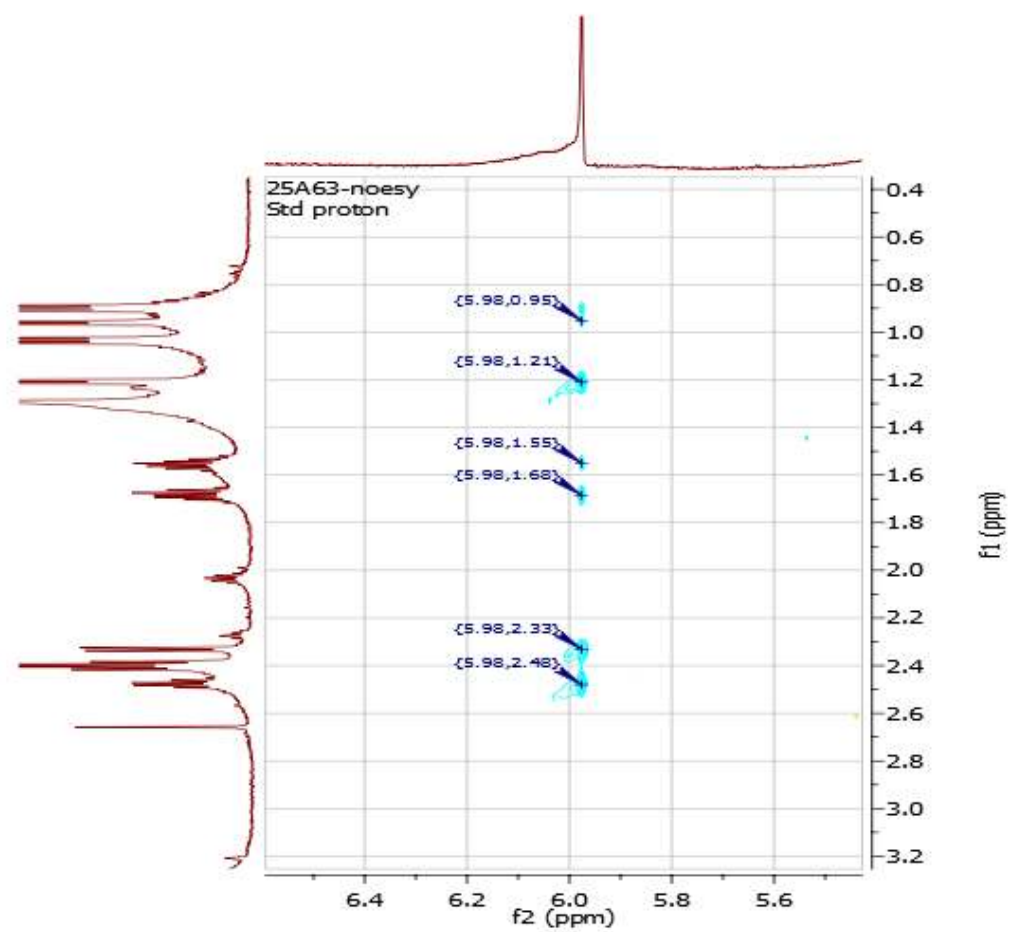


Figura 39. Espectros de 2D RMN Noesy ^1H - ^1H de 700 MHz para la fracción 25A6-3.



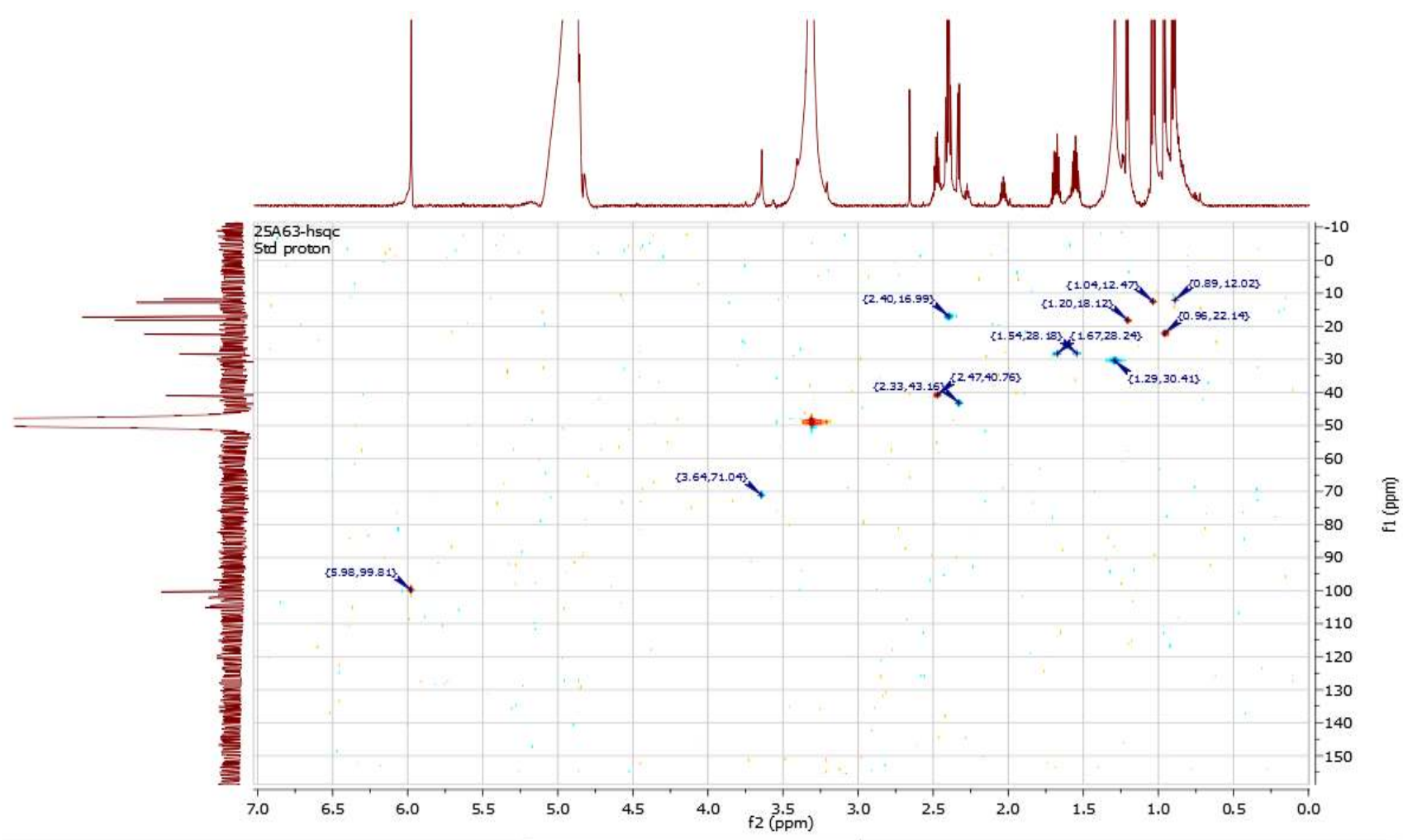
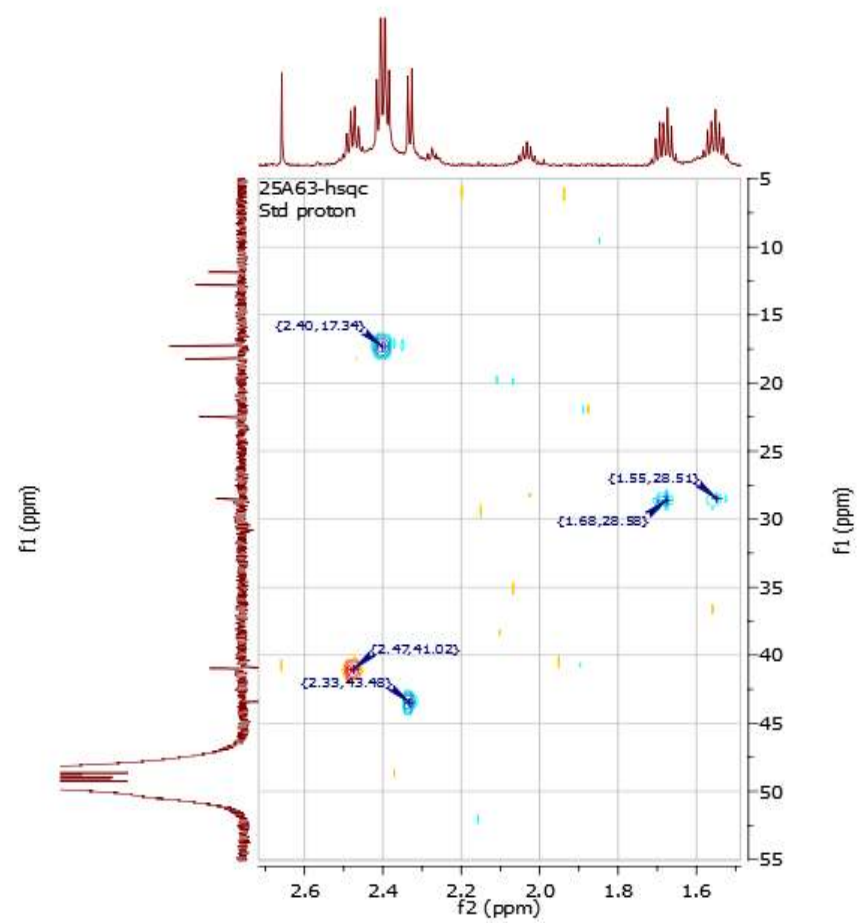
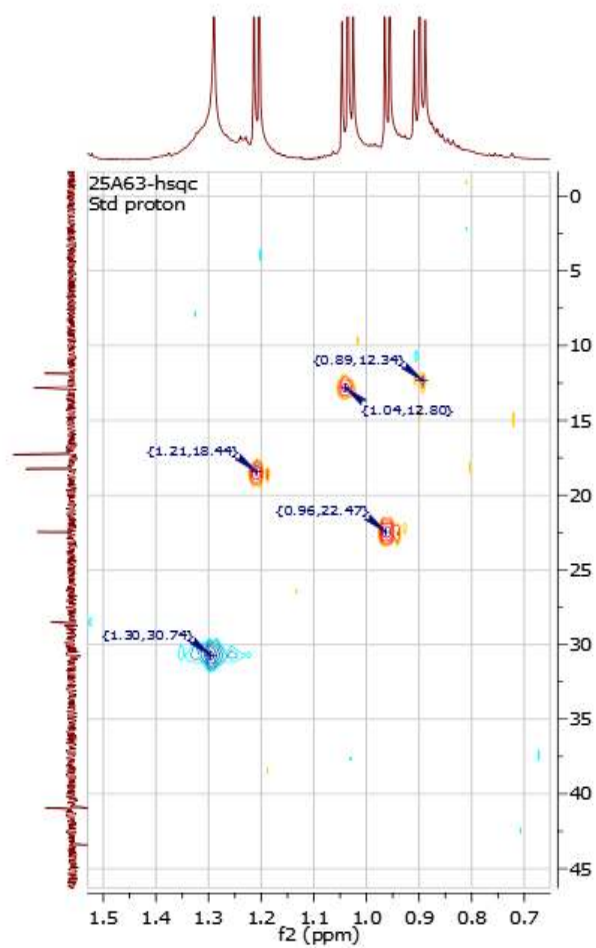
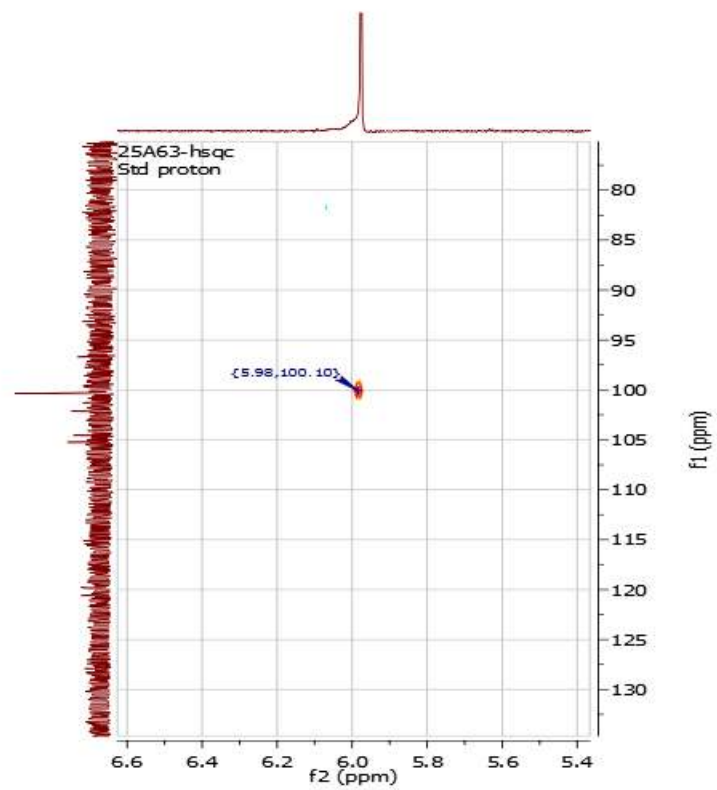
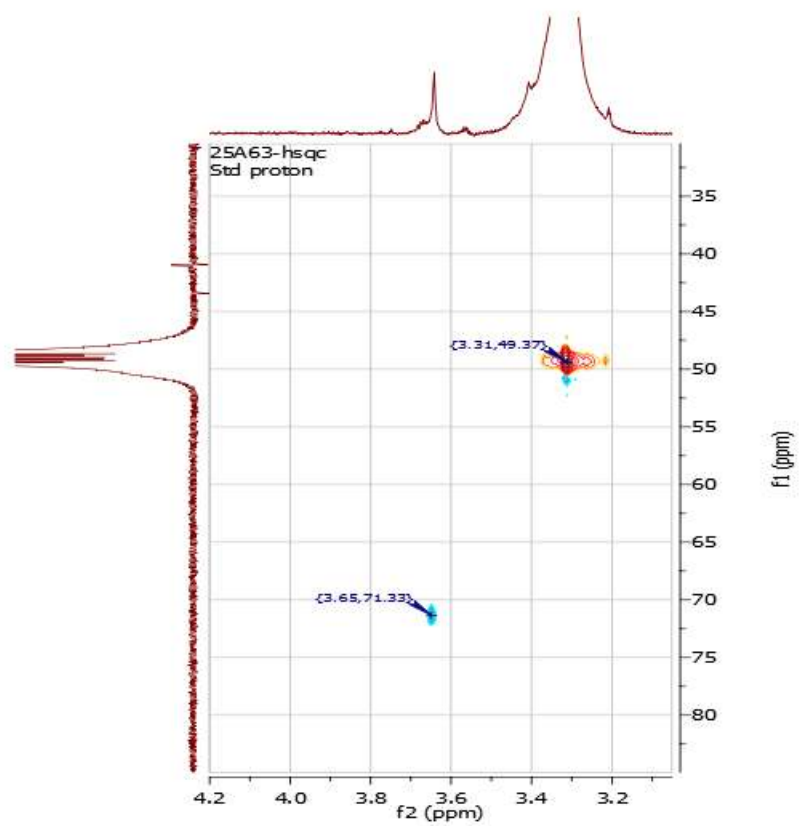


Figura 40. Espectros de 2D RMN HSQC ^1H - ^{13}C de 700 MHz para la fracción 25A6-3.





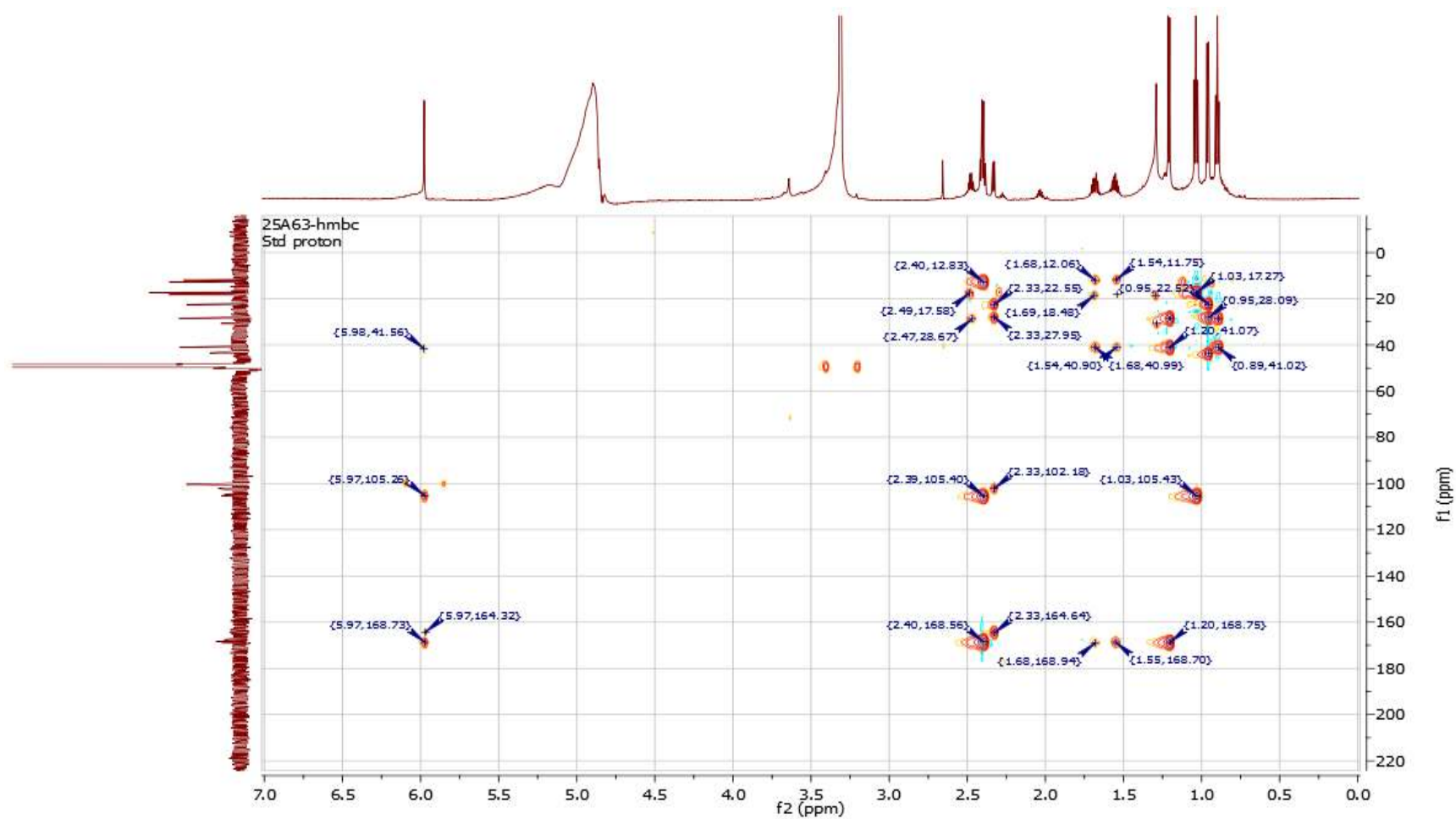
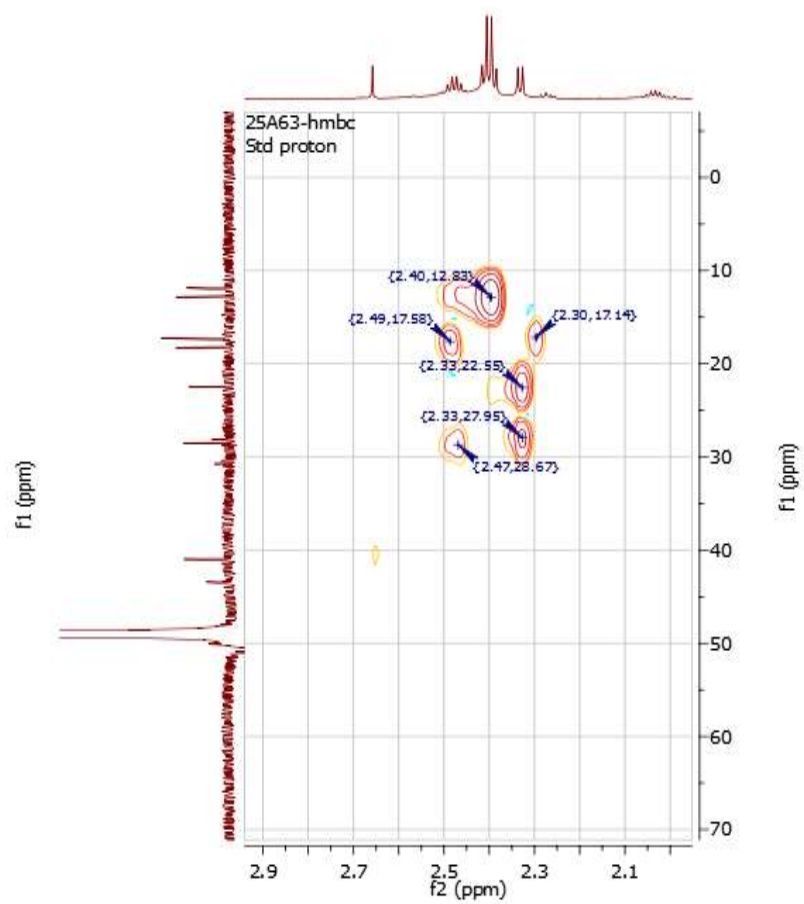
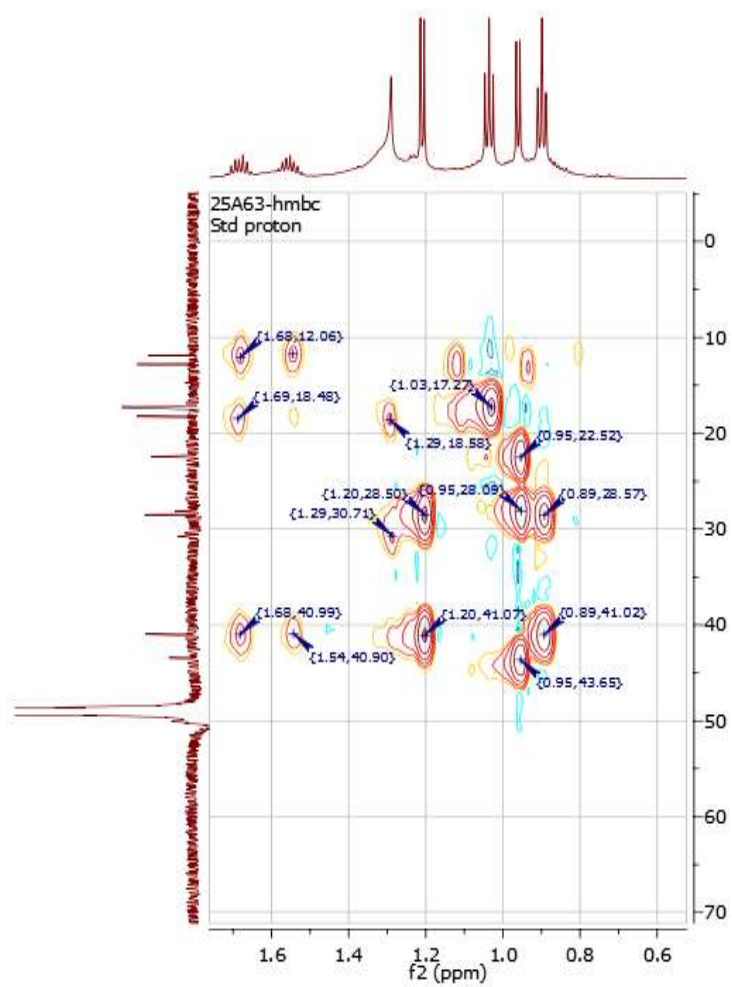


Figura 41. Espectros de 2D RMN HMBC ^1H - ^{13}C de 700 MHz para la fracción 25A6-3.



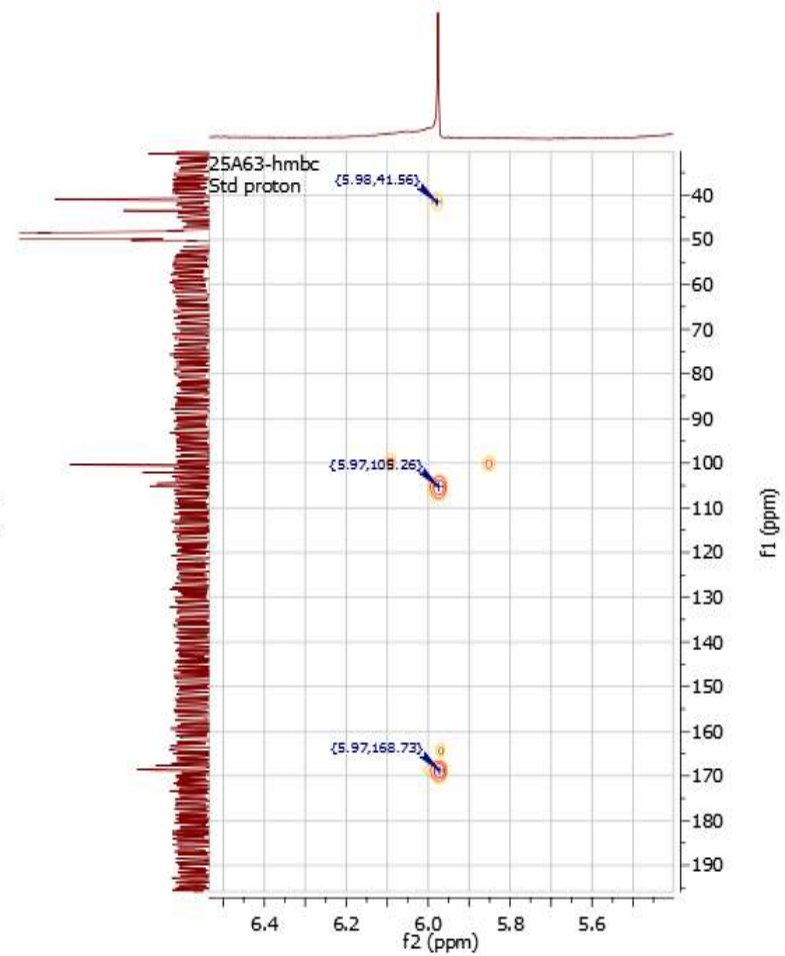
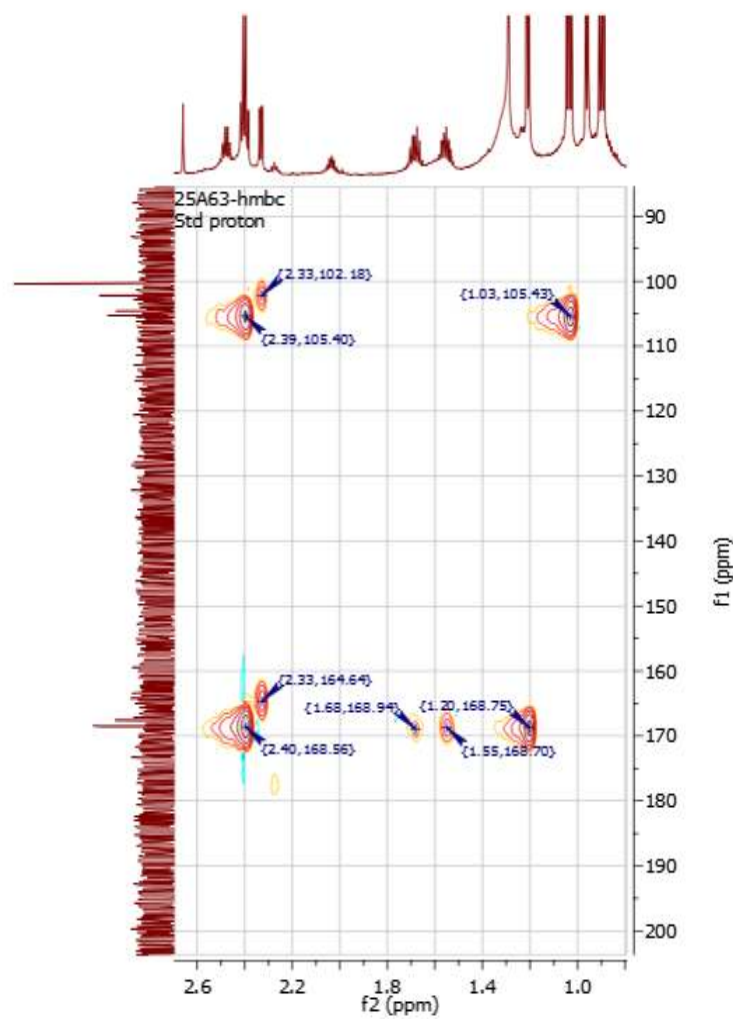


Tabla XIV Análisis Probit para estimar la CE₅₀, subfracción 25A6-2-1, línea celular HCT-116.

Información de respuesta		
Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	170
	Sin evento	530
Exp	Total	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-0.906108	0.0626957	-14.45	0.000
Conc ug/mL	0.0050024	0.0007668	6.52	0.000
Natural Respuesta	0			
Log-verosimilitud = -366.799				

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	37.7100	5	0.000
Desviación	40.5157	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error IC normal de 95.0%		Inferior	Superior
Media	Estimación	estándar		
	181.135	23.6089	134.863	227.408
Desv.Est.	199.904	30.6408	148.031	269.955

Tabla de percentiles

Porcentaje	IC fiducial de		Inferior	Superior
	Error	95.0%		
Percentil		estándar		
1	-283.912	51.2992	-426.702	-206.091
2	-229.419	43.1617	-349.230	-163.763
3	-194.844	38.0471	-300.173	-136.812
4	-168.835	34.2367	-263.342	-116.464
5	-147.679	31.1697	-233.448	-99.8477
6	-129.671	28.5898	-208.064	-85.6439
7	-113.882	26.3578	-185.867	-73.1300
8	-99.7450	24.3898	-166.054	-61.8642
9	-86.8879	22.6315	-148.098	-51.5549
10	-75.0528	21.0463	-131.637	-41.9979
20	12.8912	11.6023	-14.1832	33.8856
30	76.3050	11.7380	55.2176	103.894
40	130.490	17.0350	103.064	175.168
50	181.135	23.6089	144.388	245.183
60	231.780	30.7422	184.581	316.329
70	285.965	38.6437	227.045	392.986
80	349.379	48.0643	276.398	483.042

90	437.323	61.2839	344.537	608.240
91	449.158	63.0713	353.690	625.105
92	462.015	65.0148	363.630	643.430
93	476.152	67.1536	374.557	663.582
94	491.941	69.5443	386.756	686.094
95	509.949	72.2734	400.664	711.773
96	531.105	75.4826	416.999	741.948
97	557.114	79.4316	437.074	779.053
98	591.689	84.6865	463.748	828.387
99	646.182	92.9792	505.771	906.164

Tabla XV Análisis Probit para estimar la CE₅₀, subfracción 25A6-2-1, línea celular CRL-5872.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	174
	Sin evento	526
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-0.839214	0.0615383	-13.64	0.000
Conc ug/mL	0.0039450	0.0007656	5.15	0.000

Natural

Respuesta 0

Log-verosimilitud = -379.402

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	56.9466	5	0.000
Desviación	66.8166	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Estimación	Error estándar	Inferior	Superior
Media	212.729	35.6360	142.884	282.575
Desv.Est.	253.486	49.1948	173.284	370.808

Tabla de percentiles

Porcentaje	Percentil	IC fiducial de Error 95.0%	estándar	Inferior	Superior
1	-376.968		82.4428	-636.457	-259.327
2	-307.868		69.2407	-525.347	-208.859
3	-264.026		60.9116	-454.945	-176.745
4	-231.045		54.6823	-402.056	-152.514
5	-204.218		49.6475	-359.099	-132.741
6	-181.384		45.3925	-322.596	-115.850
7	-161.363		41.6920	-290.651	-100.980
8	-143.437		38.4097	-262.110	-87.6030
9	-127.134		35.4572	-236.219	-75.3717
10	-112.126		32.7742	-212.457	-64.0422
20	-0.610125		15.6618	-41.8449	26.1068
30	79.8009		15.1295	53.4596	118.829
40	148.509		24.5112	111.511	221.440
50	212.729		35.6360	160.721	322.397
60	276.949		47.4313	208.570	424.715
70	345.657		60.3490	259.167	534.780

80	426.069	75.6508	318.018	663.956
90	537.585	97.0321	399.318	843.417
91	552.592	99.9181	410.242	867.585
92	568.895	103.055	422.106	893.844
93	586.822	106.506	435.148	922.720
94	606.843	110.362	449.709	954.974
95	629.677	114.763	466.312	991.765
96	656.504	119.936	485.812	1034.99
97	689.484	126.299	509.777	1088.15
98	733.326	134.764	541.624	1158.82
99	802.426	148.115	591.800	1270.22

Tabla XVI Análisis Probit para estimar la CE₅₀, subfracción 25A6-2-1, línea celular HeLa.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	169
	Sin evento	531
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-0.977572	0.0642836	-15.21	0.000
Conc ug/mL	0.0063870	0.0007751	8.24	0.000
Natural				
Respuesta	0			
Log-verosimilitud = -352.467				

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	72.7004	5	0.000
Desviación	80.4204	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error	IC normal de 95.0%	Inferior	Superior
	Estimación	estándar		
Media	153.056	15.5950	122.490	183.622
Desv.Est.	156.568	18.9993	123.427	198.607

Tabla de percentiles

Porcentaje	Error	IC fiducial de 95.0%	Inferior	Superior
	Percentil	estándar		
0.1	-330.774	46.3819	-449.575	-257.041
1	-211.175	32.2202	-293.344	-159.731
2	-168.494	27.2562	-237.768	-124.828
3	-141.415	24.1537	-202.600	-102.591
4	-121.045	21.8551	-176.214	-85.7923
5	-104.475	20.0158	-154.812	-72.0676
6	-90.3711	18.4785	-136.652	-60.3297
7	-78.0050	17.1578	-120.783	-49.9836
8	-66.9326	16.0021	-106.628	-40.6660
9	-56.8627	14.9784	-93.8090	-32.1373
10	-47.5934	14.0640	-82.0658	-24.2303
20	21.2855	8.92922	1.78647	37.9349
30	70.9519	9.01654	54.2448	90.7655
40	113.390	11.8404	93.2466	141.729
50	153.056	15.5950	127.404	191.660

60	192.722	19.8128	160.628	242.525
70	235.160	24.5691	195.688	297.430
80	284.827	30.2993	236.396	362.011
90	353.706	38.3968	292.553	451.872
91	362.975	39.4948	300.094	463.981
92	373.045	40.6894	308.283	477.139
93	384.117	42.0046	317.284	491.611
94	396.483	43.4756	327.332	507.778
95	410.587	45.1556	338.787	526.221
96	427.157	47.1323	352.240	547.895
97	447.527	49.5662	368.772	574.548
98	474.607	52.8071	390.736	609.989
99	517.287	57.9255	425.335	665.869

Tabla XVII Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-2-1, línea celular MDA-MB-231.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	162
	Sin evento	538
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-0.939671	0.0634712	-14.80	0.000
Conc ug/mL	0.0048753	0.0007698	6.33	0.000
Natural				
Respuesta	0			
Log-verosimilitud =	-358.772			

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	56.0025	5	0.000
Desviación	72.8996	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error	IC normal de 95.0%		
	Estimación	estándar	Inferior	Superior
Media	192.740	25.8940	141.989	243.491
Desv.Est.	205.114	32.3864	150.521	279.509

Tabla de percentiles

Porcentaje	IC fiducial de			
	Error	95.0%		
	Percentil	estándar	Inferior	Superior
1	-284.427	53.0446	-433.978	-204.497
2	-228.513	44.4452	-353.456	-161.347
3	-193.038	39.0422	-302.473	-133.864
4	-166.351	35.0188	-264.201	-113.109
5	-144.643	31.7825	-233.143	-96.1533
6	-126.166	29.0625	-206.776	-81.6527
7	-109.966	26.7118	-183.727	-68.8699
8	-95.4604	24.6422	-163.159	-57.3539
9	-82.2681	22.7966	-144.527	-46.8066
10	-70.1246	21.1368	-127.456	-37.0187
20	20.1114	11.6281	-6.54705	41.6592
30	85.1779	12.7471	62.8849	116.143
40	140.775	18.7894	110.945	191.054
50	192.740	25.8940	152.828	264.109
60	244.705	33.5052	193.688	338.187
70	300.302	41.8973	236.908	417.938

80	365.368	51.8814	287.167	511.595
90	455.605	65.8752	356.576	641.772
91	467.748	67.7665	365.901	659.306
92	480.940	69.8228	376.028	678.358
93	495.446	72.0855	387.160	699.310
94	511.646	74.6146	399.588	722.714
95	530.123	77.5014	413.758	749.411
96	551.831	80.8957	430.401	780.782
97	578.518	85.0723	450.854	819.357
98	613.993	90.6297	478.032	870.644
99	669.907	99.3989	520.848	951.500

Tabla XVIII Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular HCT-116.

Distribución: Normal
Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	163
	Sin evento	537
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	estándar	Z	P
Constante	-0.939636	0.0634462	-14.81	0.000
Conc ug/mL	0.0049811	0.0007695	6.47	0.000
Natural				
Respuesta	0			
Log-verosimilitud = -359.041				

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	50.9033	5	0.000
Desviación	60.2494	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error	IC normal de 95.0%	Inferior	Superior
	Estimación	estándar		
Media	188.640	24.7630	140.106	237.175
Desv.Est.	200.759	31.0123	148.315	271.747

Tabla de percentiles

Porcentaje	Error	IC fiducial de 95.0%	Inferior	Superior
	Percentil	estándar		
0.1	-431.751	74.3089	-639.973	-319.599
1	-278.394	50.9836	-420.739	-201.167
2	-223.668	42.7569	-342.695	-158.712
3	-188.946	37.5897	-293.282	-131.672
4	-162.825	33.7430	-256.191	-111.251
5	-141.579	30.6497	-226.091	-94.5691
6	-123.494	28.0507	-200.538	-80.3026
7	-107.638	25.8054	-178.201	-67.7267
8	-93.4402	23.8291	-158.269	-56.3980
9	-80.5281	22.0673	-140.214	-46.0231
10	-68.6425	20.4834	-123.670	-36.3965
20	19.6774	11.3993	-6.37340	40.7728
30	83.3623	12.3330	61.6432	112.980
40	137.779	18.0110	108.996	185.443
50	188.640	24.7630	150.245	256.183

60	239.502	32.0231	190.468	327.949
70	293.918	40.0409	233.004	405.229
80	357.603	49.5878	282.460	495.996
90	445.923	62.9761	350.755	622.167
91	457.809	64.7860	359.930	639.162
92	470.721	66.7538	369.894	657.629
93	484.918	68.9192	380.847	677.937
94	500.775	71.3397	393.075	700.622
95	518.859	74.1026	407.017	726.499
96	540.106	77.3514	423.391	756.907
97	566.226	81.3491	443.514	794.297
98	600.948	86.6687	470.253	844.010
99	655.675	95.0632	512.378	922.384

Tabla XIX Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular CRL-5872.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	160
	Sin evento	540
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-0.936372	0.0635018	-14.75	0.000
Conc ug/mL	0.0045886	0.0007714	5.95	0.000
Natural				
Respuesta	0			
Log-verosimilitud	= -358.780			

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	62.7201	5	0.000
Desviación	76.7130	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error	IC normal de 95.0%		
	Estimación	estándar	Inferior	Superior
Media	204.066	29.2961	146.647	261.486
Desv.Est.	217.933	36.6354	156.759	302.980

Tabla de percentiles

Porcentaje	IC fiducial de			
	Error	95.0%		
	Percentil	estándar	Inferior	Superior
1	-302.922	59.5125	-475.768	-214.623
2	-243.514	49.7583	-387.626	-169.480
3	-205.821	43.6241	-331.810	-140.730
4	-177.466	39.0522	-289.907	-119.018
5	-154.402	35.3713	-255.897	-101.282
6	-134.770	32.2744	-227.021	-86.1132
7	-117.557	29.5952	-201.776	-72.7408
8	-102.145	27.2336	-179.246	-60.6925
9	-88.1286	25.1251	-158.836	-49.6558
10	-75.2262	23.2263	-140.133	-39.4109
20	20.6492	12.3272	-7.97176	43.5287
30	89.7822	13.9609	65.8227	124.837
40	148.854	21.1096	115.959	207.231
50	204.066	29.2961	159.677	287.385
60	318.351	47.5372	247.558	455.907

80	387.484	58.8721	300.122	558.446
90	483.359	74.7375	372.732	700.938
91	496.262	76.8805	382.487	720.129
92	510.278	79.2103	393.083	740.981
93	525.690	81.7737	404.729	763.913
94	542.903	84.6387	417.732	789.527
95	562.535	87.9084	432.558	818.745
96	585.599	91.7527	449.971	853.079
97	613.954	96.4824	471.371	895.294
98	651.647	102.775	499.808	951.422
99	711.055	112.703	544.610	1039.91

Tabla XX Análisis Probit para estimar la CE₅₀, subfracción 25A6-3, línea celular HeLa.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	150
	Sin evento	550
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-1.00533	0.0649740	-15.47	0.000
Conc ug/mL	0.0049711	0.0007754	6.41	0.000
Natural				
Respuesta	0			
Log-verosimilitud = -343.354				

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	55.8208	5	0.000
Desviación	69.5766	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error Estimación	IC normal de 95.0% estándar	Inferior	Superior
Media	202.234	26.7980	149.711	254.757
Desv.Est.	201.161	31.3790	148.172	273.101

Tabla de percentiles

Porcentaje	IC fiducial de Error 95.0% Percentil	estándar	Inferior	Superior
1	-265.737	49.7757	-405.203	-190.456
2	-210.900	41.4752	-326.717	-147.961
3	-176.108	36.2699	-277.041	-120.878
4	-149.936	32.4022	-239.767	-100.409
5	-128.646	29.2992	-209.533	-83.6739
6	-110.526	26.6993	-183.882	-69.3468
7	-94.6376	24.4612	-161.475	-56.7015
8	-80.4116	22.5000	-141.498	-45.2929
9	-67.4736	20.7615	-123.421	-34.8257
10	-55.5642	19.2096	-106.880	-25.0919
20	32.9327	11.1485	8.65004	54.6221
30	96.7451	13.5765	73.5857	130.471
40	151.271	19.8147	119.954	204.398
50	202.234	26.7980	160.912	275.877
60	253.198	34.2059	201.015	348.211
70	307.723	42.3496	243.486	426.035

80	371.536	52.0276	292.900	517.405
90	460.032	65.5863	361.159	644.390
91	471.942	67.4186	370.330	661.494
92	484.880	69.4106	380.290	680.079
93	499.106	71.6027	391.238	700.516
94	514.994	74.0528	403.462	723.346
95	533.115	76.8493	417.398	749.387
96	554.404	80.1376	433.767	779.987
97	580.577	84.1836	453.883	817.614
98	615.369	89.5673	480.614	867.642
99	670.205	98.0623	522.726	946.511

Tabla XXI Análisis Probit para estimar la CE_{50} , subfracción 25A6-3, línea celular MDA-MB-231.

Distribución: Normal

Información de respuesta

Variable	Valor	Conteo
% Mortalidad	Evento	159
	Sin evento	541
	ExpTotal	700

Método de cálculo: Máxima verosimilitud

Tabla de regresión

Variable	Coef	Error estándar	Z	P
Constante	-1.00240	0.0647704	-15.48	0.000
Conc ug/mL	0.0058654	0.0007737	7.58	0.000

Natural

Respuesta 0

Log-verosimilitud = -346.190

Pruebas de bondad del ajuste

Método	Chi-cuadrada	GL	P
Pearson	55.0205	5	0.000
Desviación	67.3412	5	0.000

Distribución de tolerancia

Cálculos del parámetro

Parámetro	Error	IC normal de 95.0%	Estimación	estándar	Inferior	Superior
Media	170.902	18.9635	133.734	208.070		
Desv.Est.	170.493	22.4887	131.652	220.792		

Tabla de percentiles

Porcentaje	IC fiducial de	Error	95.0%	Percentil	estándar	Inferior	Superior
0.1	-355.960	53.7579	-497.511	-271.915			
1	-225.723	36.9555	-322.604	-167.692			
2	-179.247	31.0592	-260.384	-130.303			
3	-149.759	27.3716	-221.013	-106.475			
4	-127.577	24.6385	-191.476	-88.4685			
5	-109.533	22.4513	-167.522	-73.7506			
6	-94.1754	20.6232	-147.201	-61.1562			
7	-80.7095	19.0533	-129.449	-50.0474			
8	-68.6523	17.6808	-113.620	-40.0343			
9	-57.6868	16.4667	-99.2938	-30.8591			
10	-47.5931	15.3846	-86.1782	-22.3413			
20	27.4118	9.57241	6.65229	45.5822			
30	81.4956	10.4167	62.7830	105.366			
40	127.708	14.2678	104.056	163.139			

50	170.902	18.9635	140.374	219.395
60	214.096	24.0952	175.815	276.530
70	260.308	29.8140	213.278	338.112
80	314.392	36.6614	256.815	410.489
90	389.397	46.3010	316.912	511.147
91	399.491	47.6062	324.983	524.709
92	410.456	49.0257	333.749	539.445
93	422.513	50.5883	343.384	555.651
94	435.979	52.3355	354.141	573.755
95	451.337	54.3304	366.404	594.407
96	469.381	56.6770	380.807	618.677
97	491.563	59.5655	398.506	648.520
98	521.051	63.4105	422.024	688.201
99	567.527	69.4808	459.071	750.764